



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

**ENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE PESCADO EN SISTEMAS
PROTEICOS Y NANOCOMPUESTOS EN BASE A PROTEÍNAS DE
SOJA Y NANOPARTÍCULAS DE CELULOSA**

Tesista: Lic. Luciana Di Giorgio

Directora: Dra. Adriana Noemí Mauri

Co-director: Dr. Pablo Rodrigo Salgado

Año: 2019

El presente trabajo de tesis, para optar al grado de Doctora 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, CONICET-UNLP-CIC, La Plata, Argentina).



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



Agradecimientos:

- A la Dra. Adriana Mauri, por su ayuda, y dedicación en la realización de este trabajo y por haber confiado en mí para llevarlo a cabo.
- Al Dr. Pablo Salgado, por su infinita paciencia con todas mis dudas, por su gran ayuda en el laboratorio y en la escritura del trabajo y por su buena onda siempre.
- A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de La Plata por haberme brindado una formación excelente de forma gratuita.
- A la Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haber garantizado la financiación de este trabajo.
- Al Dr. Alain Dufresne y todo su grupo de investigación por recibirme y ayudarme con los trabajos realizados en el laboratorio durante mi estadía en Grenoble.
- A los técnicos, doctores, investigadores y becarios que me supieron ayudar en las medidas realizadas en el CIDCA, INIFTA, CINDECA, Universidad de Quilmes, Facultad de Ciencias Veterinarias y Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.
- A todo el grupo de investigación del Laboratorio de Aceites, por facilitarnos el uso de equipos y reactivos durante el desarrollo de este trabajo.
- A la Dra. Agustina Nardo por haber diseñado las estructuras moléculas tridimensionales de las proteínas de soja publicadas en este trabajo de tesis.
- A mis amigos del Box y del Laboratorio de Proteínas, por compartir el día a día y siempre sacarme una sonrisa.
- A todos los compañeros del CIDCA en general, por todos los momentos compartidos.
- A mis amigas de siempre, por estar en todo momento aunque sea a la distancia.
- A mi familia, por el apoyo incondicional.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABREVIATURAS

I. INTRODUCCION GENERAL

I.1.	Alimentos funcionales	1
I.2.	Ácidos grasos mono- y poli-insaturados	5
I.3.	Aceite de pescado como fuente de PUFA's	8
I.4.	Encapsulación de aceite de pescado	13
I.4.1.	Sistemas emulsionados	15
I.4.2.	Sistemas emulsionados deshidratados	20
I.5.	Envases bioactivos	23
I.6.	Biodigestibilidad	27
I.7.	Agentes encapsulantes a base de biopolímeros	28

II. OBJETIVOS

II.1.	Objetivo general	31
II.2.	Objetivos específicos	31

III. ENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE PESCADO EN SISTEMAS PROTEICOS A BASE DE PROTEÍNAS DE SOJA.

III.1.	Introducción	33
III.2.	Objetivo	36
III.3.	Materiales y métodos	37
III.3.1.	Materiales	37
III.3.2.	Preparación de las emulsiones	37
III.3.3.	Caracterización de las emulsiones	37
III.3.3.1.	Morfología	37
III.3.3.2.	Distribución de tamaño de partícula y diámetros medios	38
III.3.3.3.	Comportamiento reológico	39
III.3.3.4.	Estabilidad	39
III.3.4.	Preparación de las microcápsulas de aceite de pescado	41
III.3.4.1.	Secado <i>spray</i>	41
III.3.4.2.	Liofilización	41
III.3.5.	Caracterización de las microcápsulas	41
III.3.5.1.	Contenido de humedad y porcentaje de sólidos recuperados	41
III.3.5.2.	Contenido de proteínas	42
III.3.5.3.	Contenido total de aceite, contenido de aceite libre y eficiencia de encapsulación	42
III.3.5.4.	Color	42
III.3.5.5.	Morfología	43
III.3.5.6.	Estabilidad oxidativa del aceite de pescado	44
III.3.6.	Análisis estadístico	45
III.4.	Resultados y discusión	45
III.4.1.	Emulsiones o/w de aceite de pescado estabilizadas por proteínas de soja	45
III.4.2.	Microcápsulas de aceite de pescado utilizando proteínas de soja como	51

IV. ENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE PESCADO EN SISTEMAS NANOCOMPUESTOS EN BASE A PROTEÍNAS DE SOJA Y NANOPARTÍCULAS DE CELULOSA.

IV.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOFIBRAS DE CELULOSA

VI.1.1	Introducción	68
VI.1.2	Objetivo	74
VI.1.3	Materiales y métodos	75
VI.1.3.1	Materiales	75
VI.1.3.2	Tratamiento alcalino y blanqueo de las fibras de formio	75
IV.1.3.3	Obtención de nanocristales de celulosa (NCC) por hidrólisis ácida	75
IV.1.3.4	Obtención de celulosa microfibrilada (MFC) por desintegración mecánica	76
IV.1.3.4.1	Tratamiento de refinación en molino PFI	77
IV.1.3.4.2	Tratamiento enzimático con endoglucanasas	78
IV.1.3.4.3	Tratamiento oxidante con 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (TEMPO)	79
IV.1.3.4.4	Fibrilación mecánica en molinillo de fricción ultra-fina	79
IV.1.3.5	Caracterización de las materias primas y de las nanofibras obtenidas	80
IV.1.3.5.1	Contenido de sólidos	80
IV.1.3.5.2	Rendimiento de los procesos	81
IV.1.3.5.3	Apariencia	81
IV.1.3.5.4	Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	81
IV.1.3.5.5	Potencial Z	81
IV.1.3.5.6	Difracción de Rayos X	81
IV.1.3.5.7	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)	82
IV.1.3.6	Análisis estadístico	82
IV.1.4	Resultados y discusión	83
IV.1.4.1.	Fuentes de celulosa utilizadas	83
IV.1.4.2.	Nanocristales de celulosa (NCC) obtenidos por hidrólisis ácida	86
IV.1.4.3.	Celulosa microfibrilada obtenida por desintegración mecánica (MFC)	94
IV.1.4.4.	Efecto del procesamiento sobre las propiedades de las MFC obtenidas por desintegración mecánica	99
VI.1.5.	Conclusiones	104

IV.2. SISTEMAS EMULSIONADOS O/W ESTABILIZADOS POR PROTEÍNAS DE SOJA Y NANOFIBRAS DE CELULOSA

IV.2.1.	Introducción	106
VI.2.2.	Objetivo	109
VI.2.3.	Materiales y métodos	109
VI.2.3.1.	Materiales	109
VI.2.3.2.	Obtención de emulsiones O/W nanocompuestas	109
VI.2.3.2.1.	Emulsiones de aceite de pescado en agua con proteínas de soja y nanocristales de celulosa	110
VI.2.3.2.2.	Emulsiones de aceite de pescado en agua con proteínas de soja y celulosa microfibrilada	111
VI.2.3.3.	Caracterización de las emulsiones	112

	VI.2.3.3.1.	Morfología	112
	VI.2.3.3.2.	Tamaño de partícula	112
	VI.2.3.3.3.	Estabilidad	113
	VI.2.3.3.4.	Potencial Z	113
	VI.2.3.3.5.	Comportamiento reológico	113
	VI.2.3.4.	Análisis estadístico	114
VI.2.4.		Resultados y discusión	115
	VI.2.4.1.	Emulsiones de aceite de pescado en agua con proteínas de soja y/o nanocristales de celulosa	115
	VI.2.4.2.	Efecto del tipo de nanofibras de celulosa sobre las propiedades de las emulsiones de aceite de pescado en agua	134
VI.2.5.		Conclusiones	143
IV.3.	MICROCÁPSULAS DE ACEITE DE PESCADO FORMADAS POR UNA MATRIZ NANOCOMPUESTA EN BASE A PROTEÍNAS DE SOJA Y NANOFIBRAS DE CELULOSA		
	IV.3.1.	Introducción	145
	IV.3.2.	Objetivo	147
	IV.3.3.	Materiales y métodos	147
	IV.3.3.1	Materiales	147
	IV.3.3.2.	Obtención de los encapsulados	147
	IV.3.3.3.	Caracterización de los encapsulados	148
	IV.3.3.3.1.	Contenido de humedad y porcentaje de sólidos recuperados	148
	IV.3.3.3.2.	Color	148
	IV.3.3.3.3.	Determinación del contenido de proteínas	149
	IV.3.3.3.4.	Determinación del aceite total, del aceite libre (sin encapsular) y de la eficiencia de encapsulación	149
	IV.3.3.3.5.	Determinación de la actividad acuosa	149
	IV.3.3.3.6.	Morfología de los encapsulados	149
	IV.3.3.3.7.	Estabilidad oxidativa del aceite encapsulado	150
	IV.3.3.4.	Análisis estadístico	150
	IV.3.4.	Resultados y discusión	150
	IV.3.4.1	Microcápsulas de aceite de pescado preparadas con proteínas de soja y diferentes concentraciones de nanocristales de celulosa como material de pared	150
	IV.3.4.2	Microcápsulas de aceite de pescado preparadas con proteínas de soja y distintas nanofibras de celulosa como material de pared	161
IV.3.5.		Conclusiones	170
IV.4.	PELICULAS NANOCOMPUESTAS BIOACTIVAS EN BASE A ACEITE DE PESCADO, PROTEÍNAS DE SOJA Y NANOFIBRAS DE CELULOSA		
	IV.4.1.	Introducción	172
	IV.4.2.	Objetivos	175
	IV.4.3.	Materiales y métodos	175
	IV.4.3.1.	Materiales	175
	IV.4.3.2.	Preparación de las películas	175
	IV.4.3.3	Caracterización de las películas	177
		Espesor	177
		Color	177
		Opacidad	177
		Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	177

	Contenido de agua	178
	Solubilidad en agua	178
	Permeabilidad al vapor de agua (WVP)	178
	Ángulo de contacto	180
	Propiedades mecánicas	180
	Solubilidad diferencial	181
	Perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa	181
IV.4.3.4	Análisis estadístico	182
IV.4.4.	Resultados y discusión	182
IV.4.4.1.	Efecto del agregado de nanofibras de celulosa sobre la funcionalidad de las películas proteicas de soja	183
IV.4.4.2.	Efecto del agregado de aceite de pescado a películas proteicas y nanocompuestas	195
IV.4.5.	Conclusiones	211
V.	CONCLUSIONES GENERALES	213
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	216

Resumen

La encapsulación se basa en recubrir o atrapar materiales sólidos, líquidos o gaseosos y se puede usar para proteger, transportar o controlar la liberación de compuestos activos. Permite controlar las interacciones de los ingredientes activos con la matriz alimentaria, su compatibilidad con otros compuestos en el sistema y su liberación, y asegurar su disponibilidad en un tiempo y una velocidad específica. Esta tecnología aplicada a aceite de pescado, rico en ácidos grasos omega-3 benéficos para la salud, intenta aumentar su estabilidad retrasando su autooxidación y enmascarar su sabor y olor característicos.

El objetivo general de esta tesis fue desarrollar distintos sistemas de encapsulación para aceite de pescado (emulsiones, microcápsulas y películas), utilizando proteínas de soja y nanofibras de celulosa como material encapsulante, con el fin de proteger y vehiculizar los ácidos grasos omega-3 del aceite en alimentos saludables.

Para este fin, se obtuvieron nanofibras de celulosa con diferentes propiedades fisicoquímicas (cristalinidad, tamaño, morfología y carga superficial) por hidrólisis ácida de celulosa microcristalina (NCC) o por fibrilación mecánica de fibras de formio (MFC) modificadas o no previamente con tratamientos químicos (MFC-Q) y enzimáticos (MFC-E).

Inicialmente se estudió la capacidad de las proteínas de soja para encapsular aceite de pescado. Tanto la formulación como los procesos de emulsificación y deshidratación afectaron las propiedades estructurales, funcionales y fisicoquímicas de los productos obtenidos, así como la estabilidad oxidativa del aceite. Todos los sistemas de encapsulación estudiados lograron enmascarar el olor característico de este aceite y algunos presentaron una buena perspectiva de su estabilidad oxidativa a lo largo del tiempo.

Se obtuvieron emulsiones de aceite de pescado en agua empleando sistemas nanocompuestos formados por proteínas de soja y nanofibras de celulosa como emulsificantes que resultaron más estables que aquellas estabilizadas sólo con APS o por *Pickering* con diferentes concentraciones de NCC. Las propiedades fisicoquímicas de las nanofibras estudiadas así como su concentración, condicionaron las propiedades de los sistemas emulsionados nanocompuestos. Las emulsiones con el agregado de 2% de MFC-Q y NCC (cargadas superficialmente) resultaron ser las más estables durante 15 días de almacenamiento a temperatura ambiente.

Todas las emulsiones estabilizadas por sistemas nanocompuestos pudieron deshidratarse por secado *spray*, produciendo microcápsulas del tipo matriz, huecas adentro, con elevadas eficiencias de encapsulación de aceite de pescado. El tipo de nanofibra de celulosa agregada también determinó la estabilidad oxidativa del aceite durante su encapsulación, observándose

que las formulaciones con 4% de NCC y 2% de MFC-Q, que habían producido las emulsiones más estables, también lograron la mayor protección del aceite durante su procesamiento.

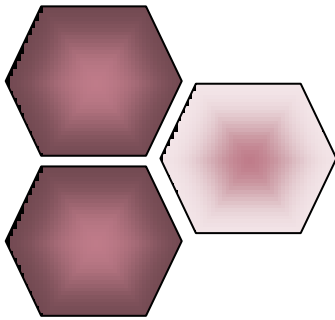
Por último, se analizó la vehiculización del aceite en películas proteicas y nanocompuestas para el desarrollo de envases bioactivos que intentan mejorar el impacto de los alimentos sobre la salud del consumidor a través de la creación de alimentos envasados más saludables. Esta vía, intenta evitar la pérdida de efectividad de los compuestos bioactivos durante su procesamiento y almacenamiento. Se obtuvieron películas proteicas y nanocompuestas bioactivas en base a proteínas de soja y nanofibras de celulosa capaces de transportar aceite de pescado. El agregado de nanofibras provocó un efecto refuerzo muy significativo en los materiales proteicos, siendo los NCC y los MFC-Q los que provocaron el mayor efecto, posiblemente debido a sus menores diámetros y a sus cargas superficiales que les permitieron dispersarse mejor en la matriz. El proceso de emulsificación utilizado para incorporar el aceite provocó una modificación estructural muy significativa en las proteínas que afectaron su capacidad formadora de películas, generando materiales menos resistentes y más hidrofílicos; pero favoreció la dispersión de las nanofibras en la matriz proteica, incrementando su efecto refuerzo así como la transparencia de los materiales.

Finalmente, el agregado de aceite de pescado mejoró la susceptibilidad al agua y las propiedades mecánicas de las películas proteicas y nanocompuestas. En estos sistemas, la presencia de nanofibras en la formulación favoreció la retención del aceite en las películas, a través de su mejor dispersión en gotas de menor tamaño. Las películas nanocompuestas formuladas con **NCC** y **MFC-Q** retuvieron una mayor concentración de los ácidos grasos omega-3, señalando su mayor protección del aceite de pescado.

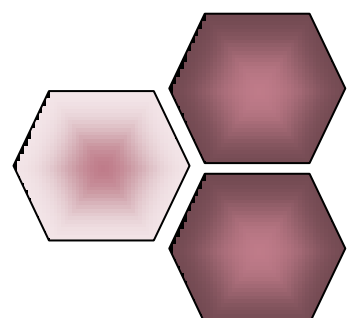
ABREVIATURAS

% p/p	Porcentaje peso en peso
% p/v	Porcentaje peso en volumen
μm	Micrómetro
2-ME	
A	Área de permeación
Abs	Absorbancia
AFM	Microscopia de fuerza atómica
AL	Aceite libre
amuestra	Parámetro de color Hunter-Lab del verde al rojo
ANOVA	Análisis de varianza
aplaca	Parámetro de color Hunter-Lab del verde al rojo del patrón
APS	Aislado proteico de soja
ASTM	American Society for Testing and Materials
AT	Aceite total
a_w	Actividad acuosa
b.s.	base seca
b_{muestra}	Parámetro de color Hunter-Lab del azul al amarillo
b_{placa}	Parámetro de color Hunter-Lab del azul al amarillo del patrón
BS	Backscattering
CLSM	Microscopia de laser confocal
D	Velocidad de deformación
$D_{3,2}$	Diámetro de Sauter
$D_{4,3}$	Diámetro de Broucker
DE	Diferencia de color Hunter-Lab
DLS	Dispersión de luz dinámica
Dm/Dt	Velocidad de permeación del vapor de agua
DRX	Difracción de rayos x
E	Modulo elástico
e	Coeficiente de extinción molar
EE	Eficiencia de encapsulación
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
G^*	Módulo complejo
G'	Módulo elástico
G''	Módulo viscoso
H	Humedad
HR	Humedad relativa
HR_c	Humedad relativa en la celda de permeación
HR_d	Humedad relativa en el desecador
IC	Índice de coalescencia
ICr	Índice de cristalinidad
IF	Índice de floculación
IP	Índice de peróxidos
K	Índice de consistencia
I	Camino óptico
L_{muestra}	Parámetro de luminosidad Hunter-Lab
L_{placa}	Parámetro de luminosidad Hunter-Lab del patrón
M	Peso molecular

mEq	miliequivalentes
mf	Masa final
MFC	Celulosa microfibrilada
MFC-E	Celulosa microfibrilada + tratamiento enzimático
MFC-Q	Celulosa microfibrilada + tratamiento químico
mi	Masa inicial
mV	milivoltios
n	Índice de flujo
NCC	Nanocristales de celulosa
nm	nanómetro
O/W	Aceite en agua
P	Proteínas
Pa	Pascal
pH	Potencial de hidrogeno
pI	Punto isoeléctrico
P _{vH2O}	Presión de vapor de agua a 20 °C
rpm	revoluciones por minuto
RSR	Rendimiento solido recuperado
s	segundo
SDS	dodecilsulfato de sodio
SEM	Microscopia electrónica de barrido
SLS	Dispersión de luz estática
TBA	Acido tiobarbiturico
Tg	Tangente
TGA	Análisis termogravimetrico
UA	unidad arbitraria (empleada en la medida de opacidad)
US	Ultrasonido
UT	Ultraturrax
Va	Volumen de alícuota
Ve	Volumen de extracto
WVP	Permeabilidad al vapor de agua
α	nivel de significación
δ	Angulo de desfasaje
$\epsilon\%$	Porcentaje de elongación respecto de la separación de mordazas inicial
η	Viscosidad
η^*	Viscosidad compleja
θ	Angulo de difracción
λ	Longitud de onda
σ	Tensión a la ruptura
τ	Esfuerzo de corte



I. INTRODUCCIÓN



I. INTRODUCCION GENERAL

I.1. Alimentos funcionales

Cada vez es más evidente que existe una estrecha relación entre los alimentos que ingerimos y nuestra salud. En los últimos años se ha presentado un marcado desarrollo en el conocimiento científico acerca del papel beneficioso de varios ingredientes alimentarios (nutrientes) para la prevención y el tratamiento de enfermedades específicas. Por lo tanto, el concepto de nutrición se ha expandido, debido a que la función de un alimento no es solo proveer nutrientes al organismo, suministrar energía o promover el crecimiento, sino también que se espera que ayude a prevenir enfermedades y mejorar la salud física y mental (Ye y col., 2018).

De hecho, los consumidores entienden y pretenden cada vez con mayor exigencia que los alimentos contribuyan directamente a su salud, y demandan por nuevos productos y cambios en la producción de los alimentos que satisfagan un estilo de vida más saludable (Downes y Myers, 2010; Küster-Boluda y Vidal-Capilla, 2017). Esto ha impulsado a las industrias alimentarias a innovar en el desarrollo de nuevos productos, de procesos o de servicios para satisfacer las expectativas de los consumidores y adicionalmente utilizar ese desarrollo como una estrategia importante para diferenciarse de la competencia (Menrad, 2004). Estas innovaciones a menudo están destinadas a desarrollar importantes productos de reemplazo siguiendo instrucciones nutricionales, u obedeciendo a las regulaciones sobre aditivos alimentarios, siguiendo los nuevos enfoques científicos y técnicos en el procesamiento de alimentos y en la introducción de nuevos alimentos (Bigliardi y Galati, 2013).

Entre todas las innovaciones introducidas en esta industria, los investigadores reconocen a los alimentos funcionales como una de las áreas más interesantes de investigación e innovación (Annunziata y Vecchio, 2011; Jones y Jew, 2007; Siro y col. 2008).

En general, los alimentos funcionales están estrechamente regulados pero no están reconocidos por la ley en la mayoría de los países, por lo que no existe una definición legal (Ye y col., 2018). Existe una definición adoptada por el Documento de Consenso del proyecto FUFOS (The European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe) la cual implica que, “un alimento puede considerarse *funcional* si se demuestra satisfactoriamente que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutricionales intrínsecos, de modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y el bienestar y/o reducir el riesgo de enfermedad” (<https://ec.europa.eu/easme/en/concerted-actions>).

Con respecto a la supervisión legal, los alimentos funcionales están regulados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) en los Estados Unidos, pero no están específicamente definidos por la ley. Las normas alimentarias de Australia/Nueva Zelanda los definen como nuevos alimentos y alimentos para fines médicos especiales. Japón regula y supervisa los alimentos funcionales, llamados "Alimentos con declaraciones de propiedades saludables", en virtud de un proceso de aprobación regulatorio específico.

Argentina, a la fecha no cuenta con una definición consensuada sobre los alimentos funcionales. Sin embargo, el Código Alimentario Argentino (CAA) en los artículos 1389 y 1390 definen a los alimentos probióticos y prebióticos respectivamente (http://www.anmat.gov.ar/webanmat/formularios/alimentos/Instructivo_autorizacion_probio_ticos_y_prebioticos.doc).

Por otra parte, los japoneses han resaltado tres condiciones que definen un alimento funcional: i) es un alimento (no una cápsula, tableta o polvo) derivado de ingredientes naturales; ii) puede y debe ser consumido como parte de la dieta diaria; y tiene una función particular cuando se ingiere, y iii) sirve para regular un proceso del cuerpo en particular, tales como: la mejora de los mecanismos de defensa biológica, la prevención de una enfermedad específica, la recuperación de una enfermedad específica, el control de las condiciones físicas y mentales, el retraso del proceso de envejecimiento, entre otros.

Además de los alimentos funcionales, debe haber un reconocimiento de "dietas funcionales", lo que significa que la composición general y la elección de los alimentos en la dieta tienen un efecto funcional en la salud. Por ejemplo, el auge hacia una dieta más rica en productos vegetales y frutales y más baja en productos animales tendría un efecto funcional. Esta puede ser la forma más práctica para el consumo deliberado y en aumento de los ingredientes funcionales que se encuentran en los alimentos y consecuentemente adquirir una mejora sustancial de la salud (Goldberg, 2012).

Se han propuesto en la literatura varias clasificaciones de los alimentos funcionales. Desde el punto de vista del producto, Kotilainen y col. (2006), Millone y col., 2011 y Spence (2006), han propuesto la siguiente clasificación:

- alimentos fortificados con nutrientes adicionales (etiquetados como productos fortificados), como jugos de frutas enriquecidos con vitamina C, vitamina E, ácido fólico, zinc y calcio, donde el ingrediente se encuentra en cantidades superiores a la del contenido natural medio del alimento;

- alimentos con nuevos nutrientes o componentes adicionales que normalmente no se encuentran en un alimento en particular (etiquetados como productos enriquecidos), como probióticos o prebióticos, con el objetivo de resolver deficiencias de la alimentación que se traducen en fenómenos de carencia colectiva;

- alimentos de los que se ha eliminado, reducido o reemplazado un componente nocivo por otro con efectos beneficiosos (etiquetados como productos alterados), por ejemplo fibras como liberadores de grasa en carne o helados;

- alimentos en el que uno de los componentes se ha mejorado naturalmente (productos etiquetados como productos mejorados), por ejemplo, huevos con un mayor contenido de omega-3.

Considerando el objetivo de los alimentos funcionales, estos se pueden clasificar como (Makinen-Aakula, 2006):

- aquellos que “aportan bienestar o mejoran el estilo de vida”, como los prebióticos y probióticos;

- aquellos que “reducen un problema de riesgo para la salud existente”, como colesterol alto o presión arterial alta;

- aquellos que “facilitan la vida”, como los productos sin lactosa o sin gluten.

Por otro lado, según el Ministerio de Salud y Bienestar de Japón, se ha considerado que existen doce categorías de ingredientes que promueven la salud humana: la fibra dietaria; oligosacáridos; alcoholes de azúcar; aminoácidos, péptidos y proteínas; glucósidos; alcoholes; isoprenos y vitaminas; colinas, bacterias lácticas; minerales; ácidos grasos insaturados, y otros como los fitoquímicos y antioxidantes (Goldberg, 2012).

La suplementación de estos ingredientes activos en alimentos y productos lácteos es un método comúnmente utilizado en la industria alimentaria para mejorar el valor nutricional. Sin embargo en algunos de los casos, los ingredientes activos y sus verdaderos efectos sobre las funciones fisiológicas en los seres humanos no se han descifrado completamente. Se han realizado considerables ensayos epidemiológicos, in vivo, in vitro y clínicos, pero los resultados obtenidos son controvertidos y, a menudo, contradictorios. Además, varios ingredientes activos, como por ejemplo, probióticos, vitamina B, ácido linoleico conjugado y proteínas lácteas muestran inestabilidad cuando se los expone al calor, al ácido, al oxígeno o la luz natural (Ye y col., 2018). Estos problemas conducen a desafíos tecnológicos y oportunidades de investigación que incluyen la identificación, separación, recuperación máxima y conservación de los ingredientes activos.

Algunas de las tecnologías más prometedoras que se han propuesto para prevenir el deterioro de los compuestos fisiológicamente activos son por ejemplo:

- la microencapsulación, que consiste en la envoltura de pequeñas partículas sólidas, gotas de líquido o gases en un revestimiento, basado en los efectos de incrustación de una matriz polimérica (Betoret y col., 2011);
- el desarrollo de películas y recubrimientos comestibles que describen cualquier tipo de material utilizado para envasar un alimento y prolongar de esa manera la vida útil del producto (Pavlath y Orts, 2009) o para mejorar su valor nutricional. Estos materiales tienen la capacidad de transportar ingredientes activos que pueden reducir el riesgo de crecimiento de patógenos en la superficie de los alimentos y a su vez pueden proporcionar nutrientes específicos (Betoret y col., 2011); y
- la impregnación al vacío, considerada una manera útil de introducir solutos deseables en una estructura porosa, modificando su composición original (Watanabe y col., 2011).

A la par de la gran actividad que está desarrollando el sector científico en esta área, el mercado de alimentos funcionales ha experimentado un aumento global en estos últimos años. Las causas principales que estarían impulsando el crecimiento en el mercado de los alimentos funcionales incluyen: el creciente interés de los consumidores en la prevención de problemas de salud, el rápido crecimiento en la ciencia y tecnología de los alimentos, el aumento en el costo de la atención médica, el aumento constante en la esperanza de vida y el deseo de mejorar la calidad de vida en la etapa de envejecimiento (Bigliardi y Galati, 2013).

En términos de valor, la producción de estos alimentos aumentó un 26,7% de 2009 a 2013 (Leatherhead Food Research, 2014). Con una tasa de crecimiento promedio anual de alrededor del 8,5%, se espera que el mercado mundial de alimentos funcionales supere los US\$ 305,4 mil millones para 2020. Una estadística publicada por Grand View Research (<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/functional-food-market>) dio a conocer que el mercado de los alimentos funcionales tuvo un ingreso de 100.000 millones de dólares en 2014 y que podría alcanzar una ganancia de 250.000 millones de dólares para el 2024 (**Figura I.1**).

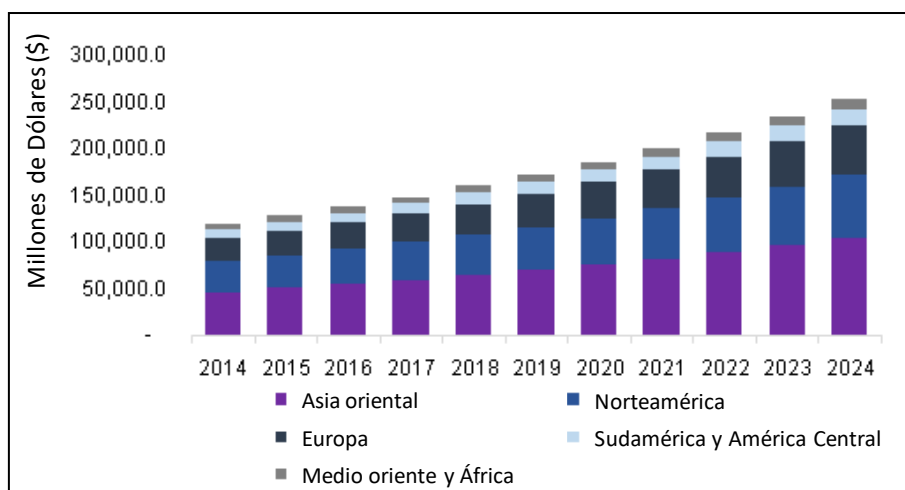


Figura I.1. Crecimiento del mercado global de los alimentos funcionales en el periodo 2014-2024. Gráfico extraído de <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/functional-food-market>.

Los mercados más importantes de alimentos funcionales a nivel mundial son los Estados Unidos y Japón, seguidos por los mercados de Asia oriental y Europa. Las empresas mundiales de alimentos representan más del 75% del mercado de alimentos funcionales e incluyen actores clave como: Coca Cola Co., DeanFoods, General Mills Inc., Kellogg Co., KraftFoods, Nestlé SA y Pepsi Co (Khan y col., 2013). Entre todos los mercados de alimentos, los alimentos funcionales se han lanzado principalmente en el mercado de lácteos, confituras, refrescos, panadería y alimentos para bebés (Alzate y col., 2010; Kim y col., 2010; Karaaslan y col., 2011; Zare y col., 2011; Alliet y col., 2007, Da Costa y col., 2009).

I.2. Ácidos grasos mono- y poli- insaturados

Los ácidos grasos son las unidades más simples de los lípidos y generalmente se clasifican en dos grupos: ácidos grasos saturados e insaturados. Estos consisten en una cadena lineal de carbonos ($-CH_2-$), que termina en grupos metilo ($-CH_3$) y ácido carboxílico ($-COOH$).

Los ácidos grasos insaturados son aquellos que contienen al menos un doble enlace $C=C$ en su cadena carbonada. Dependiendo de la cantidad de insaturaciones, se pueden clasificar en ácidos grasos mono- y poli-insaturados (**MUFA** y **PUFA** respectivamente) (**Figura I.2**). El ácido oleico omega-9 (OA; $C18:1$, n-9) es el MUFA más común en la nutrición diaria, mientras que el ácido α -linolénico (ALA; $18:3$, n-3), el ácido linoleico (LA; $18:2$, n-6), ácido araquidónico (AA; $20:4$, n-6), ácido eicosapentaenoico (EPA; $20:5$, n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA; $22:6$, n-3) son ejemplos de PUFAs presentes en la dieta (Schwingshackl y Hoffmann, 2014; Kuna y Achinna, 2013; Schwingshackl y Hoffmann, 2012; Ruxton y col., 2004; Tapiero y col. 2002; Ander y col., 2003).

La actividad biológica de estos ácidos grasos está relacionada con la cantidad, ubicación e isomería geométrica (*cis/trans*) de los dobles enlaces, así como con la longitud de la cadena del hidrocarburo. Los ácidos grasos insaturados *cis* se asocian con efectos beneficiosos para la salud, mientras que los insaturados *trans* se asocian con efectos perjudiciales o neutros. Solo el ALA y LA son esenciales para la dieta humana porque ninguno es sintetizado endógenamente por los humanos y las familias n-3/n-6 no pueden ser interconvertidas. Pero los ácidos omega-3 y 6 con cadenas más largas se pueden sintetizar a partir de cada precursor correspondiente. La dieta rica en MUFA se ha asociado con una reducción de la incidencia de enfermedades cardiovasculares, un aumento del colesterol HDL y una disminución correspondiente de los triglicéridos y con un efecto hipoglucémico y una reducción de la hemoglobina glicosilada a largo plazo en sujetos diabéticos tipo 2 (Salgado y col., 2018).

Los ácidos grasos de la familia n-3 (el ALA está en los aceites de canola y de soja; el DHA y EPA están en los aceites de pescado graso, mariscos y algas) se han asociado con una reducción en la incidencia de enfermedades cardiovasculares debido a una disminución de los triglicéridos en plasma, efectos antihipertensivos, antiarrítmicos, antitrombóticos y antiinflamatorios. Además, el EPA y el DHA son importantes para un desarrollo fetal adecuado, incluidas las funciones neuronales, de retina e inmune, y se han relacionado con resultados prometedores en la prevención, el control del peso y la función cognitiva en las personas con enfermedad de Alzheimer poco avanzado (Yashodhara y col., 2009. Swanson y col., 2012). Por otro lado, los ácidos grasos de la familia n-6 (el LA se encuentra en los aceites de maíz, soja, girasol y maní) se utilizan para reducir el riesgo de enfermedades cardíacas, reducir el colesterol total y los niveles de LDL, elevar los niveles de HDL y reducir el riesgo de cáncer. Ayudan en la formación ósea y el metabolismo; favorecen la absorción de calcio y tienen efectos antidiabetogénicos e inmunomoduladores. Hoy en día, se sugiere una proporción equilibrada de omega-6/omega-3 1/1–2/1 (Khandelwal y col., 2013).

Si hay una acumulación excesiva de omega-6, estos van a competir con los omega-3 por la $\Delta 6$ -desaturasa y por lo tanto van a hacer más lenta la síntesis de omega-3. Además, debido a la mayor cantidad de ácidos grasos omega-6 en la dieta occidental, los productos metabólicos eicosanoides del ácido araquidónico, específicamente las prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, ácidos grasos hidroxí y lipoxinas, se forman en cantidades mayores que las formadas por ácidos grasos omega-3. Estos eicosanoides del ácido araquidónico son biológicamente activos en cantidades muy pequeñas y, si se forman en grandes cantidades, contribuyen a la formación de trombos y ateromas, a trastornos alérgicos e inflamatorios, particularmente en personas susceptibles, y a la proliferación de células (Simolopoulos, 2002).

Cuando se consume EPA y/o DHA de la dieta, estos reemplazan parcialmente a los ácidos grasos omega-6 en las membranas de probablemente todas las células, pero especialmente en las membranas de plaquetas, eritrocitos, neutrófilos, monocitos y células hepáticas (Simopoulos, 2006) lo cual es beneficioso ya que le da mayor fluidez a la membrana plasmática.



Figura I.2. Clasificación y fuentes alimentarias de los ácidos grasos.

La mejor manera de aumentar los niveles plasmáticos de estos ácidos grasos es consumir los alimentos que contienen una gran cantidad de ellos. El contenido de EPA, DHA y ALA de diferentes peces, semillas, frutos secos y plantas se presenta en la **Tabla I.1** (Jafari y col., 2017).

Tabla I.1. Fuentes naturales de ácidos grasos esenciales (g/100 g). Extraída de Jafari y col., 2017

Fuente	ALA	EPA	DHA
Pescados			
Salmón	ND	0,3	0,5
Caballa atlántica	ND	0,9	1,4
Arenque atlántico	ND	0,7	0,9
Especies de pescado blanco	ND	0,3	0,9
Pez espada	ND	0,1	0,5
Pez arcoiris	ND	0,3	0,4
Aceites de semillas y plantas			

Lino	56,0	ND	ND
Perilla	56,8	ND	ND
Sacha inchi	50,4	ND	ND
Chía	52,0-63,4	ND	ND
Camelina	33,7-40,3	ND	ND
Purslane	31,4-43,7	ND	ND
Arándanos rojos	25,2-27,3	ND	ND
Nuez	10,6-16,2	ND	ND
Cáñamo	5,0-8,7	ND	ND

ND: no detectado

Si bien no hay una dosis estándar recomendada de grasas omega-3, algunas organizaciones de salud recomiendan una dosis diaria de 250 a 500 miligramos de EPA y DHA para adultos sanos (Walker y col., 2015). La Asociación Americana del Corazón recomienda que las personas que padecen una enfermedad coronaria consuman 1000 mg de EPA y DHA diariamente, mientras que las personas con elevados niveles de triglicéridos podrían necesitar de 2000 a 3000 mg diarios; por lo que el consumo de aceite de pescado sería una buena alternativa para cubrir estos niveles de ingesta de PUFA.

I.3. Aceite de pescado como fuente de PUFA

El aceite de pescado se deriva del tejido de las especies de peces grasos y contiene un alto porcentaje de ácidos grasos omega-3 de cadena larga, como el EPA y el DHA, que son nutrientes esenciales tanto para los humanos como para los animales (Valenzuela y col., 2012).

Según las estadísticas oficiales publicadas por la FAO (<http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture/es/>), la producción pesquera mundial alcanzó un máximo de aproximadamente 171 millones de toneladas en 2016, de las cuales la acuicultura representó un 47% del total y un 53% si se excluyen los usos no alimentarios (incluida la reducción para la preparación de harina y aceite de pescado).

En 2016, cerca del 88% (o más de 151 millones de toneladas) de los 171 millones de toneladas de la producción pesquera total, se utilizaron para consumo humano directo. En el mismo año, la mayor parte del 12% utilizado con fines no alimentarios (cerca de 20 millones de toneladas), se transformó en harina y aceite de pescado (74% o 15 millones de toneladas), mientras que el resto (5 millones de toneladas) se utilizó en su mayoría como materia prima

para la alimentación directa en la acuicultura y la cría de ganado y animales de peletería, en cultivos (por ejemplo, semillas, alevines o adultos pequeños para cría), como cebo, en usos farmacéuticos y con fines ornamentales.

Zion Market Research ha publicado un informe titulado “Mercado de aceite de pescado por tipo (tilapias, crustáceos, peces marinos, salmón y trucha, y otros) y por aplicación (acuicultura, nutrición animal y alimentos para mascotas, consumo humano directo, productos farmacéuticos y suplementos) - Perspectiva mundial de la industria, análisis integral y pronóstico, 2017-2024”. Según este informe, el mercado del aceite de pescado se valoró en alrededor de USD 2,955 millones en 2017 y se espera que alcance aproximadamente USD 4,65 mil millones en ingresos para 2024, con una tasa de crecimiento anual compuesto (CAGR) de alrededor del 7,0% entre 2018 y 2024 (<https://globenewswire.com/news-release/2018/10/23/1625536/0/en/Global-Fish-Oil-Market-Expected-to-Reach-USD-4-65-Billion-By-2024-Zion-Market-Research.html>).

El aceite de pescado generalmente se extrae de pequeñas especies de peces de agua fría como la anchoa, la sardina, el arenque, la caballa, el menhaden o el capelán, así como del hígado de especies de peces magros como el bacalao (Encina y col., 2016). A su vez, considerando la perspectiva de mercado de 2018 a 2024, se espera que el aceite extraído de salmón y trucha logre una mayor participación. Esto se debe a la creciente importancia del consumo de salmón por su capacidad de fortalecer los músculos y el corazón y mejorar el metabolismo.

En cuanto al uso del aceite de pescado (acuicultura, nutrición animal y alimentos para mascotas, consumo humano directo, productos farmacéuticos, suplementos y alimentos funcionales) se espera que la acuicultura gane más participación en términos de valor durante el período 2018-2022 (**Figura I.3**). Al crecer esta industria, indirectamente aumentaría la producción de aceite de pescado, debido a que es el ingrediente principal en la alimentación acuática.

Por otro lado, la creciente preocupación por las enfermedades crónicas entre los consumidores se traduce en una mayor concientización sobre la ingesta de aceite de pescado omega-3 en diversos suplementos para la salud y alimentos funcionales.

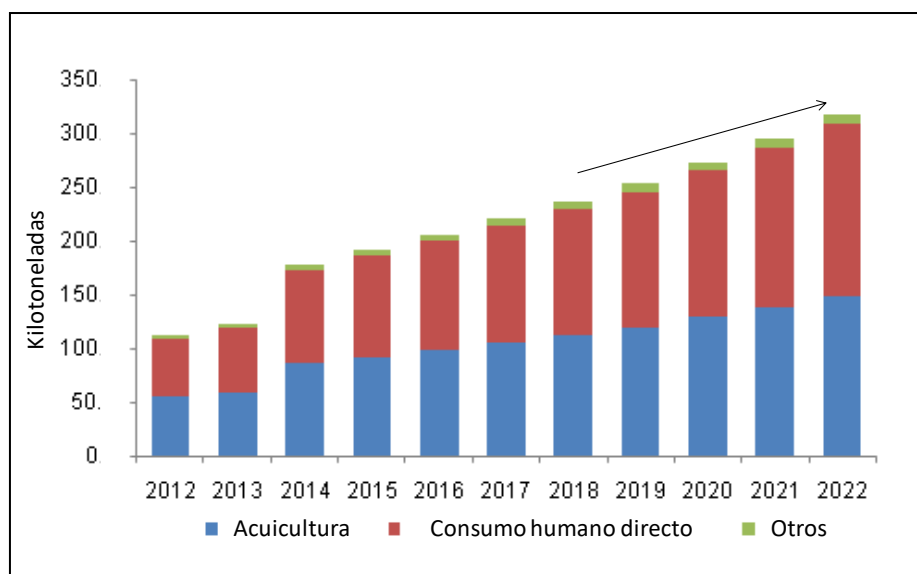


Figura I.3. Perspectiva de consumo mundial de aceite de pescado. Imagen adaptada de <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/fish-oil-market>.

Las imposiciones gubernamentales que limitan la cuota de pesca causan una brecha en la oferta, que afecta en gran medida el crecimiento de la industria del aceite de pescado.

Así en Argentina, está prohibida la pesca destinada a la fabricación de harina y aceite de pescado. La obtención de la harina y del aceite de pescado la aporta la fracción del pescado que no se destina a consumo humano (http://www.minagri.gob.ar/new/0-0/programas/dma/newsletters/nro66/nl_aceite-pescado.php).

El mercado global de aceite de pescado tiene su alcance en América del Norte, Europa, Asia Pacífico, América Latina y Oriente Medio y África, aunque los países europeos, Chile, Dinamarca y Perú tienen la mayor producción de aceite de pescado y representan más de 50 % de participación en el mercado. China es el mayor consumidor de aceite de pescado del mundo y esto se debe principalmente a la mayor concentración de la industria de la acuicultura en esta región. Se proyecta que Europa alcance la mayor participación de mercado en el mercado mundial de aceite de pescado debido a la cría de salmón y trucha a gran escala. Se prevé que el consumo total de aceite de pescado en las partes occidentales de Europa aumentará en los próximos años. (<http://www.digitaljournal.com>, <http://www.sbwire.com/press-releases/fish-oil-market-production-demand-and-supply-analysis-2019-to-2025-1156526.htm>)

En la actualidad, la obtención de harina y de aceite de pescado se fabrica globalmente con el método denominado "de prensado en húmedo". Los pescados, son sometidos a cocción con vapor a 120-140°C, y luego prensados en grandes prensas metálicas, obteniéndose así un

sólido que luego se seca en túneles de calor a 50-60°C, hasta 8% de humedad y se envasa como harina; el líquido de prensa se procesa en un "decanter" (un tipo de separador centrífugo) para separar el aceite de pescado, el cual finalmente se centrifuga a alta velocidad para eliminar restos de agua y posteriormente se acopia en grandes estanques para su comercialización (Valenzuela y col., 2012).

La composición química del aceite de pescado depende de muchos factores, entre los que se cuentan: la especie de pescado, composición del plancton y la época del año de que se trate, condiciones del pescado en el momento de la elaboración. Un pescado de mala calidad produce un aceite de mal olor con un contenido muy elevado de azufre, siendo un defecto que afecta tanto su precio como su uso. El valor comercial del aceite depende de su análisis clínico; normalmente, se establece un valor básico de venta para un aceite que contenga un cierto nivel de ácidos grasos libres de 2 a 3%, y de agua e impurezas, 2%. Si se rebasan estos niveles, el precio baja (el aceite adquiere un color oscuro o huele mal) (Dirección de Mercados Agrícolas dependiente de la Subsecretaría de Agricultura, http://www.minagri.gob.ar/new/0-0/programas/dma/newsletters/nro66/nl_aceite-pescado.php).

Los lípidos insaturados, como los presentes en el aceite de pescado, son extremadamente susceptibles al deterioro oxidativo. La oxidación de los ácidos grasos ω -3 es una reacción química compleja que a menudo requiere de múltiples tecnologías que actúen como antioxidantes para una adecuada estabilización (McClements y Decker 2000). Por ejemplo, se ha demostrado que el DHA (con seis dobles enlaces) es 50 veces más susceptible a la oxidación que el ácido oleico (con solo un doble enlace), principalmente debido a su alto número de dobles enlaces insaturados (Frankel, 2005). El EPA y el DHA pueden reaccionar rápidamente con el oxígeno singulete en un proceso de reacción de radicales libres conocido como autooxidación en el que se forman hidroperóxidos (LOOH) a través de la reacción en un centro alílico ($-\text{CH}_2$ adyacente a un doble enlace) (**Figura I.4**). Estos hidroperóxidos se degradan rápidamente a un rango de cetonas volátiles y aldehídos. Algunos de estos productos de descomposición tienen valores umbrales sensoriales muy bajos, lo que significa que incluso los niveles pequeños de oxidación pueden detectarse por el gusto y el olfato humanos. Por ejemplo, se sabe que los aldehídos trans, cis-2,6-nonadienal y trans, cis-3,6-nadadienal formado durante la autooxidación de EPA y DHA causan un olor y sabor indeseables en algunos productos alimenticios, incluso a un nivel tan bajo como 0,01 ppm (Barrow y col., 2007).

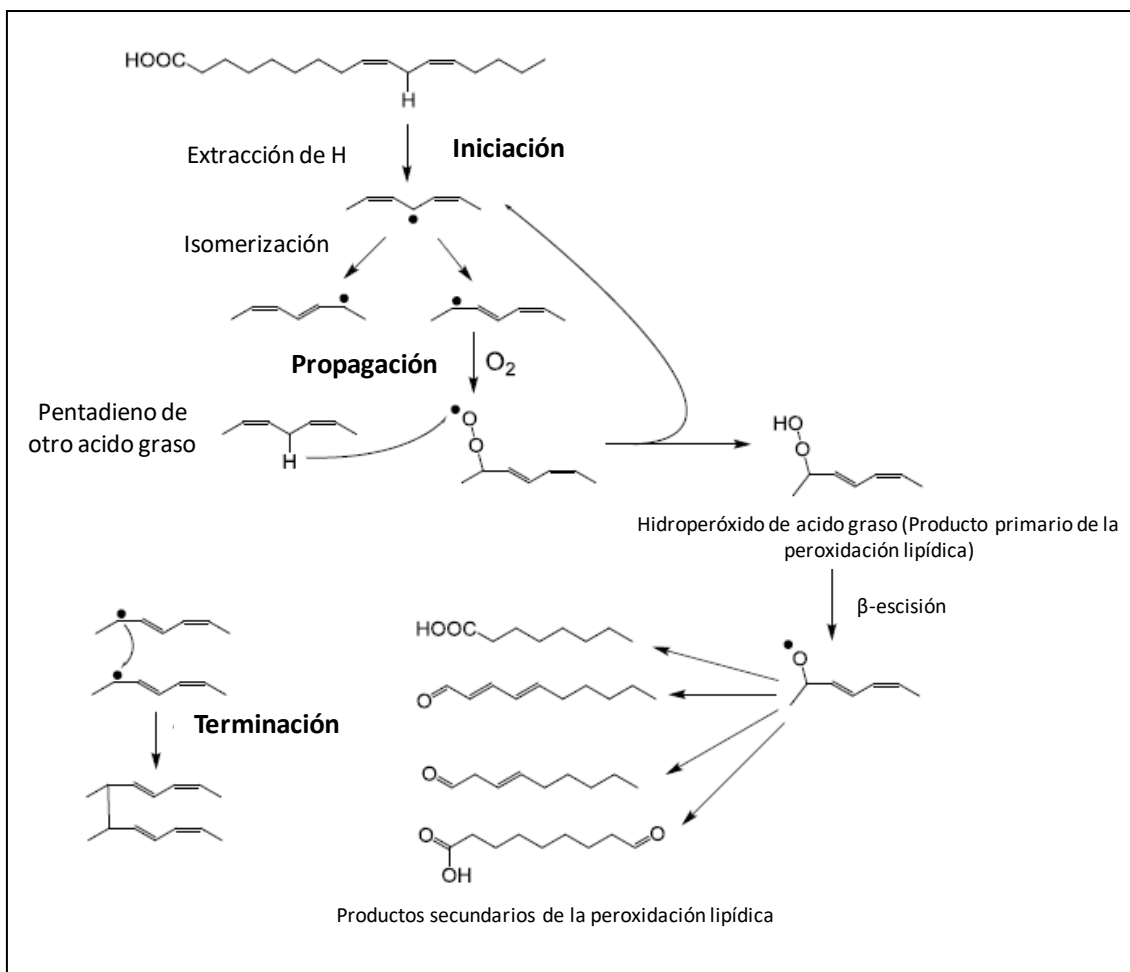


Figura I.4. Esquema general del mecanismo de acción de la oxidación lipídica. Figura extraída y adaptada de Wang y col. (2017).

Los radicales libres formados durante la oxidación también pueden causar efectos tóxicos en el cuerpo humano, como daños en las membranas y núcleo de las células (Young y col., 2001), provocando el inicio de enfermedades tales como el cáncer o la aterosclerosis (Lobo y col., 2010).

Por lo tanto, estos aceites deben estabilizarse contra la oxidación antes de que puedan agregarse con éxito a los alimentos o bebidas sin afectar negativamente el sabor, el olor o la vida útil del producto (Barrow y col., 2013). Esto se logra principalmente mediante la adición de antioxidantes, microencapsulación o una combinación de ambas técnicas.

El agregado de antioxidantes puede garantizar cierta protección durante el procesamiento y posterior almacenamiento de los aceites poliinsaturados (Serfert y col., 2009). Estas sustancias pueden inhibir o retrasar los procesos de oxidación, pero sin lograr su completa prevención, mediante varios mecanismos. Pueden disminuir la concentración de oxígeno, interceptar la acción del oxígeno singulete, prevenir la etapa de iniciación por captación de radicales libres hidroxilo, quelar metales, lograr descomponer los compuestos primarios a

compuestos no radicalarios, interrumpir la cadena iniciación o propagación por transferencia de átomos de hidrógeno a radicales lipídicos ($L\bullet$) y peroxilos ($LOO\bullet$), etc. Se debe tener en cuenta que no todos los antioxidantes actúan de la misma manera y que su efectividad depende de su mecanismo de acción y concentración utilizada. Cabe destacar que también el uso de dos o más antioxidantes puede causar un efecto sinérgico que aumente la efectividad. Drusch y col. (2008) lograron una combinación eficiente de antioxidantes para la estabilización de aceite de pescado a granel con alto contenido de δ -tocoferol y bajo contenido de α -tocoferol en combinación con lecitina o ésteres de ácido cítrico de monoglicéridos (Citrem) y palmitato de ascorbilo.

Como este aceite tiende a oxidarse fácilmente, además de utilizar antioxidantes para contrarrestar estos efectos nocivos, se debe almacenar en lugares oscuros, en un envase que no permita el pasaje de la luz, que tenga una entrada limitada de oxígeno, por ejemplo utilizando atmósferas modificadas, y se debe mantener a una temperatura lo mas baja y constante posible.

Sin embargo, si bien estos procesos pueden retrasar la oxidación, el aceite de pescado aún así se puede oxidar y generar sabores y olores desagradables (Shahidiy Zhong, 2010).

Por otro lado, se ha encontrado que la encapsulación de ácidos grasos omega-3 es un método excelente para la estabilización (Garg y col., 2006) y preservacion contra la oxidación al restringir las influencias indeseables del medio ambiente, es decir, el oxígeno, la luz, la humedad, etc. (Kolanowski y col., 2006; Keoghy col., 2001; Kagamiy col., 2003; Shen y col., 2010; Aghbashlo y col., 2013; Jiménez-Martín y col., 2015; Encina y col., 2016). Además, la encapsulación también permite el enmascaramiento del *flavor* desagradable del aceite de pescado (Arab-Tehrany y col., 2012; Kralovec y col., 2012; Rubio-Rodríguez y col., 2010).

I.4. Encapsulación de aceite de pescado

En los últimos años, las tecnologías de encapsulación han sido de gran interes en la industria alimentaria, particularmente en el desarrollo de ingredientes para diseñar alimentos funcionales y/o saludables. Sin embargo, la adición de aceite de pescado a los alimentos hidrofílicos representa un desafío importante, debido a su hidrofobicidad, baja estabilidad oxidativa y olor desagradable (McClements y col., 2007).

La encapsulación se basa en recubrir o atrapar materiales sólidos, líquidos o gaseosos y se puede usar para proteger, transportar o controlar la liberación de compuestos activos (Desai y Park, 2005). Permite controlar las interacciones de los ingredientes activos con la matriz alimentaria, su compatibilidad con otros compuestos en el sistema y su liberación, y asegurar

su disponibilidad en un tiempo y una velocidad específica (Gibbs y col., 1999; Pothakamury y Barbosa-Cánovas, 1995; Ubbink y Kruger, 2006; Weiss y col., 2006). La selección de un agente de encapsulación adecuado y el proceso de microencapsulación determinan la aplicabilidad del aceite de pescado (Anwar y Kunz, 2011).

Un sistema de transporte comestible para lípidos bioactivos debe poder cumplir con ciertas funciones: primero, debe servir como un medio para encapsular el lípido bioactivo en una forma física que pueda incorporarse convenientemente en alimentos o bebidas. Segundo, el sistema de transporte o *delivery* debe ser compatible con el alimento o bebida en particular en el que se incorporará; es decir, no debe afectar negativamente el aspecto, el sabor, la textura o la vida útil del producto. En tercer lugar, puede que tenga que proteger el lípido bioactivo de la degradación química durante la preparación, el almacenamiento, el transporte y la utilización para que permanezca en su estado activo. En cuarto lugar, es posible que tenga que ser capaz de controlar la liberación del agente funcional a una cierta velocidad, en un sitio particular y/o en respuesta a un estímulo ambiental específico (por ejemplo, pH, fuerza iónica o temperatura); además debe mejorar (o el producto final al menos no debe afectar de manera adversa) la biodisponibilidad/bioactividad del componente encapsulado. Finalmente, debe prepararse a partir de ingredientes de grado alimentario utilizando operaciones de procesamiento simples y rentables si va a ser utilizado prácticamente por la industria alimentaria. Se ha desarrollado una amplia variedad de diferentes tipos de sistemas para encapsular agentes funcionales lipofílicos, que incluyen soluciones simples, combinación de coloides, emulsiones, matrices de biopolímeros, polvos, etc. (McClements, y col., 2007).

Cada tipo de sistema de transporte tiene sus propias ventajas y desventajas específicas para la encapsulación, protección, transporte y liberación de agentes funcionales, así como en su costo, estado regulatorio, facilidad de uso, biodegradabilidad, biocompatibilidad, etc.

La selección del método de encapsulación se rige por variables importantes, como el tamaño deseado de las micropartículas, el tipo de alimento a desarrollar y, si es necesario, la liberación controlada de aceite de las micropartículas en los alimentos o en el tracto gastrointestinal.

En la mayoría de los procesos utilizados para la encapsulación de aceite, un paso previo es formar una emulsión con el aceite y con el material utilizado para encapsular este compuesto activo, donde se utilizan biopolímeros naturales o modificados de calidad alimentaria como emulsionantes y agentes de encapsulación.

En esta tesis, solo nos centraremos en los sistemas de transporte basados en emulsiones que son dispersables en soluciones acuosas, es decir, aquellos en los que el agua es la fase continua (emulsiones O/W).

I.4.1. Sistemas emulsionados

Las emulsiones de aceite en agua se utilizan como sistemas de transporte en muchas industrias, incluyendo productos farmacéuticos, productos petroquímicos, productos para el cuidado de la salud, cosméticos, productos agroquímicos y alimentos (McClements y col., 2009).

Las emulsiones de aceite en agua (O/W) convencionales consisten en gotitas de aceite dispersadas en una fase acuosa continua, rodeando las gotitas de aceite por una capa interfacial delgada que consta de moléculas con capacidad emulsificante (Dickinson, 1992; Friberg y col., 2004; McClements 2015).

Se preparan homogeneizando el aceite, el agua y el emulsionante utilizando un dispositivo mecánico conocido como homogeneizador, por ejemplo, mezclador de alto cizallamiento, homogeneizador de alta presión, molino coloidal, sonicador u homogeneizador de membrana (McClements, 2015; Walstra, 2003).

Las gotas de aceite en la mayoría de las emulsiones alimenticias tienen típicamente diámetros entre 0,1 y 100 μm , aunque en ciertas aplicaciones son posibles gotas más grandes y más pequeñas.

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente desfavorables que tienden a descomponerse con el tiempo debido a una variedad de mecanismos físicoquímicos, que incluyen la separación gravitacional, la floculación, la coalescencia y la maduración de Ostwald (Dickinson 1992; Friberg y col., 2004; McClements 2015) (**Figura I.5**). La separación gravitacional es una de las formas más comunes de inestabilidad en emulsiones alimenticias, y puede tomar la forma de cremado o sedimentación dependiendo de las densidades relativas de las fases dispersas y continuas.

El fenómeno de **cremado** es el movimiento hacia arriba de las gotitas debido al hecho de que tienen una densidad más baja que el líquido circundante, mientras que la **sedimentación** es el movimiento hacia abajo de las gotitas debido al hecho de que tienen una densidad más alta que el líquido circundante. Los aceites comestibles líquidos normalmente tienen densidades más bajas que el agua líquida, por lo que la formación de la fase crema es más frecuente en las emulsiones de aceite en agua, mientras que la sedimentación es más frecuente en las emulsiones de agua en aceite.

La velocidad a la que se produce la separación gravitacional disminuye al aumentar la concentración de gotitas debido a que el movimiento de una gotita se ve obstaculizado por la presencia de las gotitas circundantes (McClements y col., 2007).

Por otro lado, la floculación es el proceso por el cual dos o más gotitas se juntan para formar un agregado en el cual las gotitas conservan su integridad individual, mientras que la coalescencia es el proceso por el cual dos o más gotitas se fusionan para formar una sola gota más grande.

La **floculación** de gotitas puede ser ventajosa o perjudicial para la calidad de la emulsión dependiendo de la naturaleza del producto alimenticio. La floculación acelera la velocidad de cremado en emulsiones diluidas, lo cual no es deseable porque reduce su vida útil (Luyten y col., 1993). También causa un aumento pronunciado en la viscosidad de la emulsión e incluso puede conducir a la formación de un gel (Demetriades y col., 1997). En otros productos, una cantidad controlada de floculación puede ser ventajosa porque conduce a la creación de una textura deseable.

La **coalescencia** es el principal mecanismo por el cual una emulsión se desplaza hacia su estado termodinámicamente más estable porque implica una disminución en el área de contacto entre las fases de aceite y agua. La coalescencia hace que las gotas de la emulsión se conviertan en crema o sedimento más rápidamente debido al aumento de su tamaño. En las emulsiones de aceite en agua, la coalescencia eventualmente conduce a la formación de una capa de aceite en la parte superior del material, lo que se conoce como *oiling off*. En las emulsiones de agua en aceite, conduce a la acumulación de agua en la parte inferior del material (McClements y col., 2015).

La **maduración de Ostwald** es el proceso por el cual las gotitas grandes crecen a expensas de las más pequeñas debido al transporte masivo de la fase dispersa de una gota a otra a través de la fase continua intermedia (Kabalnov y Shchukin 1992). Es despreciable en la mayoría de las emulsiones de alimentos porque las solubilidades de los triglicéridos y el agua entre sí son tan bajas que la velocidad de transporte de masa es insignificante (Dickinson y Stainsby, 1982).

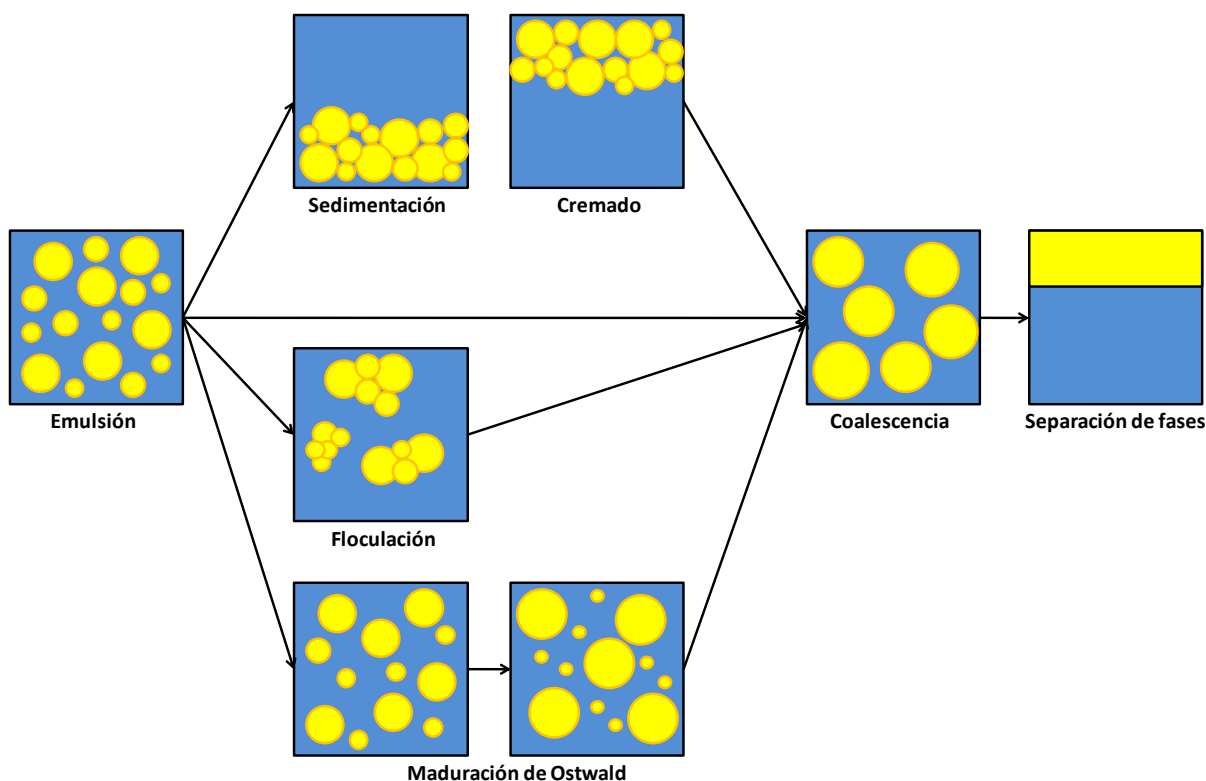


Figura I.5. Esquema de los diferentes mecanismos de desestabilización de una emulsión.

Es posible realizar emulsiones que sean cinéticamente estables durante un período de tiempo razonable incluyendo sustancias conocidas como estabilizantes, por ejemplo, emulsionantes, partículas sólidas o modificadores de textura (McClements, 2012).

Los **emulsionantes** son moléculas de superficie activa que se adsorben a la superficie de las gotitas recién formadas durante la homogeneización, formando una capa protectora que evita que las gotitas se agreguen (McClements y col., 2007). Son sustancias anfífilas que tienen la capacidad de adsorberse en la superficie de las gotitas de aceite, reducir la tensión interfacial y protegerlas de la agregación (McClements, 2015). Los emulsionantes de grado alimenticio utilizados con mayor frecuencia son las proteínas, los polisacáridos, los fosfolípidos y los surfactantes de bajo peso molecular (Hasenhuettl, 2008; Kralova y Sjöblom, 2009).

Debido a que estas moléculas tienen regiones apreciables no polares y polares dentro de la misma, son moléculas anfífilas que pueden adsorberse en la interfaz aceite-agua y estabilizar las gotas de lípidos (Pichot y col., 2013; Klang y Valenta, 2011). Cuando una molécula anfífila se adsorbe a una interfaz de aceite y agua, las partes no polares sobresalen en la fase de aceite, mientras que los grupos hidrófilos polares sobresalen en la fase acuosa circundante.

Las **partículas sólidas** también permiten la formación de emulsiones estables (emulsiones *Pickering*). Estas partículas pueden adsorberse en la interfaz aceite-agua y crear una barrera

mecánica que protege las gotas de la emulsión contra la desestabilización (Dickinson, 2012). A diferencia de los emulsionantes, no disminuyen la tensión interfacial y la adsorción de estas partículas se considera irreversible.

Finalmente, los **modificadores de la textura** espesan o gelifican la fase continua, lo que mejora la estabilidad de la emulsión al retardar o prevenir el movimiento de las gotas (McClements y col., 2007). Su capacidad para aumentar la viscosidad de una solución depende principalmente de su peso molecular, grado de ramificación, conformación y flexibilidad (Launay y col., 1986, Rha y Pradipasena 1986).

La selección del estabilizador más apropiado es uno de los factores más importantes que determinan la vida útil y las propiedades fisicoquímicas de los sistemas de administración basados en emulsiones (**Figura I.6**).

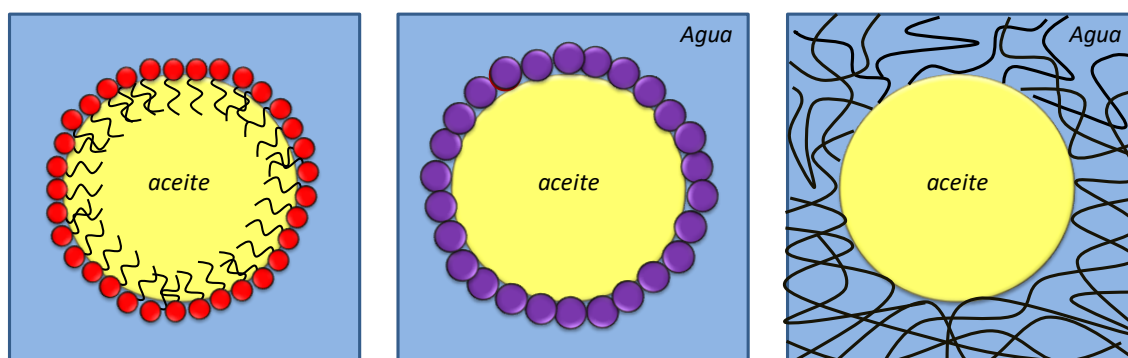


Figura I.6. Esquema de los diferentes mecanismos de estabilización de una emulsión.

Las propiedades coloidales de las emulsiones (tamaño de partícula, concentración, carga, interacciones y estado físico) determinan sus propiedades fisicoquímicas (propiedades ópticas, reología, partición molecular y estabilidad), y estas a su vez establecen los atributos de calidad de los productos alimentarios (apariencia, textura, sensación en la boca, sabor y vida útil) (McClements, 2015). Consecuentemente, estas características son importantes cuando se diseña una emulsión como sistema de transporte, donde hay que asegurarse que no tengan un efecto adverso en los atributos de calidad de los productos alimentarios.

Otra propiedad importante de una emulsión utilizada como sistema *delivery* es su habilidad para liberar el material encapsulado. En particular, es importante establecer algún mecanismo de liberación (por ejemplo, por el pH, fuerza iónica, temperatura y presencia de enzimas), así como la velocidad y la extensión de la liberación. En una emulsión, la liberación usualmente se caracteriza en términos del aumento de la concentración del componente bioactivo en la fase continua (o en algún lugar en específico como en la boca, el estómago o el tracto

gastrointestinal) en función del tiempo. La velocidad de liberación del componente encapsulado desde la emulsion depende de varios factores, incluyendo los coeficientes de reparto en el equilibrio, la ubicación original del bioactivo, los coeficientes de transferencia de masa de cada componente en las diferentes fases, la agitación mecánica y la microestructura del sistema (tamaño de gota, el espesor del film interfacial, etc.) (McClements, 2015). Por lo tanto, es posible diseñar una emulsion que sea capaz de controlar la liberación de un componente encapsulado seleccionando los ingredientes y microestructuras apropiadas (Lian y col., 2004).

Las emulsiones aceite en agua presentan ciertas ventajas al utilizarse como sistemas de transporte para componentes de alimentos funcionales y nutraceuticos. Las emulsiones son sistemas que pueden formarse completamente con ingredientes de grado alimentario (como agua, aceite, surfactantes, fosfolípidos, proteínas y polisacáridos) usando condiciones de procesamiento simples (mezclando y homogeneizando). Controlando la composición y microestructura es posible crear una emulsión con propiedades reológicas diferentes (desde líquidos viscosos a pastas plásticas y sólidos elásticos), por lo que se puede preparar de la forma que sea más conveniente para cada aplicación. Las emulsiones convencionales deben ser usualmente el primer sistema a considerar cuando se quiere usar un sistema de liberación de componentes lipídicos debido a que son relativamente fáciles de preparar y tienen un bajo costo en comparación con otros sistemas más sofisticados (McClements y col., 2009).

Sin embargo, existen ciertas limitaciones en las emulsiones convencionales que provocan que se deban utilizar sistemas más sofisticados para algunas aplicaciones particulares.

Por otro lado, además del desarrollo de emulsiones aceite en agua o agua en aceite (O/W o W/O), también es posible preparar emulsiones múltiples, como por ejemplo emulsiones aceite en agua en aceite (O/W/O) o agua en aceite en aceite (W/O/W) (Garti y Bisperink 1998; Benichou y col., 2004; van der Graaf y col., 2005). Además, es posible formar “emulsiones” de mezclas de biopolímeros que son termodinámicamente incompatibles, por ejemplo emulsiones agua en agua (W/W) o aceite en agua en agua (O/W/W) (Norton y Frith 2001; Kim y col., 2006; Norton y col., 2006).

Las emulsiones O/W ofrecen un medio conveniente para fortificar muchos productos de alimentos y bebidas a base de agua con ácidos grasos omega-3 (Chee y col., 2005, 2007; Sharma 2005; Lee y col., 2005, 2006). Las emulsiones fortificadas podrían introducirse en sistemas alimentarios tales como bebidas, aderezos para ensaladas, salsas y postres (Velikov y

Pelan, 2008; Yang y col., 2012). Los productos alimenticios líquidos o semisólidos actuales que se han enriquecido con ácidos grasos omega-3 utilizando emulsiones como sistemas de transporte incluyen productos para untar, yogures y leche (Chee y col., 2005; Lane y col., 2014; O'Dwyer y col., 2013; Sharma y col., 2005).

Estas emulsiones se desarrollan específicamente para prevenir la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados en las gotas lipídicas (McClements y Decker 2000). La oxidación en las emulsiones se puede controlar parcialmente controlando sus características físicoquímicas. Los emulsificantes pueden influir en la carga de la gota, el grosor y la permeabilidad, factores que controlan la capacidad de los pro-oxidantes, los radicales libres y el oxígeno para interactuar con los lípidos en las gotas (Waraho y col., 2011). Varios estudios han demostrado que los emulsionantes aniónicos atraen a los metales de transición catiónicos, mientras que los tensioactivos catiónicos los rechazan, disminuyendo así la velocidad de oxidación (Boon y col., 2008; Mancuso y col., 2000). Además, el film interfacial de una emulsión puede formar una barrera física (estérica) contra la fase acuosa de un sistema que contiene pro-oxidantes (Silvestre y col., 2000; Waraho y col., 2011)

Estos sistemas emulsionados es posible usarlos directamente en su estado "húmedo" o también se pueden secar para obtener polvo y de esa manera facilitar su transporte y utilización en otras aplicaciones.

I.4.2. Sistemas emulsionados deshidratados

En general, los métodos de encapsulación se utilizan combinados con técnicas de secado como la liofilización y el secado *spray* para convertir a las emulsiones y suspensiones encapsuladas en una forma seca estable (Ezhilarasi y col., 2013). Las micropartículas secas de aceite de pescado se destinan generalmente a categorías de alimentos sólidos como barras, fórmulas en polvo para lactantes y productos horneados (muffins y pan, entre otros), pero también para otros tipos de productos alimenticios, como alimentos instantáneos, yogures, quesos, mantequilla y crema que pueden estar fortificados con aceite de pescado microencapsulado en cierto nivel sin cambios sensoriales (Kolanowski y Weibbrodt, 2007; Kolanowski y col., 2007; Gökmen y col., 2011; Borneo y col., 2007).

Los polvos secos, además de tener una mayor estabilidad, tienen la capacidad de controlar y mantener mejor la liberación de compuestos bioactivos (Guterres, 2009). Pero el secado también puede provocar un estrés adicional en las cápsulas, lo que afecta la estabilidad de los ingredientes bioactivos (Nakagawa y col., 2011).

Dos de las técnicas de microencapsulación más utilizadas comúnmente son el secado *spray* y la liofilización (Anwar y Kunz, 2011; Sánchez-Navarro y col., 2011).

El **secado *spray*** es una técnica utilizada para la encapsulación de compuestos activos y es simple, de bajo costo, reproducible y fácil de escalar. Además, es útil para encapsular materiales sensibles al calor (como el aceite de pescado) debido a sus cortos tiempos de secado (entre 5 y 30 s) (Desai y Park, 2005). Este método produce micropartículas de polvo con baja actividad de agua (a_w), lo que simplifica el transporte, la manipulación y el almacenamiento y garantiza la calidad microbiológica (Gouin, 2004). Sin embargo, la encapsulación por secado *spray* se considera una tecnología de “inmovilización” en lugar de una verdadera tecnología de encapsulación porque algunos compuestos activos permanecen expuestos en la superficie de las micropartículas (de Vos y col., 2010).

El secado por *spray* es un proceso continuo para convertir un líquido inicial en un polvo sólido de micropartículas. Es un proceso de deshidratación muy común utilizado para formar una matriz continua que rodea las sustancias activas. El líquido inicial (solución, emulsión o suspensión) que contiene al material encapsulante y al compuesto activo se atomiza en forma de gotas finas en un medio de secado en caliente (aire o nitrógeno). Cuando las gotas pequeñas entran en contacto con el medio de secado a alta temperatura, se produce una rápida evaporación del disolvente (principalmente agua) y se produce instantáneamente un polvo (Gharsallaoui y col., 2007).

El proceso de secado *spray* se realiza típicamente con una solución de alimentación acuosa, que limita el agente de encapsulación y el compuesto activo a compuestos solubles en agua a una concentración aceptable (Gharsallaoui y col., 2007; Gouin, 2004). Sin embargo, la encapsulación de moléculas lipofílicas, como el aceite de pescado, requiere una elaboración previa de emulsiones de aceite en agua (Aghbashlo y col., 2013; Drusch, 2007; Drusch y col., 2006; Jafari y col., 2008; Keogh y col., 2001; Shaw y col., 2007). Se ha demostrado que la estabilidad de las emulsiones de alimentación en el proceso de secado *spray* desempeña un papel importante en la retención del aceite de pescado (Drusch, 2007; Drusch y col., 2006; Keogh y col., 2001).

La emulsión formada debe ser estable durante un cierto período de tiempo, antes de la etapa de secado *spray* (Liu y col., 2001), la viscosidad debe ser lo suficientemente baja para evitar la inclusión de aire en la partícula y las gotas de aceite deben ser bastante pequeñas (Drusch, 2007). La temperatura de alimentación, la temperatura de entrada de aire y la temperatura de salida de aire son los factores principales en el secado *spray* que deben optimizarse (Liu y col., 2004). De hecho, la temperatura de alimentación modifica la viscosidad

y la fluidez de la emulsión, por lo que su capacidad para pulverizarse de manera homogénea se ve afectada negativamente. Para garantizar que cada gota pulverizada alcance el nivel de secado deseado, se ajusta la velocidad de alimentación al atomizador, antes de pulverizar en la cámara de secado. Además, los ajustes apropiados de la temperatura de entrada de aire y el caudal son importantes, ya que modifican el tiempo de secado y el contenido de humedad de las partículas (Zbicinski y col., 2002).

Las desventajas que puede presentar esta técnica son la pérdida de una cantidad significativa de producto, sobre todo a escala de laboratorio debido a la adhesión de las micropartículas a la pared del secador *spray*, y la posibilidad de degradación de productos sensibles a altas temperaturas de secado.

En el secado por congelación o **liofilización**, el líquido inicial se congela a una temperatura entre -90 y -40 ° C y luego se seca por sublimación a baja presión. La principal ventaja de esta tecnología es la eliminación del oxígeno y la aplicación de bajas temperaturas, que ayudan a minimizar la oxidación del producto. De esta manera, los materiales liofilizados parecen tener una máxima retención de compuestos volátiles en comparación con el secado *spray* (Krokida y Philippopoulos 2006). Estas ventajas del secado por congelación hacen que esta tecnología sea adecuada para la microencapsulación de ingredientes altamente sensibles, como los probióticos y los ácidos grasos omega-3 (Kaushik, y col., 2015). Esta técnica se ha utilizado con éxito para microencapsular algunos aceites como el de pescado, de semilla de lino, de nuez y el aceite de oliva (Heinzelmann y col., 2000; Quispe-Condori y col., 2011; Calvo y col., 2012; Karaca y col., 2013).

Pocos estudios han explorado la microencapsulación de ácidos grasos omega-3 utilizando la liofilización. Heinzelmann, Franke, Valesco y Marquez-Ruiz (2000) informaron que la liofilización del aceite de pescado microencapsulado proporciona polvos con estructuras altamente porosas y una vida útil corta. En estudios similares, Anwar y Kunz (2011) compararon las características de los productos de aceite de pescado microencapsulados utilizando secado *spray*, granulación por aspersión y liofilización y encontraron que la estructura porosa, irregular y en forma de escamas del polvo liofilizado acelera la oxidación debido al fácil acceso del oxígeno al interior de dichos polvos.

Por lo tanto, la liofilización de emulsiones es una tecnología costosa para la producción comercial de productos omega-3 microencapsulados, que requiere de un alto consumo de energía, un largo tiempo de procesamiento y altos costos de producción en comparación con otros métodos de secado (Desobry y col., 1997), por ejemplo es de 30 a 50 veces más costoso que el secado *spray* (Gouin, 2004).

En cuanto a la porosidad que presentan las estructuras obtenidas, si bien se expone en mayor medida el material del núcleo al ambiente circundante; estas estructuras porosas a su vez proporcionan una mayor liberación de los productos bioactivos de interés (Sinha y col., 2007). Por lo tanto, según la función que se busque, la liofilización podría ser una alternativa para encapsular el aceite de pescado.

Otras técnicas que se encuentran en bibliografía que son utilizadas para formar cápsulas de aceite de pescado son por ejemplo el secado en lecho fluidizado (Rumpler y Jacob, 1998, Ponginebbi y Publisi, 2008), extrusión (Serfert y col., 2009, Gouin, 2004), inyección de fusión (Valentinotti y col., 2006), coacervación (Barrow y col., 2007; Liu y col., 2010, Kralovec y col., 2012), e inclusión molecular (Choi y col., 2010, Schmid y col., 2001).

A su vez, en los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías interesantes para avanzar en la encapsulación de aceite de pescado, como el electrospraying el cual forma un recubrimiento ultra-fino (Torres-Giner y col., 2010), granulación en spray (Anwar y col., 2010) y el atomizador con ultrasonido (Klaypradit y Huang 2008, Legako y Dunford, 2010).

I.5. Envases bioactivos

En muchos casos el desarrollo de nuevos alimentos funcionales y su efectividad están limitados por la desactivación de los compuestos bioactivos durante el procesamiento (por exposición a la temperatura, el oxígeno, o la luz), el almacenamiento, la comercialización del alimento o en el tracto gastrointestinal (pH, enzimas, presencia de otros nutrientes, etc.); la incompatibilidad de los mismos con la matriz alimentaria; los cambios sensoriales indeseables que pueden provocar en el producto alimenticio, etc. Por lo tanto, es necesario enfocarse en alternativas para una administración efectiva de estos compuestos a fin de preservar su actividad biológica, mejorar su biodisponibilidad y lograr su liberación controlada (Katouzian y Jafari, 2016).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el desarrollo de algunos alimentos funcionales podría rediseñarse involucrando los materiales de envase, surgiendo así una disciplina tecnológica de envasado denominada **envase bioactivo**. Estos envases tienen el rol de mejorar el impacto de los alimentos sobre la salud del consumidor a través de la creación de alimentos envasados más saludables. El concepto amplio apunta a la protección de compuestos bioactivos utilizando biomateriales, ya sea a través de tecnologías de micro y nanoencapsulación, o mediante la incorporación de ingredientes funcionales dentro de las paredes del envase (López-Rubio, 2011). Si bien estas características se asemejan al concepto

de envase activo, cuyo objetivo es prolongar la vida útil y mantener o mejorar el estado de los alimentos envasados, el envase bioactivo busca tener un impacto directo y positivo en la salud de los consumidores. Así, el diseño de nuevos envases bioactivos surge para dar respuesta a las barreras y limitaciones actuales en la fabricación de alimentos funcionales (López-Rubio, 2011; Salgado y col., 2018).

Actualmente, existen diferentes estrategias para poder activar a los materiales que se van a utilizar como envase. Estas incluyen: i) la incorporación del compuesto bioactivo dentro de un sachet que va incluido en el envase, ii) la incorporación directa del compuesto bioactivo en la pared del envase, iii) recubrir el envase con una matriz que se utilice como transportador de la sustancia bioactiva, iv) utilizar un polímero con propiedades bioactivas intrínsecas (antioxodante, antimicrobiano) que también tenga la capacidad de formar películas (ejemplo: quitosano), v) utilizar el un recubrimiento comestible bioactivo directamente sobre el alimento (Ouattara y col., 2000; Coma, 2008).

Lastécnicas y condiciones de procesamiento para la preparación del material deben seleccionarse considerando las características de los agentes activos, especialmente su resistencia al calor y mecanismo de acción, para evitar daños en estos compuestos durante el procesamiento y asegurar la actividad del envase (Salgado y col., 2015). El método de fabricación también determinará la estructura del material y, por lo tanto, la velocidad de liberación de la sustancia bioactiva. La selección de los materiales que se utilizarán en forma de envase o como recubrimiento es crucial porque, además de contener al compuesto activo, deberá ejercer una función de protección, manteniendo y asegurando la calidad y seguridad de los alimentos que contienen (Han, 2014). Como las sustancias funcionales propuestas para estos envases en general son no volátiles, es necesario asegurar el contacto directo entre el envase y la superficie de los alimentos. La utilización de formulaciones comestibles aplicadas como recubrimientos necesitarían menos requerimientos sobre la liberación de los principios activos previo a su consumo y deberían poder proteger a los principios activos durante la cocción de los alimentos, en el caso de que este procesamiento fuera necesario. Además, como las películas comestibles se pueden formar utilizando polisacáridos (almidón, quitosano, alginatos, etc.), proteínas (gelatina, proteína de soja, gluten de trigo, etc.) y lípidos (ceras, triglicéridos, ácidos grasos, etc.), pueden contener cualquier sustancia funcional y pueden adaptarse a cualquier producto alimenticio. Pero se deben contemplar cuidadosamente otros factores como la interacción química de los aditivos con la matriz de la película, los coeficientes de transferencia de masa, las propiedades físicas de los materiales de envase y las condiciones ambientales durante el almacenamiento (temperatura y humedad relativa) (Han, 2014).

El agregado de nanorefuerzos a materiales en base a biopolímeros proporciona un terreno más sólido para aumentar la competitividad técnica y económica de los polímeros renovables para diferentes aplicaciones. Los nanorefuerzos son rellenos que tienen al menos una dimensión en la escala nanométrica (<100 nm, por ejemplo, nanopartículas, nanofibras o nanotubos y nanocapas), que ofrecen una tremenda mejora en las propiedades del nanocompuesto resultante, cuando se dispersa en la matriz polimérica. Debido a su tamaño, tienen una alta relación de aspecto que implica un área superficial relativamente más grande por masa de relleno que los micro-refuerzos, lo que provoca una fuerte interacción con la matriz polimérica. Como resultado, se espera que los materiales resultantes exhiban mejores propiedades mecánicas y de barrera, estabilidad térmica, resistencia química y apariencia de la superficie. Curiosamente, estas mejoras se pueden lograr con bajos niveles de carga ($\leq 5\text{-}10\%$), lo que conduce a reducciones en el peso del material, mayor resistencia y mejores propiedades de barrera (Rhim y col., 2013; Zhao y col., 2008; Condes y col., 2016). Actualmente, hay un gran interés en el uso potencial de los sistemas de nanocompuestos como portadores de compuestos activos para el envasado de alimentos, ya que la presencia de nanorefuerzos bien dispersos en la matriz del polímero podría modular el paso de moléculas a través de la película (Abdollahi y col., 2012; Echeverría y col., 2016 y 2018; Ortiz y col., 2018). Las nanopartículas preparadas a partir de polisacáridos, como nanocristales de almidón y quitosano, y nanofibras de celulosa, son los nanorefuerzos más prometedores para ser incorporados en películas y recubrimientos biodegradables y/o comestibles (Condes y col., 2016).

La **Tabla 1.2** muestra algunos ejemplos de películas de biopolímeros que contienen compuestos bioactivos. En la mayoría de estos trabajos, estos compuestos se usan para activar a las películas con el fin de prolongar la vida útil del alimento envasado, y no como un compuesto bioactivo en sí, el cual puede posiblemente lograr un efecto en la salud de los consumidores.

Tabla 1.2. Algunos ejemplos de películas de biopolímeros que contienen diferentes compuestos bioactivos.

Compuesto bioactivo	Biopolimero	Actividad evaluada	Referencia
Polifenoles	Gelatina	Actividad antioxidante	Gómez-Estaca y col. (2009)
	Maltodextrinaoaislado proteico de soja	Contenido de fenoles totales	Robert y col. (2015)
	Proteinas de pescado	Actividad antioxidante y antibacteriana	Teixeira y col. (2014)
	Carragenato	Actividad antimicrobiana	Kanmani y Rhim (2014)
	Quitosano	Actividad antioxidante	Peng y col. (2013)
	Proteinas de gelatina y cebada	Actividad antimicrobiana	Song y col. (2012)
	Pectina de bajo metoxilo	Actividad antimicrobiana	Du y col. (2011)
Flavonoides	Quitosano	Actividad antimicrobiana	Iturriaga y col. (2014)
Carotenoides	Agar, alginato de sodio, y pectina	Actividad antimicrobiana	Amnuakit y col. (2012)
	Harina de curcuma	Actividad antioxidante	Maniglia y col. (2014)
	Almidon de mandioca	Actividad antioxidante	Queiroz y col. (2017)
Aceites esenciales	Gelatina	Actividad antioxidante y antimicrobiana	Martucci y col. (2015)
	Quitosano y almidon de mandioca	Actividad antimicrobiana	Pelissari y col. (2009)
Vitaminas	Almidon	Actividad antioxidante	Kowalczyk y col. (2018)
	Carboximetilcelulosa	Actividad antioxidante y liberacion de vitamina	Martelli y col. (2017)
Minerales	Carragenato/porfirano	Propiedades fisicoquímicas del film	Cian y col. (2015)
MUFA	Gelatina	Propiedades fisicoquímicas del film	Limpisophon y col. (2010)
Probioticos	Carboximetilcelulosa	Supervivencia de losmicroorganismos	Ebrahimi y col. (2018).
	Kefiran	Supervivencia de losmicroorganismos	Piermaría y col. (2015).
Prebioticos	Gelatina	Estabilidad de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Soukoulis y col. (2014).
Bacteriocinas	Gelatina	Actividad antimicrobiana	Ibarguren y col. (2015)
Peptidos	Aislado proteico de soja y de girasol	Actividad antioxidante	Salgado y col. (2011)

Existen en bibliografía pocos trabajos con películas que contengan ácidos grasos omega-3. Hopkins y col. (2015) han trabajado con películas con aceite de lino con aislado proteico de soja, mientras que Kaya y col. (2018) lo hicieron con aceite de semillas de *Berberiscrataegina* en una matriz de quitosano. Con respecto a películas con ácidos grasos omega-3 proveniente de pescado, Duan y col. (2011) muestran el efecto del agregado de aceite de pescado a películas de quitosano y proteínas de suero en presencia de aceite esencial de orégano o de romero. En este trabajo corroboraron que la adición de orégano retardó la oxidación de los lípidos del aceite de pescado encapsulado en las películas, en el que se logró una reducción del 43% al 53% en el valor de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico y una reducción del 39% al 51% en el valor de peróxidos.

I.6. Biodigestibilidad

Para exhibir sus efectos beneficiosos, la forma activa del compuesto bioactivo debe ser absorbida por el cuerpo humano después de la ingestión. Los sistemas de transporte deben diseñarse para retener y proteger los agentes bioactivos en ciertas condiciones, y luego liberarlos en otras condiciones específicas (Borel y Sabliov, 2014).

El tracto gastrointestinal humano (GIT, por sus siglas en inglés) comprende un proceso biológico complejo con múltiples fases (es decir, oral, estómago, intestino delgado e intestino grueso), en el que los productos alimenticios se someten a una serie de procesos que los transforman en componentes más pequeños y más básicos, para ser absorbidos (principalmente en el intestino delgado) y alcanzar el torrente sanguíneo. Desde la absorción hasta la excreción, las partículas deben superar algunos impedimentos para poder trasladar el bioactivo encapsulado al tejido sobre el que va a actuar. Algunas de esas barreras comprenden las enzimas, el bajo pH del estómago, la mucosa del tracto gastrointestinal, el epitelio gastrointestinal, la interacción con los componentes sanguíneos, el metabolismo hepático y la excreción de bilis. La ubicación del lugar de liberación y las propiedades químicas y físicas del bioactivo determinan su destino biológico.

Los compuestos bioactivos pueden ser liberados por varios mecanismos diferentes dependiendo de la naturaleza del polímero utilizado como revestimiento (McClements, 2014): por difusión a través de las partículas intactas o por el hinchamiento de las partículas; por desmontaje (por ejemplo, debilitamiento de las fuerzas electrostáticas que mantienen unidas las partículas); o por erosión (por ejemplo, debido a la degradación de las enzimas). Por lo tanto, es necesario considerar la composición de las partículas para lograr la liberación de compuestos activos en el sitio de acción apropiado. Por lo tanto, se pueden usar proteínas

digestibles para fabricar partículas que se disocian principalmente en el estómago debido a la actividad de la proteasa; lípidos digestibles para fabricar partículas que se disocian principalmente en el intestino delgado debido a la actividad de la lipasa, y fibras dietéticas para fabricar partículas que permanecerán intactas hasta que lleguen al colon. Una vez preparados, estos sistemas deben probarse utilizando primero una combinación de modelos gastrointestinales simulados in vitro, y luego estudios de alimentación en animales y humanos para verificar si efectivamente ocurre la liberación controlada (McClements, 2015).

Algunas otras propiedades fisicoquímicas, como el tamaño, la carga, la hidrofobicidad y las propiedades de orientación, también afectan la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los compuestos bioactivos, que son esenciales para modular la actividad in vivo del bioactivo administrado. Numerosos estudios (Hillyer y Albrecht, 2001; Jani y col., 1990; Win y Feng, 2005) han destacado la importancia del tamaño para el transporte de partículas a través de la capa mucosa, la absorción por las células epiteliales y el destino dentro del cuerpo humano. En general, cuanto más pequeña es la partícula, mayor es la absorción de estas partículas a través del GIT. Se ha informado que las partículas mayores de 300 nm no se transportan directamente a la circulación sistémica (Jani y col., 1990). Sin embargo, se han detectado partículas más grandes en la linfa y en la sangre, ya que pueden "filtrarse" a través de uniones apretadas y flojas (Hillyer y Albrecht, 2001). La hidrofobicidad afecta la absorción, la distribución, la interacción con las células inmunes y las proteínas plasmáticas, y la vía de excreción. La carga es importante para la mucoadhesión o difusión, la captación celular y la toxicidad. La focalización afecta la biodistribución y las respuestas inmunitarias (Faraji y Wipf, 2009, Naahidi y col., 2013).

Por lo tanto, la biodisponibilidad general de un compuesto bioactivo se puede controlar diseñando sistemas de administración que aumentan la fracción de micronutrientes que sobreviven en el alimento, son bioaccesibles, se absorben y están presentes en una forma metabólicamente activa (Grumezescu, 2016). Este objetivo se puede lograr mediante la manipulación de la composición y la estructura de los sistemas de transporte.

I.7. Agentes encapsulantes a base de biopolímeros

Un material ideal para la encapsulación del aceite de pescado debe tener propiedades emulsionantes y propiedades formadoras de película. Además, debe tener baja viscosidad en altos contenidos de sólidos, baja higroscopicidad y bajo costo (Encina y col., 2016).

Los emulsionantes naturales tienen diferentes habilidades para formar emulsiones debido a las diferencias en su capacidad para adsorberse en la superficie de las gotas, reducir la tensión interfacial de la interfaz agua-aceite y prevenir la agregación de gotas.

La mayoría de las **proteínas** son consideradas agentes tensioactivos debido a que contienen una mezcla de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos a lo largo de sus cadenas polipeptídicas (Lam y Nickerson, 2013). En consecuencia, pueden adsorberse en la interfaz aceite-agua y recubrir las gotas de aceite formadas durante la homogeneización. También pueden estabilizar las gotas de la agregación porque contienen aminoácidos que poseen cargas negativas ($-\text{COO}^-$) o positivas ($-\text{NH}_3^+$) y, por lo tanto, pueden generar una repulsión electrostática (McClements, 2004, Dickinson, 2009).

Estos biopolímeros pueden lograr adoptar diversas conformaciones interfaciales en función de sus estructuras moleculares e interacciones (Singh, 2011). Las proteínas flexibles (como la caseína o la gelatina) experimentan rápidamente cambios de conformación, de modo que los grupos hidrófilos sobresalen en el agua y los grupos hidrófobos sobresalen en el aceite (estructura de tipo “randomcoil”). Las proteínas globulares rígidas (como las proteínas de suero, huevo, soja o guisante) pueden desplegarse parcialmente después de la adsorción y formar capas viscoelásticas cohesivas. Actualmente, los emulsionantes basados en proteínas naturales más comúnmente utilizados en la industria alimentaria se derivan de la leche bovina: caseínas y proteínas de suero. Una de las áreas más interesantes de la investigación actual es la identificación de emulsionantes basados en proteínas a partir de fuentes vegetales (Lam y Nickerson, 2013). Esta investigación se debe en gran medida al deseo de reemplazar las proteínas animales en productos vegetarianos o veganos, así como a mejorar la sostenibilidad y la seguridad de los alimentos (Day, 2013). Se ha demostrado que numerosas proteínas de origen vegetal son emulsionantes prometedores, incluidas las proteínas de guisante (Stone y col., 2015), las proteínas de lupino (Benjamin y col., 2014), las proteínas de soja (Nishinari y col., 2014) y las proteínas de germen de maíz (Hojilla-Evangelista, 2014).

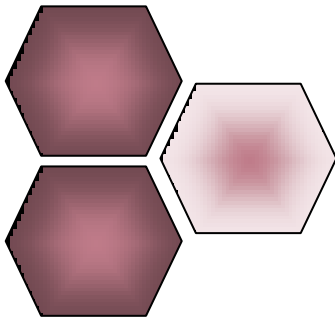
La mayoría de los **polisacáridos** son moléculas altamente hidrofílicas que no son particularmente activas en la superficie y, por lo tanto, no son buenos emulsionantes (Dickinson, 2003). En su lugar, tienden a estabilizar las emulsiones aumentando la viscosidad de la fase acuosa e inhibiendo así el movimiento de las gotas (McClements, 2015), actuando como espesantes o modificadores de textura. Algunos como la goma arábiga, la pectina y los galactomananos tienen buenas propiedades emulsionantes ya que poseen grupos o proteínas no polares unidas a sus cadenas de hidratos de carbono hidrofílicas (Dickinson, 2003).

Recientemente, el desarrollo de nanopartículas a partir de recursos naturales, como la celulosa, el almidón y la quitina, han atraído cada vez más atención como estabilizadores de las

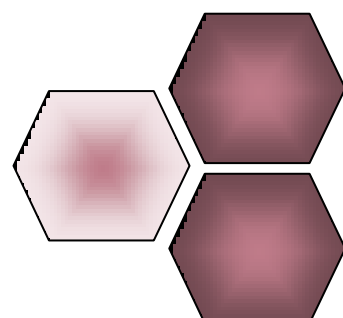
emulsiones de Pickering, en reemplazo de las partículas sintéticas e inorgánicas como la sílice y la arcilla (Ashby y Binks, 2000; Binks y Lumsdon, 2001; Tan y col., 2011), especialmente para los usos alimentarios debido a sus propiedades particulares, tales como baja densidad, baja huella de carbono, capacidad química, sostenibilidad ambiental y bajo costo (Fujisawa y col., 2017). Las partículas en la interfaz aceite-agua en las emulsiones, forman una capa densamente empaquetada contra la coalescencia y la maduración de Ostwald (Lu y col., 2017). Al disminuir el tamaño de partícula, la tensión interfacial de las partículas con dos fases disminuye y, por lo tanto, se obtiene una emulsión más estable (Nicolai y Murray, 2017).

A su vez, existen trabajos en los que se muestra que el uso de mezclas de proteínas y polisacáridos, así como el uso de glicoproteínas, o complejos de Maillard entre ambos tipos de biopolímeros, logran mejorar las propiedades emulsificantes de los componentes por separado (Evans y col., 2013; Wooster y Augustin, 2006; Zhang y col., 2014; Galazka y col., 2000), y han sido utilizadas para encapsular exitosamente aceite de pescado (Vhangani y Van Wyk, 2016; Miranda y col., 2012; Kim y col., 2013).

Hasta donde sabemos, prácticamente no se han utilizado sistemas nanocompuestos formados por proteínas y nanopartículas derivadas de polisacáridos para la encapsulación de compuestos activos, entre ellos el aceite de pescado.



II. OBJETIVOS



II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es desarrollar distintos sistemas de encapsulación para aceite de pescado (emulsiones, microcápsulas y películas), utilizando proteínas de soja y nanofibras de celulosa como material encapsulante, con el fin de proteger y vehiculizar los ácidos grasos omega-3 del aceite en alimentos saludables.

II.2. Objetivos específicos

En particular se plantearon los siguientes objetivos específicos:

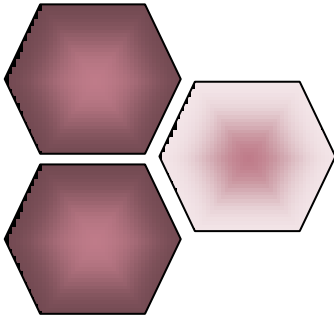
i) Desarrollar encapsulados de aceite de pescado utilizando proteínas de soja como material de pared, evaluando el efecto de la formulación y del proceso de emulsificación y deshidratación sobre las propiedades estructurales, funcionales y fisicoquímicas de los productos obtenidos (emulsiones y microcápsulas), así como la estabilidad oxidativa del aceite.

ii) Obtener nanofibras de celulosa con diferentes propiedades fisicoquímicas (cristalinidad, tamaño, morfología y carga superficial) por hidrólisis ácida de celulosa microcristalina o por fibrilación mecánica de fibras de formio modificadas o no previamente con tratamientos químicos y enzimáticos.

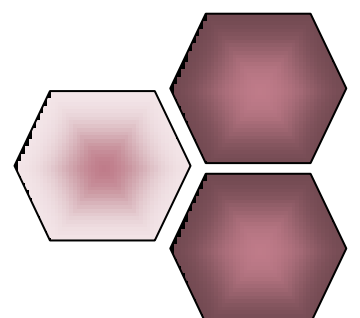
iii) Evaluar la capacidad emulsificante de sistemas nanocompuestos formados por proteínas de soja y nanofibras de celulosa para encapsular aceite de pescado, analizando el efecto de la concentración y el tipo de nanofibras sobre las características iniciales y la estabilidad de las emulsiones resultantes.

iv) Desarrollar encapsulados de aceite de pescado utilizando matrices nanocompuestas de proteínas de soja y nanofibras de celulosa, evaluando el efecto de la concentración y del tipo de nanofibras sobre las propiedades estructurales, y fisicoquímicas de los productos obtenidos y sobre la estabilidad oxidativa del aceite.

v) Desarrollar películas nanocompuestas en base a proteínas de soja y nanofibras de celulosa capaces de transportar aceite de pescado, con el fin de obtener un envase bioactivo, analizando el efecto del tipo de fibra y del procesamiento sobre la funcionalidad de los materiales resultantes y la estabilidad del aceite.



III. ENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE PESCADO EN SISTEMAS PROTEICOS A BASE DE PROTEÍNAS DE SOJA



III. ENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE PESCADO EN SISTEMAS PROTEICOS A BASE DE PROTEÍNAS DE SOJA.

III.1. Introducción

La soja (*Glycine max* (L.)) pertenece a la familia de las leguminosas y es originaria de Asia oriental. Actualmente se cultiva en todo el mundo debido a que posee un alto contenido de proteínas ($\approx 40\%$ b.s) y aceite ($\approx 20\%$ b.s) (Thrane y col., 2017). Las culturas asiáticas utilizan la soja para producir alimentos tradicionales, como la leche de soja, la salsa de soja, la pasta de soja, el tempeh, el miso, el tofu y el natto. En las culturas occidentales, la soja se procesa principalmente para obtener aceite y harinas proteicas (Nishinari y col., 2014; Wilson, 2008) (Figura III.1).

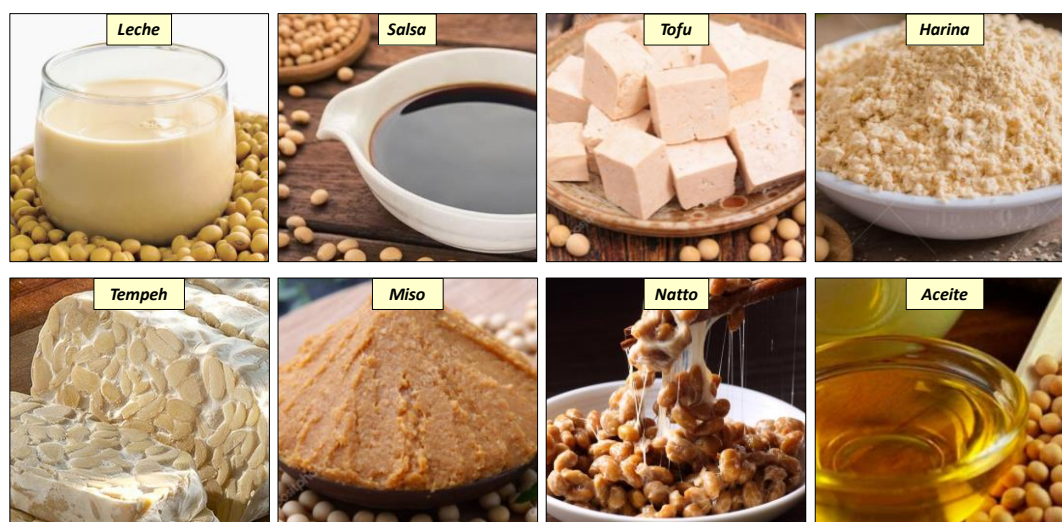


Figura III.1. Productos obtenidos a partir de la soja.

El cultivo de soja a nivel comercial se introdujo en Argentina a mediados de los años '70 y desde ese momento ha ido ganando importancia en la economía nacional. En la **Figura III.2** se muestra cómo evolucionaron la superficie destinada a la siembra y la producción de soja, tanto de granos como de aceite y harinas proteicas (*pellets* y *expellers*). Allí se puede observar que a partir de los últimos años de la década del '90 se registró un incremento notorio y sostenido en el área cultivada con soja así como también en su producción. Actualmente, Argentina se posiciona como el tercer productor mundial de soja (con aproximadamente 55 millones de toneladas, que representa el 16% de la producción mundial) y el séptimo productor mundial de aceite de soja (con aproximadamente 8 millones de toneladas, que representa el 5% de la producción mundial) y el cuarto productor mundial de harinas proteicas de soja (con aproximadamente 32 millones de toneladas, que representa el 13% de la producción mundial). La mayor parte de la producción de

aceite ($\approx 60\%$) y de harina proteica de soja ($\approx 90\%$), se destina al comercio exterior (Ministerio de Agricultura de la Nación, https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/).

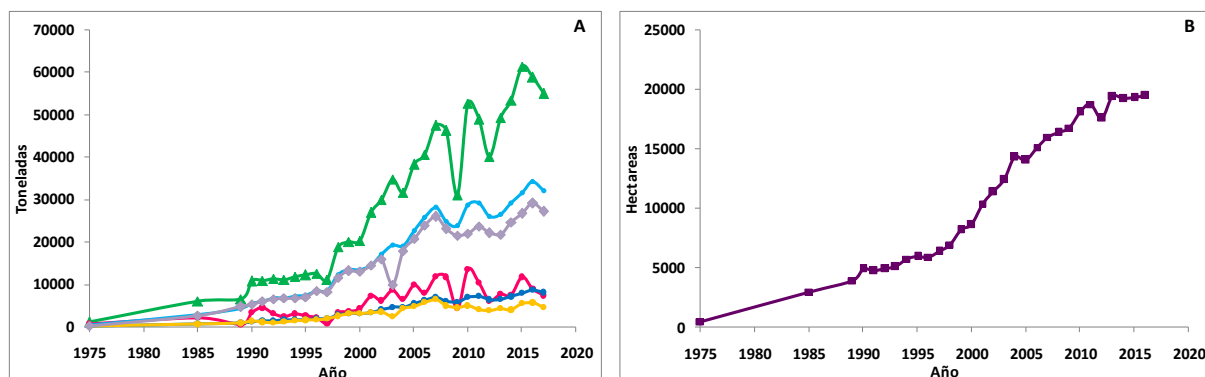


Figura III.2. A) Evolución de la producción y exportación de los granos de soja (■ y ■ respectivamente), del aceite (■ y ■) y de las harinas proteicas (■ y ■). **B)** Superficie destinada a la siembra de soja.

Aproximadamente el 90% del aceite de soja es destinado a la producción de biodiesel y un 70% de la producción de este combustible se exporta; ubicando a la Argentina hasta el 2017 en el tercer productor mundial de biodiesel en base a aceite de soja (<https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/bioenergia/informes>). En particular, nuestro país encabeza el *ranking* de exportadores de harina proteica de soja con un 43% de participación en el comercio global de dicho producto. Así, la harina proteica de soja, co-producto de la industria aceitera, es el principal producto de exportación de la balanza comercial argentina, representando en 2017 el 16% del valor total exportado por el país.

Las harinas de soja poseen un elevado contenido de proteínas (50–65% b.s.) de buena calidad nutricional, por lo que si bien se emplean principalmente para alimentación animal pueden utilizarse como materia prima para la obtención de productos con mayor valor agregado como texturizados de proteínas vegetales, concentrados proteicos (65–90% b.s.) y aislados proteicos (>90% b.s.) (Mohanty y col., 2005).

En particular, los aislados proteicos de soja son muy utilizados en la industria alimentaria como ingredientes en fórmulas infantiles, productos cárnicos y sucedáneos, postres congelados, bebidas proteicas, productos horneados, batidos, sopas, etc. Estos ingredientes se pueden obtener mediante el proceso convencional de extracción alcalina en un medio acuoso y posterior precipitación isoelectrica de las proteínas. Si bien existen algunos proyectos en desarrollo, en nuestro país no hay empresas que se dediquen a producción de aislados proteicos de soja.

Los aislados proteicos de soja están constituidos principalmente por las globulinas de reserva 7S o β -conglucina y 11S o glicina. La β -conglucina (7S) es una glicoproteína compleja que

exhibe polimorfismo en las subunidades que la componen. Se trata de un trímero con una masa molecular de 180-200 kDa, formada por tres polipéptidos diferentes, designados α , α' y β (68, 72 y 52 kDa respectivamente) unidos por enlaces no-covalentes (Nishinari y col., 2014; Thrane y col., 2017). Por el otro lado, la glicinina (11S) posee una estructura cuaternaria compleja, organizada en hexámeros ($[AB]_6$) de 320-380 kDa compuestos por dos trímeros asociados por interacciones hidrofóbicas. Todas esas subunidades (de aproximadamente 50-70 kDa) se mantienen unidas mediante interacciones no-covalentes y cada una de ellas están formadas por un polipéptido ácido (polipéptido A, de 30 kDa) y un polipéptido básico (polipéptido B, de 30 kDa) enlazados por un enlace disulfuro (Mateos-Aparicio y col., 2008; Nishinari y col., 2014). La **Figura III.3** ilustra la estructura de estas globulinas.

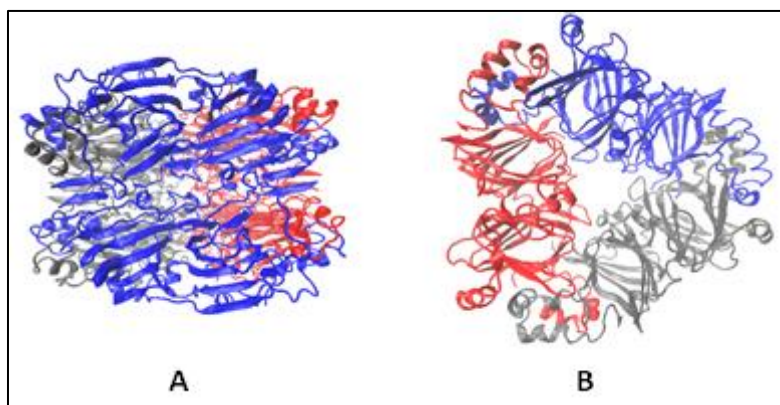


Figura III.3. Estructuras moleculares tridimensionales de **A)** glicinina –11S leguminosa de soja (PDB: 1oD5); **B)** β -conglicinina –7S vicilina de soja (PDB: 1IPK)

Estas proteínas poseen un amplio espectro de propiedades funcionales, es decir características fisicoquímicas intrínsecas que afectan el comportamiento de la proteína en los sistemas alimentarios durante el proceso, la fabricación, el almacenamiento y la preparación, por ejemplo, la adsorción, solubilidad, gelificación, propiedades surfactantes, etc. (Kinsella, 1979), que ha conducido al desarrollo de los alimentos mencionados anteriormente.

Las proteínas de soja parecen ser adecuadas para la encapsulación del aceite de pescado, ya que tienen una solubilidad en agua aceptable, una buena adsorción en la interfaz agua/aceite y propiedades de gelificación y formación de película ventajosas (Gu y col., 2009).

Durante la formación de emulsiones O/W, una fracción de las proteínas de soja difunde desde el seno de la fase acuosa en donde se encuentran solubles, o al menos dispersas, hacia la nueva interfaz aceite-agua, se adsorben y se acomodan exponiendo sus grupos hidrofóbicos hacia la fase oleosa y los hidrofílicos hacia la fase acuosa. Además, estas macromoléculas pueden

interaccionar entre sí formando una película interfacial con características viscoelásticas, la cual jugará un papel importante en la estabilidad de la emulsión resultante (Tang, 2017).

Se han utilizado concentrados y aislados de proteínas de soja como material de encapsulación de aceite de naranja, aceite de palma, oleoresina de paprika, aceite de girasol, estearina de palma y otros (Kim y Morr, 1996; Rusli y col., 2006; Rascón y col., 2011; Tavernier y col., 2019), solo o en mezclas con otros biopolímeros como maltodextrina, gelatina, pectina y otros (Yu y col., 2007; Favaro-Trindade y col., 2010; Mendanha y col., 2009).

Faraji y col. (2004) y Asnaashari y col. (2014) formularon emulsiones de aceite de pescado estabilizadas con proteínas de soja enfocando sus estudio en las propiedades antioxidantes las propiedades antioxidantes propias del aislado proteico así también como de algunos compuestos fenólicos como ácido gálico y galato de metilo para proteger a los ácidos grasos. Delgado-Pando y col. (2010, 2011) prepararon emulsiones de aceite de pescado empleando proteínas de soja modificadas con transglutaminasa como agentes emulsificantes, con el objetivo de utilizarlas como sustitutos de grasa (*fatreplacers*) en salchichas. En el mismo sentido, Cho y col. (2003) prepararon microcápsulas de aceite de pescado mediante un proceso de doble emulsificación y posterior gelificación empleando proteínas de soja modificadas con transglutaminasa. Por otra parte, Nasrin y Anal (2014 y 2015) y Zhang y col. (2014 y 2015) estudiaron las propiedades emulsificantes de mezclas físicas de proteínas de soja y almidón de banana y de complejos de proteínas de soja hidrolizadas y glicosiladas con maltodextrina (por reacción de Maillard) y su posterior encapsulación de aceite de pescado por liofilización.

Hasta donde sabemos, no se han informado trabajos donde encapsulen aceite de pescado solo con proteínas de soja sin modificar.

III.2. Objetivo

El objetivo del presente capítulo fue desarrollar encapsulados de aceite de pescado utilizando proteínas de soja como material de pared, evaluando el efecto de la formulación y del proceso de emulsificación y deshidratación sobre las propiedades estructurales, funcionales y fisicoquímicas de los productos obtenidos (emulsiones y microcápsulas), así como la estabilidad oxidativa del aceite.

III.3. Materiales y métodos

III.3.1. Materiales

Como material de encapsulación se utilizó un aislado proteico de soja (**APS**) SUPRO 500E, suministrado amablemente por DuPont N & H (Brasil). Su contenido de proteína, determinado por el método Kjeldahl, fue de $85 \pm 2\%$ p/p en base seca ($N \times 5,71$). Este aislado está compuesto mayoritariamente por globulinas 7S y 11S que se encuentran completamente desnaturalizadas, según se evaluó anteriormente (Salgado y col., 2017).

El aceite de pescado fue suministrado por OmegaSur S.A. (Mar del Plata, Argentina) (El proveedor informó que el producto posee ácido docosahexaenoico C22:6, DHA, > 22%, ácido eicosapentaenoico C20:5, EPA, > 7% y que contiene vitamina E, extracto de romero y BHA como antioxidantes).

Todos los otros reactivos utilizados en este estudio fueron de grado analítico.

III.3.2. Preparación de las emulsiones

Se prepararon emulsiones de aceite en agua con diferentes relaciones en masa de proteína:aceite: 1:1, 2:1, 3:1 y 4:1 a partir de una dispersión acuosa de **APS** 5% p/v y aceite de pescado. Las emulsiones se prepararon mediante dos procesos diferentes: **i) UT**: utilizando sólo el mezclador de sonda de alto cizallamiento Ultra-Turrax T-25 (IKA®, Werke Gmb H& Co. KG, Alemania) empleando una herramienta de dispersión S25N-18G (diámetro del rotor 13,4 mm) a 13500 rpm durante 90 s; y **ii) UT+US**: con un segundo paso adicional realizado con un homogeneizador ultrasónico SONICS Vibra Cell VCX 750 (Vibra CellSonics Materials Inc., Estados Unidos) a una potencia de 50% (375 W) por 5 minutos utilizando pulsos de 30 s ON / 30 s OFF con una punta estándar (13 mm de diámetro) sumergida 2/3 en un vaso de 70 mm de diámetro (250 ml de volumen) en agitación con un agitador magnético y con baño de hielo.

Una vez obtenidas las emulsiones, se añadió azida de sodio (0,1% p/v) para prevenir el crecimiento microbiano.

Se analizaron al menos dos réplicas preparadas individualmente para cada condición para confirmar la repetitividad del proceso.

III.3.3. Caracterización de las emulsiones

III.3.3.1. Morfología

La morfología de las emulsiones se observó mediante microscopía óptica. Cada emulsión (20 μ L) se colocó en un portaobjetos, se tapó con un cubre-objetos y se examinó inmediatamente con

un microscopio óptico (Leica DMLB (Leica Microsystems, Alemania) equipado con una cámara digital Leica DC100 (Bensheim, Alemania) usando un aumento de 100X.

III.3.3.2. Distribución de tamaño de partícula y diámetros medios

La distribución de tamaño de partícula se determinó mediante SLS empleando un equipo Malvern Mastersizer 2000E (Malvern Instruments, Worcestershire, (Reino Unido). Para realizar la medición en el equipo se agregó 1 ml de muestra (gota a gota) a un vaso de precipitado con 600 ml de agua en constante agitación a 2000 rpm (Hydro 2000MU, Malvern Instruments, Reino Unido).

A partir de las medidas realizadas, se obtuvieron los diámetros promedios: $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$. El $D_{3,2}$ es el diámetro promedio de volumen-superficie o diámetro de Sauter (**Ecuación III.1**), mientras que el $D_{4,3}$ se define como el diámetro promedio de volumen equivalente o diámetro de Broucker (**Ecuación III.2**).

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad \text{Ecuación III.1}$$

$$D_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad \text{Ecuación III.2}$$

donde n_i es el número de partículas de diámetro d_i .

El $D_{3,2}$ da una idea de la superficie creada durante la emulsificación y la distribución de los $D_{3,2}$ muestra que porcentaje de la superficie total creada está compuesta por gotas de los distintos rangos de tamaño. La distribución de $D_{4,3}$ representa el porcentaje de volumen total de aceite utilizado que forma parte de cada uno de los rangos de tamaño de gota de la distribución.

Los índices de refracción de las fases dispersas y continuas fueron 1,47 y 1,33 respectivamente.

Además, se calculó el área interfacial específica de acuerdo con la **Ecuación III.3**:

$$AIE = \frac{6\phi}{D_{3,2}} \quad \text{Ecuación III.3}$$

Donde: AIE es el área interfacial específica, ϕ es la relación volumétrica de fases, y $D_{3,2}$ es el diámetro medio de Sauter (μm).

Las determinaciones se realizaron por sextuplicado.

III.3.3.3. Comportamiento reológico

El comportamiento de flujo de las emulsiones se determinó en un reómetro de esfuerzo controlado Haake RS600 (Haake, Alemania) utilizando un sistema sensor de platos paralelos con superficies rugosas, con una separación de 1,0 mm entre los platos. Las mediciones se realizaron por triplicado a temperatura constante ($25,0 \pm 0,5$ °C). Las muestras se sometieron a un ensayo rotacional en donde el gradiente de velocidad de deformación se aumentó de 0 a 500 s^{-1} en 2 min, se mantuvo constante a 500 s^{-1} durante 1 min y luego se disminuyó desde 500 hasta 0 s^{-1} en 2 min. Se registró el esfuerzo de corte (τ) en función del gradiente de velocidad de deformación (D) y así se obtuvieron las gráficas correspondientes al comportamiento de flujo.

Los resultados experimentales se ajustaron matemáticamente al modelo reológico de Newton, mediante el software HAAKE RheoWin 3.30.0000 (ThermoScientific, Alemania).

El comportamiento de flujo de las emulsiones se describió ajustando los resultados experimentales al modelo de Newton:

$$\tau = \eta D \quad \text{Ecuación III.4}$$

Donde: τ es el esfuerzo de corte (Pa), D es el gradiente de velocidad de deformación (s^{-1}) y η es la viscosidad (Pa.s).

El modelado se realizó sobre la primer parte de la curva de comportamiento de flujo (donde aumento el valor de D hasta 500 s^{-1}).

Las mediciones se realizaron por triplicado.

III.3.3.4. Estabilidad

La estabilidad de las emulsiones se determinó utilizando un analizador óptico vertical de barrido modelo QuickScan (Beckman-Coulter inc., Estados Unidos) según Cabezas y col. (2012).

La medida se basa en la aplicación de una fuente lumínica laser en el infrarrojo cercano (850 nm) a la celda de medida que contiene la emulsión. Dos sensores ópticos sincronizados reciben respectivamente la luz transmitida a través de la muestra (180° desde la luz incidente, sensor de transmisión), y la dispersada por la muestra (45° desde la radiación incidente, detector de *backscattering*).

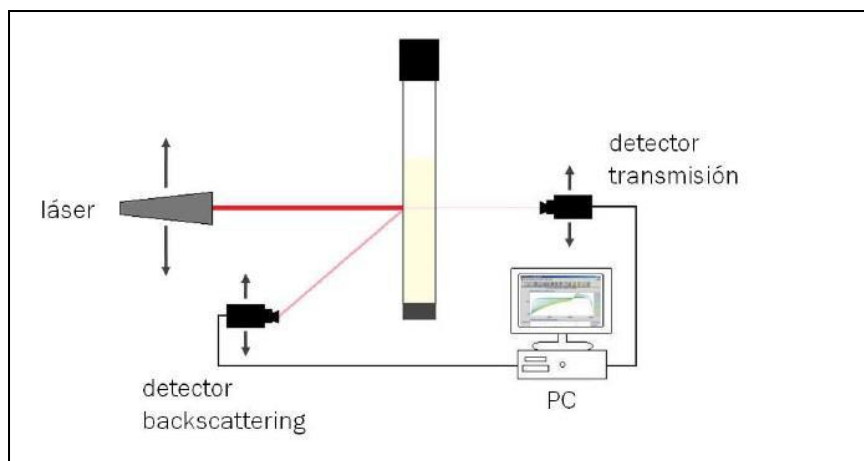


Figura III.4. Esquema simplificado del sistema óptico y de adquisición de datos del analizador óptico vertical.

Tanto la fuente de luz como los dos detectores se mueven a lo largo de la celda de medida periódicamente para analizar la emulsión cada 40 μm y poder representar el estado de la misma en toda su extensión. Las curvas obtenidas proveen el flujo de luz transmitida o dispersada estándar respecto a un estándar (suspensión de esferas monodispersas y aceite de silicona) como función de la longitud de la muestra.

Inmediatamente finalizada la homogenización se colocó aproximadamente 6 ml de emulsión en la celda de medida y se procedió a ubicar la celda en el equipo. El *backscattering* de la luz monocromática ($\lambda = 850 \text{ nm}$) generado por las emulsiones se registró cada 1 minuto por 2 horas en función de la altura del tubo de muestra y se analizó si las mismas mantenían su estabilidad durante el tiempo analizado (almacenadas a temperatura ambiente).

Se obtuvieron cinéticas de cremado-floculación y coalescencia-floculación registrando la variación del %BS en función del tiempo en la parte inferior del tubo (10-15 mm desde la base) y en la parte superior (45-50 mm desde la base) del mismo (**Figura III.5**). Las medidas se realizaron por duplicado.

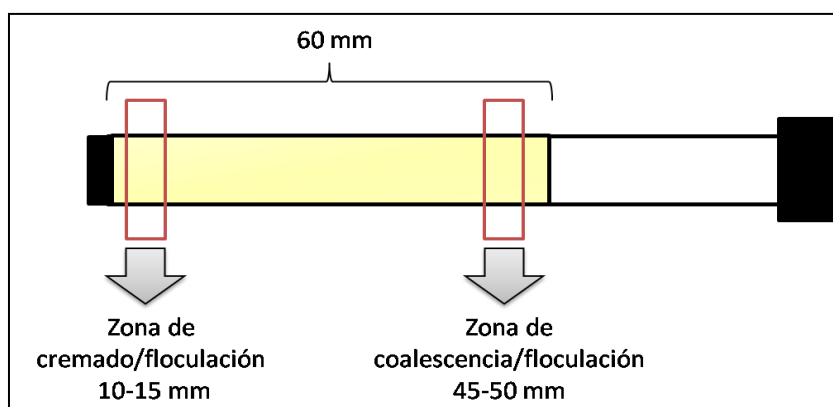


Figura III.5. Esquema simplificado la celda de medida y las zonas de análisis.

III.3.4. Preparación de las microcápsulas de aceite de pescado

III.3.4.1. Secado *spray*: El proceso de secado *spray* se realizó en un Mini *Spray Dryer* B-290 (Büchi Labortechnik AG, Suiza) equipado con una boquilla atomizadora de 700 µm de diámetro. Las emulsiones se introdujeron en la cámara principal (70 cm de diámetro) a través de una bomba peristáltica. Las condiciones de secado se fijaron usando un caudal de aire de secado de 357 l/h, la presión de aire del compresor en 6-8 bar y la temperatura del aire de entrada en $180 \pm 2^\circ\text{C}$ según Jafari y col. (2008).

Las microcápsulas secadas por *spray* se recogieron y almacenaron en recipientes de vidrio de color caramelo y se envolvieron con papel de aluminio, se mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 24 horas previo a ser caracterizadas. Se ensayaron dos réplicas preparadas individualmente para cada condición.

III.3.4.2. Liofilización: Las emulsiones se repartieron en bandejas de polipropileno, se congelaron a -80°C y se liofilizaron con un equipo Heto FD4 (LabEquipment, Dinamarca).

Los polvos obtenidos se molieron suavemente en un mortero y se almacenaron en recipientes de vidrio de color caramelo y se envolvieron con papel de aluminio, se mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 24 hasta su análisis. Se ensayaron dos réplicas preparadas individualmente para cada condición.

III.3.5. Caracterización de las microcápsulas

III.3.5.1. Contenido de humedad y porcentaje de sólidos recuperados

El contenido de humedad (**H**) de las microcápsulas se determinó gravimétricamente mediante secado en un horno de vacío (Arcano, Argentina) a 70°C y 20 mmHg hasta peso constante (durante 48 h).

El porcentaje de sólidos recuperados (**SR**) se calculó como la relación entre la cantidad de sólidos obtenidos luego del secado (m_f , en base seca) y la cantidad de sólidos iniciales en la emulsión de partida (m_i , en base seca), como se indica en la Ecuación III.5:

$$\text{SR (\%)} = \frac{m_f}{m_i} \times 100 \quad \text{Ecuación III.5}$$

Donde: SR es el porcentaje de sólidos recuperados (%), m_i es la masa de los sólidos secos presentes en la emulsión inicial (g, en base seca), y m_f es la masa del encapsulado obtenido luego del secado (g, en base seca).

Las determinaciones se realizaron por duplicado.

III.3.5.2. Contenido de proteínas

El porcentaje de contenido proteico total de las microcápsulas se determinó por la técnica de Kjeldahl (AOAC 920.53, 2005), utilizando el valor de 5,70 (Morr, 1982) como factor para relacionar el contenido de nitrógeno determinado con el de proteínas. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

III.3.5.3. Contenido total de aceite, contenido de aceite libre y eficiencia de encapsulación

El contenido total de aceite (**AT**) de las microcápsulas se determinó por el método Soxhlet (Método AOAC 920.39) utilizando éter etílico como disolvente de extracción. El AT extraído se pesó y se expresó como porcentaje de aceite con respecto al peso (en base seca) de las microcápsulas.

El contenido de aceite libre (**AL**) (fracción de aceite no encapsulado) de las microcápsulas se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Bae y Lee (2008) con algunas modificaciones. Brevemente, se añadió éter etílico (7,5 ml) a 0,5 g de polvo y la mezcla se agitó en un frasco de vidrio con tapa durante 2 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se filtró a través de un papel de filtro Whatman nº1 y el polvo recogido en el filtro se lavó, tres veces con 10 ml de éter etílico. Luego, el disolvente se dejó evaporar a temperatura ambiente hasta peso constante. El AL extraído se pesó y se expresó como porcentaje de aceite con respecto al peso (en base seca) de las microcápsulas.

La eficiencia de encapsulación (**EE**) se determinó de manera indirecta, estimando la proporción del aceite que se encuentra encapsulado como la diferencia entre el aceite total contenido en las microcápsulas (**AT**) y el aceite libre (**AL**) ubicado en su superficie, de acuerdo con la **Ecuación III.6**:

$$EE (\%) = \frac{AT - AL}{AT} \times 100 \quad \text{Ecuación III.6}$$

Donde: EE es la eficiencia de encapsulación (%), AT es el contenido total de aceite de las microcápsulas (%) y AL es el contenido de aceite libre de las microcápsulas (%).

Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

III.3.5.4. Color

El color de los encapsulados fue determinado utilizando un colorímetro Minolta Chroma meter (CR 400, Minolta Chroma Co., Osaka, Japón). Se empleó la escala CIE-L*a*b* para medir luminosidad (L*: 0=negro, 100=blanco) y cromaticidad (a*: +a=rojo, -a=verde y b*: +b=amarillo, -b=azul). El equipo fue calibrado utilizando una placa blanca provista por el fabricante (L*_{placa}=97,3;

$a^*_{\text{placa}}=0,14$; $b^*_{\text{placa}}=1,71$), que se usó como base para medir los encapsulados. Se realizaron nueve determinaciones para cada muestra.

La variación de color (ΔE^*) fue calculada mediante la **Ecuación III.7.**:

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^*_{\text{muestra}} - L^*_{\text{placa}})^2 + (a^*_{\text{muestra}} - a^*_{\text{placa}})^2 + (b^*_{\text{muestra}} - b^*_{\text{placa}})^2} \quad \text{Ecuación III.7}$$

Dónde: ΔE^* : diferencia total de color entre la muestra y la placa blanca, L^* : luminosidad, a^* y b^* : cromaticidad.

III.3.5.5. Morfología

Las microcápsulas secadas por *spray* se fotografiaron con una cámara digital (Kodak M853, Estados Unidos) para revelar sus aspectos macroscópicos.

El tamaño de las partículas y la morfología se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Los polvos se montaron en los porta-muestras utilizando una cinta de doble faz y se recubrieron con una capa delgada de oro utilizando un sistema de pulverización fría SCD 005 (BAL-TEC, Suiza). Las imágenes SEM se adquirieron con un microscopio electrónico de barrido (SEM 505, Philips, Países Bajos) a alto vacío con un voltaje de aceleración de 20 kV. Las muestras se observaron con aumentos de 500x, 1000x y 2000x. Se utilizó el programa ImageJ (ImageJ, National Institutes of Health, Estados Unidos) para determinar el tamaño de las microcápsulas secadas por *spray*.

La estructura y morfología de las microcápsulas secadas por *spray* también se observaron utilizando un microscopio láser de barrido confocal (**CSLM**) (LEICA TCS SP5, Mannheim, Alemania), equipado con un láser de argón. La fluoresceína y el rojo Nilo se usaron como sondas fluorescentes para teñir proteínas y aceite respectivamente. Para el marcado, se preparó una dispersión acuosa de APS al 5% p/v y se añadieron lentamente gotas de la solución de fluoresceína-5-isotiocianato (FITC, 10 mg/ml) mientras se agitaba suavemente. La tinción del aceite se realizó disolviendo el rojo Nilo en una concentración de 0,2 mg/ml. Luego, se mezclaron ambas fases para formar la emulsión y posteriormente secarla por *spray*. Los polvos se colocaron en un porta-objetos y se observaron con un objetivo de 63x (inmersión con aceite). Las muestras se excitaron a 488 nm y se detectaron secuencialmente a 500-550 nm (canal verde FITC) para detectar la fase de proteínas; y a 600-700 nm (canal rojo del Nilo) para detectar la fase del aceite de pescado.

III.3.5.6. Estabilidad oxidativa del aceite de pescado

El estado de oxidación del aceite de pescado luego de ser sometido al proceso de emulsificación y posterior deshidratación se determinó mediante la cuantificación del índice de peróxidos (IP) y de las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS). Asimismo, las microcápsulas de aceite de pescado se sometieron a un ensayo de estabilidad oxidativa en condiciones aceleradas empleando el equipo RANCIMAT.

Índice de peróxidos (IP). El aceite se extrajo según el método descrito por Partanen y col. (2005). Se pesó una muestra de cada polvo (0,5 g) en un tubo de ensayo y se suspendió en 5 ml de agua destilada. El tubo se agitó hasta la completa dispersión del polvo. Se tomó una alícuota 300 µl y se agitó 3 veces durante 10 s con 1,5 ml de una mezcla de isooctano/isopropanol (3:1 v:v). Las fases se separaron y la fase superior se tomó para el análisis. Se usó aceite de pescado (300 µl) como control. El índice de peróxidos se determinó espectrofotométricamente, según el método de Mancuso y col. (1999). Se añadió una alícuota del medio de extracción (200 µl) a 2,8 ml de metanol/butanol (2:1 v:v), seguido de 15 µl de una solución de tiocianato (3,94 mol/l) y 15 µl de hierro ferroso (0,072 mol/l de solución ácida). La muestra se agitó brevemente, se hizo reaccionar en la oscuridad durante 20 minutos y la absorbancia se midió a 510 nm con un espectrofotómetro Beckman DU650 (Beckman, Alemania). Las concentraciones de hidroperóxido de lípidos se determinaron utilizando una curva estándar de hidroperóxido de cumeno (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Estados Unidos). Las mediciones se realizaron por duplicado.

Ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBARS). El número de ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) se determinó de acuerdo con el método propuesto por Tironi y col. (2007) con algunas modificaciones. Una muestra de polvo (0,22 g) se homogeneizó con 1,78 ml de ácido tricloroacético al 5% p/v (TCA, Cicarelli, Argentina) y, después de 30 minutos, se centrifugó a 10000 xg durante 10 min a 20 °C en una centrifuga HERMLE Z 326 K (HERMLE Labortechnik GmbH, Alemania). 0,5 ml del sobrenadante se mezclaron con 0,5 ml de solución acuosa de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) al 0,5% p/v de en tubos cerrados. La mezcla se incubó 30 min a 70 °C con agitación suave y luego se determinó la absorbancia a 532 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman DU650 (Fullerton, CA, Estados Unidos). Los valores de TBARS se expresaron como mg de malondialdehído/kg de aceite de acuerdo con la **Ecuación III.8**:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de TBA (mg MDA/Kg de aceite)} = \frac{\text{Abs} \cdot \text{M} \cdot \text{Va} \cdot \text{Ve} \cdot 1000}{\epsilon \cdot \text{l} \cdot \text{m}} \quad \text{Ecuación III.8}$$

Donde: TBARS es el número de TBA (mg de malonaldehído/kg de aceite); Abs es la absorbancia a 532 nm; M es la masa molar de malonaldehído (72 g/mol); Vs es el volumen de muestra (0,5 ml); Ve es el volumen de extracto (1,78 ml); ϵ es el coeficiente de extinción molar del complejo coloreado ($1,56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$); l es el camino óptico (1 cm); y m es la masa de la muestra (en g). Las mediciones se realizaron por duplicado.

Análisis de estabilidad oxidativa en condiciones aceleradas (RANCIMAT). La estabilidad oxidativa del aceite de pescado y de las microcápsulas fue evaluada mediante ensayos acelerados de estabilidad oxidativa. Las determinaciones se realizaron en un equipo Rancimat modelo 743 (Metrohm AG, Herisau, Suiza). Brevemente, 1 g de aceite o 1 g de microcápsulas fueron calentadas a 90 °C bajo un caudal de aire de 20 l/h (García-Moreno y col., 2013). Los productos de oxidación de naturaleza volátil fueron transportados por dicha corriente de aire a una celda de medición donde se dispersaron en agua destilada. El registro de la conductividad de la dispersión acuosa en función del tiempo, permitió obtener las curvas de oxidación, cuyo punto de inflexión se designa como tiempo de inducción (TI) y representa una magnitud característica que permite evaluar la estabilidad oxidativa de la muestra. Este ensayo se realizó por duplicado para cada muestra.

III.3.6. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar y se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA). Los promedios se analizaron con la prueba HSD (*Honestly Significant Difference*) de Tukey para comparación pareada, con un nivel de significancia $\alpha = 0,05$, utilizando el software Statgraphics Plus versión 5.1 (Statgraphics, Estados Unidos).

III.4. Resultados y discusión

III.4.1. Emulsiones o/w de aceite de pescado estabilizadas por proteínas de soja

La relación proteína:aceite y la técnica de emulsificación utilizadas determinaron las características iniciales y la estabilidad de las emulsiones O/W resultantes. La **Figura III.6** muestra las imágenes obtenidas por microscopía óptica de las emulsiones estudiadas. Vale la pena señalar que, como en todos los casos se utilizó una dispersión **APS** al 5% p/v como fase acuosa, las emulsiones con una mayor relación proteína:aceite tienen una menor cantidad de aceite. Aquellas procesadas sólo por Ultraturrax (**UT**) mostraron un número menor de gotas de mayor

tamaño que las preparadas por Ultraturrax y Ultrasonido (**UT + US**), y parecerían tener diferentes distribuciones de tamaño.

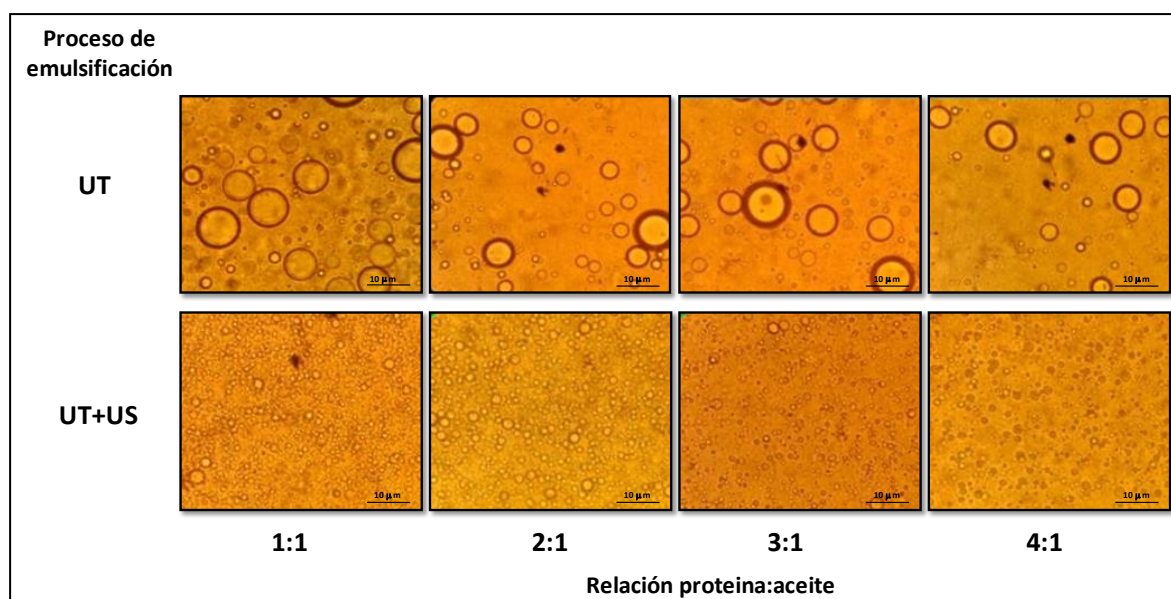


Figura III.6. Imágenes de microscopía óptica (100X) de las emulsiones de aceite de pescado en agua con diferente relación proteína:aceite (1:1, 2:1, 3:1 y 4:1 p/p), procesadas por Ultraturrax (UT) y Ultraturrax + Ultrasonido (UT + US).

Esto se confirmó mediante el análisis de dispersión de luz estática, que se muestra en la **Figura III.7** y en la **Tabla III.1**. Las emulsiones preparadas por **UT** presentaron comportamientos diferentes de acuerdo a la relación proteína:aceite.

Aquellas con proporciones de proteína más bajas (1:1 y 2:1) mostraron distribuciones bimodales de tamaño de partículas con dos poblaciones bien definidas, una predominante con un diámetro de partícula (d_p) de $\approx 20 \mu m$ y otra minoritaria con d_p de $\approx 0,2 \mu m$; mientras que las formuladas con mayores proporciones de proteína (3:1 y 4:1) presentaron distribuciones de tamaño de partículas monomodales con d_p mayores $\approx 28 \mu m$. La mayor heterogeneidad en el tamaño de las gotas de las emulsiones con menor relación proteína aceite también se visualizó en la mayor diferencia entre los diámetros medios De Brouckere ($D_{4,3}$) y Sauter ($D_{3,2}$) y el menor tamaño de las gotas se verificó en la mayor área interfacial específica (AIE) (**Tabla III.1**), siendo el área interfacial generada aproximadamente veinte veces superior a la presentada por las emulsiones 3:1 y 4:1.

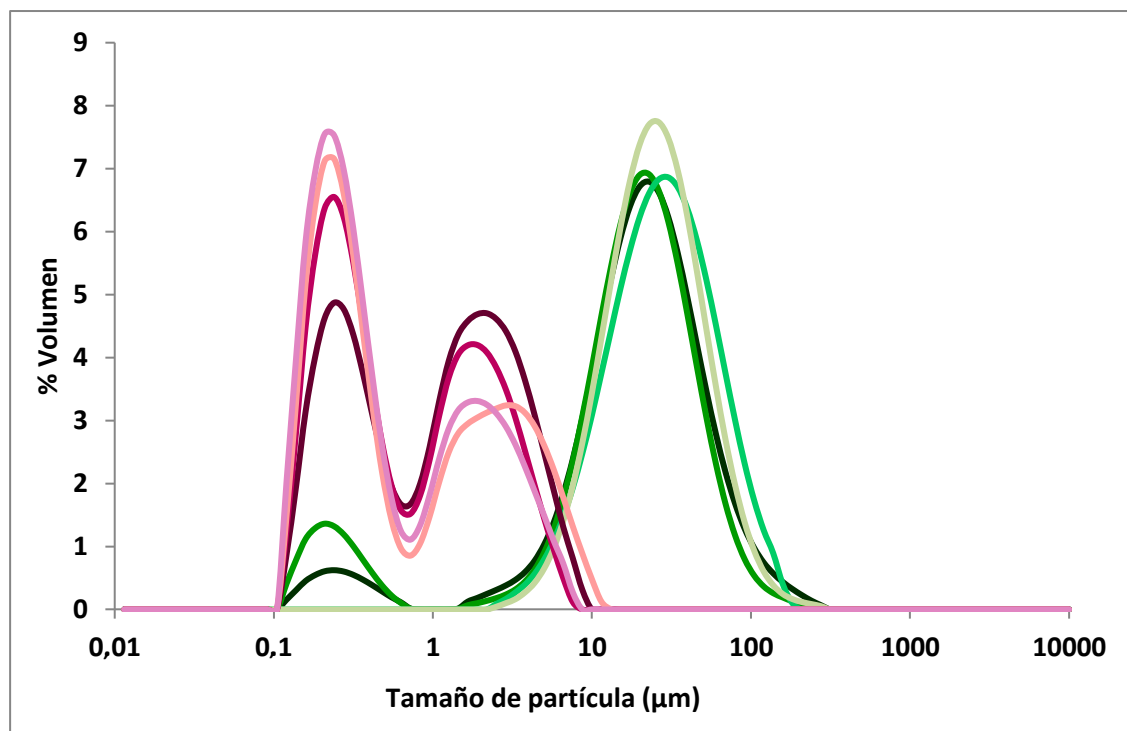


Figura III.7. Perfiles de las distribuciones de tamaño de partícula de las emulsiones de aceite de pescado en agua preparadas con diferente relación de proteína:aceite (p/p), procesadas por Ultraturrax (**UT**) (1:1, 2:1, 3:1, 4:1) y Ultraturrax + Ultrasonido (**UT + US**) (1:1, 2:1, 3:1, 4:1). Las distribuciones se expresaron en porcentaje de volumen de aceite.

Por otro lado, todas las emulsiones preparadas por **UT + US** presentaron distribuciones bimodales de tamaño de partícula con dos poblaciones definidas con $dp \approx 0,25 \mu m$ y $2,5 \mu m$ (**Figura III.7**), incrementándose la población de las gotas de menor tamaño (y en consecuencia aumentando el AIE) al disminuir la concentración de proteína (o aumentar la de aceite). Las menores diferencias entre $D_{4,3}$ y $D_{3,2}$ y las mayores AIE observadas en la **Tabla III.1** respecto de las emulsiones preparadas sólo por **UT**, se corresponden con la mayor uniformidad y menores tamaños de las gotas observadas en las microscopias (**Figura III.6**). Estos resultados pueden atribuirse a las características propias de ambos mecanismos de emulsificación. Cuando se emulsiona por **UT**, las gotas se forman por esfuerzo cortante en flujo laminar y/o esfuerzo cortante e inercial en flujo turbulento. Al agregar una etapa adicional de emulsificación con **US**, se aplica más energía al sistema (como trabajo mecánico) y las mayores fuerzas disruptivas generan una AIE mayor, provocando la aparición de un mayor número de gotitas más pequeñas. En este sentido, Jafari y col. (2008) también describieron que las emulsiones de aceite de pescado que contenían mezclas de maltodextrina y proteínas de suero como agentes emulsificantes (en relación pared:núcleo 4:1) obtenida por **UT + US** mostraron un diámetro de partícula más bajo que las preparadas sólo por **UT**.

Tabla III.1. Parámetros iniciales de las emulsiones de aceite de pescado en agua preparadas con diferentes proporciones de proteína:aceite (1: 1, 2: 1, 3: 1 y 4: 1 p/p), procesadas por Ultraturrax (UT) y Ultraturrax + Ultrasonido (UT + US). Diámetro de Broucker ($D_{4,3}$), diámetro de Sauter ($D_{3,2}$, diferencia entre $D_{4,3}$ y $D_{3,2}$ y área interfacial específica (AIE).

Proceso de emulsificación	Relación proteína:aceite	$D_{4,3}$ (μm)	$D_{3,2}$ (μm)	$D_{4,3} - D_{3,2}$ (μm)	AIE ($\mu\text{m}^2/\text{ml}$)
UT	1:1	$26,44 \pm 0,86^c$	$3,21 \pm 0,21^c$	23,23	$0,093 \pm 0,006^b$
	2:1	$22,54 \pm 0,51^b$	$1,62 \pm 0,13^b$	20,92	$0,093 \pm 0,008^b$
	3:1	$32,45 \pm 0,85^e$	$18,22 \pm 0,27^e$	14,23	$0,005 \pm 0,001^a$
	4:1	$28,64 \pm 1,09^d$	$17,04 \pm 0,58^d$	11,60	$0,004 \pm 0,001^a$
UT+US	1:1	$1,56 \pm 0,01^a$	$0,47 \pm 0,01^a$	1,09	$0,633 \pm 0,001^f$
	2:1	$1,14 \pm 0,01^a$	$0,38 \pm 0,01^a$	0,76	$0,399 \pm 0,001^e$
	3:1	$1,42 \pm 0,07^a$	$0,35 \pm 0,01^a$	1,07	$0,282 \pm 0,005^d$
	4:1	$1,03 \pm 0,02^a$	$0,32 \pm 0,01^a$	0,71	$0,232 \pm 0,002^c$

Los valores reportados para cada emulsión son promedios \pm desviación estándar ($n = 4$). Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), según la prueba de Tukey.

Teniendo en cuenta que la reología de las emulsiones condiciona su estabilidad y su posterior procesamiento, se analizó el comportamiento reológico de los sistemas estudiados. Los valores experimentales de esfuerzos de corte en función del gradiente de velocidad de deformación de todas las emulsiones se ajustaron satisfactoriamente al modelo de Newton ($r^2 > 0,97$). En la **Figura III.8** se observa que las emulsiones preparadas por **UT** casi duplicaron las viscosidades de las preparadas por **UT + US**, independientemente de la relación proteína: aceite. Tatar y col. (2017) resaltaron que los factores más importantes que afectan la reología de las emulsiones son la relación de aceite-agua (Φ), el tamaño y distribución de las gotas, las interacciones coloidales y la reología de la fase continua. En emulsiones con tamaño de gotas pequeño y fracciones volumétricas (Φ) pequeñas, la formación de una red tridimensional de tipo gel se vuelve difícil a menos que las emulsiones tengan gotitas flocluladas, lo que produce menores valores de viscosidad. En concordancia con ellos, las emulsiones formadas por gotitas más pequeñas procesadas por **UT + US** posiblemente tuvieron la capacidad de empaquetarse más eficientemente sin formar una red tridimensional, que las procesadas solo por **UT** y formadas por gotitas más grandes, provocando menores viscosidades. Si bien es de esperar que al aumentar la fracción volumétrica de la fase dispersa la viscosidad aumente, no se observaron diferencias significativas en las viscosidades de las emulsiones formadas por distintas relaciones de proteína: aceite (que implican distintas fracciones volumétricas) posiblemente debido a que las fracciones

estudiadas se corresponden con emulsiones diluidas ($0,01 < \Phi < 0,05$). Teniendo en cuenta que todas las emulsiones fueron preparadas usando una dispersión de proteínas al 5% como fase acuosa, el efecto de la fase continua no tendría peso en este trabajo. Por último, las viscosidades medidas no dieron indicio del posible efecto de las interacciones coloidales en la reología, también asociado a los procesos de desestabilización de las emulsiones.

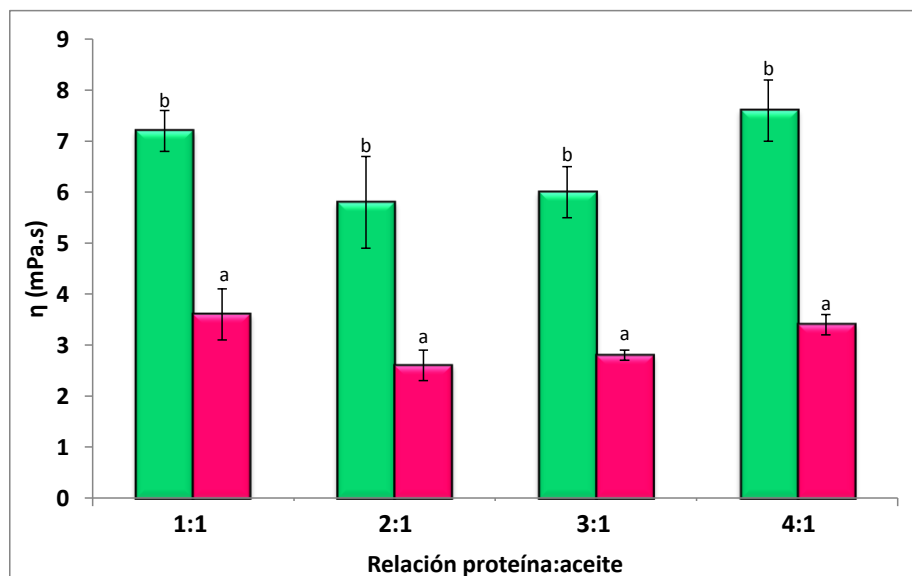


Figura III.8. Viscosidad de las emulsiones de aceite de pescado en agua preparadas con diferente relación de proteína:aceite (1:1, 2:1, 3:1 y 4:1 p/p), procesadas por Ultraturrax (UT) (■) y Ultraturrax + Ultrasonido (UT + US) (■).

Los valores reportados para cada encapsulado son promedios \pm desviación estándar ($n = 3$). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), según la prueba de Tukey.

La estabilidad de las emulsiones, que se muestra en la **Figura III.9**, se determinó comparando los porcentajes de *Backscattering* inicial (BS_0), inmediatamente después de formada la emulsión y después de dos horas de haber sido procesadas, para garantizar el tiempo necesario para procesarlas posteriormente por secado *spray*.

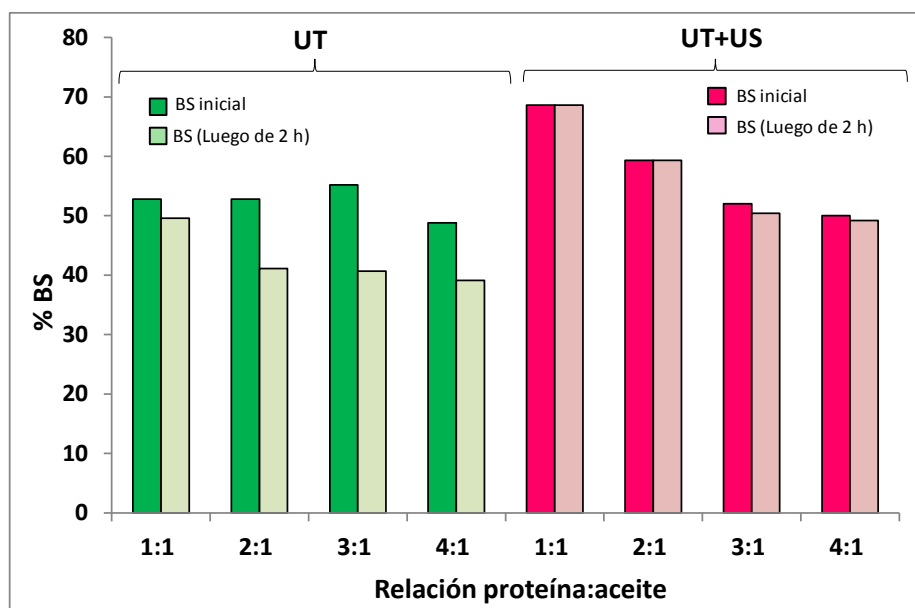


Figura III.9. Porcentaje de Backscattering en la parte inferior del tubo de medida (10-15 mm) de las emulsiones de aceite de pescado en agua preparadas con diferente relación de proteína:aceite (1:1, 2:1, 3:1 y 4:1 p/p), preparadas por Ultraturrax (UT) y Ultraturrax + Ultrasonido (UT + US). La figura muestra el Backscattering inicial (■ y ■) y su valor después de 2 h de almacenamiento estanco a temperatura ambiente (■ y ■), correspondiente al tiempo máximo para el secado por *spray* de las emulsiones.

Las emulsiones preparadas por **UT** mostraron aproximadamente 50-55% de BS_0 independientemente de la formulación; mientras que en aquellas procesadas por **UT + US**, el BS_0 disminuyó de 70 a 50% al aumentar la relación proteína:aceite. Las emulsiones con las proporciones de aceite más altas (1:1 y 2:1) formadas por una mayor proporción de gotas de aceite más pequeñas (preparadas por **UT + US**) mostraron el BS_0 más alto (> 60%), acorde con la dependencia del BS con el tamaño de gota de aceite y su concentración (Julio y col., 2016; Ixtaina y col., 2015). Pero el efecto del tamaño de gota en el BS_0 producto de los diferentes procesos de emulsificación no se visualizó en las emulsiones con menor concentración de aceite (3:1 y 4:1), evidenciando que algún otro fenómeno estaría influyendo en el backscattering. Una posible explicación podría ser que estas emulsiones al tener una fracción volumétrica (Φ) muy pequeña y consecuentemente poca cantidad de gotas de aceite, el valor de BS probablemente también este dado por agregados o interacciones de las proteínas de APS que se encuentran en la fase continua.

Después de dos horas, las emulsiones preparadas por **UT + US** prácticamente se mantuvieron estables mientras que las preparadas por **UT** disminuyeron su $\%BS \approx 10-20\%$. Esta disminución, que pareciera acrecentarse al aumentar la relación proteína:aceite, sería producto de cierta desestabilización por mecanismos de cremado-floculación pero que no llegaron a evidenciarse con una separación de fases (el % de BS en la parte superior del tubo no mostro cambios). La migración de las gotitas de aceite desde la parte inferior a la parte superior de la emulsión podría

conducir a una reducción progresiva de la concentración de gotitas de aceite en la parte inferior de la emulsión, y consecuente una disminución del valor de *Backscattering*. Las diferencias en la estabilidad de la emulsión podrían atribuirse principalmente a los tamaños de las gotas de aceite que en este trabajo estarían determinados principalmente por los procesos de emulsificación (Wang y col., 2016; Day y col., 2007), lo cual concuerda con lo establecido por la Ley de Stokes, donde la velocidad de migración de las gotas a la parte superior aumenta a medida que lo hace el radio de la gota.

III.4.2. Microcápsulas de aceite de pescado utilizando proteínas de soja como material de pared

Las condiciones de secado se establecieron en pruebas preliminares, analizando el efecto de la variación del caudal de alimentación (que se controló mediante la velocidad de rotación de la bomba) sobre el rendimiento del proceso de encapsulación. Para todas las formulaciones analizadas se observó que los mejores rendimientos de encapsulación se obtuvieron utilizando un caudal de 3,1 ml/min, valor que se seleccionó para seguir trabajando. Bajo las condiciones de procesamiento utilizadas, la temperatura de salida de aire resultó ser 96 ± 8 °C y todas las emulsiones estudiadas en la sección anterior pudieron ser secadas por *spray*.

Todos los polvos presentaron una coloración ligeramente amarillenta (**Figura III.10**) bastante similar a la del presentado por el aislado proteico de soja, y no resultaron ser aceitosos (u oleosos) al tacto ni exhibieron el olor característico del aceite de pescado.

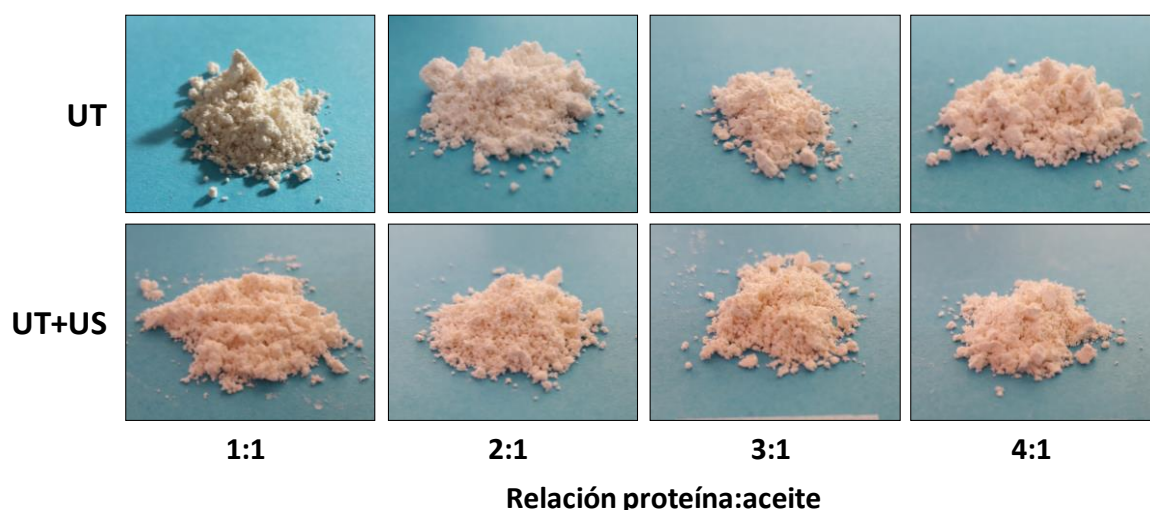


Figura III.10. Imagen de las microcápsulas deshidratadas por secado spray a partir de la emulsión preparada con una relación proteína:aceite de 4:1 p/p por UT+US.

La **Tabla III.2** muestra los parámetros de color de las microcápsulas deshidratadas por secado spray a partir de emulsiones preparadas con distinta relación proteína:aceite por UT y UT+US. El proceso de emulsificación pareció no influir significativamente en la coloración de los polvos como sí lo hizo la formulación. Al incrementar la proporción de proteínas (o disminuir la de aceite), la claridad de los encapsulados aumentó (mayor L*) y su coloración amarillenta disminuyó (menor b*) lo que resultó en un menor cambio de coloración (ΔE^*).

Tabla III.2. Parámetros de color CIE-Lab (L*, a* y b*) y diferencia de color total (ΔE^*) de las microcápsulas deshidratadas por secado spray a partir de emulsiones preparadas con distinta relación proteína:aceite por UT y UT+US.

Técnica de emulsificación	Relación proteína:aceite	L*	a*	b*	ΔE^*
UT	1:1	92,81 ± 1,22 ^a	-0,46 ± 0,13 ^c	11,10 ± 0,86 ^{c,d,e}	10,46 ± 1,21 ^c
	2:1	92,90 ± 1,72 ^a	-0,58 ± 0,12 ^{b,c}	10,54 ± 1,17 ^{b,c,d}	9,94 ± 1,81 ^{b,c}
	3:1	93,35 ± 1,71 ^{a,b}	-0,43 ± 0,18 ^c	10,25 ± 1,04 ^{b,c}	9,49 ± 1,63 ^{b,c}
	4:1	94,95 ± 0,62 ^{b,c}	-0,69 ± 0,03 ^{a,b}	8,64 ± 0,48 ^a	7,38 ± 0,56 ^a
UT+US	1:1	92,77 ± 1,06 ^a	-0,69 ± 0,08 ^{a,b}	11,39 ± 0,80 ^{d,e}	10,78 ± 0,65 ^c
	2:1	93,71 ± 0,49 ^{a,b,c}	-0,83 ± 0,06 ^a	9,67 ± 0,62 ^{a,b}	8,80 ± 0,56 ^{a,b}
	3:1	94,22 ± 0,57 ^{a,b,c}	-0,63 ± 0,08 ^b	12,01 ± 0,43 ^e	10,79 ± 0,51 ^c
	4:1	95,31 ± 0,38 ^c	-0,82 ± 0,05 ^a	9,91 ± 0,34 ^b	8,50 ± 0,33 ^{a,b}

Los valores reportados para cada encapsulado son promedios ± desviación estándar (n = 9). Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras (p < 0,05), según la prueba de Tukey.

La **Tabla III.3** muestra la composición química de los microencapsulados, y la eficiencia de encapsulación (EE) de cada proceso. El contenido de humedad (H) también pareció depender sólo de la formulación, ya que, para ambos procesos de emulsificación, los encapsulados preparados con una proporción de proteína:aceite de 3:1 mostraron el mayor valor. La relación de proteína:aceite resultante después del secado *spray* permaneció similar a la de la formulación inicial (1:1; 2:1; 3:1 y 4:1) en las muestras emulsionadas por **UT + US**, mientras que aquellas microcápsulas procesadas solo por **UT**, mostraron mayores proporciones (1,8:1; 2,8:1; 4,0:1 y 5,6:1, respectivamente). La menor estabilidad de estas emulsiones (**Figura III.9**), formadas por gotas de aceite más grandes (**Figura III.7**) provocaría la pérdida de una mayor proporción de lípidos que de proteínas durante el secado *spray*.

Estos resultados también se reflejaron en los valores del rendimiento de sólidos recuperados luego de la deshidratación (**Figura III.11**). Las micropartículas preparadas a partir de emulsiones

formadas por **UT + US** presentaron los mayores valores de **SR** (> 46%), independientemente de su relación proteína:aceite, mientras que en las provenientes de emulsiones procesadas sólo por **UT**, los **SR** fueron aumentando con la relación proteína:aceite de $\approx 23\%$ a $\approx 43\%$ (siendo este último valor estadísticamente similar a los tratados por **UT + US**). En todos los casos, las pérdidas de masa se produjeron por la adhesión del producto a las paredes de la cámara de secado y luego a las del ciclón, de acuerdo con Sosnik y Seremeta (2015), que reportaron **SR** típicos entre 20% y 70% para el secado por *spray*, dependiendo de las condiciones del proceso y las características de la muestra.

Tabla III.3. Contenido de humedad (**H**), proteína (**P**), aceite total (**AT**), aceite libre (**AL**), porcentaje de sólidos recuperados (**SR**) y eficiencia de encapsulación (**EE**) de las microcápsulas deshidratadas por secado *spray* a partir de emulsiones preparadas con distinta relación proteína:aceite por UT y UT+US.

	Relación proteína:aceite	H (%)	P (%)	AT (%)	AL (%)	EE (%)
UT	1:1	5,10 \pm 1,21 ^{b,c}	52,36 \pm 1,12 ^{b,c}	27,82 \pm 2,43 ^c	11,57 \pm 1,79 ^c	57,82 \pm 6,27 ^a
	2:1	2,32 \pm 0,01 ^{a,b}	62,95 \pm 0,09 ^d	21,84 \pm 2,39 ^{b,c}	6,65 \pm 0,95 ^c	69,20 \pm 5,50 ^{a,b}
	3:1	8,29 \pm 1,21 ^d	64,27 \pm 0,94 ^{d,e}	15,69 \pm 0,67 ^a	4,86 \pm 0,80 ^b	69,10 \pm 5,56 ^{a,b}
	4:1	3,88 \pm 0,55 ^{a,b}	68,24 \pm 2,35 ^e	12,14 \pm 1,94 ^a	4,35 \pm 1,82 ^b	65,19 \pm 11,04 ^a
UT+US	1:1	3,92 \pm 0,08 ^{a,b}	38,78 \pm 0,39 ^a	48,77 \pm 1,20 ^d	16,06 \pm 2,46 ^c	66,93 \pm 4,55 ^{a,b}
	2:1	1,62 \pm 0,49 ^a	49,63 \pm 1,34 ^b	28,94 \pm 1,49 ^c	12,23 \pm 1,48 ^c	57,73 \pm 1,83 ^a
	3:1	9,23 \pm 0,25 ^d	56,10 \pm 0,39 ^c	20,16 \pm 0,85 ^{a,b}	6,06 \pm 0,71 ^b	69,82 \pm 4,89 ^{a,b}
	4:1	6,80 \pm 0,79 ^{c,d}	60,64 \pm 0,23 ^d	15,21 \pm 1,49 ^a	1,26 \pm 0,42 ^a	88,74 \pm 3,15 ^b

Los valores reportados para cada encapsulado son promedios \pm desviación estándar (n = 2). Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras (p < 0,05), según la prueba de Tukey.

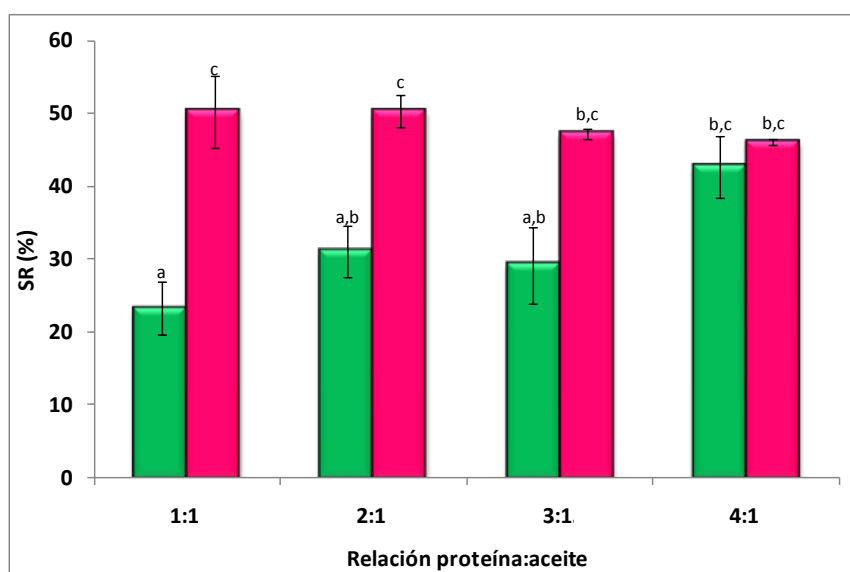


Figura III.11. Porcentaje de sólidos recuperados (**SR**) de las microcápsulas deshidratadas por secado *spray* a partir de emulsiones preparadas con distinta relación proteína:aceite por UT (■) y UT+US (■). Los valores reportados para cada encapsulado son promedios \pm desviación estándar ($n = 2$). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), según la prueba de Tukey.

Por otro lado, la eficiencia de encapsulación para todas las formulaciones estudiadas se mantuvo entre 57% y 69%, excepto para la emulsión 4:1 preparada por **UT + US**, que presentó la mayor eficiencia de encapsulación ($EE \approx 90\%$). Es evidente que la relación proteína:aceite y el proceso de emulsificación desempeñaron un papel fundamental en la EE, ya que las mismas formulaciones tratadas sólo con **UT** o las emulsiones con relaciones proteína:aceite más bajas procesadas por **UT+US** mostraron **EE** significativamente menores que la emulsión 4:1 procesada por UT+US. Posiblemente el tamaño de las gotas, la viscosidad de las emulsiones y la proporción de proteínas y aceite afectarían la EE, así como al aumentar la concentración de proteínas, habría una menor cantidad de aceite libre en los productos. Wang y col. (2016) también observaron un incremento en la EE al aumentar la concentración de proteínas de suero de leche, y lo atribuyeron principalmente a la reducción del tiempo necesario para formar una corteza semipermeable en la interfaz gota-aire durante el secado por *spray*, siendo más dificultoso que el aceite difunda a la superficie de la partícula durante el secado. Jafari y col. (2008) también observaron que el aumento en el contenido de aislado proteico de suero produjo un aumento en la viscosidad de la emulsión que redujo la movilidad de las gotas durante el secado favoreciendo la retención de aceite. Aunque en este trabajo no se observó un aumento de la viscosidad, las muestras con las concentraciones más altas de proteínas emulsionadas por **UT+US** mostraron la mayor eficiencia de encapsulación.

La **Figura III.12** muestra las imágenes tomadas por SEM de las microcápsulas de proteína de soja y aceite de pescado obtenidas por secado *spray* a partir de emulsiones formadas con distinta relación proteína:aceite procesadas por UT y UT+US. Sus diámetros aparentes medios, estimados a partir de las imágenes, fueron de 15-20 μm para todas las muestras. Sin embargo, se observaron amplias distribuciones de tamaño (de 5 a 40 μm), típicas para partículas secadas por *spray* (Carneiro y col., 2013). La relación proteína:aceite y las características de las emulsiones, como la distribución del tamaño de las partículas y la estabilidad, no parecieron influir en el tamaño de las microcápsulas, el cual está condicionado principalmente por el diámetro de la boquilla utilizada durante el secado *spray*. Las diferencias en la viscosidad de las emulsiones observadas en este trabajo tampoco parecieron afectar el tamaño de las partículas, a pesar de que se ha informado un aumento en el tamaño de las microcápsulas debido a la formación de gotas más grandes

durante la atomización cuando se trabaja con emulsiones de mayor viscosidad (Drusch y col., 2007). Las partículas mostraron una forma esférica, lisa, caracterizada por la presencia de abolladuras en la superficie (indentaciones) (**Figura III.12**). Según I Ré (1998), tales abolladuras/indentaciones resultan de los procesos lentos de formación de la película durante el secado de las gotitas atomizadas, siendo estas depresiones superficiales la consecuencia del colapso de las gotitas durante las primeras etapas del proceso de secado. En nuestro estudio, la formación de estas abolladuras en las superficies externas pareció aumentar con la relación proteína:aceite. Fäldt y Bergenståhl (1996), también describieron un comportamiento similar e informaron que esta morfología es típica de encapsulados de aceite con altas concentraciones de proteínas.

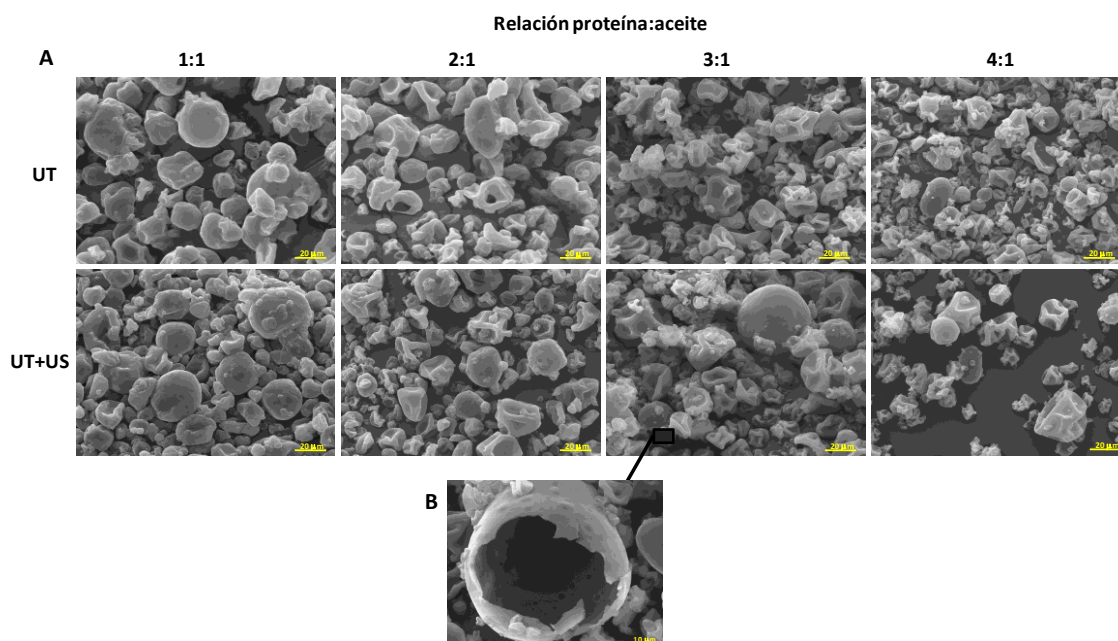


Figura III.12. A) Micrografías electrónicas de barrido (SEM) de la morfología externa (topografía) de las microcápsulas deshidratadas por secado spray a partir de emulsiones preparadas con distinta relación proteína:aceite por UT y UT+US. SEM a 500x de aumento. **B)** Morfología interna típica (topografía) de las microcápsulas obtenidas después del secado *spray* de emulsiones de aceite de pescado en agua preparadas con una relación proteína:aceite de 3:1 p/p y procesadas por UT+US. SEM a 1000x de aumento.

No se encontraron evidencias de grietas, fisuras o agujeros en las observaciones de SEM (**Figura III.12.A**), lo cual es una ventaja y sugiere que las proteínas de soja fueron eficientes para encapsular el aceite de pescado. Sin embargo, fue posible encontrar algunas microcápsulas rotas, como la preparada a partir de la emulsión 3:1 procesada por **UT+US** que se muestra en la **Figura III.12.B**, que permitieron observar la topografía interna típica de las partículas estudiadas. En el interior, las microcápsulas estaban huecas y las gotitas de aceite de pescado se adhirieron a la superficie o se incrustaron en la matriz del material de pared. La formación de huecos centrales

en las partículas secadas por *spray* se atribuyó a la expansión de la microcápsula (o "inflado") causada por la rápida fijación de la estructura de la partícula en la etapa temprana de secado con la posterior formación de vapor en el interior de la partícula y su hinchamiento (Rosenberg, y col., 1988; Nijdam y Langrish, 2006; Jafari y col., 2008). Wang y col. (2016) también observaron partículas huecas con abolladuras irregulares que aparecieron en las superficies cuando encapsularon aceite de pescado con aislado proteico de suero. Estos autores relacionaron los mecanismos para la formación de la estructura central hueca con la expansión de la partículas durante los últimos períodos del secado, y las abolladuras a la contracción que se produce durante las primeras etapas del proceso de secado (Botrel y col., 2014).

El aceite de pescado se dispersó dentro de la pared de la microcápsula en forma de pequeñas gotas con un tamaño similar ($\approx 1,4 \mu\text{m}$) que los informados para la emulsión de origen (**Tabla III.1** y **Figura III.7**). Esto puede atribuirse tanto a la rápida formación de la corteza (o solidificación) que evita la coalescencia de las gotitas dispersas como a la buena estabilidad de la emulsión durante la atomización y posterior secado (I Ré, 1998). Jafari y col. (2008) informaron que una formación rápida de la corteza podría estar asociada con niveles bajos de contenido de aceite superficial debido a que resultaría difícil que las gotas de aceite de pescado se expongan en la superficie de las cápsulas.

La ubicación de cada componente en las microcápsulas se intentó dilucidar por microscopía láser de barrido confocal utilizando sondas fluorescentes específicas, **FITC** que permitió visualizar en color verde a las proteínas (**Figura III.13.A**) y rojo Nilo que permitió visualizar en color rojo a los lípidos (**Figura III.13.B**). Las proteínas de soja se co-localizaron con las gotas de aceite de pescado (**Figura III.13.C**), sugiriendo que las microcápsulas resultantes fueron del tipo matriz donde se integran el aceite y el material de pared (Raybaudi-Massilia y Mosqueda-Melgar, 2012; Bakry y col., 2016). En las imágenes también se pudieron observar los huecos centrales en las partículas, en concordancia con las observaciones de SEM discutidas previamente y con las informadas por Wang y col. (2016), quienes describieron microcápsulas de tipo matriz similares formuladas con aceite de pescado y proteínas de suero.

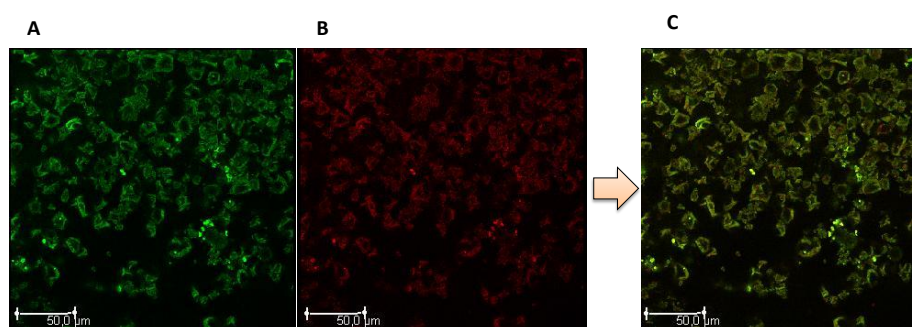
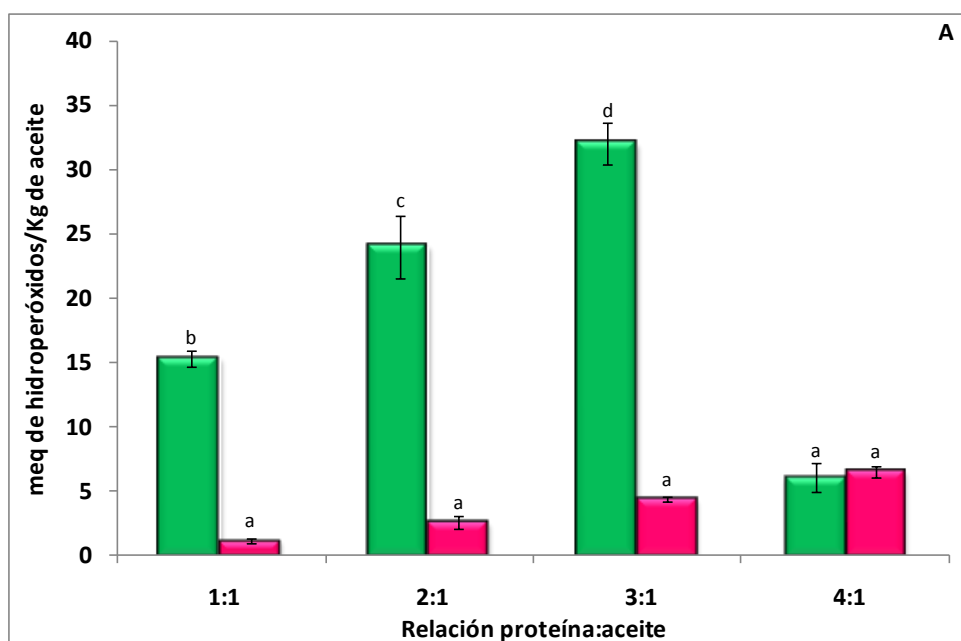


Figura III.13. Micrografía de barrido láser confocal (CLSM) de las microcápsulas deshidratadas por secado spray a partir de emulsiones de aceite de pescado en agua preparadas con una relación proteína:aceite de 4:1 p/p, procesadas por Ultraturrax + Ultrasonido. CLSM a 63x de aumento.

Doble tinción de la emulsión O/W con: **(A)** El color verde representa la proteína de soja teñida con FITC. **(B)** El color rojo representa el aceite de pescado teñido con rojo Nilo. **(C)** Representa la colocación de ambos colorantes.

La auto-oxidación de lípidos es una alteración química que se produce por radicales libres a través de reacciones en cadena. Los peróxidos son los productos primarios producidos al inicio de esta alteración que luego se degradan en otros productos, como alcoholes, cetonas, aldehídos y compuestos volátiles, responsables de los olores indeseables en los alimentos (Barrow y Wang, 2013). Estos compuestos de oxidación secundarios pueden determinarse como compuestos reactivos al ácido 2-tiobarbitúrico (Jiménez-Martín y col., 2015; Shaw y col., 2007), entre otros métodos. La **Figura III.14** muestra el índice de peróxido (IP) y el valor del ácido tiobarbitúrico (TBARS) para las muestras estudiadas. El aceite de pescado utilizado como materia prima presentó un bajo contenido de peróxidos ($IP = 1,067 \pm 0,009$ meq/kg) y no fue posible cuantificar productos secundarios de oxidación por la técnica de TBA, indicando que la autooxidación de lípidos aún no había comenzado o estaba en sus etapas iniciales. Los procesos de emulsificación y secado *spray*, así como la formulación utilizada para la encapsulación, afectaron la estabilidad oxidativa del aceite de pescado.



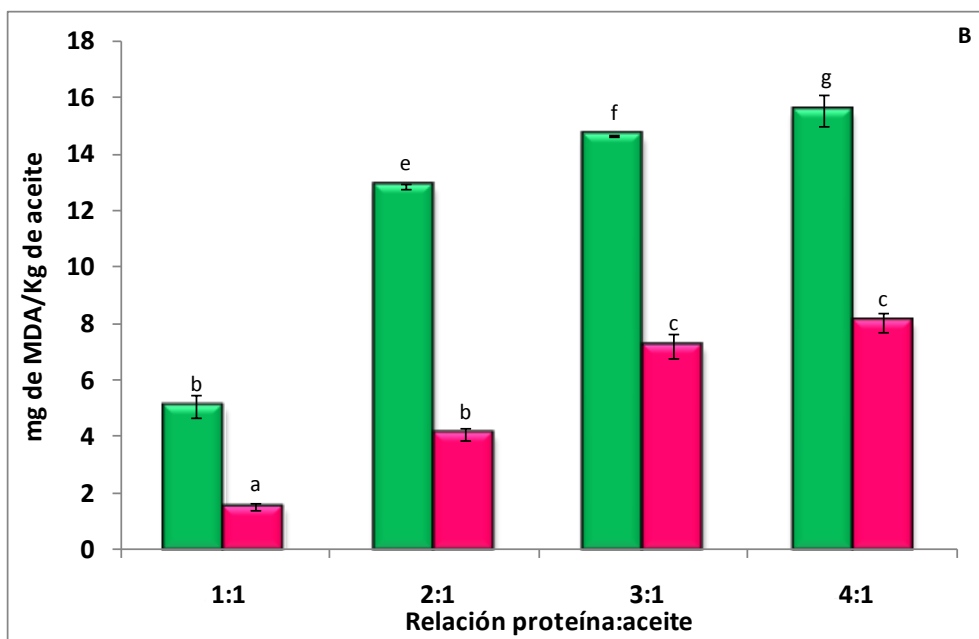


Figura III.14. Índices de peróxido (A) y TBARS (B) de las microcápsulas deshidratadas por secado spray a partir de emulsiones preparadas con distinta relación proteína:aceite por UT (■) y UT+US (■). Los valores reportados para cada encapsulado son promedios \pm desviación estándar ($n = 2$). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), según la prueba de Tukey.

Inesperadamente, todos los encapsulados presentaron mayores valores de IP y TBARS que los correspondientes al aceite de pescado libre. Encina y col. (2016), mencionaron que aunque muchos estudios han reportado una mejora en la estabilidad del aceite de pescado cuando se lo microencapsula, hay algunos trabajos en los que se ha descrito una menor estabilidad del aceite de las micropartículas cuando se los comparó con el aceite de pescado sin encapsular. En este sentido, Kolanowski y Laufenberg (2006) encontraron que la encapsulación de aceite de pescado con metilcelulosa no mejoró significativamente su estabilidad oxidativa (al evaluar el índice de peróxidos) con respecto al aceite de pescado sin encapsular, a pesar de la alta eficiencia de encapsulación alcanzada (más del 80%); y lo atribuyeron a la mayor área superficial de las micropartículas en comparación con el aceite libre. Serfert y col. (2009) también informaron que el aceite de pescado encapsulado con almidón modificado y jarabe de glucosa con diferentes antioxidantes agregados mostró índices de peróxido más altos que los del aceite puro.

Wang y col. (2016) también observaron que encapsulados formados con proteínas de suero presentaban valores de peróxidos superiores a los del aceite en la etapa inicial de almacenamiento y lo atribuyeron a la oxidación de la superficie de la partícula o del aceite que se encuentra cerca de la superficie durante la preparación de las microcápsulas, cuando se exponían al aire. Ellos también mencionaron investigaciones previas en las que sugerían que la auto-oxidación del aceite central encapsulado o no encapsulado probablemente estaría favorecida durante el proceso de secado al usar un material de pared con mayor capacidad de formación de

película, que podría catalizar la oxidación posterior durante el almacenamiento (Drusch y Berg, 2008; Wang y col., 2011), dado que la formación rápida de la corteza posiblemente impedía la evaporación, aumentando rápidamente la temperatura de las partículas durante el secado. Así, el período de exposición del aceite libre de las partículas a la alta temperatura se prolongaría; dando como resultado valores de peróxido aumentados por encima del aceite de pescado crudo sin procesar en la etapa temprana de almacenamiento. Por otra parte, otros autores propusieron que el hinchamiento de las partículas durante el secado conducía a la inclusión de aire en el interior, acelerando las reacciones de oxidación (Drusch y Schwarz, 2006; Keogh y col., 2001).

Los encapsulados emulsionados por **UT** presentaron valores de IP y TBARS significativamente mayores que los procesados por **UT + US**, con la excepción de los formulados con una relación proteína:aceite de 4:1, que mostraron valores de IP similares, independientemente de la tecnología de emulsificación utilizada. Pero como esa formulación emulsificada solo por **UT** fue la que mostró el valor más alto de TBARS, este valor de IP correspondería a un período más avanzado de oxidación, cuando los peróxidos inestables bajan su concentración debido a su oxidación posterior para formar otros compuestos, tales como aldehídos y cetonas (Drusch, y col., 2007). Durante la emulsificación con **UT** se incorpora una cierta cantidad de aire en la dispersión, que junto con la luz facilitaría el comienzo de las reacciones de oxidación. Luego, la etapa con **US** podría eliminar parte del oxígeno incorporado, retrasando la autooxidación. La oxidación también podría acelerarse con el aumento de la temperatura durante el secado *spray*. Pero aunque la temperatura de secado se fijó en 180 °C, la temperatura efectiva de las gotas fue menor (\cong 60 °C) (Masters, 1991) y el tiempo de residencia en el equipo fue mínimo (\cong 1-2 s). Más allá de estas observaciones, todas las formulaciones preparadas por **UT + US** mostraron valores de IP inferiores a 10 meq /Kg de aceite, que es el IP máximo permitido por el Código Alimentario Argentino (CAA) para la comercialización de aceites (www.anmat.gov.ar).

También inesperadamente, para las microcápsulas obtenidas por las dos procesos de emulsificación, los índices de IP y de TBARS aumentaron con la relación proteína:aceite. Al reducir la proporción de aceite de pescado en los encapsulados, los valores de TBARS aumentaron notablemente (\approx 200% para **UT** vs. \approx 300% para **UT + US**). Era de esperar que la muestra 4:1 procesada por **UT + US** que había presentado la mayor eficiencia de encapsulación, hubiese sido la que mostrara la mayor estabilidad oxidativa del aceite de pescado. En este sentido, Drusch y Schwarz (2006) informaron que la cantidad de aceite superficial, que probablemente representa una alta proporción de aceite no encapsulado, sería menos significativa en la oxidación del aceite y la estabilidad en almacenamiento que la estructura de las partículas y las propiedades del material encapsulante. Wang y col. (2016) observaron que los encapsulados con una mayor concentración de proteínas mostraron una menor estabilidad a la oxidación antes de los 20 días, a

pesar de una mayor eficiencia de encapsulación. Y lo atribuyeron por un lado a que el proceso de formación de las cápsulas es más rápido en aquellas emulsiones con alto contenido de proteínas, lo que posiblemente va acompañado de un aumento en la resistencia a la evaporación y en consecuencia un aumento de la temperatura a las que se somete a las partículas durante el secado. Por otro lado, estos autores explicaron que el menor contenido de proteínas en las muestras con alto contenido de aceite evitaría de alguna manera que el aceite libre se expusiera a altas temperaturas durante un período largo de tiempo; produciendo finalmente velocidades de oxidación iniciales menores que aquellas muestras con mayor relación de proteína/aceite.

Además, cabe señalar que los aislados de proteína de soja contienen bajas cantidades de cationes divalentes, como cobre y hierro (<http://www.guia-nutricion.com>), que podrían también catalizar la autooxidación de ácidos grasos insaturados en el aceite de pescado. Trabajando con otros biopolímeros, otros autores intentaron mejorar la estabilidad del aceite encapsulado mediante la incorporación de agentes quelantes como el ácido cítrico (Drusch y Berg, 2008) para disminuir la actividad de estos iones.

Para estudiar la estabilidad oxidativa de los encapsulados durante el almacenamiento, se determinó el tiempo de inducción (TI) obtenido a partir de la prueba de oxidación acelerada de Rancimat. Los resultados de este ensayo se muestran en la **Figura III.15**.

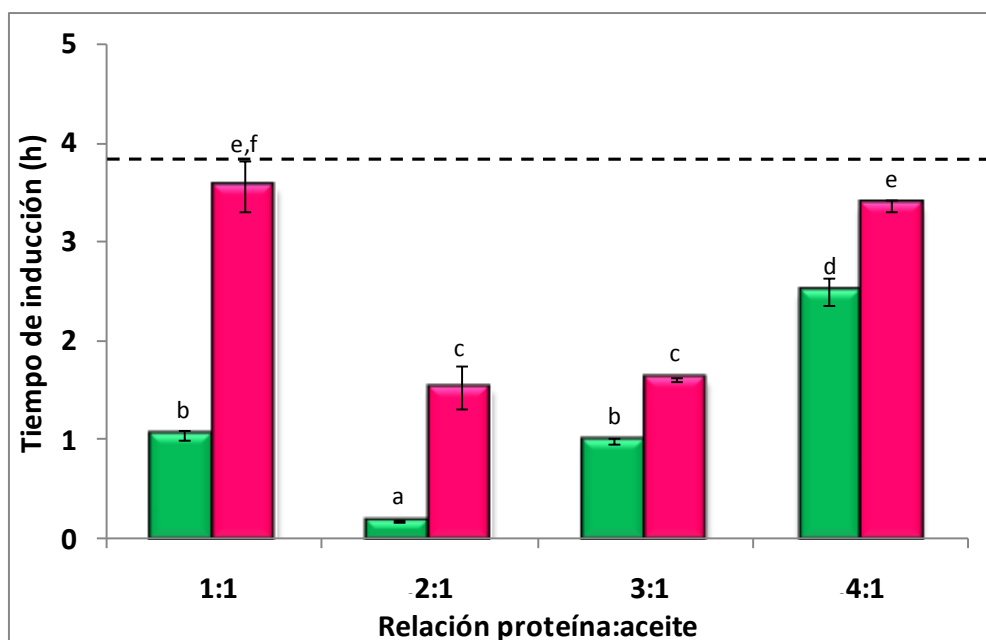


Figura III.15. Tiempo de inducción (TI) de las microcápsulas deshidratadas por secado spray a partir de emulsiones preparadas con distinta relación proteína:aceite por UT (■) y UT+US (■). (-----) indica el valor de TI para el aceite puro.

Los valores reportados para cada encapsulado son promedios \pm desviación estándar ($n = 2$). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), según la prueba de Tukey.

La prueba acelerada de Rancimat ha ganado aceptación como una medida indirecta de la estabilidad del aceite, en donde la muestra se trata bajo condiciones controladas en las que el proceso oxidativo alcanza sus pasos finales, ya que los lípidos se oxidan a compuestos volátiles de cadena corta, que se recolectan en agua destilada aumentando la conductividad de la misma. Cuanto más alto es el tiempo requerido para producir un aumento repentino de la conductividad (TI), más estable resulta la muestra. Todas las microcápsulas emulsificadas por **UT** fueron más susceptibles a la oxidación que las procesadas por **UT + US**, ya que tuvieron los tiempos de inducción más cortos. Para ambas técnicas de emulsificación, las formulaciones 1:1 y 4:1 presentaron los tiempos de inducción más largos; pero sólo el preparado por **UT + US** con la relación 1:1 fue estadísticamente similar al del aceite de pescado sin encapsular (TI = $3,91 \pm 0,25$ h). Parecería que las muestras con relación proteína:aceite 1:1 preparadas por **UT + US** lograron proteger el aceite de pescado durante su microencapsulación (por los valores iniciales de IP y TBARS) y también mantienen su estabilidad oxidativa en el tiempo; mientras que las muestras 4:1 preparadas por **UT + US**, que mostraron la mayor EE, también lograron mantener su estabilidad oxidativa, a pesar de presentar los valores más altos de IP y TBARS para las muestras procesadas por **UT + US**.

Con el fin de estudiar el efecto del proceso de deshidratación sobre las propiedades de las microcápsulas de aceite de pescado y proteínas de soja, se evaluó la **lioofilización** como otra tecnología de secado. A partir de los resultados obtenidos anteriormente, se seleccionaron las emulsiones con relación proteína:aceite de 1:1 y 4:1 procesadas por UT+US (con mayor estabilidad oxidativa) para deshidratarlas por liofilización.

Las emulsiones estudiadas pudieron deshidratarse por liofilización. Cabe destacar que estas emulsiones, necesitaron congelarse a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para ser procesadas por liofilización, y que el tiempo de deshidratación fue significativamente más largo que el utilizado para secar por *spray* (aproximadamente 48 h vs. 2 h respectivamente). Estas diferencias resultarían ser significativas y necesarias de considerar al momento de pensar en escalar el proceso de obtención.

A su vez, fue necesario moler cuidadosamente la muestra liofilizada para seguir trabajando, lo cual produjo que las microcápsulas obtenidas por liofilización mostraran una apariencia de estructura laminar o en forma de “escamas”, diferenciándose considerablemente de las obtenidas por secado *spray* (polvo granulado con partículas similares a esferas).

En todos los casos, se obtuvieron polvos ligeramente amarillentos, que no presentaron una apariencia aceitosa al tacto ni el olor característico del aceite de pescado, al igual que lo encontrado con las secadas por *spray*.

En la **Tabla III.4** se muestra el porcentaje de sólidos recuperados (**SR**) y la eficiencia de encapsulación (**EE**), junto con el aceite total y aceite libre de cada proceso.

Los encapsulados obtenidos por liofilización presentaron los porcentajes de **SR** más altos ($\approx 98\%$). La diferencia encontrada en comparación con las secadas por *spray* se debe a que estas últimas se someten a pérdidas de masa que son producidas por la adhesión del producto al equipo de secado, lo cual se comentó anteriormente en este capítulo. El alto valor de **SR** presentados por las muestras liofilizadas es causado principalmente porque el proceso de secado no presenta alguna etapa que genere una pérdida de sólidos significativa. En general, se pueden describir tres procesos en el secado por liofilización. El primero de ellos es la congelación, seguido por un secado primario y por último un secado secundario. En la primera etapa, la muestra se enfría a una temperatura (generalmente entre -20°C y -80°C) a la que el agua se cristaliza al máximo junto con la cristalización de algunos componentes sólidos solubles y de los lípidos. La etapa siguiente es la sublimación, donde se transforma el hielo en vapor de agua a baja presión y por último ocurre un secado por desorción, donde se elimina el agua adicional adsorbida (unida sin congelar) de los sólidos (Oetjen y Haseley, 2004). Estas etapas podrían considerarse casi sin pérdida de sólidos, por lo que es esperable el alto porcentaje de **SR**.

Tabla III.4. Contenido de aceite total (**AT**), aceite libre (**AL**), porcentaje de sólidos recuperados (**SR**) y eficiencia de encapsulación (**EE**) de las microcápsulas obtenidas después del secado por *spray* o liofilización de las emulsiones de aceite de pescado en agua preparadas con diferente relación proteína:aceite (1:1 y 4:1 p/p), procesadas por Ultraturrax + Ultrasonido (**UT + US**).

Proceso de secado	Relación proteína:aceite	SR (%)	AT (%)	AL (%)	EE (%)
Secado <i>spray</i>	1:1	$53,78 \pm 5,25^a$	$48,77 \pm 1,20^c$	$16,06 \pm 2,46^c$	$66,93 \pm 4,55^c$
	4:1	$49,41 \pm 2,91^a$	$15,21 \pm 1,49^{a,b}$	$1,26 \pm 0,42^a$	$88,74 \pm 3,15^d$
Liofilización	1:1	$98,89 \pm 1,15^b$	$47,77 \pm 0,37^c$	$30,07 \pm 0,73^d$	$37,05 \pm 2,79^a$
	4:1	$98,45 \pm 0,61^b$	$16,20 \pm 1,86^b$	$7,08 \pm 0,17^b$	$56,30 \pm 3,26^b$

Los valores reportados para cada encapsulado son promedios \pm desviación estándar ($n = 2$). Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), según la prueba de Tukey.

Por otro lado, el aceite total se mantuvo en los valores esperados según la formulación en cada proceso de secado, por lo que la relación de proteína:aceite resultante podría considerarse que permaneció similar a la de la formulación inicial (1:1 y 4:1 respectivamente).

El porcentaje de aceite libre sí presentó diferencias y por ende también la eficiencia de encapsulación. Tanto para la formulación 1:1 como 4:1 secadas por liofilización, presentaron una **EE** menor que las respectivas formulaciones secadas por *spray*. Para ambos procesos de secado la

formulación 4:1 presentó el mayor valor de EE, y esto podría deberse a que tiene mayor proporción de agente encapsulante para recubrir el aceite de pescado.

Los bajos valores de EE obtenidos para los encapsulados obtenidos por liofilización podrían atribuirse principalmente a dos razones: a la estructura del sistema y/o a la manipulación de la muestra una vez obtenida. Es sabido que el liofilizado obtenido generalmente se caracteriza por ser una estructura liviana y altamente porosa y que cuando se liofilizan emulsiones, las proteínas pueden perder su funcionalidad por la congelación (McClements, 2004). Como consecuencia, la microestructura del aceite libre en estas muestras, estaría compuesta por depósitos discontinuos de aceite, causados por la desestabilización de la emulsión durante la congelación y el secado, en lugar de gotas de aceite individuales (Gejlhansen y Flink, 1977).

En cuanto a la manipulación de la muestra, una vez finalizado el proceso de liofilización, hay que triturar de algún modo las láminas resultantes. Como en nuestro caso no fue posible utilizar un mortero o una espátula, la muestra se desmenuzó cuidadosamente de forma manual, con lo cual esta manipulación podría haber contribuido a la liberación del aceite que se encontraba dentro de la matriz aumentando de esta manera el aceite libre.

Anwar y Kunz (2011) evaluaron el efecto del secado *spray* y de la liofilización sobre muestras de aceite de pescado encapsulado con polisacáridos solubles de soja y maltodextrina y observaron que la eficiencia de encapsulación fue menor para las muestras liofilizadas lo cual atribuyeron a la primera causa mencionada. Por el contrario, González y col. (2016) no encontraron diferencias de EE en muestras de aceite de chía encapsulado con aislado proteico de soja y maltodextrina secadas por *spray* y liofilizadas.

La **Figura III.16** muestra las imágenes tomadas por SEM de las microcápsulas de proteína de soja y aceite de pescado obtenidas por secado *spray* o liofilizadas a partir de emulsiones formadas con distinta relación proteína:aceite (1:1 y 4:1 p/p) procesadas por UT y UT+US.

A diferencia de los encapsulados obtenidos por secado *spray* descritas anteriormente, las muestras liofilizadas mostraron una estructura laminar, porosa y uniforme.

La estructura porosa puede haberse formado por cavidades que quedaron de cristales de hielo o burbujas de aire retenidas durante la congelación (Farias y col., 2007; Anandharamakrishnan y col., 2010). Luego, mientras se sublima la humedad, el producto adquiere una naturaleza permeable/perforada y la red sólida debe poder sostener esa estructura.

Una estructura similar mostraron Silva y col. (2016) al liofilizar emulsiones de proteínas de suero de leche, almidón modificado y aceite de semillas de annatto o achiote; al igual que Yazicioglu y col. (2015) con muestras liofilizadas de aceite de germen de trigo con concentrado de proteínas de suero y maltodextrina.

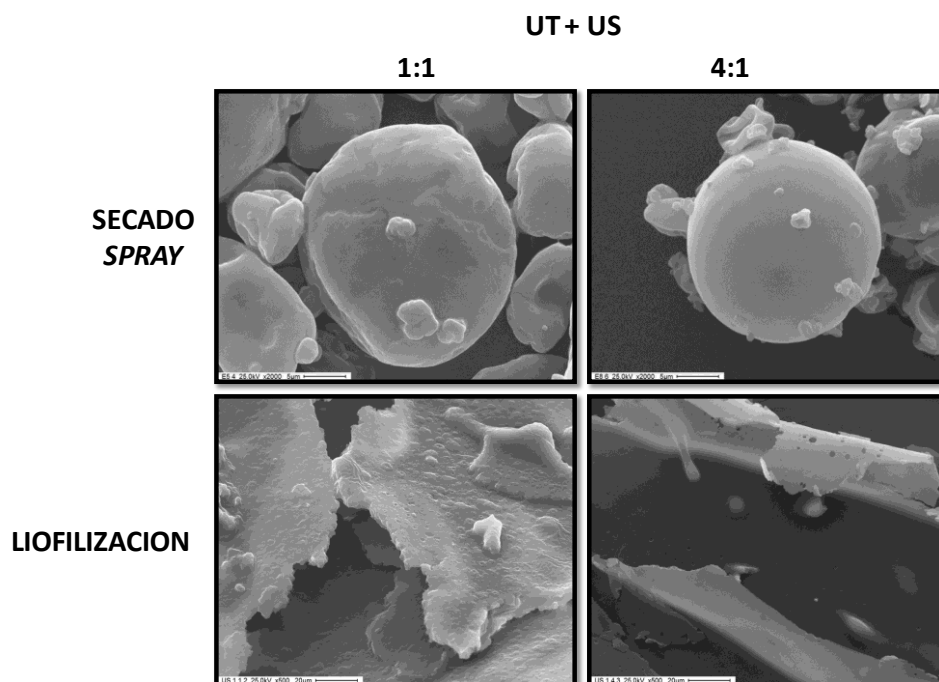


Figura III.16. Micrografías electrónicas de barrido (SEM) de la morfología externa (topografía) de las microcápsulas obtenidas después del secado *spray* o de la liofilización de emulsiones de aceite de pescado en agua preparadas con diferente relación proteína:aceite (1:1 y 4:1 p/p), procesadas por y Ultraturrax + Ultrasonido (UT + US). SEM con aumento a 2000x.

A su vez, se analizó el estado de oxidación de los encapsulados resultantes secados por *spray* y liofilizados. La **Figura III.17** muestra el índice de peróxido y el valor del ácido tiobarbitúrico iniciales y el tiempo de inducción (TI) para las muestras estudiadas.

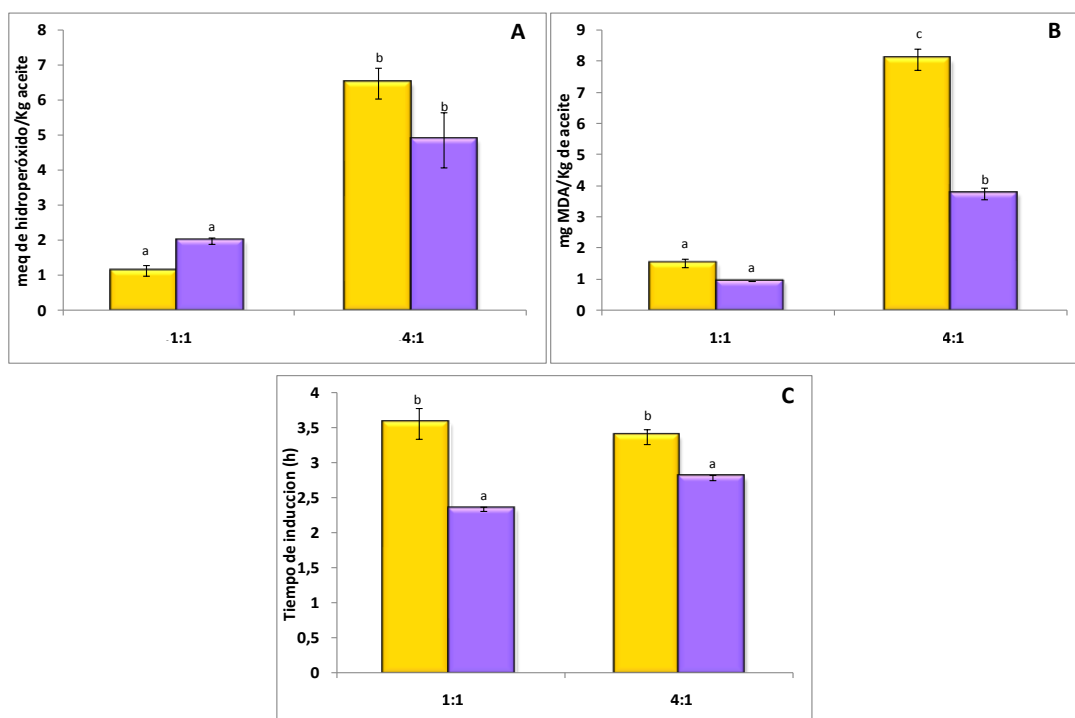


Figura III.17. Índices de peróxido (A) TBARS (B) y tiempo de inducción (TI) (C) de las microcápsulas obtenidas a partir de emulsiones de aceite de pescado en agua preparadas con diferente relación proteína:aceite (1:1 y 4:1 p/p), procesadas por Ultraturrax + Ultrasonido (UT + US) y deshidratadas por secado *spray* (■) o liofilización (■).

Los valores reportados para cada encapsulado son promedios \pm desviación estándar ($n = 2$). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), según la prueba de Tukey.

Al evaluar la estabilidad oxidativa inicial del aceite de pescado encapsulado, se observó mayor concentración de peróxidos y aldehídos (Figura III.17.A y Figura III.17.B) en las muestras con la relación de proteína:aceite 4:1 que la de 1:1 tanto para las muestras secadas por *spray* como liofilizadas, no encontrándose diferencias significativas en los valores de peróxidos con el proceso de deshidratación realizado. Tampoco se encontraron diferencias significativas en los valores de TBARS de ambas formulaciones 1:1 deshidratadas. Por otra parte, se observó que la muestra 4:1 liofilizada presentó menor valor de TBARS que la misma formulación secada por *spray*, lo que indicaría que los encapsulados liofilizados 4:1 estarían más protegidos contra la oxidación a pesar de presentar menores porcentajes de encapsulación.

Como ya se discutió anteriormente, la temperatura es uno de los factores externos más importantes que influyen en la oxidación lipídica, por lo que la protección inicial generada en el proceso de liofilización, puede deberse a las bajas temperaturas utilizadas en dicho proceso, que retardarían el desarrollo de los compuestos primarios y secundarios de oxidación en estos polvos.

Chen y col. (2013) observaron que muestras de aceite de pescado con fitoesteroles y limoneno encapsuladas con proteínas de suero de leche y fibras solubles de maíz secadas por *spray* presentaban un valor más alto de peróxidos y productos secundarios de oxidación (evaluado con el método de p-Anisidina) que las liofilizadas, indicando que las bajas temperaturas utilizadas en

este proceso y el bajo contenido de aceite libre serían los responsables de retardar la oxidación lipídica. Por otra parte, González y col. (2016) no encontraron diferencias significativas en el contenido de hidroperóxidos de muestras de aceite de chía encapsulado con aislado proteico de soja y maltodextrina, secadas por *spray* y liofilizadas, indicando que la temperatura alcanzada en la cámara de secado del equipo de secado *spray* no contribuyó significativamente a los primeros pasos del proceso de oxidación en estas muestras (temperatura de entrada de 130°C).

Al estudiar la estabilidad oxidativa de los encapsulados durante el almacenamiento, se determinó el tiempo de inducción (TI) obtenido a partir de la prueba de oxidación acelerada de Rancimat (**Figura III.17.C**)

Los encapsulados obtenidos por secado *spray* presentaron los mayores tiempos de inducción (mayor estabilidad oxidativa), siendo estos valores muy similares al del aceite de pescado sin encapsular (3,9 h), independientemente de la formulación de la emulsión.

La menor estabilidad (menores TI) de las muestras liofilizadas podría deberse a la estructura de estos polvos. Posiblemente, el oxígeno podría ingresar con mayor facilidad a la parte interna de estas microcápsulas debido al estado amorfo de la matriz. Debido a esta accesibilidad, el oxígeno puede descomponer fácilmente los lípidos que no están protegidos por la matriz proteica.

Anwar y Kunz (2011) lo relacionaron con la estructura porosa, y también con la cantidad y la ubicación de los radicales libres que pueden jugar un papel importante en la velocidad de oxidación. Dado que todas las muestras pueden contener radicales preformados que podrían haber estado desde la emulsificación, estos podrían ubicarse principalmente en la superficie del polvo. Por lo tanto, si la concentración de radicales en ambos procesos de secado es igual, entonces el factor limitante que determina la velocidad de oxidación es la difusión de oxígeno en la matriz. Debido a que el polvo liofilizado tiene una gran área superficial, el oxígeno penetra fácilmente y entra en contacto con los radicales libres, provocando que la velocidad de la oxidación lipídica sea mayor que en los secados por *spray*.

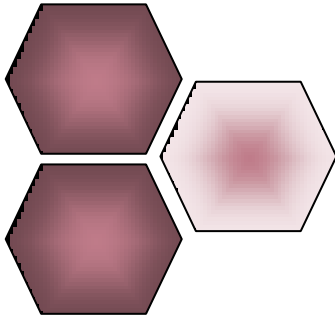
Por el contrario, González y col. (2016) no encontraron diferencias significativas entre las muestras secadas por *spray* y liofilizadas, las cuales tuvieron un tiempo de inducción superior al del aceite sin encapsular (≈ 6 vs. 2,40 h respectivamente), indicando que la combinación de APS con maltodextrina resultó efectiva contra la oxidación del aceite chía.

III.5. Conclusiones

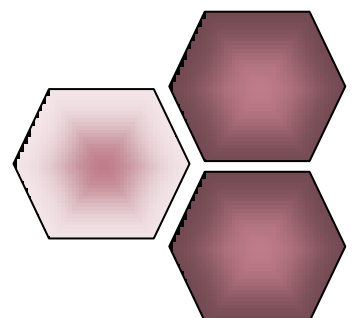
✓ Las proteínas de soja lograron encapsular el aceite de pescado por emulsificación y deshidratación en microcápsulas de tipo matriz enmascarando su olor característico y su textura aceitosa.

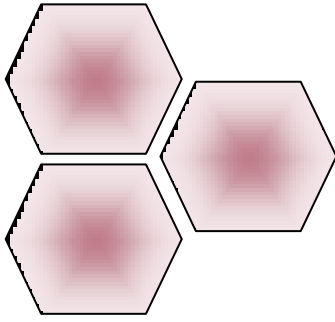
✓ Los procesos de emulsificación (UT y US) y de secado (spray y liofilización) utilizados fueron determinantes en la morfología de las microcápsulas, en la eficiencia de la encapsulación y en la protección ejercida sobre el aceite. Todos los sistemas de encapsulación estudiados mostraron cierta oxidación inicial del aceite, pero algunos presentaron una buena perspectiva de la estabilidad oxidativa a lo largo del tiempo. En este sentido, los encapsulados preparados con una relación proteína:aceite de 4:1, emulsionados por UT + US y secados por spray fueron los seleccionados para seguir trabajando.

✓ Tanto las emulsiones como las microcápsulas obtenidas podrían ser utilizadas para vehicular a los ácidos grasos poli-insaturados del aceite en distintos tipos de alimentos saludables.

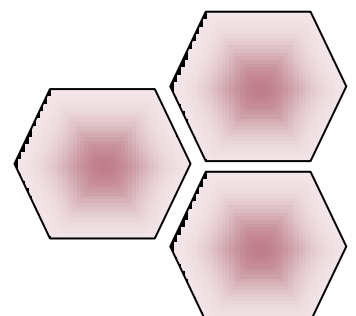
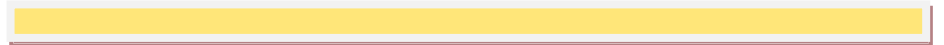


IV. ENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE PESCADO EN SISTEMAS NANOCOMPUESTOS EN BASE A PROTEÍNAS DE SOJA Y NANOFIBRAS DE CELULOSA





IV.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOFIBRAS DE CELULOSA



IV.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACION DE NANOFIBRAS DE CELULOSA

IV.1.1. Introducción

La aparición y el desarrollo de la nanotecnología han revolucionado muchos aspectos de la vida humana. Los nano-materiales han experimentado un rápido desarrollo con una amplia gama de aplicaciones en química, física, ciencias de los materiales, ciencias biomédicas, entre otras. A su vez, al ver el énfasis actual en la química verde y los procesos químicos, la aplicación de los principios fundamentales de la química verde a la nanotecnología y los nanomateriales puede extender su atractivo hacia los consumidores y abrir nuevos mercados de materiales renovables para aplicaciones avanzadas. De hecho, aquellos materiales provenientes de recursos biológicos han tenido un inmenso interés en el área de investigación en los últimos años como resultado de su alto potencial para fabricar productos de alto valor con bajo impacto en el medio ambiente (Thakur, 2014; Pappu y col., 2015; Abitbol y col., 2016).

Entre los diversos materiales naturales, la celulosa ocupa una posición crucial ya que es una de las materias primas orgánicas más abundantes, representando el 50% de la biomasa natural. La explotación de la celulosa se conoce desde el inicio de la civilización, desde la ropa y el papel hasta el uso como materiales de construcción; sin embargo, en las últimas décadas, ha atraído mucha atención y un creciente interés debido a su abundancia y versatilidad cuando se procesa a nanoescala en forma de nanomateriales de celulosa (Mariano y col., 2014; Thakur, 2014; Hoeng y col., 2016; Dufresne, 2017; Charreau y col., 2013).

La celulosa es un componente estructural importante de la pared celular de las plantas. También está presente en otras especies vivas, como algas, hongos, bacterias e incluso en algunos animales marinos, como los tunicados, o en el caso de la celulosa bacteriana es secretada extracelularmente por bacterias específicas, entre ellas las del género *Gluconoacetobacter sp.* (Klemm y col., 2005; Siró y Plackett, 2010).

En lo que respecta a las fuentes de plantas, la celulosa es el componente mayoritario de las paredes celulares (por ejemplo, la madera contiene entre un 40 y un 50% de celulosa, mientras que el algodón un 90%), a las que les otorga resistencia (Mishra y col., 2018). Este biopolímero puede encontrarse en forma abundante en algunas plantas fibrosas (como las fibras de sisal y formio), en semillas (algodón), y en los tallos primarios (lino) o secundarios (madera) (Lavoine y col., 2012).

Desde el punto de vista fisicoquímico, la celulosa es un homopolisacárido lineal de alto peso molecular formado por unidades β -1,4-D-glucosa. La estructura química básica de la celulosa se presenta en la **Figura IV.1.1.**, y consta de segmentos repetitivos de un dímero denominado

celobiosa, en los que cada monómero de anhidro glucosa presenta tres grupos hidroxilo, que le confieren a la celulosa algunas de sus propiedades características tales como hidrofobicidad, quiralidad, biodegradabilidad, etc. Estos grupos y su capacidad de generar fuertes uniones mediante puentes de hidrógeno, le confieren a la celulosa una naturaleza altamente cohesiva, y capacidad de organizarse en estructuras microfibriladas (Pasquini y col., 2010).

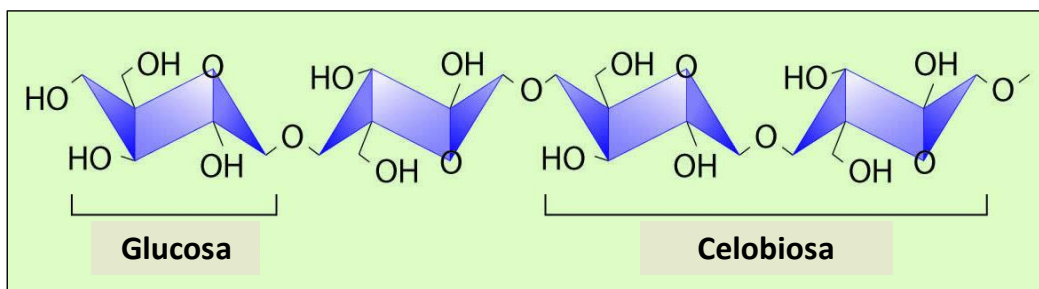


Figura IV.1.1. Estructura química básica de la celulosa.

Estas estructuras microfibriladas o microfibrillas suelen tener tamaños a escala nano (de 2 a 20 nm de diámetro) que se forman durante la biosíntesis y son empaquetadas por las hemicelulosas, ligninas y sustancias pécticas (Siqueira y col., 2010; Habibi y col., 2010).

Todas estas fibras de celulosa interactúan y se asocian con la lignina con la ayuda de las hemicelulosas, las cuales se comportan como agentes de unión para la fibra de celulosa y la lignina (Sgriecia y col., 2008) (**Figura IV.1.2**). La celulosa, al igual que la hemicelulosa y sustancias pécticas, es de naturaleza hidrofílica mientras que las ligninas son hidrofóbicas. Las hemicelulosas son heteropolisacáridos con estructura diversa. La más abundante en la pared de las plantas de Dicotiledóneas no comelinoides es el xiloglucano formado por una cadena principal de glucosa con uniones β -1,4 y cadenas laterales de xilosa, galactosa y fucosa. Otros grupos de hemicelulosas incluyen a los xilanos y mananos. Las ligninas son polímeros amorfos de unidades de fenilpropano y se encuentra en niveles apreciables sólo en paredes secundarias. Por su parte, las pectinas son también un grupo diverso de polisacáridos de naturaleza ácida caracterizados por ser ricos en unidades de ácido galacturónico que varían en su grado de metil esterificación (John y Thomas, 2008).

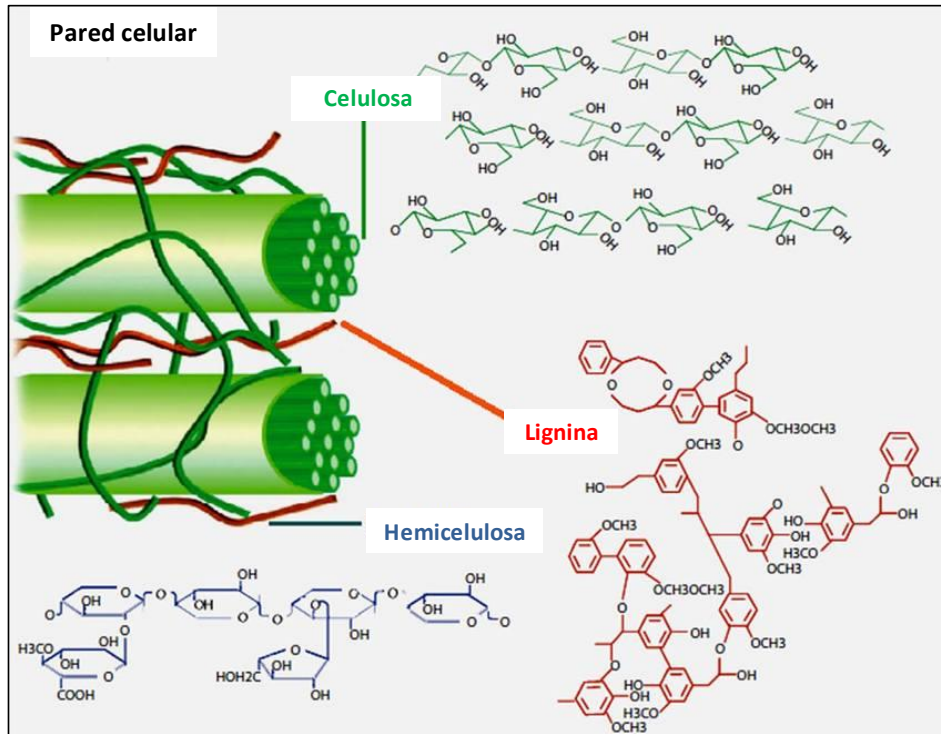


Figura VI.1.2. Esquema de la organización de las microfibrillas.

Estas microfibrillas se van agregando y forman una fibrilla como se muestra en la **Figura IV.1.3.**, estabilizadas por puentes de hidrógeno, que luego van a dar lugar a la formación de las paredes celulares de la madera y las plantas superiores.

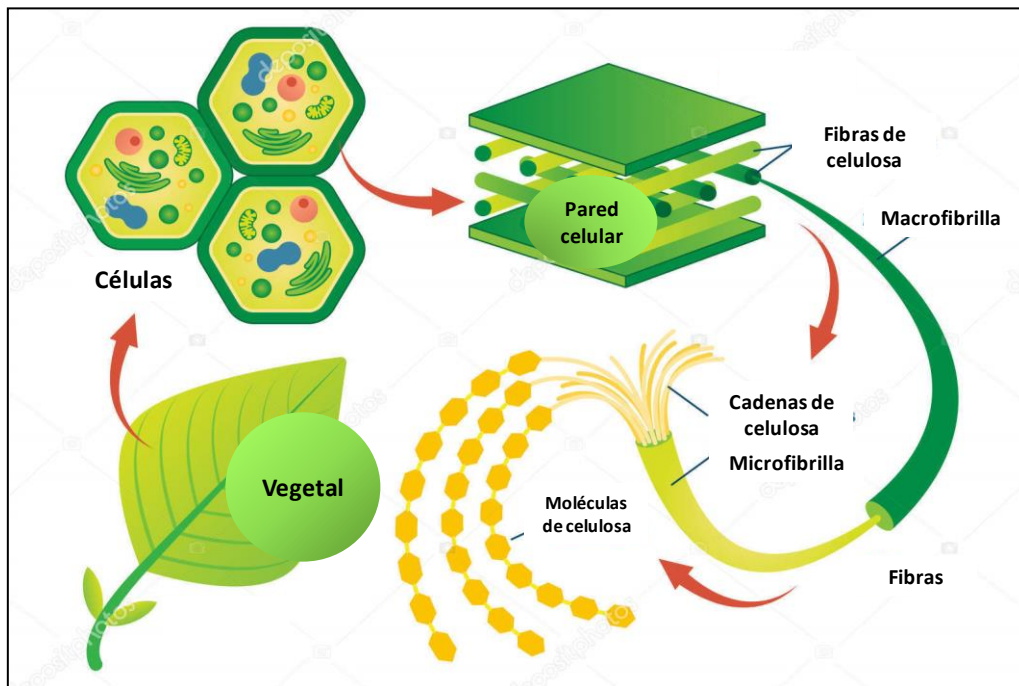


Figura IV.1.3. Esquema de la pared celular vegetal y de su organización microfibrilar.

Cada microfibrilla de celulosa a su vez se compone de dos zonas o regiones; una región cristalina y una región amorfa. Las cadenas de celulosa se organizan en una estructura significativamente ordenada en el dominio cristalino, mientras que las regiones amorfas indican las regiones en las que las cadenas se organizan al azar (alto nivel de aleatoriedad y alto grado de entropía) (Peng y col., 2012; Azizi Samir y col., 2005).

En las regiones ordenadas, las cadenas de celulosa se empaquetan estrechamente en cristalitos, que se estabilizan mediante una red de enlaces de hidrógeno fuerte y muy compleja, intra e intermolecular (**Figura IV.1.4.**). La red de enlace de hidrógeno y la orientación molecular en la celulosa pueden variar ampliamente, lo que puede dar lugar a polimorfos de celulosa o alomorfos, dependiendo de la fuente respectiva, el método de extracción o el tratamiento. Hasta ahora han sido identificados seis polimorfos de celulosa interconvertibles, denominados I, II, III, III_{II}, IV_I y IV_{II} (Habibi y col., 2010).

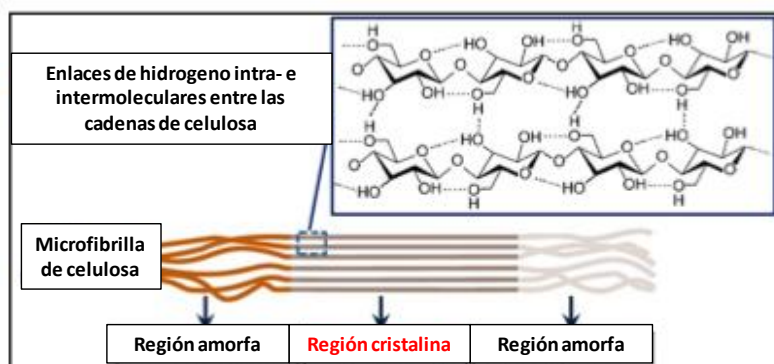


Figura IV.1.4. Esquema de la organización estructural de las cadenas de celulosa. Imagen extraída y adaptada de Mishra y col. (2018).

Entendiendo esta organización de la celulosa en las paredes celulares de las plantas, es posible a partir de ella obtener distintos tipos de nanofibras utilizando distintos mecanismos y fuentes de celulosa.

El término nanofibra o nanocelulosa se utiliza para definir a aquellas estructuras de la celulosa que presentan al menos una dimensión en el rango de la escala nano. Estas nanofibras pueden obtenerse mediante diferentes tratamientos químicos o mecánicos de la pulpa de madera o de la celulosa vegetal, entre otros (Isogai, 2013) y según las características que presenten pueden clasificarse en nanocristales de celulosa (**NCC**) o en celulosa microfibrilada (**MFC**).

Los **nanocristales de celulosa (NCC)**, también conocidos como celulosa nanocristalina, *whiskers* de celulosa, microcristales de celulosa, entre otros (Abdul Khalil y col., 2014), son estructuras obtenidas por el procesamiento de la celulosa bajo condiciones controladas, que conducen a la formación de cristales individuales de alta pureza. El proceso principal en la preparación de NCC se basa en una hidrólisis ácida fuerte bajo condiciones (temperatura, agitación y tiempo) estrictamente controladas. Las regiones amorfas de la celulosa, que se consideran defectos estructurales, son atacados bajo estos procesos de hidrólisis ácida, dejando las zonas cristalinas (dominios más resistentes) intactas (Azizi y col., 2005; Habibi y col., 2010). En general, después del proceso de hidrólisis, se realizan sucesivas etapas de centrifugaciones y lavados y, diálisis en agua con el objetivo de eliminar remanentes de ácido para purificar las nanofibras. Los NCC en general rondan los 5-70 nm de diámetro y el largo puede ser de 100 a 250 nm. Generalmente, al trabajar con altas concentraciones de ácido, largos tiempos de reacción y altas temperaturas se obtienen NCC con una alta carga superficial y tamaño reducido, pero estas condiciones también dan como resultado un menor rendimiento, una menor cristalinidad y una menor estabilidad térmica de estas nanofibras (Kargarzadeh y col., 2012; Martínez-Sanz y col., 2011). Otros autores sugieren que se pueden emplear procesos de ultrasonido luego de la obtención de los NCC para favorecer su homogenización y evitar la agregación (Pasquini y col., 2010; Atef y col., 2014).

Por otro lado, la celulosa microfibrilada (**MFC**), también conocidas como microfibrillas de celulosa, nanofibrillas de celulosa, celulosa nanofibrilada, o celulosa microfibrilar, entre otros sinónimos (Siqueira y col., 2010; Klemm y col., 2011; Dufresne, 2012; Abdul Khalil y col., 2014), son preparadas por cizallamiento mecánico de fibras de celulosa con el fin de separar las microfibrillas en sus cadenas constitutivas (Lavoine y col., 2012; Siró y col., 2010), empleando equipamientos que generan alto grado de cizalla. De este modo se generan largos filamentos de celulosa flexibles en la escala nanométrica (20-60 nm de diámetro y varios micrómetros de longitud), con dominios amorfos y cristalinos alternos que provocan que la cristalinidad sea menor que en el caso de los NCC (Siqueira y col., 2010), y que tengan una relación de aspecto (L/d) muy alta.

La desintegración mecánica de las fibras para llegar a obtener nanofibras requiere una gran cantidad de energía sobre todo porque se necesitan varias pasadas por el equipo para la obtención y, en segundo lugar, las fibras se agregan cuando la suspensión se bombea a través del equipo (Kargarzadeh y col., 2018). Se sabe que el uso de un tratamiento previo eficaz puede ayudar a reducir el consumo de energía entre 20 y 30 veces (Siró y Plackett, 2010). Un pre-tratamiento adecuado puede promover la accesibilidad, aumentar el área de la superficie interna, alterar la cristalinidad, romper los enlaces de hidrógeno y aumentar la reactividad de

la celulosa. En consecuencia, la demanda de energía disminuye y el proceso de producción de las MFC mejora (Abdul Khalil y col., 2014; Sturcova y col., 2005).

Se han publicado varias técnicas de pre-tratamiento en la literatura que incluyen por ejemplo tratamientos enzimáticos (con celobiosa hidrolasas y endoglucanasas) (Tibolla y col., 2014), así como tratamientos de oxidación con diferentes reactivos, como el uso de 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (TEMPO) que facilita la separación de las nanofibras (Cao y col., 2012; Missoum y col., 2013). La carboximetilación y la acetilación de las fibras seguidas de la homogeneización son otra técnica eficaz para reducir el consumo de energía durante la producción de las MFC (Aulin y col., 2009; Taipale y col., 2010). De manera similar, el refinamiento mecánico, la molienda y el criocrushing (combinación de la congelación de las fibras con nitrógeno líquido y fibrilación mecánica) también se han utilizado para producir MFC. Además, se han propuesto pre-tratamientos con el uso de microondas (Chowdhury y Abd Hamid, 2016), irradiación con haz de electrones (Kim y col. 2016), hinchamiento químico (Haafiz y col., 2014), pre-tratamientos de extrusión (Olea y col., 2015) y el uso de la técnica de electrospinning (Jahanbaani y col., 2016) (**Figura IV.1.5**).

Estas nanofibras han ganado interés en la comunidad científica debido a sus variadas características tales como la forma y tamaño, la capacidad de modificar químicamente su superficie, la alta resistencia mecánica, su naturaleza sustentable, su biodegradabilidad, entre otras (Islam y col., 2013). En los últimos años, las nanofibras se han usado ampliamente en una gran variedad de aplicaciones en numerosas áreas, como en la ingeniería de tejidos, en dispositivos electrónicos, en el envasado de alimentos y dispositivos médicos (liberación de fármacos, biosensores y envasado de antimicrobianos) (Klemm y col., 2011).

Las nanofibras de celulosa, obtenidas por hidrólisis o por tratamientos mecánicos actualmente están siendo estudiadas por su capacidad de estabilizar emulsiones, actuar como agentes espesantes, y como nanorefuerzos de películas en base a biopolímeros (Cunha y col., 2014; Gao y col., 2018; Niu y col., 2018). Publicaciones recientes muestran que no existe una posición concluyente sobre la biocompatibilidad y toxicidad de la nanocelulosa en relación con la salud humana y ambiental. Muchos argumentan que la toxicidad se vuelve problemática cuando las partículas están presentes como nanofibras individuales en suspensión, pero no cuando están formando una red de nanofibras de celulosa en agua que resulta ser biocompatibles y de grado alimentario (Löbmann y Svagan, 2017). Por otro lado, estudios recientes de Colic y col. (2015) propusieron que la nanocelulosa no modificada es adecuada para su uso en biomateriales al verificar que estas nanofibras resultaron ser citocompatibles, y no presentaron propiedades inflamatorias e inmunogénicas.

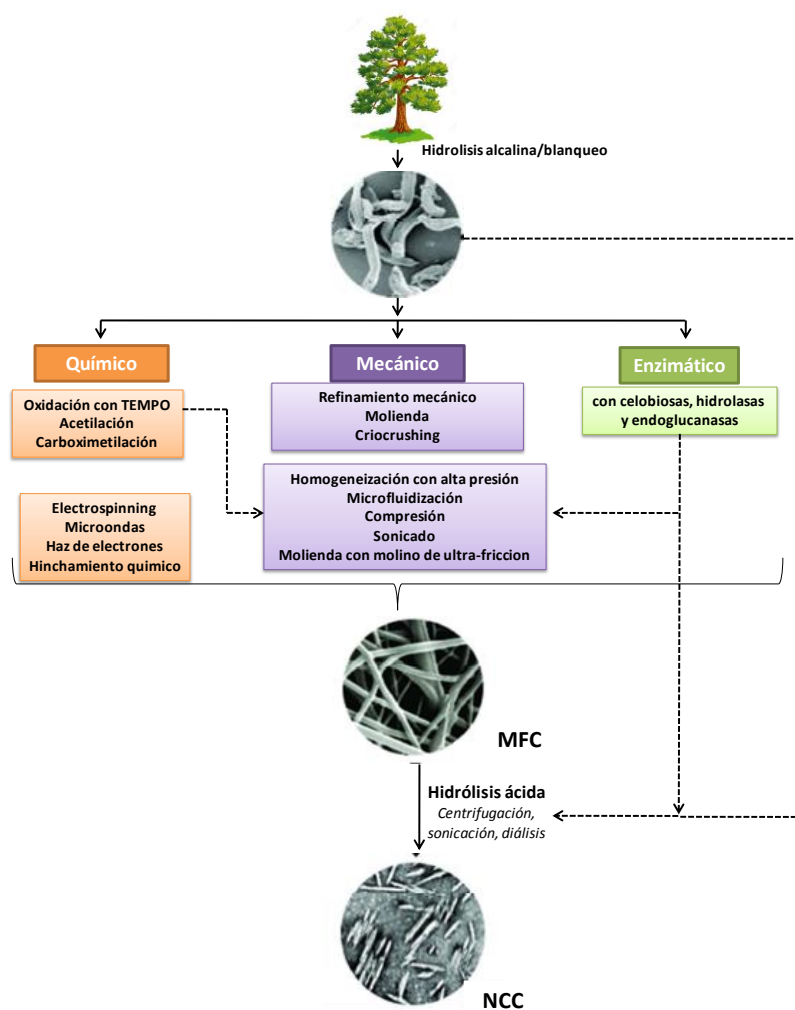


Figura IV.1.5. Esquema de los diferentes procesos empleados para obtener los NCC o MFC.

IV.1.2. Objetivo

El objetivo del presente capítulo fue obtener nanofibras de celulosa con diferentes propiedades fisicoquímicas (cristalinidad, tamaño, morfología y carga superficial) por hidrólisis ácida de celulosa microcristalina o por fibrilación mecánica de fibras de formio modificadas o no previamente con tratamientos químicos y enzimáticos.

IV.1.3. Materiales y métodos

IV.1.3.1. Materiales

Se utilizó celulosa microcristalina Avicel PH-101 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y fibras de formio (*Phormium tenax*) cultivadas en Tigre (Buenos Aires, Argentina) y adquiridas a la empresa Silkum (Argentina).

El tratamiento enzimático se realizó con endoglucanasas (FiberCare®R 4760 UE, Novozyme, Dinamarca) y para el tratamiento químico oxidante se utilizó 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (TEMPO, Sigma-Aldrich).

El resto de los reactivos utilizados para llevar a cabo las experiencias que se describen a continuación fueron todos de calidad analítica.

IV.1.3.2. Tratamiento alcalino y blanqueo de las fibras de formio

Las fibras de formio (*Phormium tenax*) fueron cortadas (≈ 5 -10 mm) hasta obtener 50 g y sometidas inicialmente a dos tratamientos alcalinos consecutivos con NaOH 4%p/v por 120 minutos a 80°C manteniendo una agitación de 500 rpm. Posteriormente se realizaron dos tratamientos de blanqueo con H₂O₂ (3% v/v), también a 80°C durante 30 minutos cada uno en agitación. Luego de cada tratamiento, las fibras fueron separadas realizando una filtración en caliente utilizando un tamiz de tamaño nº 270, lavadas con aproximadamente 3 litros de agua destilada. Finalmente fueron secadas en una estufa de convección forzada a 80°C por 15 horas, obteniendo así las **fibras de formio blanqueadas** (Ortiz y col., 2018).

IV.1.3.3. Obtención de nanocristales de celulosa (NCC) por hidrólisis ácida

Los nanocristales de celulosa (**NCC**) se obtuvieron por hidrólisis ácida a partir de celulosa microcristalina (Avicel PH-101) o de fibras de formio blanqueadas, siguiendo la metodología descrita por Bondeson y col. (2006) con pequeñas modificaciones.

La celulosa microcristalina o las fibras de formio blanqueadas se dispersaron en H₂SO₄ 63,5% p/p en una relación 10% p/v, y se mantuvieron en agitación continua a 350 rpm con un agitador de hélice (DRAGONLAB OS20-Pro, China) durante 2 horas a 45°C bajo campana. La reacción se llevó a cabo en un balón de tres bocas a reflujo, controlando la temperatura en todo momento mediante un baño de aceite de silicona (**Figura IV.1.6**). Para detener la reacción se agregó un volumen de agua destilada refrigerada igual al de la dispersión inicial. La dispersión resultante se centrifugó en un equipo HERMLE Z 326 K (HERMLE, Alemania) a 4427xg durante 15 minutos a 25°C y el precipitado recolectado se sometió a sucesivas etapas de lavado con agua destilada y centrifugado (en iguales condiciones que las mencionadas

anteriormente) hasta alcanzar aproximadamente un pH=4 en la dispersión. Posteriormente, dicha dispersión se dializó contra agua destilada 2 días a 4°C utilizando membranas de 76 mm de ancho y *cut-off* 14 KDa (Sigma-Aldrich) y se sonicó con un equipo SONICS Vibra-Cell modelo VCX 750 (Sonics & Materials Inc., Newtown, Estados Unidos) durante 10 minutos con una potencia de 30% (225W) en baño de hielo. Finalmente, a las dispersiones de nanocristales resultantes se les agregaron 1 gota de cloroformo cada 100 ml de dispersión (como antimicrobiano) y se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su caracterización o uso.



Figura IV.1.6. Equipamiento utilizado para la obtención de nanocristales de celulosa mediante hidrólisis ácida

IV.1.3.4. Obtención de celulosa microfibrilada (MFC) por desintegración mecánica

Se prepararon 3 lotes de celulosa microfibriladas. Inicialmente, para todos los casos, la celulosa blanqueada proveniente de las fibras de formio se sometieron a un proceso de refinación con el objetivo de mejorar la accesibilidad de las fibras y la eficiencia del proceso de fibrilación mecánica (Ilyas y col., 2019). Posteriormente, uno de los lotes fue sometido a un tratamiento enzimático con endoglucanasas, otro fue sometido a un tratamiento químico oxidante, y en una tercera etapa los tres lotes fueron sometidos a un proceso de fibrilación mecánica. Así se obtuvieron tres productos que diferenciaremos como **MFC-E**, **MFC-Q** y **MFC** respectivamente. En el esquema de la **Figura IV.1.7.** se ilustran los procesamientos que serán detallados a continuación, y se identifican los productos con la nomenclatura que identificará a las muestras.

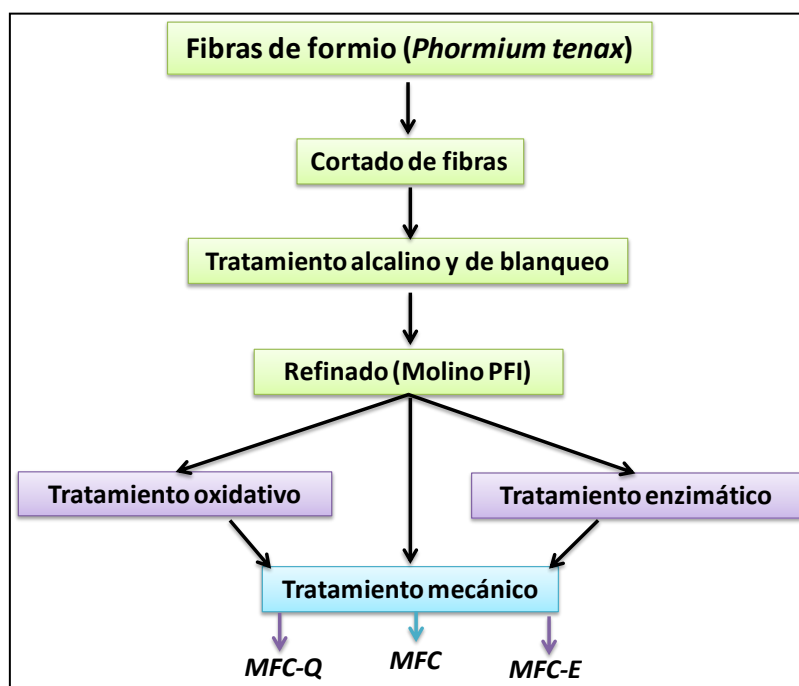


Figura IV.1.7. Esquema de los procesamientos realizados para la obtención de las diferentes celulosas microfibriladas.

IV.1.3.4.1. Tratamiento de refinación en molino PFI

Las fibras blanqueadas se hidrataron con agua destilada (10%p/v) y se las dejó en reposo por 24 h. Posteriormente se realizó un proceso de refinación mecánica con un molino de tipo PFI Modelo NPFI-02 (Metrotec, Francia) que consta de un molón con barras verticales afiladas cortantes y un recipiente que aloja la muestra a refinar (**Figura IV.1.8.A**). Para ello se colocó manualmente una cantidad pesada de las fibras de formio blanqueadas (aproximadamente 300 g de fibras + agua) sobre la pared del recipiente. El proceso de refinación comenzó al introducir el molón refinador dentro del recipiente y al aplicar la presión de refinado (3,33 N/mm) entre el molón y la pared del recipiente. La muestra a refinar impide el contacto físico entre las partes metálicas del recipiente y el molón, y a su vez sufre fibrilación externa e interna. Luego de alcanzar una velocidad de 9000 rpm (establecido con el valor de grado de refinación), el molino PFI se detuvo y se separaron manualmente las **fibras de formio blanqueadas y refinadas**.

Grado de refinación o drenabilidad: Se determinó el grado de refinación mediante el ensayo Schopper-Riegler (ISO 5267-1:1999) que consiste en drenar una suspensión diluida de las fibras refinadas por una tela metálica y cuantificar el volumen de filtrado colectado en una probeta graduada en unidades °SR, luego de un tiempo determinado. El equipo utilizado para esta

determinación se muestra en la **Figura IV.1.8.B**. Para este ensayo, se vertieron 1000 ± 5 ml de la suspensión acuosa de fibras de formio blanqueadas y refinadas (≈ 2 g de sólidos) a un vaso de medición y luego se pasó la muestra con rapidez dentro del recipiente cilíndrico de desagote. Luego de 5 s, se elevó el cono de sellado y se tomó nota del grado °SR indicado en el vaso graduado cuando el orificio lateral dejó de gotear agua. En la escala Schopper-Riegler, una descarga de 1000 ml corresponde a 0 °SR y una descarga de 0 ml corresponde a 100 °SR, por lo que cada 10 ml de agua vertida a través del orificio lateral en el vaso graduado representa 1°SR.

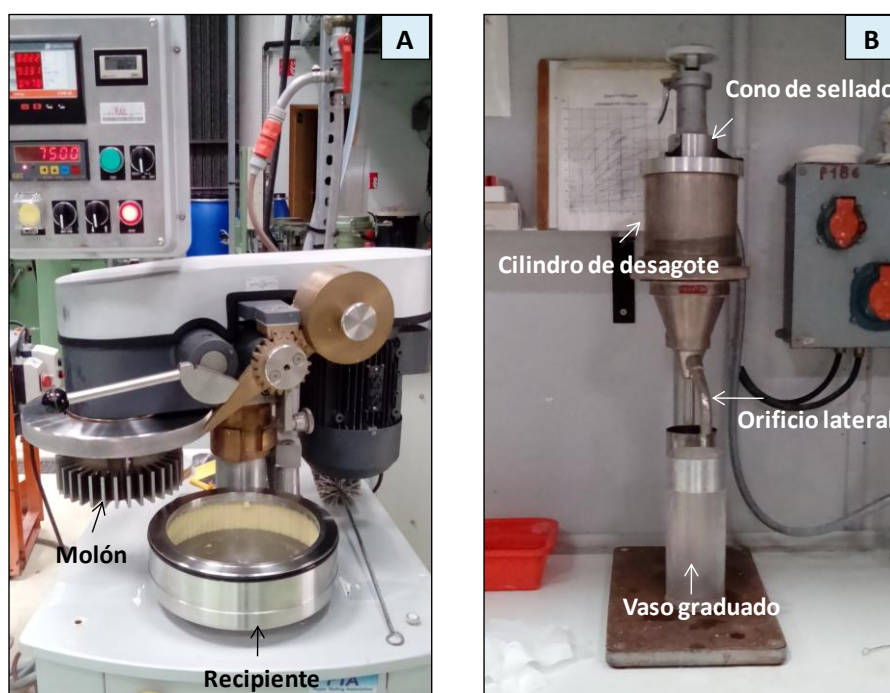


Figura VI.1.8. A) Equipo de refinamiento PFI. **B)** Equipo para medir el grado de refinación o grados Schopper-Riegler.

IV.1.3.4.2. Tratamiento enzimático con endoglucanasas

El procedimiento se desarrolló siguiendo la metodología descrita por Siqueira y col. (2010) con algunas modificaciones. Se preparó una suspensión acuosa de las fibras de formio blanqueadas y refinadas (al 2%p/v) y se la dejó a temperatura ambiente con agitación continua durante 30 minutos. Luego, se colocó la suspensión en un balón de tres bocas, se adicionaron 2 ml de solución de enzimas de tipo endoglucanasas y se controló el pH del medio con el agregado de un *buffer* acetato de pH 5. La reacción enzimática se llevó a cabo a 50°C con agitación continua a 350 rpm durante 120 minutos. Posteriormente, se aumentó la temperatura a 80°C por 10 minutos para detener la reacción. La suspensión se dejó enfriar y se filtró sobre una membrana de nylon de 10 μ m de tamaño de poro, utilizando un embudo Büchner conectado a un kitasato y a una bomba de vacío. El retenido se lavó con agua

destilada hasta lograr tener un pH cercano a la neutralidad. Finalmente, la suspensión se almacenó a 4°C por 24 h para luego someterla al proceso de fibrilación mecánica (ver sección **IV.1.3.4.4**).

IV.1.3.4.3. Tratamiento oxidante con 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (TEMPO)

El procedimiento se desarrolló siguiendo la metodología descrita por Saito y col. (2007) con algunas modificaciones. Se preparó una suspensión acuosa de las fibras de formio blanqueadas y refinadas (al 1%p/v) y se la dejó a temperatura ambiente con agitación continua durante 30 minutos. Luego, la suspensión se colocó en un balón de tres bocas, se adicionó 0,24 g de 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (TEMPO) y 1,5 g de NaBr y se dejó agitando aproximadamente 10 minutos hasta lograr la completa disolución de los reactivos. Posteriormente, se agregaron 5,58 g de NaClO y se ajustó el pH a 10 adicionando NaOH 3M. La mezcla se mantuvo en agitación a 350 rpm, por 2 horas a 25°C. La reacción se detuvo disminuyendo el pH de la suspensión a 7 con el agregado de HCl 3M. La suspensión se filtró sobre una membrana de nylon de 10 µm de tamaño de poro, utilizando un embudo Büchner conectado a un kitasato y a una bomba de vacío. El retenido se lavó con agua destilada hasta lograr tener una conductividad de 5 µS/cm. Finalmente, la suspensión se almacenó a 4°C por 24 h y luego se realizó el proceso de fibrilación mecánica (ver sección **IV.1.3.4.4**).

IV.1.3.4.4. Fibrilación mecánica en molinillo de fricción ultra-fina

Para la obtención de celulosa microfibrilada se utilizó un molinillo de fricción ultra-fina cuyo nombre comercial es “SuperMassColloider” (MasukoSangyo Co, Japón). Este equipo consta de dos discos de molienda cerámicos no porosos, uno estático y otro rotatorio, ambos con microcanales por donde circula la muestra (**Figura IV.1.9**). En este proceso, la estructura de las paredes celulares es alterada mediante las fuerzas de cizalla generadas entre los discos y se produce la individualización de las nanofibras (Siró y Plackett, 2010). La distancia entre ambos discos, la velocidad de rotación y el número de pasos fueron las variables que se definieron en ensayos preliminares. La distancia entre ambos discos (*gap*) se ajustó en 0 antes de cargar la muestra y se varió a -1 al inicio del proceso. En la posición 0 se produce el contacto directo entre ambos discos; mientras que en la posición -1 dicho contacto no se produce debido a la presencia de las fibras. Este ajuste evita que el equipo se obstruya y produce una mayor eficiencia de fibrilación (Wang y col., 2012). La velocidad de rotación se fijó en 2500 rpm y se realizaron 130 pasos de las muestras a través del equipo.

Se procesó una suspensión acuosa de las fibras de formio blanqueadas y refinadas al 2%p/v o bien se utilizaron las suspensiones obtenidas de los pre-tratamientos enzimático (IV.1.3.4.2) y químico (IV.1.3.4.3). A las dispersiones resultantes (**MFC**, **MFC-E** y **MFC-Q**) se les agregaron 10 gotas de cloroformo por litro para evitar la contaminación microbiana, y se conservaron en refrigeración a 4°C hasta su caracterización o utilización.

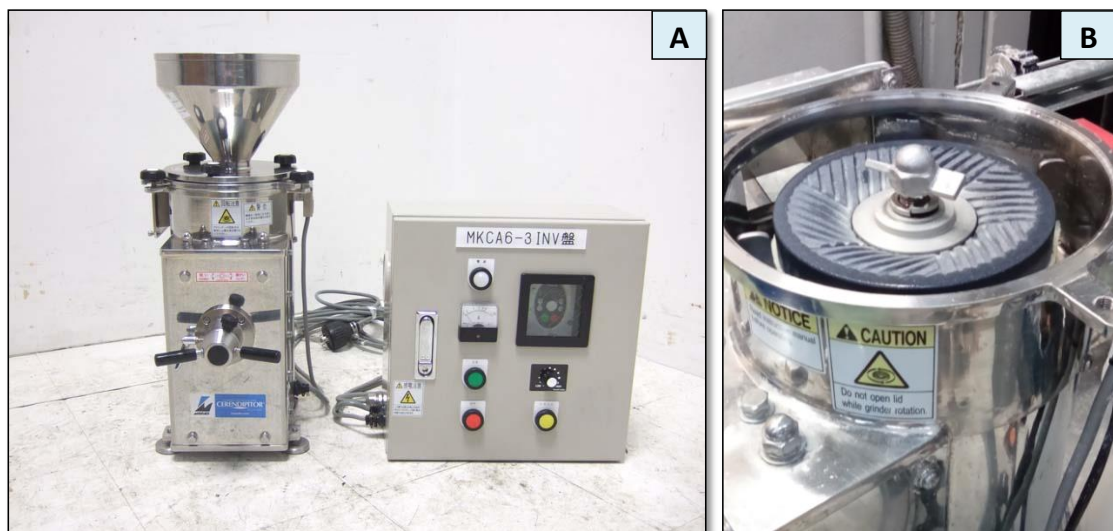


Figura IV.1.9. Molinillo de fricción ultra-fina, “SuperMasscolloider” utilizado en la obtención de celulosa microfibrilada por fibrilación mecánica. **A)** Estructura externa del equipo. **B)** Interior de la cámara de fricción.

IV.1.3.5. Caracterización de las materias primas y de las nanofibras obtenidas

IV.1.3.5.1. Contenido de sólidos

El contenido de sólidos se determinó según el método descrito por Tang y col. (2014) con algunas modificaciones. Se tomó un volumen de la suspensión de las nanofibras de celulosa, se colocó en cápsulas de Petri de vidrio previamente taradas, y se registró el peso antes y después de secarlas en una estufa a 105°C hasta peso constante. El contenido de sólidos se calculó según la ecuación:

$$\% \text{sólidos} = P_{ms} * 100 / P_{mh} \quad \text{Ecuación IV.1.1.}$$

Donde: P_{ms} es el peso de la muestra luego del secado y P_{mh} es el peso de la muestra húmeda al inicio del ensayo. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

IV.1.3.5.2. Rendimiento de los procesos

El rendimiento de sólidos de cada proceso se determinó relacionando el contenido de sólidos de la dispersión final (luego de la hidrólisis ácida o de los procesos mecánicos) con respecto al contenido de sólidos de la dispersión inicial o de las materias primas, según corresponda. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

IV.1.3.5.3. Apariencia

Las suspensiones de nanofibras obtenidas se fotografiaron con una cámara digital (Kodak M853, Estados Unidos) para revelar sus aspectos macroscópicos.

IV.1.3.5.4. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La morfología de las nanofibras se observó por microscopía de fuerza atómica (AFM). Se colocó 1 gota (20 μ L) de la dispersión de fibras sobre un porta-muestra de mica y se secó con una corriente de nitrógeno. La muestra se analizó en un equipo NanoScope III (Veeco Instruments, China), en modo *tapping*, utilizando una sonda cantilever de silicona. A partir de las imágenes se calculó el diámetro de las nanofibras utilizando el software Nanoscope 6.13. Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

IV.1.3.5.5. Potencial Z

El potencial Z está relacionado tanto con la carga superficial como con el entorno local de la partícula, y frecuentemente es utilizado como un indicador de estabilidad de una dispersión. Para las determinaciones de potencial Z se empleó un analizador de nanopartículas (Nanopartica SZ-100 series, Horiba, Japón). Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente, diluyendo las dispersiones de las nanofibras con agua destilada (1/1000). Se hicieron 10 replicados por cada muestra.

IV.1.3.5.6. Difracción de Rayos X

Los espectros de difracción de rayos X de las nanofibras y de la celulosa microcristalina de partida para obtener los NCC, se obtuvieron con un difractómetro X'Pert Pro (PANalytical, Estados Unidos) equipado con una fuente de radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0,154$ nm). La tensión y la corriente utilizada fueron de 40 kV y 40 mA, respectivamente. Los datos de difracción se obtuvieron en el rango $2\theta = 5-40^\circ$ en un modo de tiempo fijo con un intervalo de paso de $0,10^\circ$, a una velocidad de paso de $1,2^\circ/\text{min}$. Para este análisis, se formaron películas delgadas

de cada tipo de nanofibra secando pequeñas porciones de las correspondientes dispersiones acuosas durante 3 h a 60 °C. Los espectros de difracción de rayos X (XRD) se emplearon para calcular el índice de cristalinidad (ICr) según la **Ecuación IV.1.1.**, usando los valores de intensidad correspondientes a la difracción de la estructura cristalina y la fracción amorfa, según el método propuesto por Segal y col. (1959) y Park y col. (2010):

$$ICr = \frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \quad \text{Ecuación IV.1.2.}$$

Donde: I_{002} es la intensidad máxima del pico cristalino ubicado a $2\theta=22-23^\circ$, y I_{am} es la intensidad del valle ubicado a 2θ entre 17 y 18° (banda o zona amorfa).

Las determinaciones se realizaron por duplicado.

IV.1.3.5.7. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

La espectroscopía FTIR es una técnica que brinda una gran cantidad de información relacionada con la conformación molecular, estructura cristalina (polimorfismo) y la naturaleza de los puentes de hidrógeno en la celulosa (que dan origen a su estructura supramolecular) (Michell y Higgins, 2002). Sin embargo, es común que en los espectros de esta macromolécula, las bandas se traslapen, con lo que se tornan bastante anchas y con una resolución muy pobre, lo que limita su caracterización. Este problema puede solucionarse con el empleo de la reflectancia total atenuada (ATR). Esta técnica de muestreo es la más usada en espectroscopía infrarroja debido a su facilidad de uso, ya que proporciona espectros de alta calidad sin tener que realizar algún pre-tratamiento a la muestra. Los espectros ATR-FTIR se registraron en la región 4000 a 400 cm^{-1} , empleando un espectrómetro ThermoNicolet iS10 (ThermoScientific, Waltham, MA, Estados Unidos), realizando 60 escaneos por ensayo con una resolución de 4 cm^{-1} . Las muestras se colocaron sobre el cristal de diamante ATR (Smart iTXaccessory, ThermoScientific, Waltham, MA, Estados Unidos y las medidas fueron realizadas a temperatura ambiente. Los espectros fueron analizados con software Omnic Spectra (Nicolet Instrument Co., Madison, WI, Estados Unidos). Las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

IV.1.3.6. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valor medio \pm desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medias fueron evaluadas por el Test de Tukey para

comparación de pares, con un nivel de significación $\alpha=0,05$. Para ello se empleó el programa Statgraphics Centurion, versión 16.1.18 (Statgraphics, Estados Unidos).

IV.1.4. Resultados y discusión

IV.1.4.1. Fuentes de celulosa utilizadas

En este trabajo utilizamos dos fuentes vegetales de celulosa para el desarrollo de nanofibras: celulosa microcristalina y fibras de formio.

La celulosa microcristalina es una celulosa purificada, parcialmente depolimerizada, de α -celulosa. Generalmente, se obtiene por hidrólisis controlada de la pulpa de madera, de algodón o también de bambú refinada con ácidos minerales (HCl, 105°C, 15 min por ejemplo) (Kharismi y col., 2018). Tiene una apariencia de polvo cristalino fino blanco (**Figura IV.1.10.A**) que fluye libremente, posee elevada porosidad y es insoluble en agua (Iijima y col., 2000). Por SEM se observaron partículas alargadas con formas irregulares y con tamaños superiores a los 50 μm en al menos alguna de sus dimensiones (**Figura IV.1.10.B**). Al dispersar estas partículas en agua, se pudieron visualizar por AFM (**Figura IV.1.10.C**) agregados de unos de 5-20 nm de alto y fibras ahusadas de 5-15 nm de diámetro (medidos en altura) por unos 300-1200 nm de largo. Cabe resaltar que las partículas de MCC presentan gran tendencia a formar agregados mediante interacciones por puentes de hidrógeno y esta sería la razón por la que en bibliografía generalmente se informan tamaños de partículas del orden de los micrómetros (Tang y col., 2014, Satyamurthy y col., 2011, Bondenson y col., 2006).

El espectro de rayos X de la **MCC** (**Figura IV.1.10.D**) presentó tres picos bien marcados pero que en realidad son el resultado del solapamiento de otros que corresponden a distintos planos cristalinos característicos de la forma polimórfica celulosa I. El que aparece a 34,1°, se corresponde con el plano 040; el de 22,2° con un hombro a 20° corresponden a los planos 002 y 021 respectivamente; y un pico ancho 14,5-16,5° sumaría a los planos 101 y 100 (Park y col., 2010). A partir de este difractograma se determinó un $\text{ICr}=80\text{-}85\%$, que resultó estar dentro del rango que describe Park y col. (2010) y Kafle y col. (2015) para diferentes muestras de MCC.

En la **Figura IV.1.10.E** se muestra el espectro ATR-FTIR de la **MCC**. Allí se pueden observar: una banda ancha a 3600-2900 cm^{-1} (con un pico amplio a 3330 cm^{-1}) asociada al estiramiento de los enlaces O-H de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares; un pico a 2894 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace C-H; y un pico a 1645 cm^{-1} que se atribuye a la flexión del enlace O-H del agua absorbida (Khalil y col., 2001; Troedec y col., 2008). También se

encuentran las bandas típicas de la celulosa, atribuidas al movimiento vibracional simétrico en dirección latitudinal de tipo “tijera” (1428 cm^{-1}) y el de dirección longitudinal “meneo” del enlace $-\text{CH}_2$ (1334 cm^{-1} y 1314 cm^{-1}); a la flexión y al estiramiento del enlace C-H (1368 cm^{-1} y 1201 cm^{-1} respectivamente); y al estiramiento del enlace C-O (1104 cm^{-1} , 1055 cm^{-1} , 1028 cm^{-1} y 985 cm^{-1}) (Hospodarova y col., 2018). Además, las bandas a 1158 cm^{-1} y 897 cm^{-1} se atribuyen al estiramiento de los enlaces C–O–C y a los enlaces β -glicosídicos respectivamente (Mandal y Chakrabarty, 2011; Liu y Kim, 2017). Algunos autores asocian la banda que aparece entre $1430\text{--}1420\text{ cm}^{-1}$ y el pico a 897 cm^{-1} con las proporciones de estructura cristalina y amorfa respectivamente (Ohwoavworhua y col., 2009).

La MCC es un ingrediente muy utilizado en la industria de alimentos (INS460i o E460i) como agente de textura, antiaglutinante, espesante, estabilizante y emulsionante; y en la industria farmacéutica como excipiente de comprimidos y tabletas. Está reconocida como una sustancia segura (GRAS) por la FDA (Estados Unidos) y su uso también está aprobado por otras entidades nacionales e internacionales como la legislación de la Comunidad Europea y el *Codex Alimentarius* (FAO). Esta sustancia se ha utilizado ampliamente para obtener nanocristales de celulosa por hidrólisis ácida (Bondeson y col., 2006; Petersson y col., 2007; Capadona y col., 2009; Tang y col., 2014), así como también celulosa microfibrilada (Borsoi y col., 2016; Cheng y col., 2018).

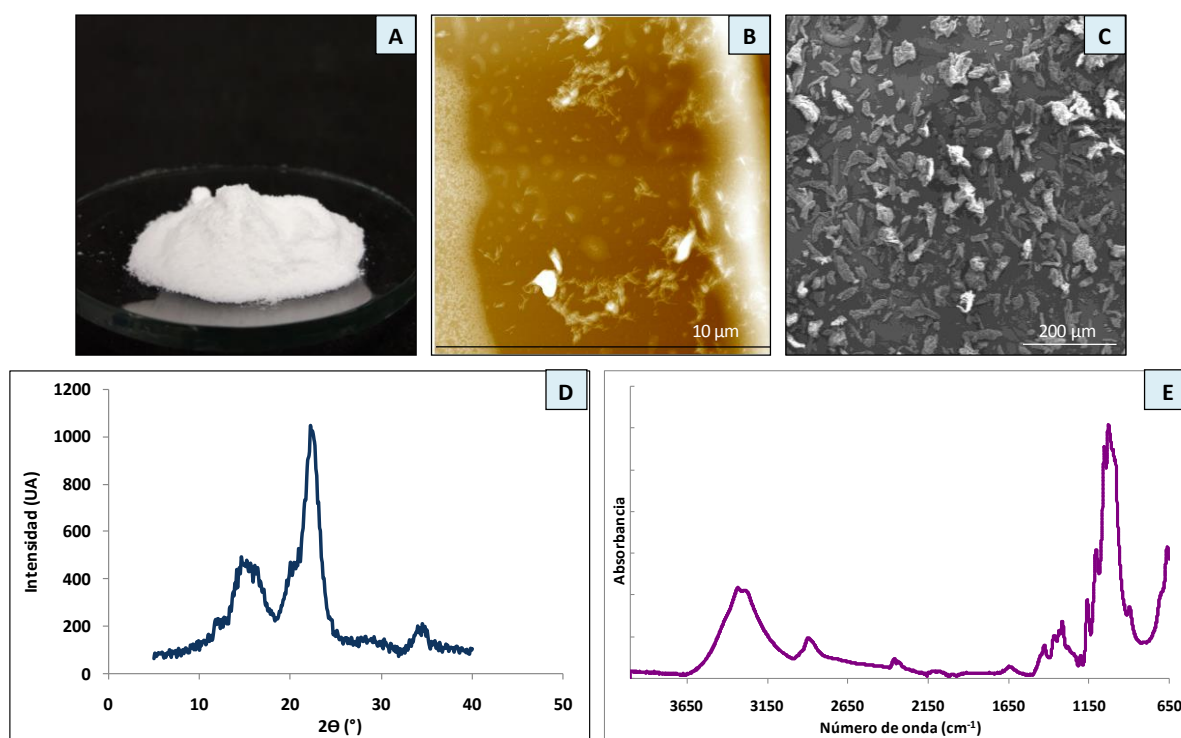


Figura IV.1.10. Aspecto visual (A), SEM (B); AFM (C); Difractograma de Rayos X (D); ATR-FTIR (E) de la celulosa microcristalina (MCC).

Por su parte las fibras de formio se obtienen de las hojas de una planta monocotiledónea herbácea perenne llamada *Phormium tenax* (**Figura IV.1.11.A**), también conocida como lino de Nueva Zelanda, y se emplean principalmente en la industria textil para la fabricación de hilos, plantillas de calzados, alfombras, bolsas, etc. (Carr y col., 2005; De Rosa y col., 2010; Fuqua y col., 2012). Estas fibras vegetales (**Figura IV.1.11.B**) poseen un elevado contenido de celulosa ($\cong 45-60\%$), pero también contienen hemicelulosa ($\cong 27-30\%$) y lignina ($\cong 8-11\%$) (Carr y col., 2005; Fortunati y col., 2013), por lo que resulta imprescindible realizar tratamientos tendientes a purificar la celulosa. El tratamiento alcalino se llevó a cabo para eliminar los materiales solubles en estos medios como la hemicelulosa y otras impurezas, que cubren la superficie externa de las paredes celulares de las fibras (Savadekar y Mhaske 2012; Zainuddin y col., 2013). En este proceso, se rompen las uniones de -OH en la estructura de red de la fibra y esto conduce a la separación de las regiones interfibrilares de las fibras de celulosa. Posteriormente, el proceso de blanqueo con H_2O_2 se realizó para eliminar los materiales residuales, principalmente lignina (Panaitescu y col., 2013; Shi y col., 2011). En la **Figura IV.1.11** se muestran fotografías de las fibras de formio iniciales (nativas) (**Figura IV.1.11.B**) y de las alcalinizadas y blanqueadas (**Figura IV.1.11.C**). Las primeras presentaron una coloración y un aspecto similar al publicado por otros autores (Rosa y col., 2010). En las imágenes se puede observar que el tratamiento alcalino y de blanqueo provocó un cambio de color en las fibras y que las mismas tienden a aglomerarse después del pre-tratamiento a causa de los lavados y el posterior secado a 80°C . La diferencia de coloración se debe justamente a la eliminación parcial de hemicelulosas y ligninas (Ortiz y col., 2018).

Las fibras de formio han sido objeto de varios estudios (Newman y col., 2007, 2010; De Rosa y col., 2010a, 2010b, 2011; Jayaraman y Halliwell, 2009) en lo que se han evaluado sus propiedades mecánicas y térmicas, sus características morfológicas y la posibilidad de incluirlas en diferentes matrices como resinas epoxy, polipropileno, ácido poliláctico y proteínas de soja (Fortunati y col., 2013; Ortiz y col., 2018). Las fibras de formio también se han propuesto como materias primas para la obtención de nanocristales de celulosa (Fortunati y col., 2013) y de celulosa microfibrilada (Ortiz y col., 2018).

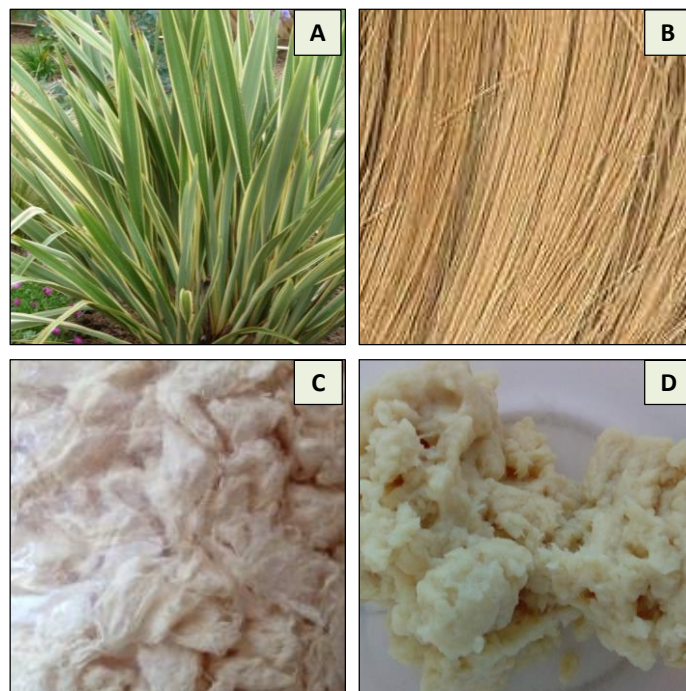


Figura IV.1.11. Planta de formio (*Phormium tenax*) (A), fibras de formio sin tratar (B), luego de los tratamientos alcalino y de blanqueo (C), luego del proceso de refinación (D).

IV.1.4.2. Nanocristales de celulosa (NCC) obtenidos por hidrólisis ácida

Los *nanocristales de celulosa (NCC)* son estructuras obtenidas por el procesamiento de la celulosa bajo condiciones controladas, que conducen a la formación de cristales individuales de alta pureza (Khalil y col., 2014). El proceso más utilizado para su obtención se basa en una hidrólisis fuerte con H_2SO_4 (Figura VI.1.12). En este sistema heterogéneo, el ácido difunde hacia el interior de las fibras y escinde los enlaces glicosídicos. Durante este proceso, las regiones amorfas de la celulosa son atacadas mientras que las zonas cristalinas (dominios más resistentes) quedan intactas (Azizi y col., 2005; Habibi y col., 2010; Börjesson y Westman, 2015). En particular, durante la hidrólisis, el H_2SO_4 también induce la esterificación de algunos de los grupos hidroxilo con grupos sulfatos en la superficie de las fibras y estos restos cargados, cuya densidad aumenta con la severidad del tratamiento (concentración de ácido, tiempo, temperatura), son los responsables de la estabilidad de las suspensiones acuosas de NCC resultantes (Dufresne, 2012; Bondeson y col., 2006). En general, después del proceso de hidrólisis, se realizan sucesivas etapas lavado y centrifugaciones y se dializa contra agua destilada hasta llegar a pH neutro con el objetivo de eliminar remanentes del ácido y así purificar los NCC. Algunos autores sugieren emplear procesos de ultrasonido luego de la obtención de los NCC para favorecer su homogenización y evitar la agregación (Pasquini y col., 2010; Atef y col., 2014); pero el proceso debe realizarse en un baño de hielo para evitar el

sobrecalentamiento y la desulfatación de los grupos sulfatos en la celulosa (Dong y col., 1998; Bondeson y col., 2006).

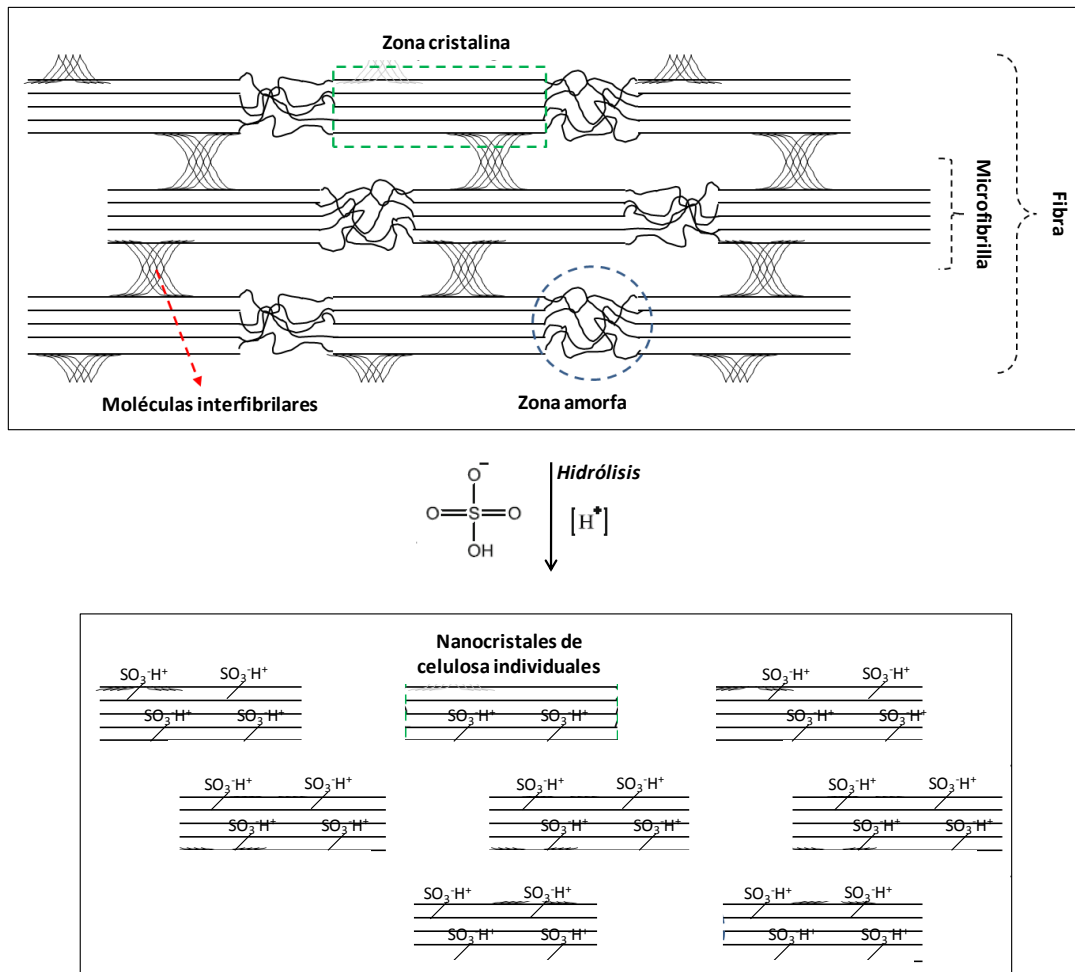


Figura IV.1.12. Esquema del proceso de hidrólisis ácida para obtener los nanocristales de celulosa (NCC).

En bibliografía hay varios trabajos que han estudiado el impacto de distintas condiciones de hidrólisis ácida sobre las propiedades de los NCC resultantes (Couret y col., 2017; do Nascimento y col., 2016; Yu y col., 2013; Mohd y col., 2016; Lamaming y col., 2015; Bettaieb y col., 2015; Fortunati y col., 2015; Tang y col., 2014; Bondeson y col., 2006; Mishra y col., 2019). Las condiciones de hidrólisis seguidas en este trabajo (H_2SO_4 63,5% p/p, a 45°C durante 2 h) fue seleccionada teniendo en cuenta el trabajo de Bondeson y col. (2006) los cuales también trabajaron con MCC.

En primera instancia, la celulosa microcristalina (**MCC**) fue sometida al proceso de hidrólisis ácida, con la que se obtuvo una dispersión acuosa de nanocristales de celulosa (**NCC**) con un rendimiento de 41,44%. La dispersión resultante presentó una apariencia homogénea, de color

blanquecino (ver **Figura IV.1.13.A**), con cierta viscosidad y un contenido de sólidos totales de 2,81% (g de NCC/100 g dispersión). El rendimiento de la hidrólisis ácida es fuertemente influenciado por las condiciones de reacción y la materia prima utilizada. Este mismo protocolo lo aplicó Martin y col. (2018) sobre MCC de otra marca comercial y obtuvo un rendimiento significativamente menor (32,5%) que el encontrado en el presente trabajo. Por otra parte, Bondeson y col. (2006) optimizó la obtención de NCC a partir de la misma marca de MCC y obtuvo un rendimiento máximo de 30% al utilizar H_2SO_4 63,5% p/p, 44°C, 130 min. Por su parte, Tang y col. (2014) alcanzaron un rendimiento máximo de 33% al hidrolizar MCC (de otra marca comercial que la utilizada en el presente trabajo) con H_2SO_4 65%p/p a 50°C durante 90 min. La concentración de H_2SO_4 es uno de los factores más importantes que afectan la extracción de los NCC durante la hidrólisis. Concentraciones muy bajas pueden generar fibras poco dispersas y agregadas; por el contrario, concentraciones elevadas pueden causar una excesiva degradación de la celulosa en sus monosacáridos constituyentes, disminuyendo el rendimiento del proceso (Tang y col., 2014).

Por microscopía de fuerza atómica (AFM) fue posible visualizar la topografía de los NCC obtenidos (**Figura IV.1.13.B**). Allí se pueden observar partículas individualizadas con forma de “varillas” o “agujas”, con diámetros de 0,5-3 nm y largos de 250-550 nm, lo que implica una gran relación de aspecto ($L/d \cong 230$ en promedio). En general, en bibliografía se describen NCC con diámetros de unos pocos nanómetros mientras que el largo es de dimensiones más variables según los parámetros de hidrólisis y la naturaleza de la celulosa utilizada (Habibi y col., 2010). Así, se pueden encontrar NCC producidos a partir de MCC con diferentes dimensiones: $d=5,4$ nm y $L=276$ nm (Martin, 2018); $d=10$ nm y $L=90$ nm (Liu y col., 2011); $d=10$ nm y $L=200-400$ nm (Bondeson y col., 2006); $d=29,7$ nm y $L=287$ nm (Satyamurthy y col., 2011). El mismo comportamiento se ha observado en trabajos que obtienen NCC a partir de diferentes fuentes vegetales. Así, los NCC provenientes de hojas de piña presentaron $d=4,18 \pm 1,44$ nm y $L=190,2 \pm 36,5$ nm (Santos y col., 2013), aquellos obtenidos a partir de bagazo de caña de azúcar presentaron $d=5 \pm 1,1$ nm y $L=275 \pm 73$ nm (Kassab y col., 2019), mientras que los producidos a partir de brotes de vid presentaron $d=14 \pm 3$ nm y $L=456 \pm 123$ nm (Achaby y col., 2018). Asimismo, los NCC obtenidos a partir de celulosa bacteriana también presentaron tamaños muy variados. Kalashnikova y col. (2011) informaron un $d=17$ nm y una $L=855$ nm; George y Siddaramaiah (2012) describieron partículas con $d=20 \pm 5$ nm y $L=290 \pm 130$ nm, mientras que Vázquez y col. (2013) informaron un $d=13-24$ nm y un L = varios micrómetros.

La **Tabla IV.1.1** resume el tamaño de los NCC obtenidos a partir de distintas fuentes de celulosa.

Tabla IV.1.1. Longitud (L), diámetro (d) y relación de aspecto (L/d) de los NCC obtenidos a partir de distintas fuentes de celulosa.

Fuente de celulosa	L (nm)	d (nm)	L/d	Referencia
MCC	250-550	0,5-3	230	El presente trabajo
MCC	276	5,4	51	Martin(2018)
MCC	90 ± 50	10 ± 4	9	Liu y col. (2018)
MCC	200-400	10	30	Bondeson y col. (2006)
MCC	287 ± 80	30 ± 5	10	Satyamurthy y col. (2011)
Hojas de piña	190,2 ± 36,5	4,18±1,44	45	Santos y col.(2013)
Bagazo de caña de azúcar	275 ± 73	5 ± 1,1	55	Kassab y col.(2019)
Brotos de vid	456 ± 123	14 ± 3	32	Achaby y col. (2018)
Celulosa bacteriana	855	17	50	Kalashnikova y col. (2011)
Celulosa bacteriana	290 ± 130	20 ± 5	15	George y Siddaramaiah (2012)
Celulosa bacteriana	ND	13-24	ND	Vázquez y col. (2013)

Martin (2018) también determinaron tamaños de partícula de la dispersión de NCC por dispersión de luz dinámica y observaron que la misma presentaba una distribución de tamaño de partícula bimodal, con un pico de mayor área correspondiente a diámetros promedios de 210 nm y uno de menor área para partículas de 1090 nm (1,09 μ m). Estos tamaños, muy superiores a los obtenidos por AFM hacen pensar en la existencia de agregados de NCC, ya descrita en la bibliografía (Ljungberg y col., 2005; Eichhorn y col., 2010). Esta tendencia a agregarse puede atribuirse a la gran área superficial de los NCC, y a la asociación a través de la formación de uniones puente hidrógeno entre los grupos hidroxilos presentes en un importante número por área en las nanofibras de celulosa.

El proceso de hidrólisis ácida resultó muy eficiente en la eliminación de las zonas amorfas de las fibras ya que los NCC obtenidos presentaron un ICr de $96,14 \pm 0,14$ %, significativamente mayor que el de la MCC de partida. La alta cristalinidad de los NCC se aprecia en su espectro de difracción de rayos X (**Figura IV.1.13.C**), en donde sólo se observa claramente el pico correspondiente al plano 002 de la celulosa tipo I a $22,9^\circ$ (Klemm y col., 2005; Park y col., 2010). También se puede apreciar un leve levantamiento en la zona de $34,1^\circ$ correspondiente al plano 040, pero no se observa la presencia de los picos que aparecían a ángulos menores

(14,5-16,5° correspondientes a los planos 101 y 100) en el difractograma de la MCC. de Souza Lima y col. (2004) explicaron que en el proceso de hidrólisis, los iones de hidronio podrían penetrar en las regiones amorfas de la celulosa promoviendo la escisión hidrolítica de los enlaces glicosídicos, liberando las zonas cristalinas y aumentando así la cristalinidad. Sin embargo, cabe destacar que los valores del índice de cristalinidad varían notoriamente según la metodología utilizada para su determinación (DRX o RMN) (Park y col., 2010), pero también dependen de la fuente de celulosa en estudio y de las condiciones de hidrólisis. Generalmente, los valores de ICr informados para NCC son mayores al 70% (Sheltami y col., 2012; Li y col., 2009; Hedjazi y col., 2018; Tang y col., 2014; Yan y col., 2017). Bondeson y col. (2006) obtiene NCC con ICr=85% y Martin (2018) con un ICr = 98%, ambos realizando una hidrólisis ácida de MCC comercial.

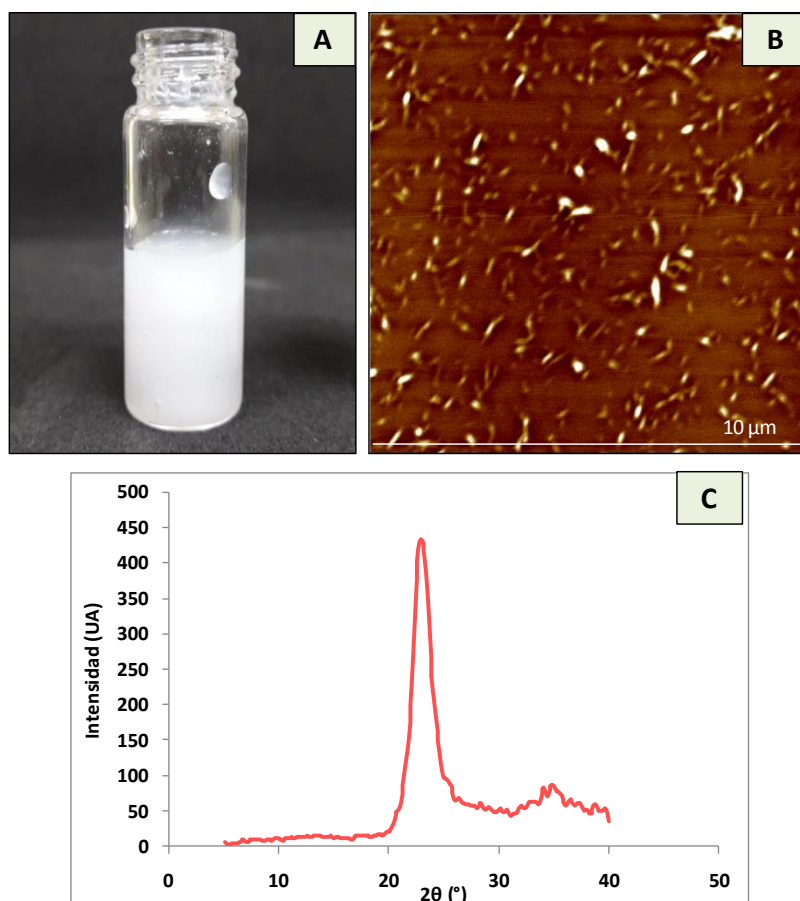


Figura IV.1.13. Aspecto visual de la dispersión (A), imagen de microscopía de fuerza atómica (B) y difractograma de rayos X (C) de los NCC obtenidos a partir de la hidrólisis ácida de MCC.

Los NCC presentaron un potencial zeta de $-41,6 \pm 5,2$ mV, evidenciando que durante la hidrólisis ácida, algunos de los grupos hidroxilo presentes en la superficie de la celulosa han sido esterificados con grupos sulfatos, otorgándole de esta manera carga negativa (Figura

IV.1.12) (Ng y col., 2015). Las suspensiones acuosas de NCC resultaron altamente estables, de acuerdo a la clasificación de Sherman (1970) para sistemas dispersos que presentan un valor de potencial zeta por encima de $|\zeta| > 30$ mV. La **Figura IV.1.14** muestra distintas interacciones posibles entre partículas, según el valor de potencial zeta, y cómo impactan en la estabilidad y en la distribución de tamaños de los sistemas dispersos.

Al comparar los valores de potencial zeta informados en la bibliografía encontramos resultados variados. Kian y col. (2018) informaron un valor de potencial Z de -25mV para NCC obtenidos a partir de la hidrólisis ácida de MCC extraída de las fibras de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), e indicaron que dichas suspensiones resultaron estables. Por otra parte, valores similares al descrito en este trabajo fueron encontrados para NCC de salvado de granos de arroz (-58 mV) (Angkuratipakorn y col., 2017), de coco blanco (-33 mV) (Nascimento y col., 2014) y de algodón (-31mV) (de Moraes Teixeira y col., 2010).

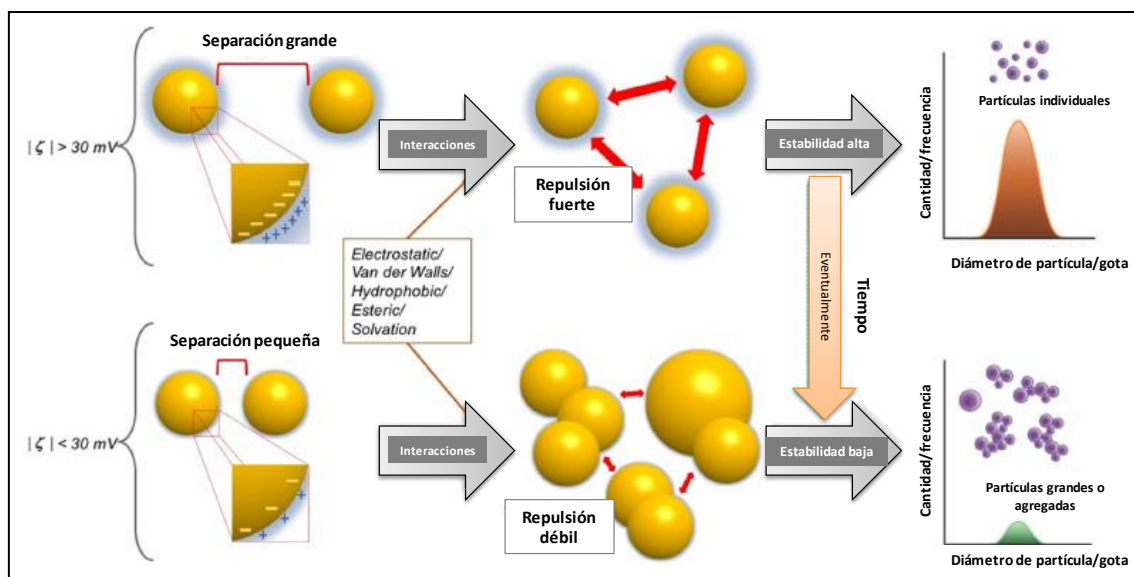


Figura IV.1.14. Esquema que muestra las interacciones posibles entre partículas según el valor de potencial zeta, y cómo estas impactan en la estabilidad y en la distribución de tamaños de los sistemas dispersos. Esquema adaptado de Cano-Sarmiento y col. (2018).

Dufresne (2010) describe que la superficie con carga negativa de los NCC crea una repulsión electrostática de doble capa entre los nanocristales en suspensión logrando una estabilización aniónica, que desempeña un papel importante para prevenir la agregación de los NCC por afinidad hidrofílica. En ese sentido, Satyamurthy y col. (2011) señalan que las fuerzas de repulsión deben ser lo suficientemente fuertes como para evitar que las partículas difundan cerca unas de otras, donde las fuerzas atractivas de van der Waals de corto alcance dominan, y se produce la agregación.

En la **Figura IV.1.15** se muestra el espectro ATR-FTIR de los NCC obtenido, en el que aparecen la mayoría de las bandas descritas para MCC, y algunas particularidades.

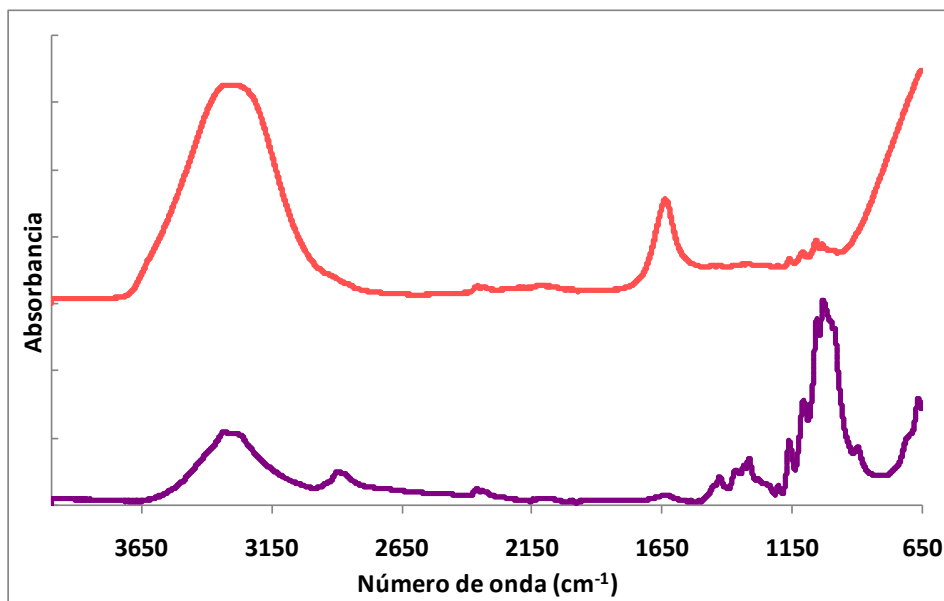


Figura IV.1.15. Imágenes del espectro de ATR-FTIR de la suspensión de nanocrisales obtenidos por hidrólisis ácida (NCC, ■), y de la celulosa microcristalina de partida (MCC, ■).

La banda asociada al estiramiento de los enlaces O-H de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares se hizo más ancha ($3700\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$) pero manteniendo su máximo en 3330 cm^{-1} . Asimismo, el pico asociado a la flexión del enlace O-H del agua absorbida (1635 cm^{-1}) se volvió más predominante. Estas diferencias pueden deberse a que los NCC se analizaron en suspensión acuosa, mientras que la MCC se encontraba deshidratada. Por otra parte, el pico a 2894 cm^{-1} y las bandas típicas de la celulosa descritas entre 1428 cm^{-1} y 985 cm^{-1} se encontraron en menor proporción que en el espectro de MCC. La desaparición del pico en 897 cm^{-1} , atribuido a los enlaces β -glicosídicos, sugiere que el proceso de hidrólisis ácida resultó efectivo para eliminar las zonas amorfas de la celulosa.

Con el objetivo de obtener NCC a partir de las fibras de formio blanqueadas, se estudiaron distintas condiciones de hidrólisis (concentración de H_2SO_4 y tiempo de reacción, entre ellas, las utilizadas para la MCC). En la **Figura IV.1.16** se muestran las dispersiones obtenidas luego de cada una de las condiciones ensayadas. Allí se puede observar que al aumentar la concentración de H_2SO_4 y/o el tiempo de hidrólisis se intensificó la coloración de las

dispersiones resultantes, tornándolas marrones. Si bien, se obtuvieron fibras con menores longitudes al avanzar la reacción de hidrólisis, tal como se puede visualizar en las imágenes, ninguna de las condiciones ensayadas permitió obtener NCC. Este comportamiento sugiere que el tratamiento de blanqueo realizado con H_2O_2 no resultó efectivo para remover la totalidad de la lignina presente en las fibras de formio (Ortiz y col., 2018) ya que este componente puede sufrir reacciones secundarias de deshidratación y oxidación durante la hidrólisis (Borjesson y Westman, 2015) produciendo compuestos que le otorgan coloraciones oscuras a las dispersiones (Dong y col., 1998).

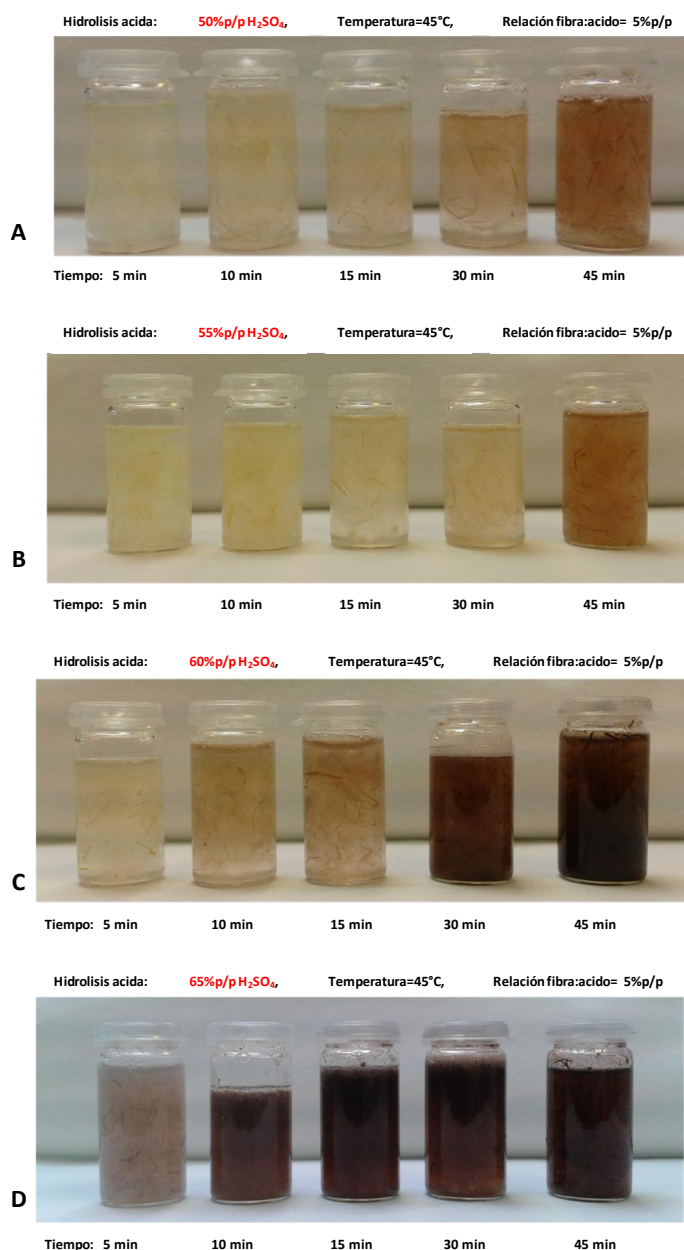


Figura IV.1.16. Dispersiones de fibras de formio (*Phormium tenax*) obtenidas luego de distintos tiempos de hidrólisis ácida realizada a 45°C con diferentes concentraciones de H_2SO_4 : **A)** 50% p/p, **B)** 55% p/p, **C)** 60% p/p, y **D)** 65% p/p.

En contraposición a nuestros resultados, Fortunati y col. (2013) lograron obtener NCC a partir de fibras de formio siguiendo un tratamiento previo de las fibras diferente. Primeramente eliminaron las ceras por extracción con solventes orgánicos, blanquearon las fibras con NaClO_2 (0,7%p/v NaClO_2 ; 2 h a ebullición; pH=4 ajustado con ácido acético) y luego realizaron tratamientos con NaHSO_3 (5%p/v) y NaOH (17,5% p/v). Finalmente, realizaron la hidrólisis ácida con H_2SO_4 64% p/p a 45°C durante 30 min. Estos autores describieron que los pre-tratamientos de las fibras de formio resultaron efectivos en la remoción de lignina y hemicelulosa, y que obtuvieron NCC con estructura acicular ($d=15$ nm y $L=100-200$ nm) con un rendimiento del 35%. Las diferencias en los pre-tratamientos de las fibras, puntualmente en los reactivos de blanqueo empleados así como también el orden de las etapas, y el menor tiempo de hidrólisis ácida (30 min) utilizado, podrían justificar su éxito en la obtención de NCC.

IV.1.4.3. Celulosa microfibrilada obtenida por desintegración mecánica (MFC)

La celulosa microfibrilada (**MFC**) se obtiene por cizallamiento mecánico de fibras de celulosa con el fin de separar las microfibrillas en sus cadenas constitutivas (Lavoine y col., 2012; Siró y col., 2010), empleando equipamientos que producen alto grado de cizalla. Este tratamiento mecánico provoca la escisión transversal de las microfibrillas de celulosa a lo largo de su eje longitudinal (Vázquez y col., 2015). De este modo se producen filamentos de celulosa que poseen dominios cristalinos y dominios amorfos, y que presentan elevada relación de aspecto (L/d), con diámetros en la escala nanométrica y varios micrómetros de longitud (Lavoine y col., 2012; Tayeb y col., 2018).

Generalmente, las fibras vegetales blanqueadas se someten a un proceso de refinación y luego a un tratamiento de homogeneización para obtener MFC (Siró y Plackett, 2010). Durante el proceso de refinación se favorece la eliminación parcial de la pared primaria de las fibras por el esfuerzo de cizalla producido en el molino PFI, lo que conduce a un incremento en la flexibilidad de las fibras por la rotura de su estructura en capas delgadas (delaminación o fibrilación). Luego, se produce la liberación de las fibrillas, aumentando así la superficie específica de las fibras refinadas. Si el proceso de refinación se prolonga demasiado, las fibras pueden sufrir acortamientos que, en algunos casos pueden ser indeseables, resultando en fibras con menor resistencia y menor drenabilidad (Nakagaito y Yano, 2004). Las fibras de formio blanqueadas y refinadas, que se muestran en la **Figura IV.1.11.D**, presentaron un valor

de drenabilidad de 74 ± 2 °SR, que resultó muy próximo al valor óptimo (70°SR) requerido para la posterior homogeneización mecánica (Desmaisons y col., 2017).

Seguidamente, las fibras de formio blanqueadas y refinadas se procesaron en un molino de fricción ultra-fina con el fin de obtener MFC. Durante este proceso, la estructura de la pared celular se rompe por las fuerzas de corte generadas por el equipo y luego las fibras de tamaño nanométrico se individualizan (Siró y Plackett, 2010). El número de re-ciclos se definió teniendo en cuenta que después de cada paso a través del molino, las partículas generalmente se vuelven más pequeñas y más uniformes en diámetro, mientras que el daño mecánico a la celulosa cristalina y la energía requerida para el proceso aumentan (Vazquez y col., 2015). En nuestro estudio, se obtuvieron MFC luego de re-circular 130 veces las suspensiones acuosas con las fibras de formio blanqueadas y refinadas.

En la **Figura IV.1.17** se muestra el aspecto visual de la suspensión acuosa de **MFC**, la cual presentó un aspecto de gel débil con coloración amarillenta tenue, que no se desestabilizó durante su conservación en refrigeración (al menos 2 años). Dicha suspensión presentó un contenido de sólidos de 1,35% y su proceso de obtención tuvo un rendimiento del 77% (**Tabla IV.1.2**) debido a que parte de los sólidos quedaron retenidos entre el rotor y el estator de los molinos utilizados. El rendimiento obtenido es típico de este tipo de procesos. Ilyas y col. (2019) informan rendimientos entre 70 y 92% al producir MFC a partir de fibras de la palmera del azúcar (*Arenga pinnata*) a las cuales refinaron previamente con un molino PFI y luego procesaron con un homogeneizador de alta presión. Estos autores notaron que a medida que aumentaba la cantidad de ciclos de homogeneización, de 5 a 15, también aumentaba el rendimiento del proceso y se hacía más efectiva la desfibrilación mecánica de las fibras.

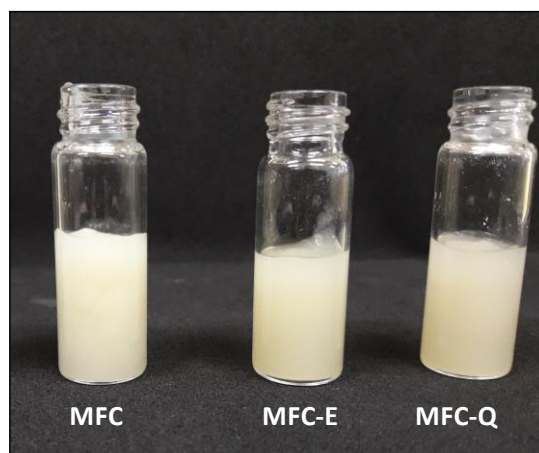


Figura IV.1.17. Aspecto visual de la dispersión de las celulosas microfibriladas extraídas de las fibras de formio blanqueadas y refinadas mediante fibrilación mecánica (**MFC**), y de las MFC modificadas por tratamientos enzimático (**MFC-E**) o químico (**MFC-Q**) realizados previamente al tratamiento mecánico.

Tabla IV.1.2. Contenido de sólidos (%), y rendimiento (%) de las celulosas microfibriladas extraídas de las fibras de formio blanqueadas y refinadas mediante fibrilación mecánica (**MFC**), y de las MFC modificadas por tratamientos enzimático (**MFC-E**) o químico (**MFC-Q**) realizados previamente al tratamiento mecánico.

	Sólidos (%)	Rendimiento (%)
MFC	$1,35 \pm 0,16^b$	77,50
MFC-E	$1,70 \pm 0,12^c$	66,50
MFC-Q	$0,82 \pm 0,07^a$	73,00

Los valores con distintas letras en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según el test de Tukey.

Mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) se pudo observar la morfología de las nanofibras (**Figura IV.1.18**) y determinar sus dimensiones (**Tabla IV.1.3**). Las **MFC** presentaron su forma cilíndrica característica (**Figura IV.1.18**), con un diámetro promedio de 9,67 nm (**Tabla IV.1.3**). También se pudo observar que estas nanofibras no se encontraban completamente individualizadas, sino que estaban agrupadas. Además, al encontrarse enrolladas, sólo fue posible determinar su longitud en algunos casos, variando desde 750 a 5750 nm (**Tabla IV.1.3**). Estas nanofibras resultaron significativamente más delgadas que las informadas por Ortiz y col. (2018), quienes obtuvieron MFC, con $d=50-60$ nm y $L=485 \pm 2$ μm , a partir de fibras de formio blanqueadas pero no refinadas. En este caso, al no haber refinado previamente las fibras, las MFC resultantes presentan mayor diámetro debido a su agregación y mayor longitud ya que no fueron suficientemente desintegradas. La fuente de celulosa utilizada también condiciona el tamaño de las nanopartículas resultantes. En este sentido, Claro y col. (2018) encontraron que luego del tratamiento mecánico las MFC provenientes de hojas de eucalipto tenían un diámetro de 17 nm y una longitud de 1100 nm mientras que las de hojas de caraúba presentaban diámetros mayores a 36 nm y largos que no pudieron determinar; y Hassan y col. (2012) obtuvieron MFC de bagazo y paja de arroz con diámetros de 5–15 nm y 4–13 nm respectivamente.

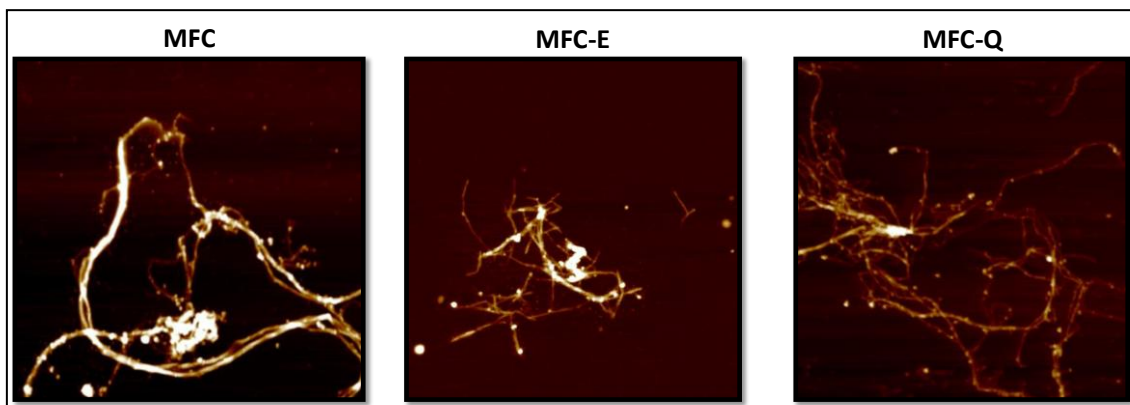


Figura IV.1.18. Imágenes de microscopía de fuerza atómica de las celulosas microfibriladas extraídas de las fibras de formio blanqueadas y refinadas mediante fibrilación mecánica (**MFC**), y de las MFC

modificadas por tratamientos enzimático (**MFC-E**) o químico (**MFC-Q**) realizados previamente al tratamiento mecánico.

Tabla IV.1.3. Diámetro (nm) y longitud (nm), índice de cristalinidad (%) y potencial Z (mV) de las celulosas microfibriladas extraídas de las fibras de formio blanqueadas y refinadas mediante fibrilación mecánica (**MFC**), y de las MFC modificadas por tratamientos enzimático (**MFC-E**) o químico (**MFC-Q**) realizados previamente al tratamiento mecánico.

	MFC	MFC-E	MFC-Q
Diámetro (nm)	9,67 ± 3,09 ^b	6,84 ± 3,13 ^{a,b}	3,89 ± 1,97 ^a
Largo (nm)	754-5741	406,74 ± 132,50	ND
Índice de Cristalinidad (%)	55,77 ± 14,30 ^a	57,53 ± 11,39 ^a	61,23 ± 4,75 ^a
Potencial Z (mV)	-0,7 ± 0,3 ^a	-0,1 ± 0,1 ^a	-50,7 ± 2,4 ^b

Los valores con distintas letras en la misma fila son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según el test de Tukey.

En la **Figura IV.1.19** se muestra el difractograma de rayos X de las **MFC** de formio. En el mismo se observa claramente un pico bien definido a $2\theta = 22,6^\circ$ correspondiente al plano cristalográfico 002 de la celulosa tipo I (Bras y col., 2010; Lu y col., 2010). También aparecen un pico menos marcado entre $2\theta = 14-15^\circ$ (correspondiente a los planos 101 y 100) y un leve levantamiento en la zona de $2\theta = 35^\circ$ (atribuible al plano 040). Este difractograma concuerda con el que describe Fortunati y col. (2013) para las fibras de formio iniciales/sin tratamiento. Debido a que el tratamiento mecánico realizado afecta tanto a los dominios amorfos como cristalinos, las **MFC** resultantes presentaron un 55,8% de cristalinidad (**Tabla IV.1.3**). Este valor resultó significativamente mayor que el informado por Ortiz y col. (2018) para MFC de formio ($ICr=35,5\%$), posiblemente debido a que las fibras de formio que utilizaron no fueron refinadas previamente. Otros autores han informado valores de cristalinidad similares al determinado en este trabajo (54-64%) para MFC extraídas de lino, eucalipto y madera (Bhatnagar y Sain, 2005; Lavoine y col., 2012; Borsoi y col., 2016).

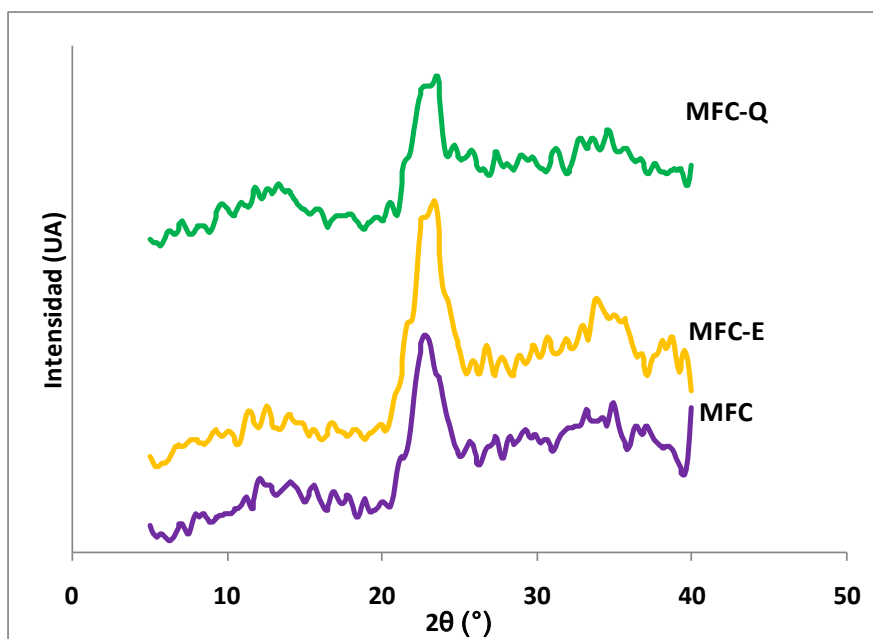


Figura IV.1.19. Diffractogramas de las celulosas microfibriladas extraídas de las fibras de formio blanqueadas y refinadas mediante fibrilación mecánica (**MFC**), y de las MFC modificadas por tratamientos enzimático (**MFC-E**) o químico (**MFC-Q**) realizados previamente al tratamiento mecánico.

En la **Tabla IV.1.3** se muestra el potencial zeta de las MFC en estudio. Como era esperable, teniendo en cuenta los pre-tratamientos químicos realizados sobre las fibras de formio, las MFC presentaron un valor de potencial zeta cercano a cero. Este resultado nos indicaría que estas nanopartículas no presentan carga superficial y que su dispersión acuosa resultaría muy inestable/o sería propensa a sedimentar (de Cano y col., 2018). Sin embargo, la suspensión acuosa de MFC no mostró signos visibles de desestabilización durante su almacenamiento refrigerado. Por otra parte, otros autores han informado valores de potencial zeta levemente negativos (-13 mV a -19 mV) para MFC obtenidas a partir de fibras de zanahoria y de eucalipto (Guimarães y col., 2016; Tonoli y col., 2012).

En la **Figura IV.1.20** se muestra el espectro ATR-FTIR de las MFC obtenidas. Allí se pueden observar: una banda ancha a $3700\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$ (con un pico amplio a 3330 cm^{-1}) asociada al estiramiento de los enlaces O-H de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares; un pico a 2900 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace C-H; y un pico a 1635 cm^{-1} que se atribuye a la flexión del enlace O-H del agua absorbida. También se encuentran las bandas típicas de la celulosa, atribuidas a los movimientos de tipo “tijera” (1425 cm^{-1}) y de tipo “meneo” del enlace --CH_2 (1334 cm^{-1} y 1318 cm^{-1}); a la flexión y al estiramiento del enlace C-H (1370 cm^{-1} y 1206 cm^{-1} respectivamente); y al estiramiento del enlace C-O (1110 cm^{-1} , 1055 cm^{-1} , 1033 cm^{-1} y 987 cm^{-1}). Pero también se registran picos correspondientes a lignina, atribuidos a la vibración del enlace C-H, al estiramiento del C=O y a la deformación del enlace C-H en los

grupos -CH_2 y -CH_3 (1593 cm^{-1} , 1506 cm^{-1} , 1459 cm^{-1}), y a la presencia de unidades p-hidroxifenilo (833 cm^{-1}). Además, los picos a 1236 cm^{-1} y 2900 cm^{-1} también pueden asociarse a las vibraciones de los enlaces que conforman el esqueleto de la hemicelulosa (Ko y col., 2015). Estos resultados nos confirman que había restos de lignina en la suspensión de MFC, por lo que el tratamiento de blanqueo con H_2O_2 no resultó efectivo para eliminar completamente la lignina de las fibras de formio, tal como lo describieron Ortiz y col. (2018) y supusimos en la sección anterior.

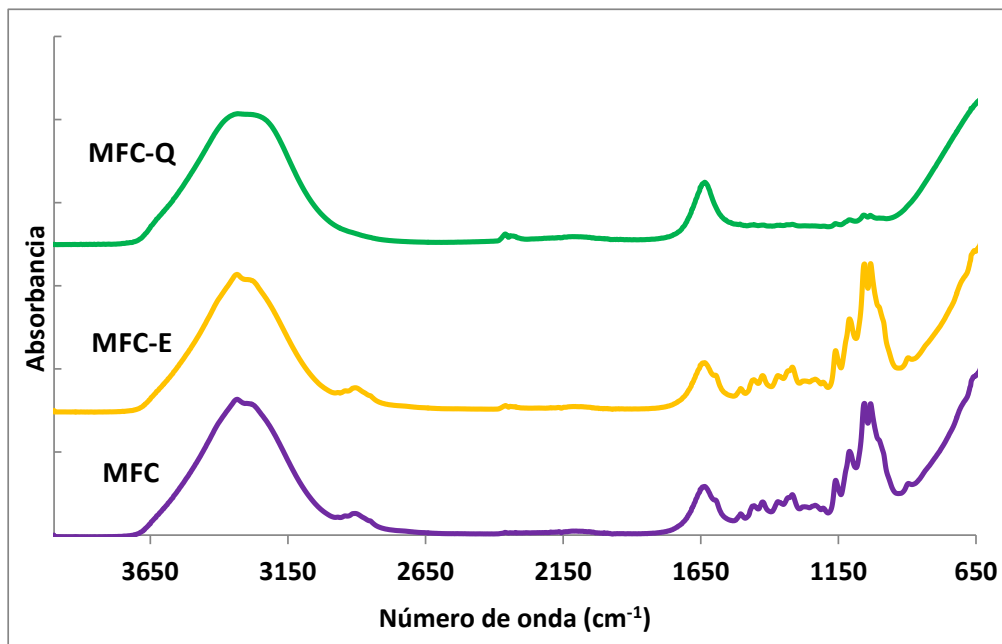


Figura IV.1.20. Espectros ATR-FTIR de las celulosas microfibriladas extraídas de las fibras de formio blanqueadas y refinadas mediante fibrilación mecánica (**MFC**), y de las MFC modificadas por tratamientos enzimático (**MFC-E**) o químico (**MFC-Q**) realizados previamente al tratamiento mecánico.

IV.1.4.4. Efecto del procesamiento sobre las propiedades de las MFC obtenidas por desintegración mecánica

Varios estudios plantean la realización de pre-tratamientos a las fibras antes de someterlas al tratamiento mecánico, con el fin de aumentar el área superficial, alterar la cristalinidad, romper los enlaces puente de hidrógeno y aumentar la reactividad de la celulosa, así como también disminuir el alto consumo energético durante el procesamiento que limita su aplicación (Khalil y col., 2014; Kargarzadeh y col., 2018, Siró y Plackett, 2010). En esta Tesis, las fibras de formio blanqueadas y refinadas fueron sometidas a un tratamiento enzimático y a uno químico previamente a ser procesadas en el molino de fricción ultra-fina, para finalmente obtener **MFC-E** y **MFC-Q** respectivamente.

Respecto al tratamiento enzimático, es sabido que la celulosa necesita un conjunto de enzimas, las celulasas, para ser completamente degradada en la naturaleza. Las celulasas pueden clasificarse en tres grupos de acuerdo con su modo de acción: i) endoglucanasas (o endocelulasas) que hidrolizan las regiones amorfas de la celulosa; ii) celobiohidrolasas (o exoglucanasas) que hidrolizan progresivamente los extremos reductores (tipo I) y no reductores (tipo II) en las zonas cristalinas y amorfas de la celulosa, produciendo disacáridos (celobiosa) y tetrasacáridos; y iii) β -glicosidasas (celobiasas) que hidrolizan los di- y tetrasacáridos produciendo glucosa (Lynd y col., 2002). En la **Figura IV.1.21.** se muestra un esquema de la acción de estas enzimas sobre las fibras de celulosa. Es evidente que el efecto específico sobre las fibras de celulosa depende del tipo de celulosa, además de las condiciones de reacción y del sustrato utilizado (Missoum y col., 2013).

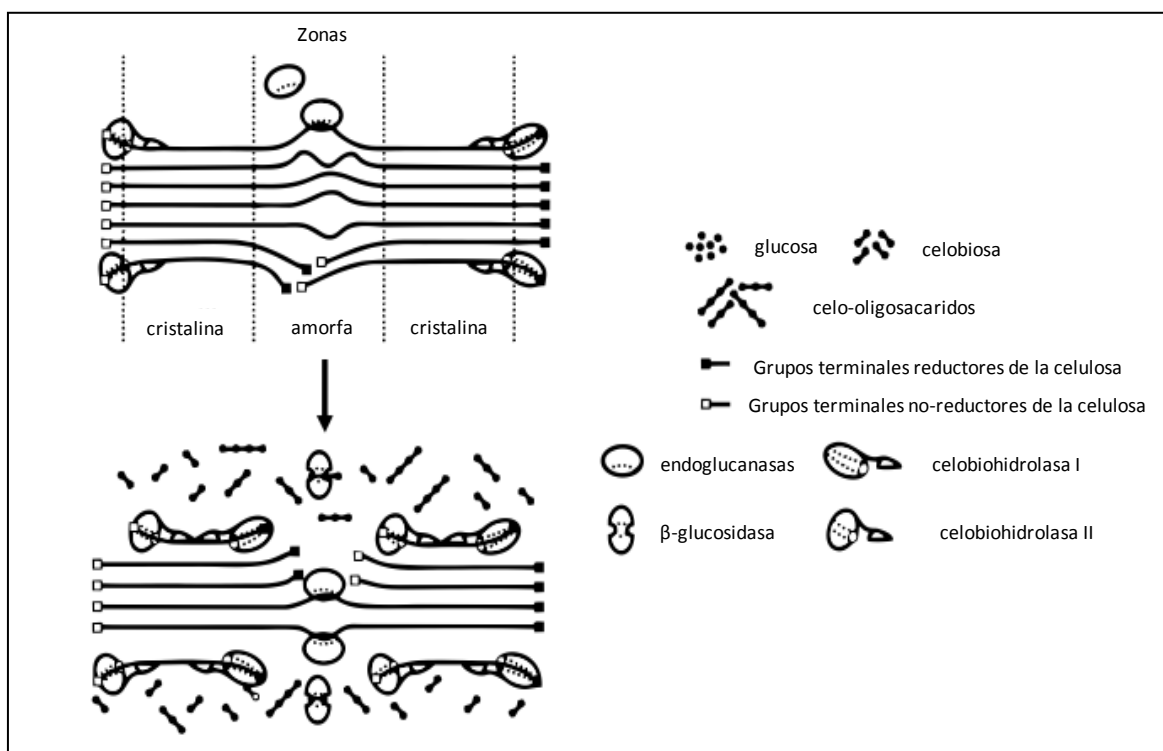


Figura IV.1.21. Esquema de la acción de diferentes enzimas (endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glicosidasas) sobre las fibras de celulosa. Esquema adaptado de Lynd y col. (2002).

En nuestro trabajo las fibras de formio blanqueadas y refinadas se sometieron a una hidrólisis enzimática con endogluconasas, que posteriormente se homogeneizaron mecánicamente. Finalmente se obtuvo una suspensión acuosa, que denominamos **MFC-E**, con un contenido de sólidos de 1,7% (**Tabla IV.1.2**). El rendimiento de este proceso resultó significativamente menor que el descrito para la obtención de MFC en la sección anterior, posiblemente debido a la pérdida de sólidos por solubilización durante los lavados realizados

luego de detener la reacción enzimática. Las **MFC-E** también presentaron forma cilíndrica (**Figura IV.1.18**), pero de menores dimensiones que las MFC. En este caso se pudieron determinar tanto el $d = 6,8$ nm como el $L = 406$ nm (**Tabla IV.1.3**) mediante el análisis de las imágenes de AFM. Otros autores también describieron dimensiones similares en la obtención de celulosa microfibriladaa partir de fibras de sisal (Siqueira y col., 2010), madera (Henriksson y col., 2007) previamente tratadas con endoglucanasas. Es evidente que la hidrólisis enzimática disminuye la longitud de las fibras, pero además facilita su desintegración/delaminación por desestabilización de los enlaces puentes de hidrógeno entre las microfibrillas (Morgado y col., 2000; Pérez y col., 2002), además de prevenir el bloqueo del homogeneizador (Missoum y col., 2013).

Si bien estas enzimas hidrolizan las zonas amorfas de la celulosa, en este trabajo no se encontraron diferencias significativas en la cristalinidad de las MFC-E y MFC. Asimismo, Long y col. (2017) también informaron que el tratamiento con hemicelulasas (xilanasas) y endoglucasas no afectó el ICr de las nanofibras extraídas de madera de pino. Andersen (2007) describió que es necesario eliminar la lignina de las fibras antes de la hidrólisis enzimática ya que las celulasas pueden interaccionar irreversiblemente con este compuesto. De manera que dependiendo de la ubicación de la lignina remanente en las fibras de formio, la actividad de la enzima podría estar algo impedida o ser menor a la esperada.

Por otra parte, y como era de esperar las **MFC-E** presentaron valores de potencial zeta (**Tabla IV.1.3**) y espectros ATR-FTIR (**Figura IV.1.20**) similares a los descriptos para las MFC, evidenciando que el tratamiento enzimático no modificó la carga superficial de estas nanofibras ni su naturaleza química.

Respecto al **tratamiento químico**, en nuestro trabajo se utilizó el radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (TEMPO) para oxidar a las fibras de formio blanqueadas y refinadas, previamente a ser homogeneizaron mecánicamente. De esta manera se obtuvo una suspensión acuosa de nanofibras que denominamos **MFC-Q**. Mediante este tratamiento, se produce la oxidación selectiva de los grupos hidroxilo de los alcoholes primarios ($-OH$ del C_6) a aldehídos (grupos carbonilo $-COH$) o a ácidos carboxílicos (grupos carboxilo $-COOH$), por lo que modifica la superficie de las microfibrillas de celulosa (Siró y Plackett, 2010; Dufresne, 2012; Missoum y col., 2013). En la **Figura IV.1.22** se presenta un esquema general de la oxidación de la celulosa, en donde también se muestra la adición de NaBr y NaClO como catalizador y oxidante primario respectivamente (Saito e Isogai, 2006).

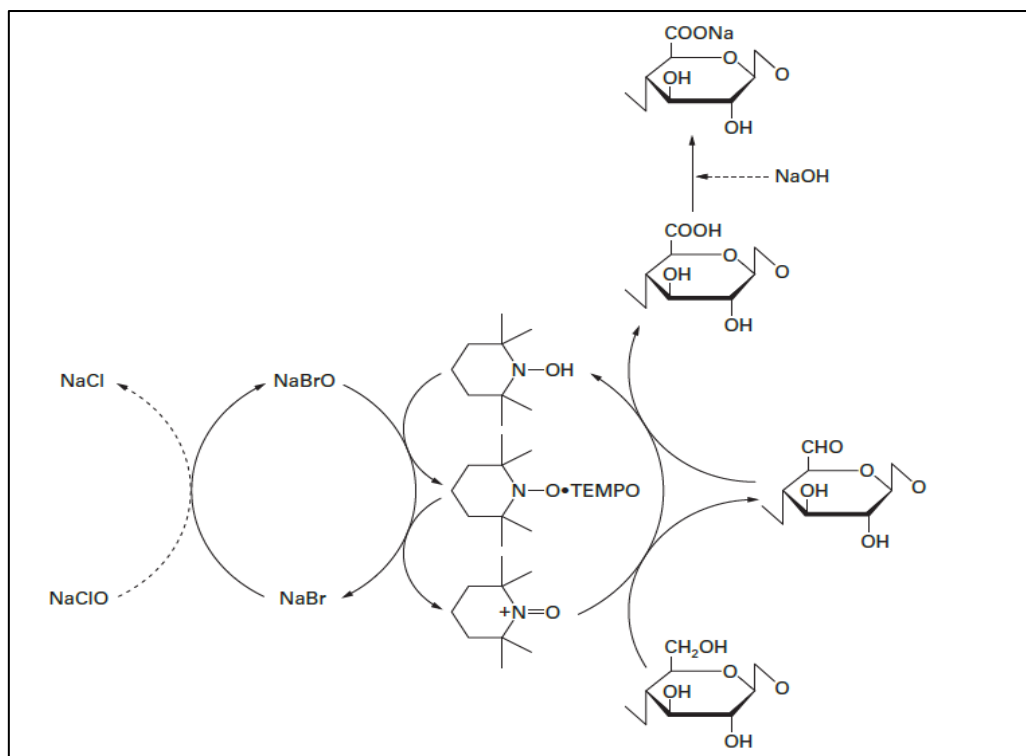


Figura IV.1.22. Esquema básico del ciclo de reactivos de TEMPO durante la oxidación de alcohóles primarios (R o R': H). Esquema adaptado de Rol y col. (2019).

Las suspensiones acuosas de **MFC-Q** presentaron un contenido de sólidos de 0,82% (**Tabla IV.1.2**), significativamente menor que el de las **MFC** y **MFC-E**. Cabe recordar que en este caso se partió de una dispersión acuosa de fibras de formio blanqueadas y refinadas del 1% p/v, mientras que en los otros ensayos la concentración de fibras utilizada fue el doble. El rendimiento del proceso fue del 73%, resultando levemente inferior al descrito para la obtención de MFC, posiblemente debido a la pérdida de sólidos por solubilización durante los lavados realizados luego del tratamiento químico. Gamelas y col. (2015) describieron rendimientos similares en la obtención de nanofibras a partir de fibras de eucalipto blanqueadas y tratadas con TEMPO; mientras que Besbes y col. (2011) lograron un rendimiento superior (88%) procesando fibras de pino blanqueadas y oxidadas con TEMPO.

Las **MFC-Q** fueron las únicas celulosas microfibriladas estudiadas que presentaron carga superficial, con un potencial zeta= -50,7 mV (**Tabla IV.1.3**) debido a los grupos carboxilatos ionizados, introducidos en la superficie al oxidar la celulosa. Resultados similares informaron Benhamou y col. (2014) y Gamelas y col. (2015) para nanofibras producidas a partir de fibras de palmera (-59mV) y eucalipto (-46 mV) respectivamente.

La morfología de las **MFC-Q** se muestra en la **Figura IV.1.17**. Por AFM se pudo determinar el diámetro de las nanofibras pero no así su longitud debido a que son fragmentos muy largos. El

diámetro de las MFC-Q de 3,9 nm resultó ser significativamente menor que el de las **MFC** y **MFC-E** (Tabla IV.1.3). En este caso, se pudo observar que las nanofibras se encontraban completamente individualizadas, sin encontrar la presencia de agregados.

En concordancia con estas observaciones Siqueira y col. (2010) describió que este tratamiento químico facilita la separación de las nanofibras y evita su posterior agregación debido a las fuerzas repulsivas de los grupos carboxilatos superficiales. Jiang y Hsieh (2013) también encontraron que las nanofibras obtenidas a partir de paja de arroz pre-tratadas con TEMPO presentaban menores diámetros que las que habían sido sometidas directamente al tratamiento mecánico ($\approx 1,7$ nm vs ≈ 12 nm) y señalaron que el menor diámetro les confería mayor flexibilidad y superficie específica.

Por otra parte, las **MFC-Q** presentaron un ICr=61,2% (Tabla IV.1.3) que no mostró diferencias significativas con las otras dos celulosas microfibriladas estudiadas. El mismo comportamiento lo describieron Besbes y col. (2011) y Benhamou y col. (2014) para nanofibras de eucalipto y palmera respectivamente, y lo atribuyeron a que la reacción química no tendría lugar en las zonas cristalinas de la celulosa I.

El tratamiento químico modificó la estructura química de las nanofibras y esto se puede observar en el espectro ATR-FTIR que se muestra en la Figura IV.1.20. Se pudieron identificar una banda ancha a $3700-2800\text{ cm}^{-1}$ (con un pico a 3330 cm^{-1}) asociada al estiramiento de los enlaces O-H de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares y al estiramiento del enlace C-H ($2900-2800\text{ cm}^{-1}$) y el pico a 1635 cm^{-1} que se atribuye a la flexión del enlace O-H del agua absorbida.

A su vez, el pico presente a aproximadamente 1630 cm^{-1} , puede corresponder también a los grupos carboxilo, producto de la acción del TEMPO sobre la celulosa, pero el mismo probablemente se encuentre solapado por lo descrito anteriormente.

Hay (2007) explica que el ácido carboxílico protonado produce bandas de absorción correspondientes al estiramiento del grupo carbonilo (C=O) entre 1690 y 1750 cm^{-1} , y vibraciones de C-OH entre 1200 y 1300 cm^{-1} . En la desprotonación, el estiramiento vibracional del C=O cambia a una energía más baja a medida que su modo vibratorio se acopla al del otro oxígeno, dando lugar a una vibración característica asimétrica entre 1540 y 1650 cm^{-1} . De manera similar, la banda C-OH cambia a una energía más alta en la desprotonación, produciendo un modo COO simétrico entre 1300 y 1420 cm^{-1} .

En ambos casos resultaron más prominentes que en los espectros de **MFC** y **MFC-E**. Todos los picos anteriormente descritos en las zonas $1600-900\text{ cm}^{-1}$ se encuentran presentes pero con menores intensidades. No se observó el pico atribuido a la presencia de unidades p-

hidroxifenilo (833 cm^{-1}), por lo que podríamos suponer que la lignina también ha sido oxidada durante el ensayo.

Resultados comparables se obtuvieron en el trabajo de Benhamou y col., 2014, donde vieron que al oxidar con TEMPO la celulosa proveniente del raquis de *Phoenix dactylifera* L. (palmera) aparecía cerca de 1730 cm^{-1} el pico correspondiente a la frecuencia de estiramiento de C-O del grupo carboxilo en su forma ácida. El mismo resultado obtuvieron Sbiai y col., 2011 con las hojas de la misma planta.

Cao y col., 2012 al oxidar con TEMPO la celulosa proveniente de yute observaron que aparecían dos bandas de absorción a 1601 y 1410 cm^{-1} derivados de los grupos carbonilo presentes en respuesta a la oxidación mediada por TEMPO, lo que indicaría que los grupos hidroxilo en la posición C6 de las moléculas de celulosa se convierten en carboxilato de sodio (Ifuku y col., 2009).

IV.1.5. Conclusiones

Fue posible obtener nanofibras de celulosa con distinta morfología, cristalinidad, tamaño y carga superficial por hidrólisis ácida de celulosa microcristalina o por fibrilación mecánica de fibras de formio modificadas o no previamente con tratamientos químicos y enzimáticos.

En la **Figura IV.1.22** se resumen las características de cada proceso y en la **Tabla IV.1.4** las propiedades de las diferentes nanofibras obtenidas.

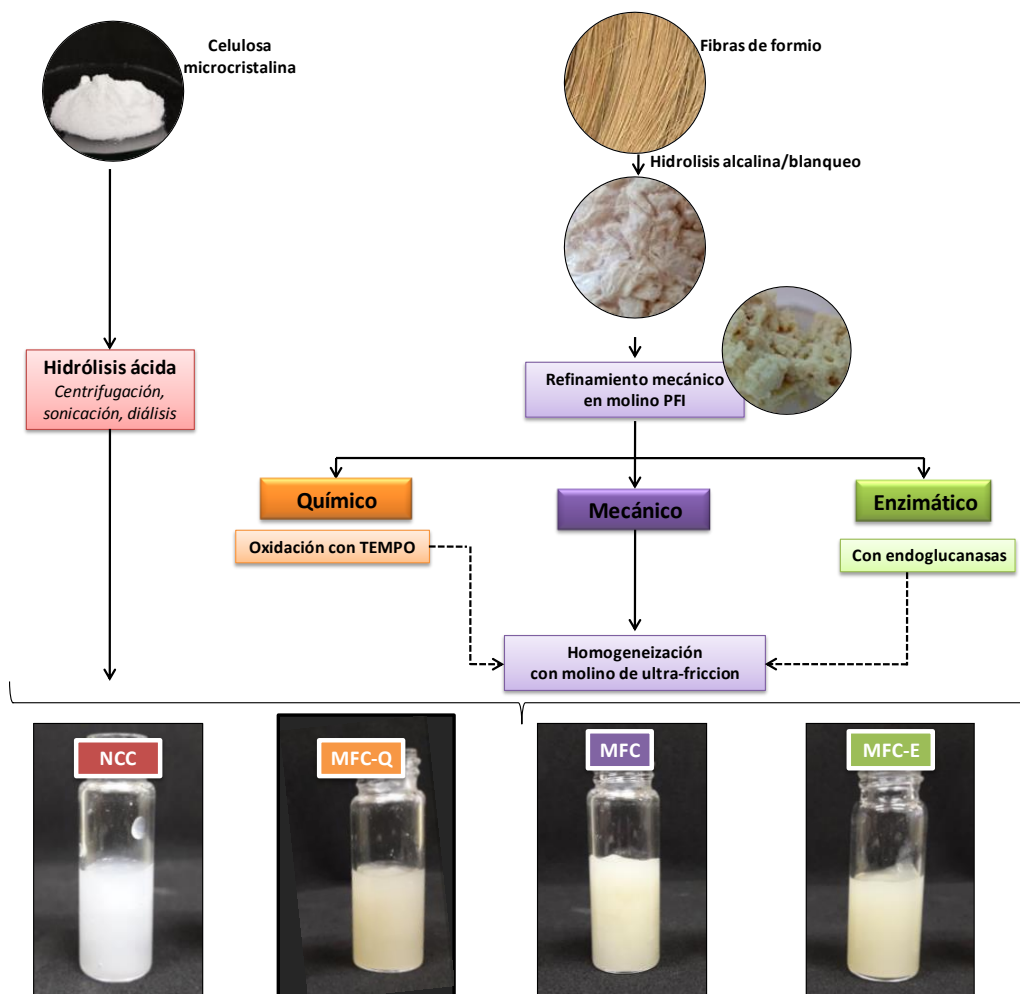
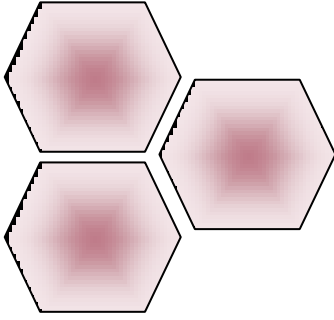


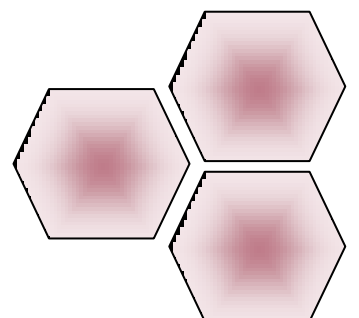
Figura IV.1.22. Esquema de la obtención de las distintas nanofibras a partir de las dos fuentes de celulosa empleadas en este trabajo

Tabla IV.1.4. Diámetro (nm) y longitud (nm), índice de cristalinidad (%) y potencial Z (mV) de los nanocristales de celulosa (**NCC**) obtenidos por hidrólisis ácida a partir de la celulosa microcristalina y de las celulosas microfibriladas extraídas de las fibras de formio blanqueadas y refinadas mediante fibrilación mecánica (**MFC**), y de las MFC modificadas por tratamientos químico (**MFC-Q**) o enzimático (**MFC-E**) realizados previamente al tratamiento mecánico.

	NCC	MFC-Q	MFC	MFC-E
Diámetro (nm)	0,5-3	3,89 ± 1,97	9,67 ± 3,09	6,84 ± 3,13
Largo (nm)	250-550	ND	754-5741	406,74 ± 132,50
Índice de Cristalinidad (%)	96,14 ± 0,14	61,23 ± 4,75	55,77 ± 14,30	57,53 ± 11,39
Potencial Z (mV)	-41,6 ± 5,2	-50,7 ± 2,4	-0,7 ± 0,3	-0,1 ± 0,1



IV.2. SISTEMAS EMULSIONADOS O/W ESTABILIZADOS POR PROTEÍNAS DE SOJA Y NANOFIBRAS DE CELULOSA



IV.2. SISTEMAS EMULSIONADOS O/W ESTABILIZADOS POR PROTEÍNAS DE SOJA Y NANOFIBRAS DE CELULOSA

IV.2.1. Introducción

El desarrollo de productos a base de emulsiones juega un papel importante en las industrias de alimentos, cosméticos y fármacos. Las emulsiones pueden formarse y estabilizarse no sólo por compuestos tensioactivos (como surfactantes y proteínas) o modificadores de textura (como muchos polisacáridos), sino también por partículas sólidas para formar las llamadas "emulsiones *Pickering*" (Pickering, 1907). El mecanismo de estabilización de estas últimas consiste en la adsorción efectiva e irreversible de las partículas dispersas en la interfaz aceite-agua para formar barreras mecánicas (estéricas) alrededor de las gotas de la emulsión, y de esa manera evitar su coalescencia (Chevalier y Bolzinger, 2013; Dickinson, 2010, 2012).

En general, se pueden enumerar tres factores que influyen en la estabilización de las emulsiones *Pickering* (Fournier y col., 2009; Varka, y col., 2010): (i) el tamaño de partícula debe ser considerablemente pequeño en comparación con el tamaño de la gota; (ii) las partículas deben estar débilmente floculadas para lograr una estabilización eficiente; y (iii) las partículas utilizadas deben estar parcialmente humedecidas por ambas fases de la emulsión. El último factor indica que el ángulo de contacto del sistema trifásico debe ser mayor que 0° y menor que 180° . En general, una partícula moderadamente hidrofóbica con un ángulo de contacto inferior a 90° tiende a formar una emulsión O/W, mientras que una partícula hidrofóbica con un ángulo de contacto mayor que 90° estabiliza emulsiones W/O (Binks, 2002) (**Figura IV.2.1**).

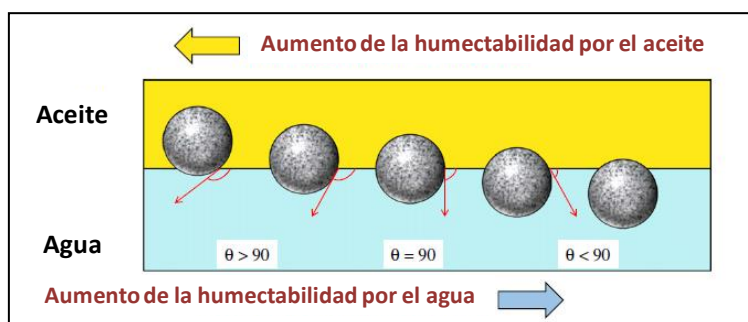


Figura IV.2.1. Variación de la humectabilidad con el ángulo de contacto de las partículas sólidas en la interface aceite-agua. Imagen extraída y adaptada de McClements y Gumus, 2016.

Por lo tanto, varias características de estas partículas sólidas, como el tamaño (Binks y Lumsdon, 2001), la forma (Kalashnikova y col., 2013; Madivala y col., 2009), la humectabilidad (Kalashnikova y col., 2012; Xhanari y col., 2011), la concentración (Frelichowska y col., 2010; Kalashnikova y col., 2011), y las interacciones (Lee y col., 2014; Wongkongkatep y col., 2012) desempeñan un papel importante en las propiedades y estabilidad de las emulsiones *Pickering*. En general, se sabe que las partículas sólidas presentaran mayores propiedades emulsificantes cuanto menor tamaño y mayor relación de aspecto (L/d) posean, mientras que su humectabilidad debería ser intermedia. A concentraciones de partículas relativamente bajas, el tamaño de las gotas de la emulsión disminuye al aumentar la concentración de partículas porque hay más partículas sólidas disponibles para estabilizar gotas de aceite más pequeñas. Por el contrario, a mayores concentraciones de partículas, puede ocurrir un aumento en el tamaño de las gotas debido a la mayor viscosidad de la fase continua que puede reducir la eficiencia del proceso de emulsificación. La estabilidad de la emulsión también se ve aumentada por las interacciones de las partículas sólidas en las interfaces de las gotas (Winuprasith y Supphantharika, 2015). Numerosos tipos de partículas inorgánicas tienen la capacidad de actuar como emulsionantes de *Pickering*, incluyendo sílica (Sadeghpour y col., 2013), arcilla (Brunier y col., 2016), hidroxiapatita (Fujii y col., 2012), nanotubos de carbono (Wang y col., 2003), etc. Sin embargo, debido a su naturaleza no comestible y/o toxicidad, su uso está limitado en la industria alimentaria y farmacéutica. Las partículas utilizadas para estabilizar emulsiones alimentarias deben ser de calidad GRAS (*Generally Recognized As Safe*) y, por lo tanto, las opciones están limitadas a partículas de origen biológico, como cristales de grasa (Gupta y Rousseau y col., 2012), derivados de celulosa (Jin y col., 2012), gránulos de almidón (Li y col., 2013), proteínas lácteas y vegetales (Wu y col., 2015; Liu y Tang, 2013), complejos proteína-polisacáridos (Meshulam y Lesmes, 2014) y flavonoides (Luo y col., 2012).

Las nanopartículas sólidas derivadas de la celulosa son de gran interés para ser evaluadas en esta aplicación debido a sus propiedades fisicoquímicas, abundancia, renovabilidad, sostenibilidad, biodegradabilidad, baja toxicidad y biocompatibilidad (Tingaut y col., 2012). En particular, los nanocristales de celulosa (NCC) (Hedjazi y Razavi, 2018; Angkuratipakorn y col., 2017; Wen y col., 2014; Kalashnikova y col., 2013) y la celulosa microfibrilada (MFC) (Costa y col., 2018; Gestranus y col., 2017; Winuprasith y Supphantharika, 2015) han mostrado la capacidad de autoensamblarse en interfaces líquidas y actuar como emulsionantes y estabilizantes en las emulsiones *Pickering*, observándose que este comportamiento está muy influenciado por las propiedades de superficie, la morfología, el tamaño y la cristalinidad de estas partículas, así como por las interacciones que pueden formar entre las mismas partículas

y con el disolvente. La **Figura IV.2.2.** ilustra un esquema de emulsiones O/W estabilizadas por NCC, adaptado de Angkuratipakorn y col., 2017.

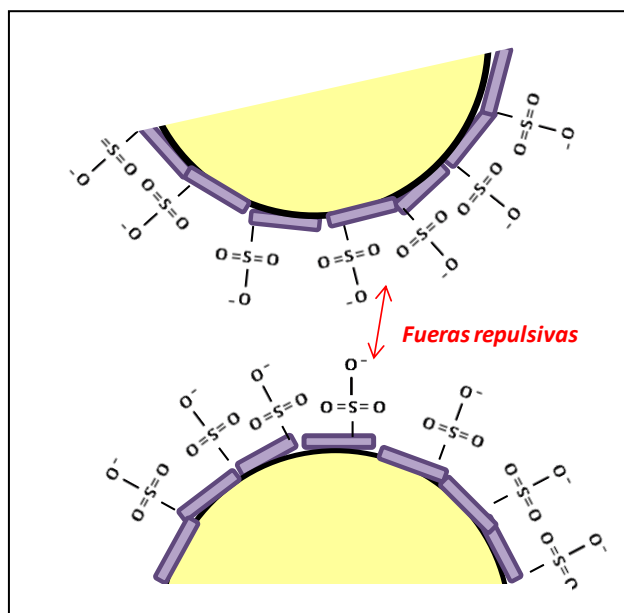


Figura IV.2.2. Esquema de emulsiones O/W estabilizadas por NCC adaptado de Angkuratipakorn y col., 2017.

Considerando la capacidad de las nanofibras de celulosa y de las proteínas (**Capítulo III**) para estabilizar emulsiones por separado, y la eficiencia de los sistemas nanocompuestos para aumentar la competitividad técnica y económica de películas en base a biomateriales (y en particular de proteínas, discutida en la **sección I.5**), podría ocurrir que estos sistemas nanocompuestos presenten buenas propiedades emulsificantes. Existen pocos trabajos publicados en este sentido.

Gülseren y Corredig (2013) lograron estabilizar emulsiones O/W de aceite de soja con nanocristales de quitosano y β -lactoglobulina. Por otra parte Feng y Lee (2016) han informado una mejora de la estabilidad y dispersabilidad de emulsiones O/W de aceite de canola utilizando caseinato de sodio junto con partículas de zeína. A su vez, Sarkar y col. (2017) han logrado estabilizar emulsiones O/W de aceite de girasol con proteínas de suero de leche y nanocristales de celulosa con la finalidad de modular la digestión de los lípidos emulsionados al restringir el acceso de la lipasa al sustrato lipídico hidrofóbico. Estas propiedades moduladoras de la digestión lipídica podrían explotarse para mejorar la sensación de saciedad o utilizarse para la liberación dirigida de componentes bioactivos dentro del tracto gastrointestinal (Sarkar y col., 2016, Sarkar y col., 2015, Tzoumaki y col., 2013).

Hasta donde sabemos, aun no hay publicaciones en las que se analicen las propiedades emulsificantes de sistemas nanocompuestos formados por proteínas de origen vegetal y

nanopartículas derivadas de polisacáridos. Estos sistemas preparados con biopolímeros de grado alimentario podrían tener un amplio rango de aplicaciones. Así, se podrían utilizar por ejemplo para encapsular ingredientes activos, o para mejorar el perfil nutricional, la textura, la estructura y la sensación de saciedad de varios alimentos procesados (Berton-Carabiny col., 2015).

IV.2.2. Objetivo

El objetivo del presente capítulo fue evaluar la capacidad emulsificante de sistemas nanocompuestos formados por proteínas de soja y nanofibras de celulosa para encapsular aceite de pescado, analizando el efecto de la concentración y el tipo de nanofibras sobre las características iniciales y la estabilidad de las emulsiones resultantes.

IV.2.3. Materiales y métodos

IV.2.3.1. Materiales

Se utilizó aceite de pescado (OmegaSur, Mar del Plata, Argentina) como fase oleosa. Como agentes emulsificantes se agregaron a la fase acuosa: un aislado proteico de soja (**APS**, SUPRO 500E, DuPont N & H, Brasil) y las distintas nanofibras de celulosa: nanocristales de celulosa (**NCC**), celulosa microfibrilada (**MFC**), celulosa microfibrilada modificada previamente por tratamiento enzimático (**MFC-E**) y celulosa microfibrilada modificada previamente por tratamiento químico (**MFC-Q**), obtenidas como se describió en las secciones **IV.1.3.4.2.**, **IV.1.3.4.3.** y **IV.1.3.4.4.**

El resto de los reactivos utilizados para llevar a cabo las experiencias que se describen a continuación fueron todos de grado analítico.

IV.2.3.2. Obtención de emulsiones O/W nanocompuestas

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el **Capítulo III**, donde encontramos que una de las formulaciones óptimas para la obtención de encapsulados resultó ser la que tenía una relación de proteína:aceite de 4:1 p/p, se decidió preparar emulsiones de aceite en agua (O/W) con una única relación de fases aceite:agua de 1,25:98,75; utilizando aislado proteico de soja (al 5% p/v) como base para preparar las dispersiones proteicas y nanocompuestas.

IV.2.3.2.1. Emulsiones de aceite de pescado en agua con proteínas de soja y nanocristales de celulosa

Inicialmente, el aislado proteico de soja (**APS**) se dispersó en agua mezclando con un agitador magnético DRAGONLAB (DRAGONLAB OS20-Pro, China) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Una vez obtenida la dispersión proteica, se adicionaron distintas volúmenes de la suspensión de nanocristales de celulosa (**NCC**) con el fin de tener porcentajes de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 20% p/p con respecto a la cantidad de **APS**. El volumen final de las dispersiones se ajustó a 100 ml con agua destilada, resultando una concentración final de **APS** del 5% p/v. Las dispersiones acuosas obtenidas ($\text{pH} \cong 7$) se mezclaron con aceite de pescado manteniendo la relación proteína:aceite de 4:1 p/p, que equivale a una relación aceite:agua de 1,25:98,75. Las emulsiones de aceite en agua (O/W) se obtuvieron como se describió en la **sección III.3.2**: primero con un mezclador de sonda de alto cizallamiento Ultra-Turrax T-25 (IKA®, Werke Gmb H & Co. KG, Alemania) a 13500 rpm durante 90 s y luego con homogeneizador ultrasónico (SONICS Vibra Cell VCX 750, Vibra CellSonics Materials Inc., Estados Unidos) a 50% de potencia, 350 W, por 5 minutos, con pulsos de 30 s.

También se prepararon emulsiones O/W conteniendo sólo los **NCC** en la fase acuosa en concentraciones equivalentes a las de las emulsiones que también contenían **APS** en la formulación, con la finalidad de evaluar el efecto emulsificante propio de los **NCC**. A continuación, en la **Tabla IV.2.1.** se detallan las formulaciones de las emulsiones O/W estudiadas, expresando también la concentración neta de **NCC** en la dispersión acuosa. Para facilitar la discusión de los sistemas nanocompuestos, en el transcurso del capítulo usaremos la concentración de nanofibras respecto de la del aislado proteico, pero entendiendo que esta concentración no tendría sentido para los sistemas sólo emulsionados con **NCC**.

Tabla IV.2.1. Formulaciones de las emulsiones de aceite de pescado en agua con una relación de fases aceite:agua 1,25:98,75, con y sin el agregado de APS y con distintas concentraciones de NCC.

g APS/100 ml de fase acuosa	g NCC/100 g de APS	g NCC/100 g de fase acuosa	g aceite de pescado
0	2	0,10	1,25
	4	0,20	
	6	0,30	
	8	0,40	
	10	0,50	
	15	0,75	
	20	1,00	
5	2	0,10	1,25
	4	0,20	
	6	0,30	
	8	0,40	
	10	0,50	
	15	0,75	
	20	1,00	

IV.2.3.2.2. Emulsiones de aceite de pescado en agua con proteínas de soja y celulosa microfibrilada

Se prepararon emulsiones de aceite de pescado en agua con distintas nanofibras de celulosa: celulosa microfibrilada (**MFC**), celulosa microfibrilada modificada previamente por tratamiento enzimático (**MFC-E**) y celulosa microfibrilada modificada previamente por tratamiento químico (**MFC-Q**).

Inicialmente, el aislado proteico de soja (**APS**) se dispersó en agua mezclando con un agitador magnético DRAGONLAB (DRAGONLAB OS20-Pro, China) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Una vez obtenida la dispersión proteica, se adicionaron distintos volúmenes de las suspensiones de nanofibras de celulosa (**MFC**, **MFC-E** y **MFC-Q**) con el fin de tener un porcentaje de 2%p/p con respecto a la cantidad de **APS**. El volumen final de las dispersiones se ajustó a 100 ml con agua destilada, resultando una concentración final de **APS** del 5% p/v. Las dispersiones acuosas obtenidas ($\text{pH} \cong 7$) se mezclaron con aceite de pescado manteniendo la relación proteína:aceite de 4:1 p/p, que equivale a una relación aceite:agua de

1,25:98,75. Las emulsiones de aceite en agua (O/W) se obtuvieron por las técnicas de Ultraturrax y ultrasonido (**UT+US**) como se describió para los **NCC** en la sección anterior.

IV.2.3.3. Caracterización de las emulsiones

IV.2.3.3.1. Morfología

La morfología de las emulsiones se observó por microscopía óptica según el método descrito en la **sección III.3.3.1.**

IV.2.3.3.2. Tamaño de partícula

La distribución de tamaño de partícula se determinó mediante dispersión de luz estática (SLS) empleando un equipo Malvern Mastersizer 2000E (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Las medidas se hicieron en presencia y en ausencia de dodecilsulfato de sodio (SDS, Cicarelli, Argentina). El SDS se utilizó para evitar la floculación de las gotas ya que carga negativamente a las moléculas de proteína o, con el tiempo, reemplaza a las mismas de la interface y produce repulsión electrostática entre las gotas. Para permitir la acción del SDS, se colocó 1 ml de la emulsión a ensayar con el agregado opcional de 1 ml de solución de SDS 1% p/v y se las mezcló suavemente. Las determinaciones se realizaron agregando gota a gota 1 ml de la muestra a un vaso de precipitado con 600 ml de agua en constante agitación a 2000 rpm

A partir de las medidas realizadas, se obtuvieron el diámetro promedio de volumen-superficie o diámetro de Sauter, $D_{3,2}$ y el diámetro promedio de volumen equivalente o diámetro de Broucker, $D_{4,3}$

Asimismo, el $D_{4,3}$ se utilizó para calcular el índice de floculación, **IF** (**Ecuación IV.2.1**) y el índice de coalescencia, **IC** (**Ecuación IV.2.2**) según lo descrito por Palazolo y col. (2005):

$$IF = (D_{4,3t} - D_{4,3t+SDS}) / D_{4,3t+SDS} \quad \text{Ecuación IV.2.1}$$

$$IC = (D_{4,3t+SDS} - D_{4,3in+SDS}) / D_{4,3in+SDS} \quad \text{Ecuación IV.2.2}$$

Donde: $D_{4,3t}$ (μm) es el valor de $D_{4,3}$ a un cierto tiempo t ; $D_{4,3t+SDS}$ (μm) es el valor de $D_{4,3}$ a un cierto tiempo t medido en presencia de SDS; $D_{4,3in+SDS}$ (μm) es el valor inicial de $D_{4,3}$ medido en presencia de SDS.

Las emulsiones nanocompuestas de **APS** y **NCC** se caracterizaron inicialmente y a los 3, 5, 10 y 15 días de su almacenamiento a temperatura ambiente; mientras que las emulsiones de

APS con las distintas **MFC** se caracterizaron inicialmente y a los 15 días de su almacenamiento a temperatura ambiente.

Las determinaciones se realizaron sobre dos muestras independientes de cada emulsión, registrando tres mediciones de cada una en el equipo.

IV.2.3.3.3. Estabilidad

Inmediatamente luego de la emulsificación, la estabilidad de las emulsiones fue analizada mediante la cuantificación de luz dispersada (*backscattered light o backscattering*), según el método descrito en la **sección III.3.3.4.**

Se colocaron aproximadamente 6 ml de emulsión en la celda de medida y se procedió a ubicar la celda en el equipo. Se obtuvieron las cinéticas de cremado-floculación y coalescencia-floculación registrando la variación del *backscattering* (%BS) en función de la altura del tubo de medida y del tiempo. Para el análisis, se determinaron los valores promedio del %BS en la parte inferior del tubo de medida (10-15 mm desde la base) y en la parte superior (45-50 mm desde la base) del mismo.

Las determinaciones se realizaron inmediatamente después de la emulsificación y durante su almacenamiento estanco a temperatura ambiente (3, 5, 10 y 15 días).

Las medidas se realizaron al menos sobre dos muestras independientes de cada una de las emulsiones.

IV.2.3.3.4. Potencial Z

Las medidas de potencial Z se realizaron por dispersión de luz dinámica (DLS) con un analizador de partículas NanoparticaSZ-100 (Nanopartica SZ-100 series, Horiba, Japón). Para ello se realizó una dilución 1/1000 de la emulsión correspondiente en agua destilada y se la colocó cuidadosamente en la celda de medición, evitando la generación de burbujas. Los resultados presentados son el promedio de 10 mediciones.

IV.2.3.3.5. Comportamiento reológico

Ensayo rotacional: El comportamiento de flujo de las emulsiones se determinó con un reómetro de esfuerzo controlado Haake RS 600 (Haake, Alemania), empleando sensores rugosos con geometría plato-plato, manteniendo una distancia entre platos (*gap*) de 1 mm. Las determinaciones se realizaron a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ sobre muestras obtenidas inmediatamente luego del proceso de emulsificación. Las muestras se sometieron a un aumento continuo de la

velocidad de corte desde 1 a 500 s⁻¹ en 2 minutos, luego se mantuvo 500 s⁻¹ durante 1 minuto, y finalmente se realizó un descenso de la velocidad de corte de 500 a 1 s⁻¹ en 2 minutos.

El comportamiento de flujo de las emulsiones se describió ajustando los datos experimentales al modelo de Ostwald de Waele (*Power-law*):

$$\tau = kD^n \quad \text{Ecuación IV.2.3}$$

Donde: τ es el esfuerzo de corte (Pa), D es el gradiente de velocidad de deformación (s⁻¹), k es el índice de consistencia (Pa.s ^{n}) y n es el índice de comportamiento de flujo (adimensional). Las medidas se realizaron por triplicado.

Ensayo oscilatorio: El comportamiento viscoelástico de las emulsiones se determinó con un reómetro de esfuerzo controlado HaakeRheoStress 600 (Haake, Alemania), empleando sensores rugosos con geometría plato-plato, manteniendo una distancia entre platos (*gap*) de 1 mm. Las determinaciones se realizaron por triplicado, a 25 ± 0,5 °C sobre muestras obtenidas inmediatamente luego del proceso de emulsificación.

Inicialmente, se determinó la región de viscoelasticidad lineal, en donde las propiedades de la emulsión no dependen de la magnitud del esfuerzo aplicado, realizando un barrido de esfuerzos entre 0,5 y 100 Pa, a una frecuencia de 1 Hz. Posteriormente, se realizó un barrido de frecuencias entre 0,1 y 10 Hz, manteniendo fijo el esfuerzo en 5 Pa.

A partir de las curvas obtenidas se determinaron el módulo de almacenamiento o elástico (G'), el módulo de pérdida o viscoso (G''), la viscosidad compleja (η^*) y la tangente del ángulo de desfasaje (δ).

El módulo elástico se encuentra relacionado con la energía almacenada en el material, mientras que el módulo viscoso está asociado con la energía disipada por el material. El ángulo de desfasaje (δ) entre el esfuerzo y la deformación es un indicativo de la relación entre la energía disipada y la almacenada por el material. En los sólidos ideales, el esfuerzo y la deformación se encuentran en fase, por lo que $\delta=0^\circ$, mientras que en un líquido ideal se presenta una diferencia de fase de 90° entre el esfuerzo y la deformación (Steffe, 1996).

IV.2.3.4. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valor medio ± desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medias fueron evaluadas por el Test de Tukey para comparación de pares, con un nivel de significación $\alpha=0,05$. Para ello se empleó el programa Statgraphics Centurion, versión 16.1.18 (Statgraphics, Estados Unidos).

IV.2.4. Resultados y discusión

IV.2.4.1. Emulsiones de aceite de pescado en agua con proteínas de soja y/o nanocristales de celulosa

En esta sección se presentan los resultados de las emulsiones de aceite de pescado en agua empleando proteínas de soja y nanocristales de celulosa como emulsificantes. Se sabe que cuando hay más de un emulsificante en la formulación de una emulsión se produce una adsorción competitiva en la interfase, pero también pueden existir interacciones entre los diferentes componentes (Dickinson, 2011; Ghouchi Eskandar y col., 2007; Niu y col., 2015). Por lo tanto, con el objetivo de dilucidar el efecto de cada uno de los componentes sobre las propiedades de los sistemas, también se obtuvieron y caracterizaron emulsiones O/W utilizando sólo proteínas de soja o nanocristales (en concentraciones equivalentes a las de las formulaciones nanocompuestas) como agentes emulsificantes dispersos en la fase acuosa.

En la **Figura IV.2.3** se muestra la morfología de todas las emulsiones estudiadas. La emulsión estabilizada sólo con proteínas de soja (**APS**) estuvo formada por gotas con tamaños que oscilaban entre 1-3 μm mientras que aquellas preparadas sólo con dispersiones de NCC presentaron gotas de mayor tamaño, entre 15-25 μm , junto con la aparición de agregados de nanocristales que se perciben como estructuras alargadas próximas a las gotas, a concentraciones iguales o superiores al 6%. Por su parte, las emulsiones nanocompuestas estuvieron formadas por gotas más similares en tamaño a las proteicas, aunque a simple vista parecieran ser más pequeñas (1-3 μm) y agregados de NCC que ya se observaron para concentraciones de 2% de NCC y aparecieron con mayor frecuencia al aumentar la concentración de NCC.

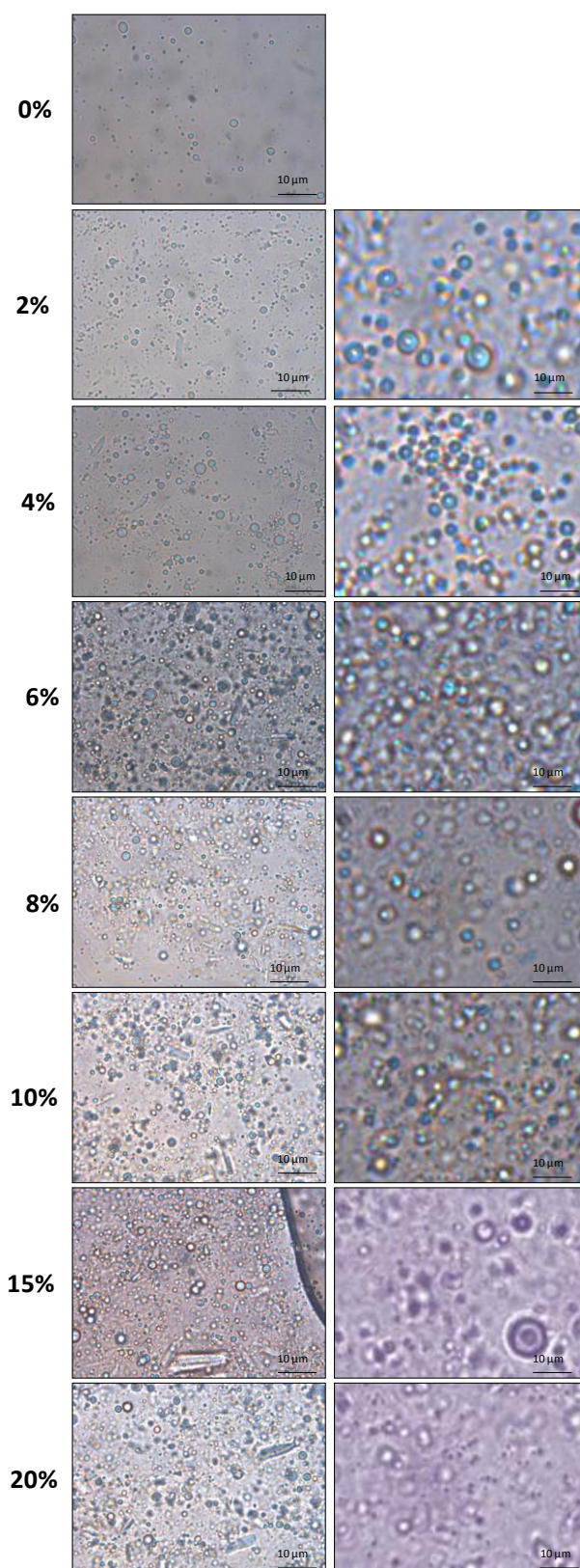


Figura IV.2.3. Morfología de las emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizadas sólo por proteínas de soja (APS+ 0% NCC), por sistemas nanocompuestos formados con proteínas de soja y distintas concentraciones de NCC (2, 4, 6, 8, 10, 15 y 20% p/p respecto de la cantidad de APS) y sólo por NCC en concentraciones equivalentes a las estudiadas para los sistemas nanocompuestos. Aumento 100X.

En la **Figura IV.2.4.** se muestra la distribución de tamaño de partículas iniciales de las emulsiones estabilizadas sólo con proteínas (0% NCC) y de las emulsiones nanocompuestas con concentraciones variables de NCC (2-20% p/p respecto de APS). Estas emulsiones presentaron distribuciones multimodales de tamaño de partículas inmediatamente después de su obtención. La emulsión estabilizada sólo por APS presentó una distribución bimodal, caracterizada por una población mayoritaria de partículas con aproximadamente 3 μm de diámetro y una población minoritaria alrededor de los 80 μm . Al incorporar 2% de NCC en las emulsiones, se observan claramente dos poblaciones más estrechas, una mayoritaria correspondiente a partículas de 1-2 μm de diámetro y otra con tamaños de 10-20 μm , que podría llegar a estar solapada con una tercera población minoritaria que incluiría partículas de hasta 150 μm . Con el agregado de 4%, se incrementa el pico de 10-20 μm a expensas de los de mayor tamaño, y para 6% aumenta la población de 1-2 μm en detrimento de la de 10-20 μm . Por encima de esas concentraciones, la tendencia se empieza a invertir llegando la muestra con 20 % de NCC a tener dos poblaciones equivalentes con máximos correspondientes a 1 μm y 8-10 μm . El aumento en el tamaño de las partículas podría indicar que no sólo las proteínas se encuentran en la interfase sino que es posible que los NCC también se reordenen allí. Nesterenko y col. (2014) sugirieron que las proteínas podrían anclarse en la superficie de las partículas coloidales formando aglomerados que luego pueden adsorberse en la interfase aceite-agua, aumentando el tamaño de las partículas.

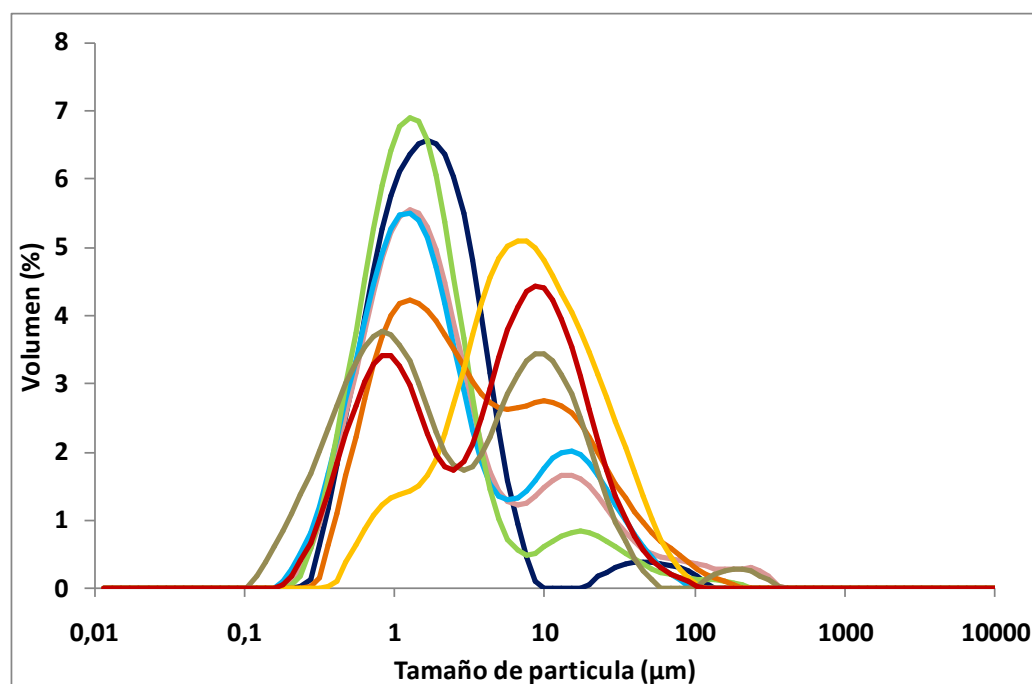


Figura IV.2.4. Distribución del tamaño de partículas inicial de las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas de aislado proteico de soja (APS) con distintas concentraciones de NCC (0■, 2■, 4■, 6■, 8■, 10■, 15■ y 20■%p/p con respecto a la cantidad de APS).

En la **Tabla IV.2.2.** se muestran los valores de diámetros promedio $D_{3,2}$, $D_{4,3}$ (determinado en presencia y ausencia de SDS) y el índice de floculación (IF) de las emulsiones estabilizadas sólo con APS y de las emulsiones nanocompuestas (APS+NCC), inmediatamente después de su obtención. La emulsión estabilizada sólo por APS presentó valores de $D_{3,2}=1\ \mu\text{m}$ y de $D_{4,3}=3,6\ \mu\text{m}$; mientras que las emulsiones nanocompuestas tuvieron valores de $D_{3,2}=1-3\ \mu\text{m}$ y de $D_{4,3}=4-10\ \mu\text{m}$.

Teniendo en cuenta que el parámetro $D_{4,3}$ es sensible a procesos de floculación y coalescencia y que durante su determinación es probable que las partículas débilmente floculadas se separen por la agitación mecánica presente en la cámara de medida del equipo, mientras las partículas fuertemente floculadas queden intactas, se realizó su determinación en presencia y en ausencia de SDS. El ensayo en presencia de SDS permitió evaluar el tamaño de las partículas individuales, evitando su floculación (Anton y col., 2002; McClements, 2015). Al comparar los valores de $D_{4,3}$ determinados con y sin SDS (**Tabla IV.2.2**) se pudo observar que tanto las emulsiones estabilizadas sólo con APS o con los sistemas nanocompuestas (APS+NCC) presentaron flóculos. El índice de floculación (**Tabla IV.2.2**) de la emulsión estabilizada sólo por APS fue de 53, por lo que el tamaño real de las partículas resultó ser $2,3\ \mu\text{m}$. Al incorporar 2% de NCC en la formulación, se obtuvo una emulsión con mayor grado de floculación (IF=139), sin embargo el tamaño de las partículas individuales resultó similar al de la emulsión estabilizada sólo con APS. Al aumentar la concentración de NCC en las emulsiones, se observó una menor tendencia a la floculación, disminuyendo el IF de 139 a 1. A su vez, las emulsiones nanocompuestas con concentraciones de NCC mayores al 8% fueron las que presentaron las partículas individuales con mayores tamaños (entre $5,8$ y $7,6\ \mu\text{m}$). En particular, la emulsión nanocompuesta con 10% de NCC estaría compuesta por un menor número de partículas de gran tamaño y con baja proporción de flóculos.

Tabla IV.2.2. D_{3,2} inicial, D_{4,3} inicial con y sin SDS, e índice de floculación (IF) inicial de las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas de aislado proteico de soja (APS) y distintas concentraciones de NCC (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 20%p/p con respecto a la cantidad de APS).

g NCC/100g APS	D _{3,2} (μm)		D _{4,3} (μm)		IF
	Sin SDS	Sin SDS	Con SDS	Con SDS	
0	1,027 ± 0,167 ^a	3,602 ± 1,389 ^a	2,348 ± 0,533 ^a		53
2	1,183 ± 0,062 ^{a,b}	10,170 ± 2,046 ^c	4,263 ± 0,614 ^{a,b}		139
4	1,141 ± 0,057 ^{a,b}	6,646 ± 1,612 ^{a,b,c}	3,954 ± 0,276 ^{a,b}		68
6	0,967 ± 0,106 ^a	4,340 ± 0,815 ^{a,b}	3,053 ± 2,426 ^a		42
8	1,532 ± 0,292 ^c	8,552 ± 3,212 ^c	5,871 ± 1,194 ^{b,c}		46
10	3,112 ± 0,345 ^d	9,847 ± 2,672 ^c	7,620 ± 0,476 ^c		29
15	0,991 ± 0,034 ^a	7,391 ± 2,202 ^{b,c}	6,628 ± 2,056 ^c		12
20	1,377 ± 0,131 ^{b,c}	7,344 ± 0,522 ^{b,c}	7,245 ± 0,768 ^c		1

Los valores en las columnas con distintas letras son significativamente diferentes (p<0,05) según el test de Tukey.

Las emulsiones son sistemas que generalmente contienen partículas cargadas eléctricamente que interactúan entre sí y con el medio en el cual se encuentran. La determinación del **potencial Z** permite estudiar dichas interacciones eléctricas y también proporciona una medida de la carga neta en la superficie de las partículas y de la distribución del potencial eléctrico en la interfase. En la **Tabla IV.2.3** se muestran los valores de potencial Z de las emulsiones estabilizadas sólo por APS, sólo por NCC (con diferentes concentraciones), así como también el de las emulsiones nanocompuestas (APS+NCC). Todas las emulsiones analizadas presentaron valores negativos de potencial Z. En particular, las emulsiones estabilizadas sólo por APS presentaron un potencial Z de -28,8 mV. Se sabe que la carga neta de una proteína depende de los residuos cargados de los aminoácidos que la componen y, a su vez, la carga de los mismos varía según el pH del medio en el que se encuentra dispersa la proteína. Malhotra y Coupland (2004) calcularon teóricamente la carga total de las proteínas de soja en función del pH mediante la ecuación de Henderson-Hasselbach, utilizando datos de bibliografía de la composición aminoacídica de estas proteínas y de los valores de pKa de sus cadenas laterales. Estos autores encontraron que en los valores de pH por debajo del punto isoelectrico de las proteínas de soja (pI = 4,5) su carga neta está dominada por una contribución positiva de lisina e histidina; mientras que al aumentar el pH por encima de su pI hay una contribución de carga negativa dada por los ácidos aspártico y glutámico. Por lo tanto,

es razonable el valor negativo de potencial Z de la emulsión estabilizada sólo con APS, ya que el pH de la emulsión ($\approx 6-7$) es mayor que el pI de las proteínas de soja.

Por otra parte, las emulsiones estabilizadas sólo por NCC presentaron valores negativos de potencial Z (**Tabla IV.2.3**) debido a la presencia de los nanocristales de celulosa, cuya carga neta negativa era de $-41,6$ mV (**Sección IV.1.4.2**) debido a la presencia de grupos sulfato en su superficie producto de las condiciones de hidrólisis ácida utilizadas para su obtención. Los valores de potencial Z de las emulsiones estabilizadas sólo por NCC estuvieron entre -54 mV y -75 mV. Al incrementar la concentración de nanocristales hasta 6% el valor absoluto de potencial Z aumentó, pero a partir de esa concentración las emulsiones presentaron fluctuaciones en ese rango de valores. Los valores encontrados, están en el rango de los descritos por Kargar y col. (2012) (≈ -60 mV) para emulsiones O/W estabilizadas con NCC preparados a partir de celulosa microcristalina.

Tabla IV.2.3. Potencial Z de las emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizadas sólo por proteínas de soja (APS+ 0% NCC), por sistemas nanocompuestos formados con proteínas de soja y distintas concentraciones de NCC (2, 4, 6, 8, 10, 15 y 20% p/p respecto de la cantidad de APS) y sólo por NCC en concentraciones equivalentes a las estudiadas para los sistemas nanocompuestos.

g NCC/100g APS	Potencial Z (mV)	
	APS+NCC	Sólo NCC
0	$-28,80 \pm 1,90^e$	
2	$-56,47 \pm 5,44^{a,b}$	$-53,80 \pm 6,26^c$
4	$-57,94 \pm 1,67^a$	$-74,89 \pm 4,28^a$
6	$-56,94 \pm 2,88^a$	$-74,50 \pm 2,99^a$
8	$-51,12 \pm 2,03^c$	$-57,26 \pm 2,44^c$
10	$-47,89 \pm 0,87^{c,d}$	$-64,83 \pm 2,08^b$
15	$-51,18 \pm 5,87^{b,c}$	$-56,46 \pm 3,81^c$
20	$-43,40 \pm 4,44^d$	$-71,69 \pm 5,16^a$

Los valores en las columnas con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según el test de Tukey.

Todas las emulsiones nanocompuestas presentaron mayores valores absolutos de potencial Z que las emulsiones estabilizadas sólo por APS, posiblemente debido a la contribución de la carga negativa dada por los nanocristales de celulosa; pero algo menores que los de las emulsiones estabilizadas sólo con NCC, sugiriendo la presencia de interacciones entre ambos componentes y/o la formación de agregados de NCC. En este sentido, Sarkar y col. (2017) informaron un valor de potencial Z positivo para emulsiones estabilizadas sólo por proteínas de suero de leche (WPI) a pH=3, que se volvió negativo en las emulsiones estabilizadas por WPI

y NCC. Para explicar estos resultados, estos autores postularon que los NCC forman una capa que cubre la superficie de la gota que se encuentra recubierta con WPI. En nuestro caso, sería posible pensar en interacciones electrostáticas entre los dominios restantes con cargas positivas de las proteínas de soja y los grupos sulfato de los NCC. Al incorporar hasta un 6% de NCC no se observan cambios significativos en el potencial Z (-56 mV) de las emulsiones nanocompuestas, mientras que al agregar más de 8% de NCC el valor absoluto del potencial Z tiende a disminuir llegando a -43 mV para la emulsión nanocompuesta con 20% de NCC. Por lo tanto, la concentración de nanocristales condiciona la posibilidad de que se den interacciones electrostáticas entre las proteínas de soja y los NCC.

A pesar que todas las emulsiones presentaron valores absolutos de potencial Z próximos a 30 mV o mayores y se esperaría que sean sistemas muy estables (Sherman, 1970; Hunter, 2013), se evaluó la estabilidad de cada emulsión durante su almacenamiento a temperatura ambiente a través del análisis de luz dispersada (*backscattering*). En la **Tabla IV.2.4** se presentan los valores promedio de *backscattering* iniciales en las zonas inferior y superior del tubo de medida de las emulsiones estabilizadas con APS y diferentes concentraciones de NCC y de aquellas estabilizadas sólo con diferentes concentraciones de NCC. Asimismo, en las **Figuras IV.2.5 y IV.2.6** se muestran las cinéticas de desestabilización de dichos sistemas emulsionados.

Las emulsiones estabilizadas sólo por **APS** presentaron un porcentaje de *backscattering* inicial (%BS₀) uniforme a lo largo del tubo (48%) (**Tabla IV.2.4**). Al tercer día, se observa una disminución en el BS promedio de la zona inferior del tubo (**Figura IV.2.5.A**) y un aumento en el BS promedio de la zona superior (**Figura IV.2.5.B**). Teniendo en cuenta que el BS está relacionado con el tamaño de las partículas y con la densidad de las partículas en las emulsiones (Palazolo y col., 2004 y 2005), la disminución del BS en la zona inferior del tubo podría asociarse con una disminución en la densidad de las gotas debido a la separación gravitacional (cremado) y/o a la presencia de flóculos. Por otra parte, el aumento en el BS de la zona superior del tubo podría deberse a la formación de la fase crema enriquecida en gotas de aceite. A partir del quinto día de almacenamiento, no se detectaron cambios en la zona inferior del tubo (BS=41%); pero sí se observó una tendencia levemente creciente en el BS promedio de la zona superior del tubo (BS=68%). Aún así, no fue posible evidenciar la separación de las fases a simple vista ni con los perfiles de *backscattering* durante el almacenamiento estudiado.

Tabla IV.2.4. Porcentaje inicial de Backscattering (%BS₀) en las zonas inferior y superior de la celda de medida de las emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizadas sólo por proteínas de soja (APS + 0% NCC), por sistemas nanocompuestos formados con proteínas de soja y distintas concentraciones de NCC (2, 4, 6, 8, 10, 15 y 20%p/p respecto de la cantidad de APS) y sólo por NCC en concentraciones equivalentes a las estudiadas para los sistemas nanocompuestos.

g NCC/100g APS	APS+NCC		Sólo NCC	
	%BS ₀ – Zona inferior	%BS ₀ – Zona superior	%BS ₀ – Zona inferior	%BS ₀ – Zona superior
0	47,80 ± 0,09 ^{a,b}	48,28 ± 1,21 ^a		
2	48,52 ± 0,52 ^b	50,69 ± 0,58 ^a	42,52 ± 2,15 ^a	40,44 ± 3,13 ^a
4	46,86 ± 0,48 ^a	50,03 ± 0,58 ^a	42,94 ± 1,55 ^a	42,52 ± 2,15 ^a
6	51,55 ± 0,08 ^c	55,23 ± 0,26 ^b	44,60 ± 2,75 ^a	40,86 ± 2,55 ^a
8	48,34 ± 0,27 ^b	50,87 ± 0,60 ^a	43,77 ± 1,65 ^a	39,61 ± 3,15 ^a
10	53,51 ± 0,55 ^d	56,74 ± 0,90 ^{b,c}	44,60 ± 1,57 ^a	39,19 ± 3,57 ^a
15	55,68 ± 0,08 ^e	58,42 ± 0,77 ^c	44,00 ± 0,35 ^a	45,57 ± 0,98 ^a
20	54,88 ± 0,16 ^e	58,24 ± 0,01 ^c	45,32 ± 0,37 ^a	47,86 ± 0,13 ^a

Los valores en las columnas con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según el test de Tukey.

Las emulsiones estabilizadas sólo por NCC también presentaron %BS₀ uniformes a lo largo del tubo (41-46%) (**Tabla IV.2.4**), pero resultaron levemente inferiores que el %BS₀ de la emulsión estabilizada sólo por APS. Este resultado sugiere que las emulsiones con APS están formadas por partículas de menor tamaño que las emulsiones con NCC, lo cual es acorde con los resultados observados por microscopía óptica. La concentración de NCC no afectó significativamente el %BS₀, pero sí su estabilidad (**Figura IV.2.6**). Si bien no se detectaron cambios significativos en la zona inferior del tubo (**Figura IV.2.6.A**); se observó un aumento en el BS promedio de la zona superior del tubo (**Figura IV.2.6.B**) en las emulsiones con 4, 6, 8 y 10% de NCC. En estas emulsiones los mecanismo de floculación y coalescencia parecieran ser los más importantes en su desestabilización. En particular, las emulsiones formuladas con las concentraciones de NCC extremas (2, 15 y 20% de NCC) resultaron las más estables durante el almacenamiento estudiado, no observándose cambios en sus perfiles de *backscattering* (**Figura IV.2.C y D**). Varios autores han utilizado concentraciones similares (entre 0,5 y 1,5 g NCC/100g fase acuosa) de NCC de distintas fuentes, entre ellas celulosa microcristalina (Kargar y col., 2012), cáscaras de pistacho (Kasiri y col., 2018), espárragos (Wang y col., 2016) y salvado de arroz (Angkuratipakorn y col., 2017), para estabilizar emulsiones de aceite en agua, indicando que a partir de esas concentraciones las partículas lograban cubrir la superficie de las gotas y formar una capa interfacial gruesa alrededor de las mismas (Frelichowska y col., 2012).

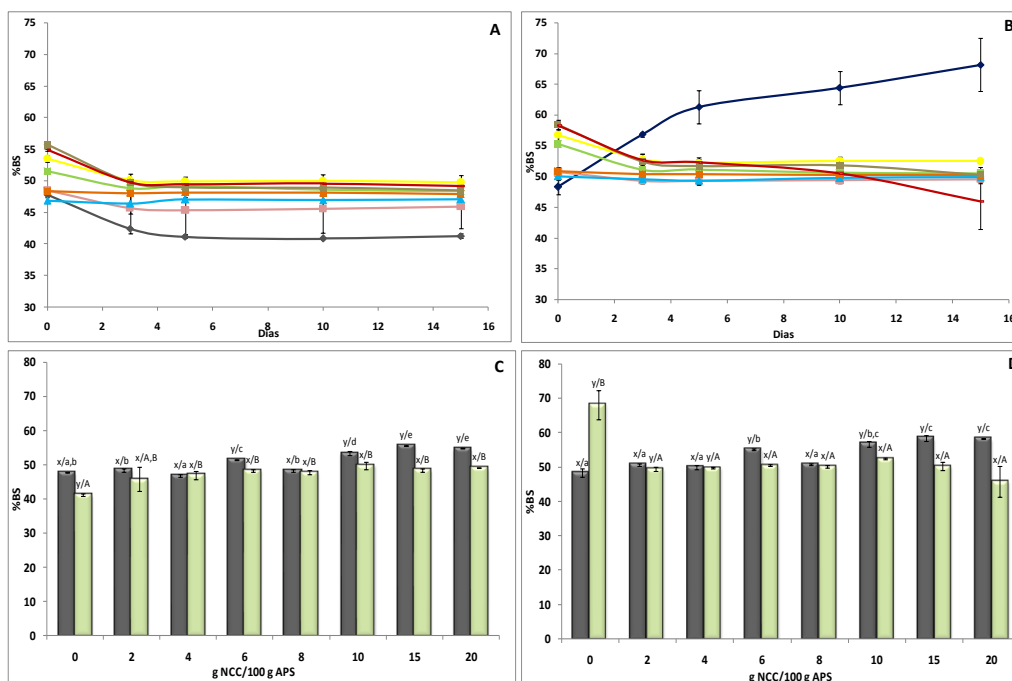


Figura IV.2.5. A) Cinéticas de desestabilización en la zona de cremado/floculación (10–15 mm del tubo de medida), **B)** Cinéticas de desestabilización en la zona de coalescencia/floculación (45–50 mm del tubo de medida), **C)** Valores de %BS en la zona de cremado/floculación, **D)** Valores de %BS en la zona de coalescencia/floculación, correspondientes a las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas de aislado proteico de soja (APS) con distintas concentraciones de NCC (0 ■, 2 ■, 4 ■, 6 ■, 8 ■, 10 ■, 15 ■ y 20 ■ p/p con respecto a la cantidad de APS), al inicio (■) y a los 15 días (■). Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según el test de Tukey. Las letras x,y informan diferencias entre el valor de BS al inicio y a 15 días de cada muestra. Las letras minúsculas indican diferencias entre las formulaciones al día inicial y las letras mayúsculas las diferencias a los 15 días.

Todas las emulsiones nanocompuestas (**APS+NCC**) presentaron valores de $\%BS_0$ mayores que los de las emulsiones estabilizadas con diferentes concentraciones de NCC (**Tabla IV.2.4**). Sólo las emulsiones nanocompuestas con 10, 15 y 20% de NCC presentaron superiores $\%BS_0$ (54–58%) que el de las emulsiones estabilizadas sólo por APS (48%). Estos resultados sugieren que estas emulsiones nanocompuestas presentan mayor densidad de gotas o gotas de mayor tamaño que las otras emulsiones estudiadas, siendo acorde a lo mostrado en la **Figura IV.2.4**. La concentración de NCC afectó la estabilidad de las emulsiones nanocompuestas. Los sistemas con menores concentraciones de NCC se mantuvieron estables durante su almacenamiento, no observándose cambios en los valores promedio de BS en ambas zonas del tubo (**Figura IV.2.5 A y B**). Por otra parte, luego de tres días de almacenamiento, las emulsiones nanocompuestas con 10, 15 y 20% de NCC presentaron una disminución notoria en los BS promedios en ambas zonas del tubo, indicando que se están desestabilizando por cremado/floculación y floculación/coalescencia. Dichos valores de BS permanecieron aproximadamente constantes hasta finalizar el almacenamiento (**Figura IV.2.5 C y D**). Cabe

destacar que a los 15 días estas últimas emulsiones presentaron una capa de líquido (exudado) en la parte inferior del tubo.

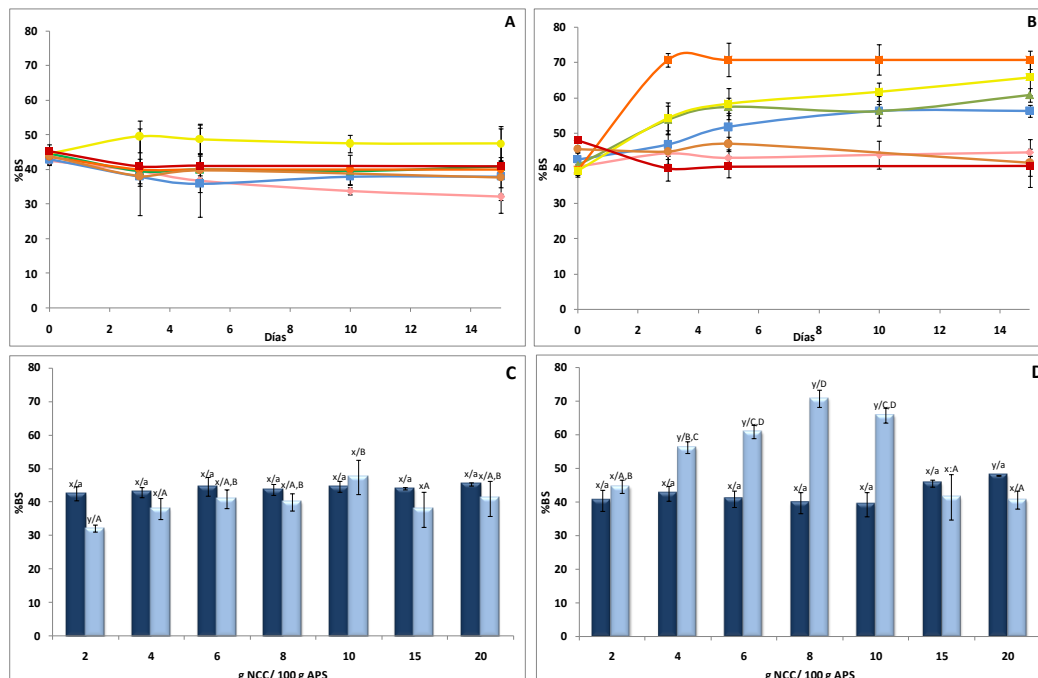


Figura IV.2.6. A) Cinéticas de desestabilización en la zona de cremado/floculación (10–15 mm del tubo de medida), **B)** Cinéticas de desestabilización en la zona de coalescencia/floculación (45–50 mm del tubo de medida), **C)** Valores de %BS en la zona de cremado/floculación, **D)** Valores de %BS en la zona de coalescencia/floculación, correspondientes a las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas con distintas concentraciones de NCC (concentraciones equivalentes a los sistemas nanocompuestos: 0 ■, 2 ■, 4 ■, 6 ■, 8 ■, 10 ■, 15 ■ y 20 ■ %p/p con respecto a la cantidad de APS), al inicio (■) y a los 15 días (■).

Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según el test de Tukey. Las letras x,y informan diferencias entre el valor de BS al inicio y a 15 días de cada muestra. Las letras minúsculas indican diferencias entre las formulaciones al día inicial y las letras mayúsculas las diferencias a los 15 días.

Con el objetivo de profundizar el análisis, se determinó el diámetro promedio $D_{4,3}$ en presencia y ausencia de SDS (**Figura IV.2.7**) y se calcularon los índices de floculación (**Tabla IV.2.5**) y coalescencia (**Tabla IV.2.6**) en función del tiempo de almacenamiento de las emulsiones en estudio. En la **Figura IV.2.7** se puede observar un incremento de los diámetros promedio $D_{4,3}$ (determinados sin SDS) de todas las emulsiones al transcurrir el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, dicho incremento en el tamaño de las partículas dependió de la concentración de NCC presentes en la emulsión. La emulsión estabilizada sólo por APS mostró un aumento sostenido en el valor de $D_{4,3}$ sin SDS en función del tiempo, pero valores de $D_{4,3}$ con SDS aproximadamente constantes durante todo el almacenamiento (**Figura IV.2.7.A**). Esto implica que dicha emulsión estaría compuesta por partículas pequeñas, que inicialmente

presentaron cierto grado de floculación el cual también aumentó al transcurrir el tiempo (**Tabla IV.2.5**), resultando en partículas con mayor tamaño. En este sistema, la coalescencia cobró importancia al finalizar el almacenamiento (**Tabla IV.2.6**), por lo que los flóculos formados podrían estar retrasando dicho proceso de desestabilización.

La emulsión nanocompuesta con 2% de NCC mostró un aumento inicial en el valor de $D_{4,3}$ sin SDS a los tres días de almacenamiento que luego se mantuvo constante; y valores de $D_{4,3}$ con SDS aproximadamente constantes durante todo el almacenamiento (**Figura IV.2.7.B**). Dicha emulsión estaría compuesta por partículas pequeñas, que inicialmente presentaron un alto grado de floculación (**Tabla IV.2.5**) que fue en aumento hasta el quinto día de análisis, a partir del cual comienza a observarse un pequeño incremento en el índice de coalescencia (**Tabla IV.2.6**).

En las emulsiones nanocompuestas con 4 y 6% de NCC se observó un incremento inicial en el valor de $D_{4,3}$ sin SDS hasta el quinto día de almacenamiento que luego se mantuvo constante; y valores de $D_{4,3}$ con SDS en aumento durante todo el almacenamiento (**Figura IV.2.7.C y IV.2.7.D**). En estas emulsiones, que presentaron menor IF que la emulsión nanocompuesta con 2%NCC (**Tabla IV.2.5**), la coalescencia cobra importancia a partir del tercer día de almacenamiento (**Tabla IV.2.6**).

Por otra parte, en las emulsiones nanocompuestas con 8, 10 y 20% de NCC se observó un aumento sostenido en los valores de $D_{4,3}$ evaluados con y sin SDS durante su almacenamiento (**Figura IV.2.7.E, IV.2.7.F y IV.2.7.H**). En estos casos, la coalescencia es el mecanismo de desestabilización predominante (**Tabla IV.2.6**), presentando bajos grados de floculación (**Tabla IV.2.5**). Resta mencionar que la emulsión nanocompuesta con 15% de NCC presentó un comportamiento diferente; observándose un aumento sostenido en los valores de $D_{4,3}$ sin SDS durante su almacenamiento y valores de $D_{4,3}$ con SDS aproximadamente constantes (**Figura IV.2.7.G**). En este caso, el mecanismo de floculación (**Tabla IV.2.5**) resulta predominante sobre la coalescencia, la cual comienza a ser evidente al finalizar el almacenamiento (**Tabla IV.2.6**).

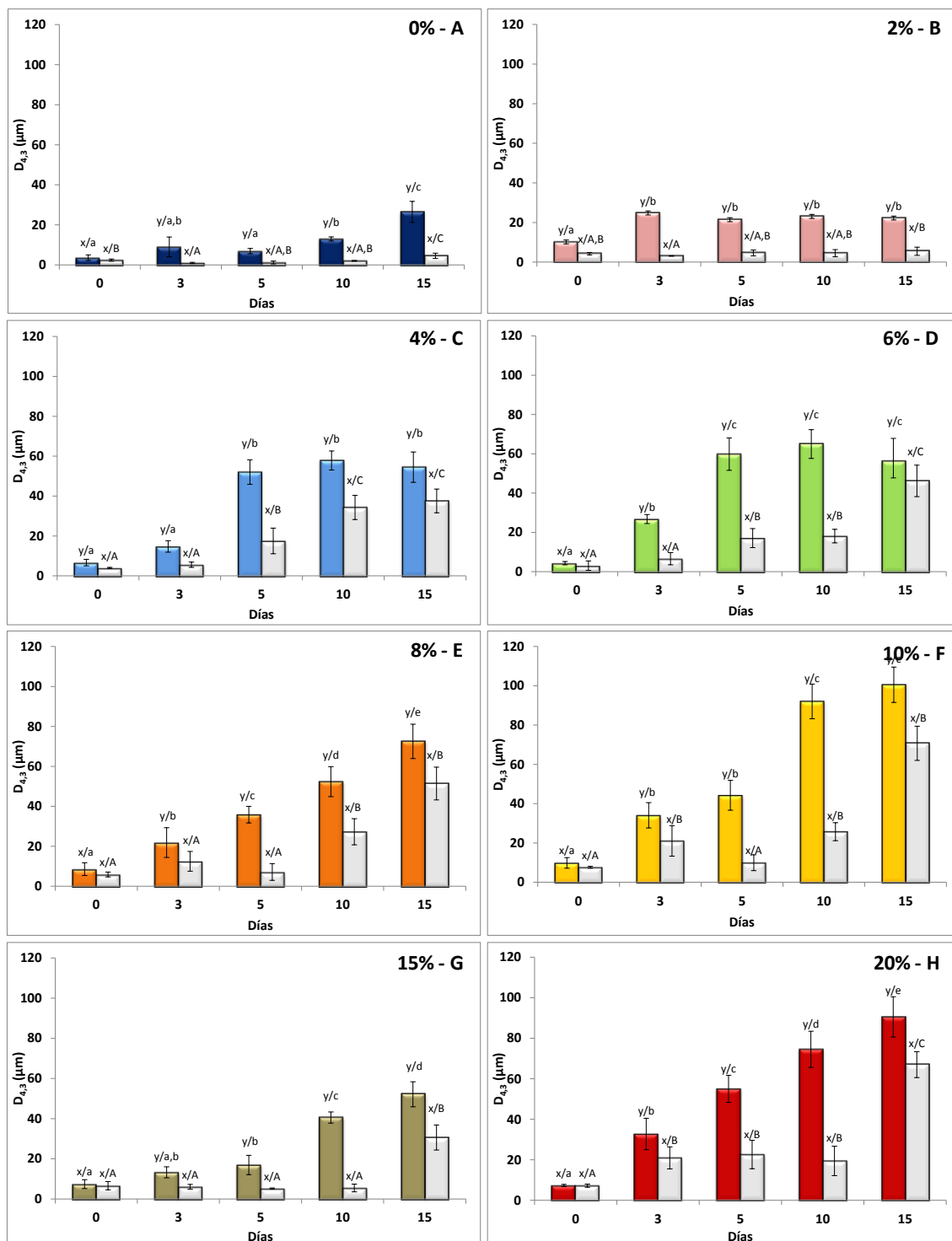


Figura IV.2.7. $D_{4,3}$ con (□) y sin (■) SDS de las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas de aislado proteico de soja (APS) con distintas concentraciones de NCC: 0 (A), 2 (B), 4 (C), 6 (D), 8 (E), 10 (F), 15 (G) y 20 (H) %p/p con respecto a la cantidad de APS al momento inicial, a los 3, 5, 10 y 15 días.

Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según el test de Tukey. Las letras x,y informan diferencias entre el valor de $D_{4,3}$ con y sin SDS de cada muestra. Las letras minúsculas indican diferencias entre los $D_{4,3}$ sin SDS, y las letras mayúsculas entre los valores con SDS.

Tabla IV.2.5. Índice de Floculación (IF) de las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas de aislado proteico de soja (APS) con distintas concentraciones de NCC (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 20%p/p con respecto a la cantidad de APS) al momento inicial y a los 3, 5, 10 y 15 días.

g NCC / 100 g APS	Inicial	3 días	5 días	10 días	15 días
0	53	830	495	546	487
2	138	705	364	414	306
4	68	164	197	69	45
6	42	305	250	41	296
8	45	76	404	92	41
10	29	62	345	485	42
15	11	118	227	636	70
20	1	56	144	284	35

Tabla IV.2.6. Índice de Coalescencia (IC) de las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas de aislado proteico de soja (APS) con distintas concentraciones de NCC (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 20%p/p con respecto a la cantidad de APS) al momento inicial y a los 3, 5, 10 y 15 días.

g NCC / 100 g APS	Inicial	3 días	5 días	10 días	15 días
0	0	0	0	0	92
2	0	0	8	5	28
4	0	41	343	767	850
6	0	116	460	1414	134
8	0	111	21	364	77
10	0	175	30	106	828
15	0	0	0	0	362
20	0	189	212	168	824

Teniendo en cuenta que durante el almacenamiento de las emulsiones se produjo un aumento en el tamaño de sus partículas, ya sea por floculación y/o coalescencia, pero que sólo en las emulsiones estabilizadas por APS se encontraron signos de cremado; que los estudios realizados no muestran tendencias únicas con el incremento en la concentración de NCC; y que es sabido que los NCC pueden modificar la reología de algunos sistemas (Thakur, 2014), se decidió estudiar el comportamiento reológico inicial de las emulsiones.

La **Figura IV.2.8** muestra las curvas de flujo de las emulsiones en estudio. En la **Tabla IV.2.7** se presentan los parámetros reológicos que surgen del ajuste matemático de los resultados experimentales al modelo de Ostwald de Waele (con $r^2 > 0,97$ en todos los casos). Se pueden distinguir tres comportamientos diferentes. La emulsión estabilizada sólo con APS y la nanocompuesta con 2% de NCC resultaron fluidos newtonianos ($n=1$) con bajos valores de viscosidad (3-4 mPa.s) y tixotropía (20-36 Pa.s⁻¹). Es evidente que el agregado de NCC produjo un aumento en la viscosidad de las emulsiones. McClements (1999) atribuye este comportamiento a la carga que poseen las gotas y explica que cuando una gota se mueve a través de un fluido, la nube de contraiones que la rodean se distorsiona. Esto causa una atracción entre la carga de la gota y la asociada con la nube de contraiones que se retrasa ligeramente detrás de ella. Esta atracción se opone al movimiento de las gotas y, por lo tanto, aumenta la viscosidad de la emulsión porque se necesita más energía para hacer que las gotas se muevan a la misma velocidad que las gotas no cargadas. Esta explicación resulta válida también para nuestra observación, ya que la emulsión nanocompuesta con 2% NCC presentó mayor viscosidad y potencial Z que la emulsión estabilizada sólo por APS.

Las emulsiones nanocompuestas con 4 y 6% de NCC presentaron comportamiento de flujo pseudoplástico ($n < 1$), aumentando a su vez el índice de consistencia y la tixotropía al incrementar el contenido de NCC en las emulsiones (**Figura IV.2.8** y **Tabla IV.2.7**). El flujo pseudoplástico es el tipo más común de comportamiento no ideal mostrado por las emulsiones alimentarias y se manifiesta como una disminución de la viscosidad aparente del fluido a medida que aumenta el gradiente de velocidad de corte (McClements, 1999). En las emulsiones, la pseudoplasticidad puede ocurrir por diversas razones, entre ellas porque la distribución espacial de las partículas puede verse alterada por el esfuerzo de corte, porque las partículas no esféricas pueden alinearse más fácilmente en el sentido del flujo, porque las moléculas de disolvente unidas a las partículas pueden eliminarse o porque los flóculos pueden deformarse y romperse por el esfuerzo de corte disminuyendo así su radio hidrodinámico (Hunter, 1993; Mewis y Macosko, 1994).

Por otra parte, en las curvas de flujo de las emulsiones nanocompuestas con más de 8% de NCC se observó un rápido crecimiento del esfuerzo de corte (τ) y una abrupta disminución al aumentar el gradiente de velocidad de deformación (D), en la zona de velocidades de corte muy bajas (0-25 s⁻¹). Este comportamiento se denomina “sobreesfuerzo” (*Overshoot*) y puede estar ligado a la formación de microestructuras en la emulsión y su posterior destrucción. En este sentido, Chen y col. (2011) describen una ruptura parcial y un reordenamiento de las estructuras de las partículas sólidas adsorbidas en la interfaz entre el aceite y el agua. La presencia del *overshoot* en las curvas de flujo no permitió su ajuste matemático al modelo

seleccionado y sugiere que estos sistemas emulsionados presentan características viscoelásticas.

Todas las emulsiones estudiadas presentaron tixotropía (**Tabla IV.2.7**), evidenciada por el área de histéresis entre las curvas ascendente y descendente de τ vs. D . La emulsión estabilizada sólo por APS presentó un bajo valor de tixotropía ($20 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$). Por lo tanto, el cizallamiento de la emulsión hace que las partículas agregadas (flóculos) se deformen progresivamente y se rompan, disminuyendo así su resistencia a fluir (viscosidad) con el tiempo. Al aumentar la concentración de NCC en las emulsiones nanocompuestas se observó un incremento en la tixotropía, llegando a valores de $\approx 400 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$ para la muestra con 20% de NCC (**Tabla IV.2.7**). En las emulsiones nanocompuestas se pueden formar redes tridimensionales, productos de las interacciones entre las proteínas y los NCC, que pueden romperse parcial o totalmente con la aplicación del esfuerzo de corte (Chen y col., 2011). Es probable que al aumentar la concentración de NCC en las emulsiones se formen redes tridimensionales más densas, aumentando su consistencia y su tixotropía (Peng y col., 2018). Esta mayor estructuración en las emulsiones nanocompuestas con 10, 15 y 20% NCC también se manifiesta en el *overshoot* que presentan sus respectivas curvas de flujo. Por esta razón también se determinó el comportamiento reológico de las emulsiones estudiadas a través de ensayos oscilatorios.

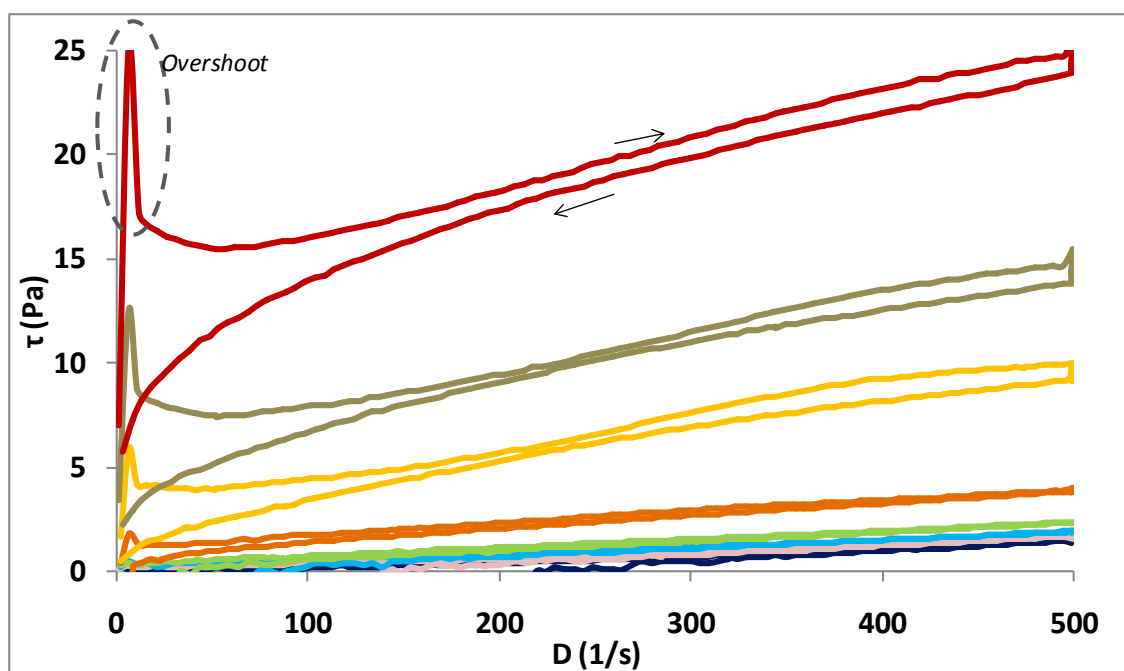


Figura IV.2.8. Curvas de comportamiento de flujo (τ vs. D) obtenidas mediante ensayos rotacionales de las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas de aislado proteico de soja (APS) con distintas concentraciones de NCC (0 ■, 2 ■, 4 ■, 6 ■, 8 ■, 10 ■, 15 ■ y 20 ■ %p/p con respecto a la cantidad de APS) al momento inicial.

Tabla IV.2.7. Índice de consistencia (K), índice de flujo (n) y tixotropía de las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas de aislado proteico de soja (APS) con distintas concentraciones de NCC (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 20%p/p con respecto a la cantidad de APS).

g NCC/100 g APS	K (mPa.s ⁿ)	n	Tixotropía (Pa/s)
0	2,645 ± 0,221 ^a	1,00	20,60 ± 0,69 ^a
2	3,855 ± 0,1585 ^b	1,00	36,34 ± 8,80 ^{a,b}
4	9,875 ± 0,880 ^a	0,844 ± 0,015 ^a	39,52 ± 9,27 ^{a,b}
6	13,875 ± 0,868 ^a	0,840 ± 0,100 ^a	51,60 ± 9,22 ^b
8	No se ajusta al modelo		86,94 ± 4,75 ^c
10	No se ajusta al modelo		292,60 ± 5,12 ^d
15	No se ajusta al modelo		284,65 ± 12,65 ^d
20	No se ajusta al modelo		404,23 ± 14,14 ^e

Los valores en las columnas con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según el test de Tukey

Las propiedades viscoelásticas de las emulsiones se muestran en la **Figura IV.2.9** y sus parámetros reológicos se resumen en la **Tabla IV.2.8**. Un material viscoelástico exhibe un comportamiento viscoso y elástico simultáneamente (Dickinson, 1992). Es decir que cuando se aplica energía mecánica al material, una parte se almacena como energía mecánica dentro del material (se comporta como un sólido) y otra parte se disipa como calor debido a la fricción (se comporta como un líquido).

En la **Figura IV.2.9.A** se muestra el espectro mecánico (G' y G'' vs. f) de la emulsión estabilizada sólo por APS, en donde se puede observar que el módulo de pérdida o módulo viscoso (G'') se encuentra por encima del módulo de almacenamiento o módulo elástico (G'), y que ambos aumentan con la frecuencia. En particular, para una frecuencia de 1 Hz, esta emulsión presentó $G'=0,6$ Pa y $G''=1,0$ Pa (**Tabla IV.2.8**) y un ángulo de desfase entre el esfuerzo y la deformación (δ) de 58°. Estos resultados indican que en esta formulación las propiedades viscosas son dominantes en comparación con las propiedades elásticas. En los espectros mecánicos de las emulsiones nanocompuestas con 2, 4, 6 y 8% de NCC se observa que las curvas de G' y G'' se encuentran casi superpuestas (**Figura IV.2.9.B, IV.2.9.C, IV.2.9.D y IV.2.9.E**) y que aumentan con la frecuencia. El aumento en la concentración de NCC no modificó significativamente los valores de G' , G'' y $\tan \delta$ (**Tabla IV.2.8**). En estos casos, $\delta=50^\circ$ por lo que no se observa preponderancia de la componente viscosa sobre la elástica ni viceversa, por lo que el material responde con componentes viscosa y elástica en igual

magnitud (Chhabra y Richardson, 2011). Pero en los espectros mecánicos de las emulsiones con 10, 15 y 20% de NCC se observó el módulo de almacenamiento elástico (G') por encima del módulo de pérdida o viscoso (G''), ambos independientes de la frecuencia. Este comportamiento es característico de muestras con cierto grado de estructuración o de tipo gel (Masalova y col., 2011). Al aumentar la concentración de NCC se registraron incrementos en G'' y G' , siendo estos últimos más notorios; y también se observó una disminución en $\tan \delta$ (δ disminuye de 18° a 11°) (**Tabla IV.2.8**). Estos resultados indican que en estas formulaciones predominan las propiedades elásticas frente a las propiedades viscosas, por lo que estos sistemas emulsionados tendrían mayor grado de estructuración o empaquetamiento que las otras emulsiones analizadas. Estas redes tridimensionales, con mayor grado de estructuración, actuarían como un sólido cuando el esfuerzo aplicado no resulta suficiente para desestabilizar las interacciones entre las proteínas y los NCC. En el mismo sentido, Angkuratipakorn y col. (2017) describieron un comportamiento de tipo gel para emulsiones de aceite de arroz en agua estabilizadas con NCC, un surfactante no-iónico y goma arábica; y atribuyeron sus resultados a un mayor empaquetamiento entre el surfactante y ambos estabilizantes.

La viscosidad compleja (η^*) (o resistencia total a la cizalla dinámica) de las emulsiones se presenta en la **Tabla IV.2.8**. Se puede observar que las emulsiones estabilizadas sólo por APS y las emulsiones nanocompuestas con 2, 4, 6 y 8% de NCC no presentaron diferencias significativas en sus valores de viscosidad compleja (189 mPa.s). Al incorporar 10% de NCC, la emulsión nanocompuesta resultante mostró un incremento significativo en su viscosidad compleja (754 mPa.s) que se acentuó significativamente con el agregado de 15 y 20% de NCC, alcanzándose valores de viscosidad compleja de 2259 y 7178 mPa.s para sus respectivas emulsiones nanocompuestas. Probablemente el agregado de NCC permita un mayor grado de empaquetamiento o refuerce la red tridimensional de partículas agregadas.

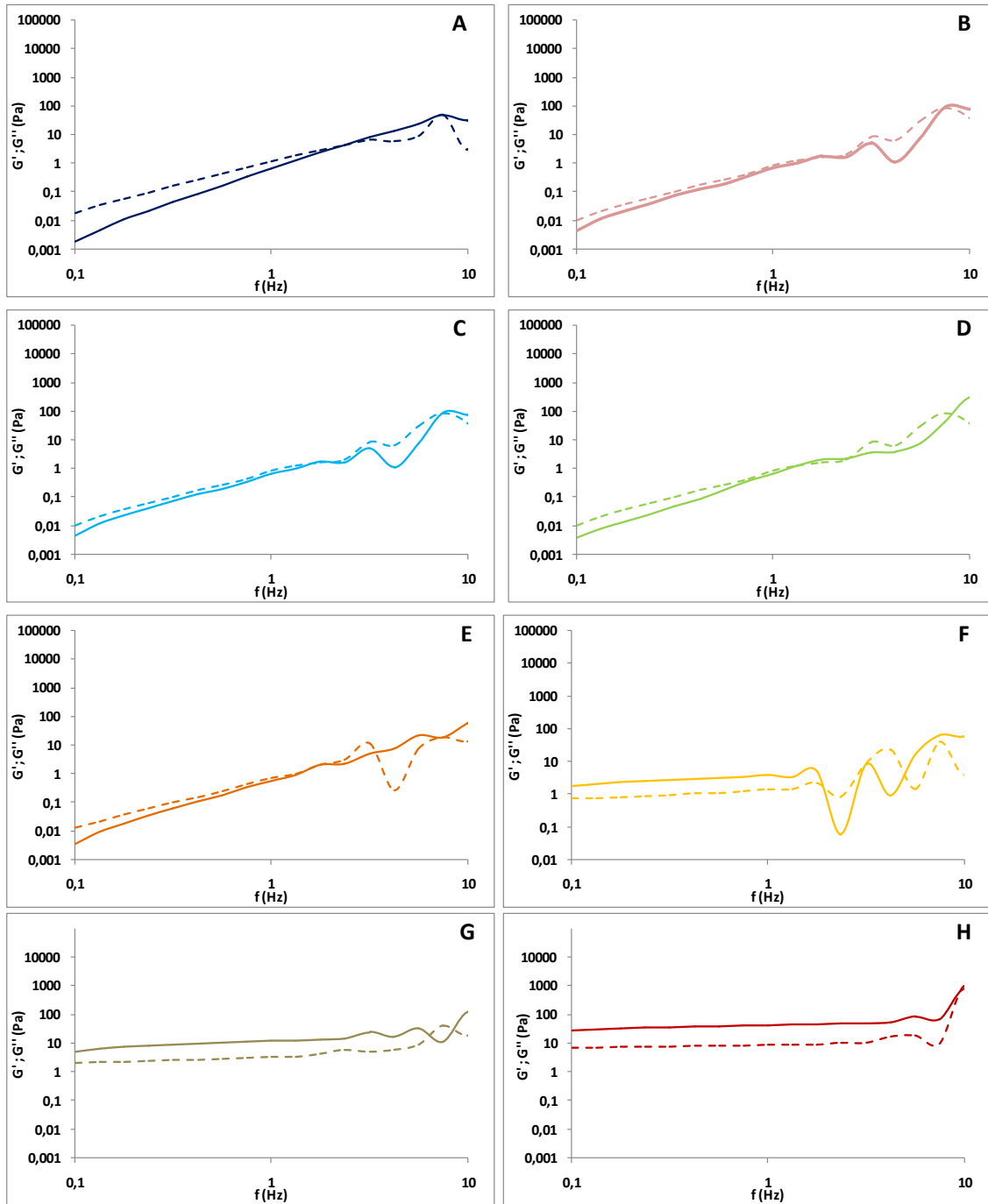


Figura IV.2.9. Curvas del módulo de almacenamiento (G' , —) y del módulo de pérdida (G'' , - -) vs. f obtenidas mediante ensayos oscilatorios de las emulsiones O/W preparadas con dispersiones acuosas de aislado proteico de soja (APS) con distintas concentraciones de NCC (0 ■(A), 2 ■(B), 4 ■(C), 6 ■(D), 8 ■(E), 10 ■(F), 15 ■(G) y 20 ■(H) %p/p con respecto a la cantidad de APS) al momento inicial.

Tabla IV.2.8. Módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G''), tangente del ángulo de desfase ($\tan \delta$) y viscosidad compleja (η^*) de las emulsiones O/W con el agregado de nanocristales de celulosa (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 20%p/p con respecto a la cantidad de **APS**) al momento inicial. Las mediciones se realizaron a una frecuencia definida (1 Hz).

g NCC/100 g APS	G' (Pa)	G'' (Pa)	$\tan \delta$ (G''/G')	η^* (Pa.s)
0	$0,624 \pm 0,054^a$	$1,009 \pm 0,273^{a,b}$	$1,604 \pm 0,299^c$	$0,189 \pm 0,041^a$
2	$0,724 \pm 0,046^a$	$0,911 \pm 0,048^{a,b}$	$1,260 \pm 0,014^b$	$0,186 \pm 0,011^a$
4	$0,731 \pm 0,117^a$	$0,897 \pm 0,132^{a,b}$	$1,229 \pm 0,016^b$	$0,184 \pm 0,028^a$
6	$0,738 \pm 0,087^a$	$0,896 \pm 0,094^{a,b}$	$1,215 \pm 0,034^b$	$0,185 \pm 0,020^a$
8	$0,563 \pm 0,020^a$	$0,722 \pm 0,001^a$	$1,282 \pm 0,046^b$	$0,146 \pm 0,002^a$
10	$4,503 \pm 0,931^b$	$1,459 \pm 0,040^b$	$0,330 \pm 0,059^a$	$0,754 \pm 0,143^b$
15	$13,747 \pm 2,100^c$	$3,536 \pm 0,238^c$	$0,259 \pm 0,021^a$	$2,259 \pm 0,334^c$
20	$44,310 \pm 0,884^d$	$8,411 \pm 0,415^d$	$0,190 \pm 0,013^a$	$7,178 \pm 0,125^d$

Los valores en las columnas con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según el test de Tukey

En síntesis, las emulsiones nanocompuestas de aceite de pescado en agua presentaron mejores características iniciales y mayor estabilidad que aquellas estabilizadas por sus componentes por separado, APS y NCC. Con bajas concentraciones de NCC (2%) se obtuvieron emulsiones con elevado grado de floculación que se mantuvieron estables durante 15 días de almacenamiento a temperatura ambiente. Al incrementar la concentración de NCC hasta 6 u 8% NCC, las partículas se encontrarían en dispersión y serían posibles las interacciones entre ellas, posibilitando la desestabilización por floculación y/o coalescencia. Por encima de dichas concentraciones, el comportamiento de tipo gel de los sistemas emulsionados nanocompuestos dificulta la floculación y el cremado; por lo que estos sistemas se desestabilizan principalmente por coalescencia.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, proponemos que en las emulsiones nanocompuestas tanto APS como NCC se posicionarían en la interfase aceite-agua, facilitando la formación de flóculos estables cuando se emplean bajas concentraciones de NCC. Pero a medida que se va incrementando la concentración de NCC en las emulsiones, la película interfacial se iría engrosando, perdiendo su flexibilidad y además aumentaría la repulsión electrostática, esto facilitaría la coalescencia e iría dificultando la floculación del sistema emulsionado. Finalmente, cuando la concentración de NCC es muy elevada, se formaría una red tridimensional que dificultaría aún más el movimiento de las partículas y su floculación,

resultando en sistemas emulsionados susceptibles a la coalescencia. En la **Figura IV.2.10** se muestra un esquema del comportamiento de las emulsiones nanocompuestas estudiadas.

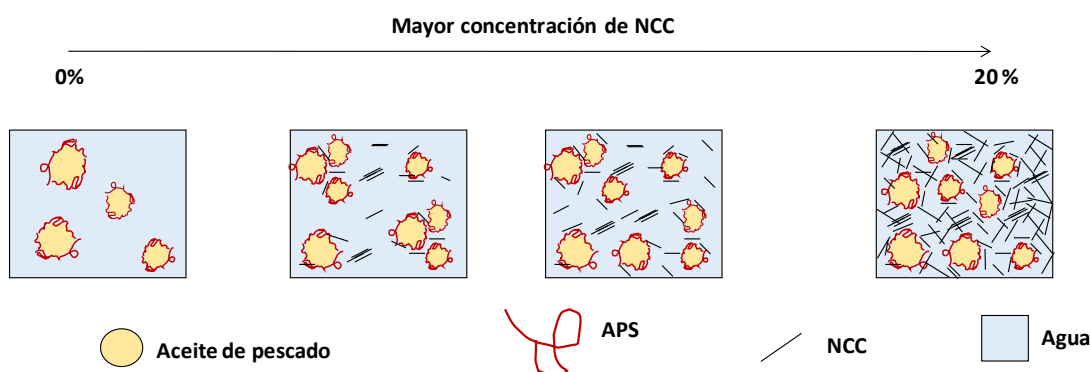


Figura IV.2.10. Esquema del comportamiento de las emulsiones nanocompuestas estudiadas.

IV.2.4.2. Efecto del tipo de nanofibras de celulosa sobre las propiedades de las emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizadas por sistemas nanocompuestos

En esta sección se analiza la preparación de emulsiones de aceite de pescado en agua empleando como emulsificantes proteínas de soja y 2% de las diferentes nanofibras de celulosa estudiadas en esta tesis: nanocristales (NCC), celulosa microfibrilada (MFC), celulosa microfibrilada previamente modificada por tratamiento enzimático (MFC-E) y celulosa microfibrilada previamente modificada por tratamiento químico (MFC-Q); y se comparan sus propiedades con las de emulsiones estabilizadas sólo por proteínas de soja (APS). La concentración de fibras se seleccionó a partir de los resultados mostrados en la sección anterior al trabajar con distintas concentraciones de NCC.

Las emulsiones estabilizadas sólo por APS, analizadas en la sección anterior, cuya morfología mostró gotas de 1-3 μm (**Figura IV.2.11**), presentaron una distribución bimodal de tamaño de partículas, caracterizada por una población mayoritaria de partículas con aproximadamente 3 μm de diámetro y una población minoritaria alrededor de los 80 μm (**Figura IV.2.12**). Inicialmente, esta emulsión presentó valores de $D_{3,2} = 1,03 \mu\text{m}$ y $D_{4,3} = 3,60 \mu\text{m}$, un potencial Z negativo (-28,8 mV), cierto grado de floculación ($IF=53$) (**Tabla IV.2.9**) y un $BS_0 \approx 50\%$ uniforme a lo largo del tubo (**Figura IV.2.13**). Esta emulsión resultó ser newtoniana ($n=1$), con baja viscosidad (3 mPa.s) y presentó tixotropía (20 Pa.s^{-1}) (**Figura IV.2.15** y **Tabla IV.2.11**). En esta formulación, las propiedades viscosas resultaron dominantes en comparación con las propiedades elásticas ($a f = 1 \text{ Hz}$: $G' < G''$; $\delta = 58^\circ$) (**Figura IV.2.16.A** y **Tabla IV.2.12**).

Luego de 15 días de almacenamiento a temperatura ambiente, se observó un incremento en el $D_{4,3} = 26,5 \mu\text{m}$ (**Figura IV.2.14**), una disminución significativa en el BS de la parte inferior del tubo y una incremento en el BS de la parte superior (**Figura IV.2.13**) como consecuencia de su desestabilización, ocasionada principalmente por floculación y cremado, y en menor medida por coalescencia.

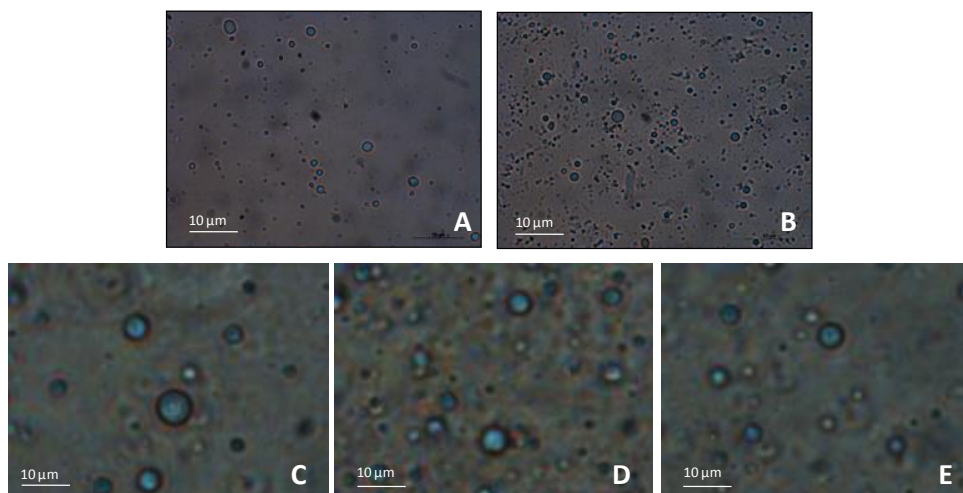


Figura IV.2.11. Morfología de las emulsiones de aceite de pescado en agua: (A) estabilizadas sólo por APS o estabilizadas con APS y 2% p/p de diferentes nanofibras de celulosa: (B) NCC, (C) MFC, (D) MFC-E, (E) MFC-Q al momento inicial. Aumento 100X.

Las emulsiones estabilizadas con 2% de **NCC** (también analizadas en la sección anterior) presentaron una distribución multimodal, caracterizada por una población mayoritaria de partículas con aproximadamente $2 \mu\text{m}$ de diámetro, una población de $15 \mu\text{m}$ y otra minoritaria alrededor de los $150 \mu\text{m}$ (**Figura IV.2.12**). Su morfología se muestra en la **Figura IV.2.11**, en donde también se puede apreciar la presencia de agregados de NCC y gotas de tamaño entre $1-4 \mu\text{m}$. Inicialmente, esta emulsión nanocompuesta presentó valores de $D_{3,2} = 1,2 \mu\text{m}$ y $D_{4,3} = 10,1 \mu\text{m}$, potencial Z negativo (-54 mV) producto de la carga neta de las proteínas y de los NCC, alto grado de floculación ($\text{IF}=139$) (**Tabla IV.2.10**) y un $\text{BS}_0 \approx 50\%$ uniforme a lo largo del tubo (**Figura IV.2.13**). Esta emulsión nanocompuesta también resultó ser newtoniana ($n=1$) pero con mayor viscosidad ($3,8 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) y tixotropía ($36 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$) que la estabilizada sólo por APS (**Figura IV.2.15** y **Tabla IV.2.11**). En la emulsión nanocompuesta con 2% de NCC no se observó preponderancia de la componente viscosa sobre la elástica ni viceversa ($a f = 1 \text{ Hz}$: $G' \cong G''$; $\delta = 50^\circ$) (**Figura IV.2.16** y **Tabla IV.2.12**). Luego de 15 días de almacenamiento a temperatura ambiente, también se registró un incremento en el $D_{4,3} = 22 \mu\text{m}$ (**Figura IV.2.14**), pero no se

observaron cambios en los BS en ambas zonas del tubo (**Figura IV.2.13**). Esta emulsión mostró signos de una baja desestabilización debido principalmente a floculación y en menor medida a coalescencia.

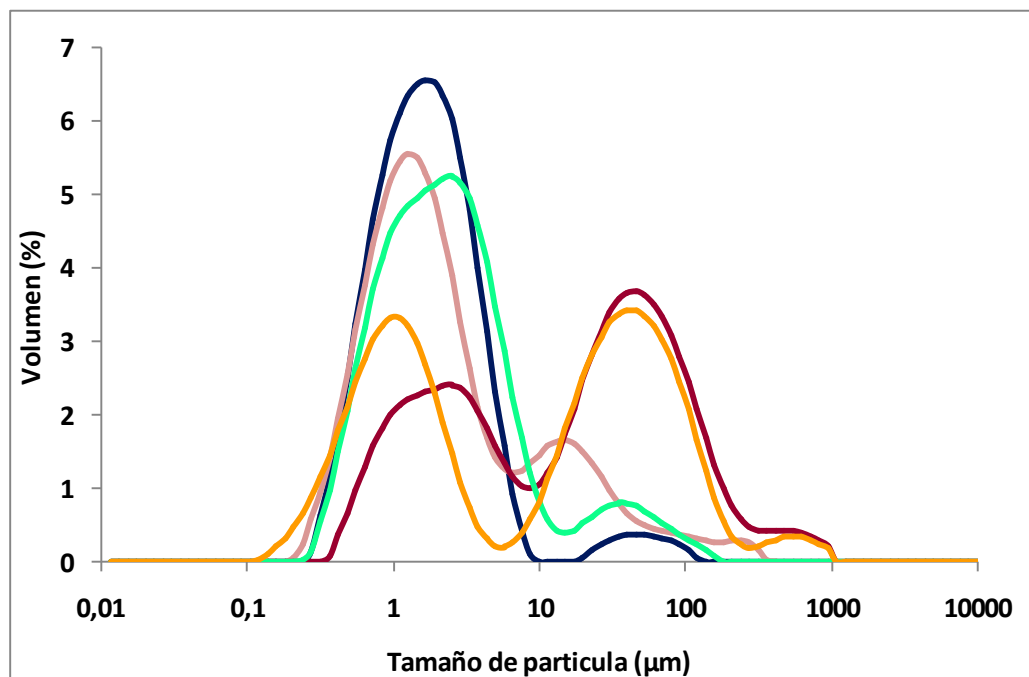


Figura IV.2.12. Distribución del tamaño de partícula inicial de las emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizadas sólo por proteínas de soja (APS, ■), o por sistemas nanocompuestos formados adicionando 2 % de distintas nanofibras de celulosa a la dispersión proteica: NCC (■), MFC (■), MFC-E (■) y MFC-Q (■).

Tabla IV.2.9. $D_{3,2}$ inicial, $D_{4,3}$ inicial con y sin SDS, índice de floculación (IF) inicial y potencial Z de las emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizadas sólo por proteínas de soja (APS, **Control**), o por sistemas nanocompuestos formados adicionando 2 % de distintas nanofibras de celulosa a la dispersión proteica: NCC, MFC, MFC-E y MFC-Q al momento inicial.

g de NCC/100g APS	$D_{3,2}$ (μm)	$D_{4,3}$ (μm)	IF	Potencial Z (mV)
	Sin SDS	Sin SDS Con SDS		
Control	$1,027 \pm 0,167^a$	$3,602 \pm 1,389^a$ $2,348 \pm 0,533^a$	53	$-28,80 \pm 1,90^b$
NCC	$1,183 \pm 0,062^a$	$10,170 \pm 2,046^b$ $4,263 \pm 0,614^a$	139	$-56,47 \pm 5,44^a$
MFC	$3,408 \pm 1,863^b$	$53,834 \pm 7,238^d$ $23,570 \pm 2,824^c$	128	$-54,03 \pm 3,85^a$
MFC-E	$1,428 \pm 0,091^a$	$9,847 \pm 5,743^b$ $10,917 \pm 1,843^b$	0	$-60,33 \pm 1,42^a$
MFC-Q	$1,446 \pm 0,127^a$	$40,099 \pm 3,515^c$ $30,238 \pm 7,586^d$	33	$-54,81 \pm 5,08^a$

Los valores en las columnas con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según el test de Tukey.

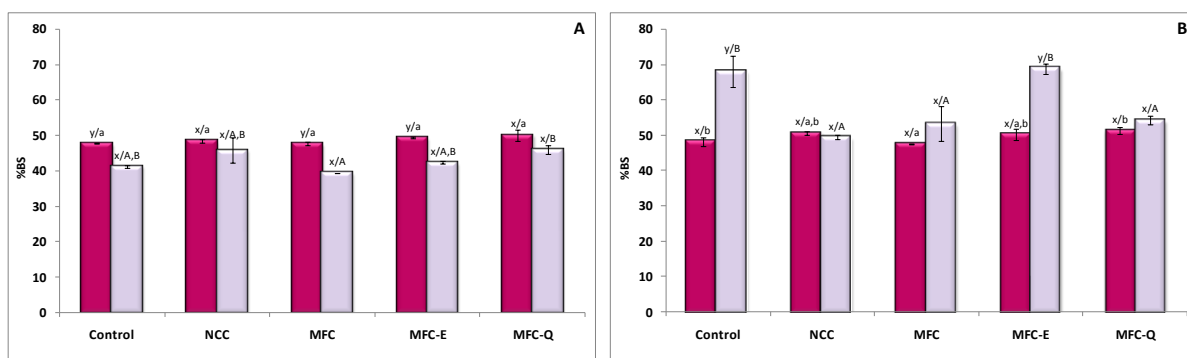


Figura IV.2.13. Valores de *backscattering* en la **A)** Zona de cremado/floculación (10–15 mm del tubo de medida) y en la **B)** Zona de coalescencia/floculación (45–50 mm del tubo de medida), correspondientes a las emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizadas sólo por proteínas de soja (APS, **Control**), o por sistemas nanocompuestos formados adicionando 2 % de distintas nanofibras de celulosa a la dispersión proteica: **NCC**, **MFC**, **MFC-E** y **MFC-Q** al momento inicial (■) y a los 15 días (■).

Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según el test de Tukey. Las letras x,y informan diferencias entre el valor de BS al inicio y a 15 días de cada muestra. Las letras minúsculas indican diferencias entre las formulaciones al día inicial y las letras mayúsculas las diferencias a los 15 días.

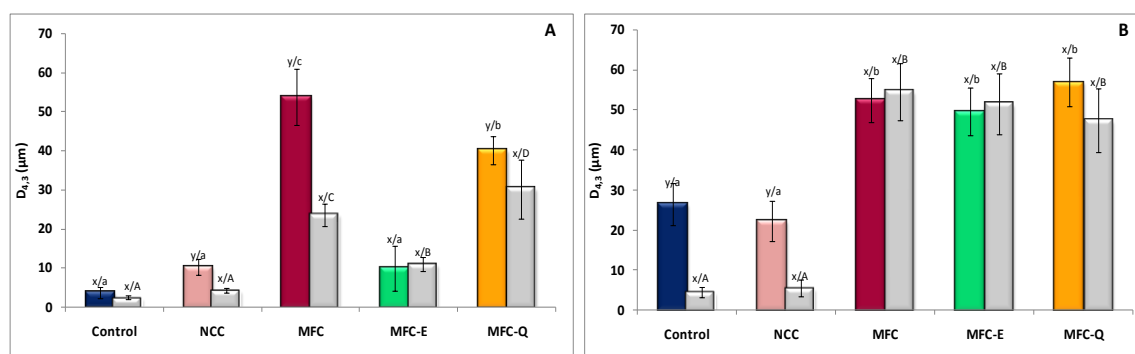


Figura IV.2.14. $D_{4,3}$ con (■) y sin (■) SDS de las emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizadas sólo por proteínas de soja (APS, **Control**) o por sistemas nanocompuestos formados adicionando 2 % de distintas nanofibras de celulosa a la dispersión proteica: **NCC**, **MFC**, **MFC-E** y **MFC-Q**; al momento inicial (**A**) y a los 15 días (**B**).

Las letras x,y informan diferencias entre el valor de $D_{4,3}$ con y sin SDS de cada muestra. Las letras minúsculas indican diferencias entre los $D_{4,3}$ sin SDS, y las letras mayúsculas entre los valores con SDS.

Tabla VI.2.10. Índice de Floculación (IF) e Índice de Coalescencia (IC) de las emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizadas sólo por proteínas de soja (APS, **Control**) o por sistemas nanocompuestos formados adicionando 2 % de distintas nanofibras de celulosa a la dispersión proteica: **NCC**, **MFC**, **MFC-E** y **MFC-Q**; al momento inicial y a los 15 días.

g de NCC/100g APS	IF		IC	
	Inicial	15 días	Inicial	15 días
Control	53	487	0	98
NCC	138	306	0	28
MFC	128	0	0	132
MFC-E	0	0	0	372
MFC-Q	33	20	0	57

Al observar a las emulsiones estabilizadas con 2% de **MFC** al microscopio, se observaron gotas de 10-26 μm y también la aparición de agregados de MFC. Estas emulsiones presentaron una distribución multimodal de tamaño de partículas caracterizada por una población ancha de partículas, una población de partículas con 2,50 y 45,70 μm y otra minoritaria alrededor de los 500 μm (**Figura IV.2.12**). Inicialmente, esta emulsión nanocompuesta presentó los mayores valores de $D_{3,2} = 3,4 \mu\text{m}$ y $D_{4,3} = 53,8 \mu\text{m}$, un potencial zeta negativo (-54 mV), alto grado de floculación (IF=128) (**Tabla IV.2.10**) y un $BS_0=48\%$ uniforme a lo largo del tubo (**Figura IV.2.13**). La curva de flujo de esta emulsión nanocompuesta presentó un *overshoot* y la mayor tixotropía (503 $\text{Pa}\cdot\text{s}^{-1}$) (**Figura IV.2.15** y **Tabla IV.2.11**). En esta emulsión nanocompuesta, las propiedades elásticas predominaron sobre las propiedades viscosas (a $f = 1 \text{ Hz}$: $G' \gg G''$; $\delta = 20^\circ$) (**Figura IV.2.16** y **Tabla IV.2.12**). Luego de 15 días de almacenamiento a temperatura ambiente, sólo se registró una disminución en el BS de la zona inferior del tubo (**Figura IV.2.13**), sin observarse cambios en la zona superior del tubo ni en los valores de $D_{4,3} = 52 \mu\text{m}$ (**Figura IV.2.14**). Esta emulsión se desestabilizó principalmente por cremado, favorecido por el alto grado de floculación y por coalescencia.

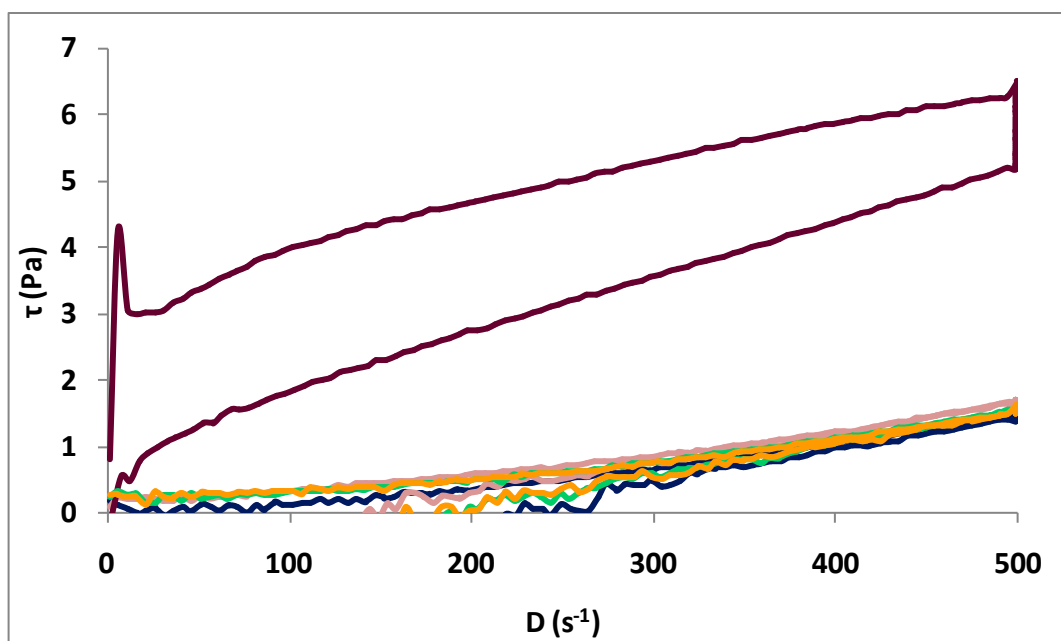


Figura IV.2.15. Curvas de comportamiento de flujo (τ vs. D) obtenidas por reología rotacional de las emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizadas sólo por proteínas de soja (APS, **Control**) o por sistemas nanocompuestos formados adicionando 2 % de distintas nanofibras de celulosa a la dispersión proteica: **NCC** (■), **MFC** (■), **MFC-E** (■) y **MFC-Q** (■) al momento inicial.

Tabla IV.2.11. Viscosidad (η) y tixotropía de las emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizadas sólo por proteínas de soja (APS, **Control**) o por sistemas nanocompuestos formados adicionando 2 % de distintas nanofibras de celulosa a la dispersión proteica: **NCC**, **MFC**, **MFC-E** y **MFC-Q** al momento inicial.

	η (mPa.s)	Tixotropía (Pa/s)
Control	$2,6455 \pm 0,22136^a$	$20,60 \pm 0,69^a$
NCC	$3,8548 \pm 0,1586^b$	$36,34 \pm 8,80^{a,b}$
MFC	No se ajusta al modelo	$503,12 \pm 16,74^d$
MFC-E	$2,7753 \pm 0,0960^a$	$49,72 \pm 5,61^b$
MFC-Q	$2,4807 \pm 0,2205^a$	$119,83 \pm 11,44^c$

Los valores en las columnas con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según el test de Tukey.

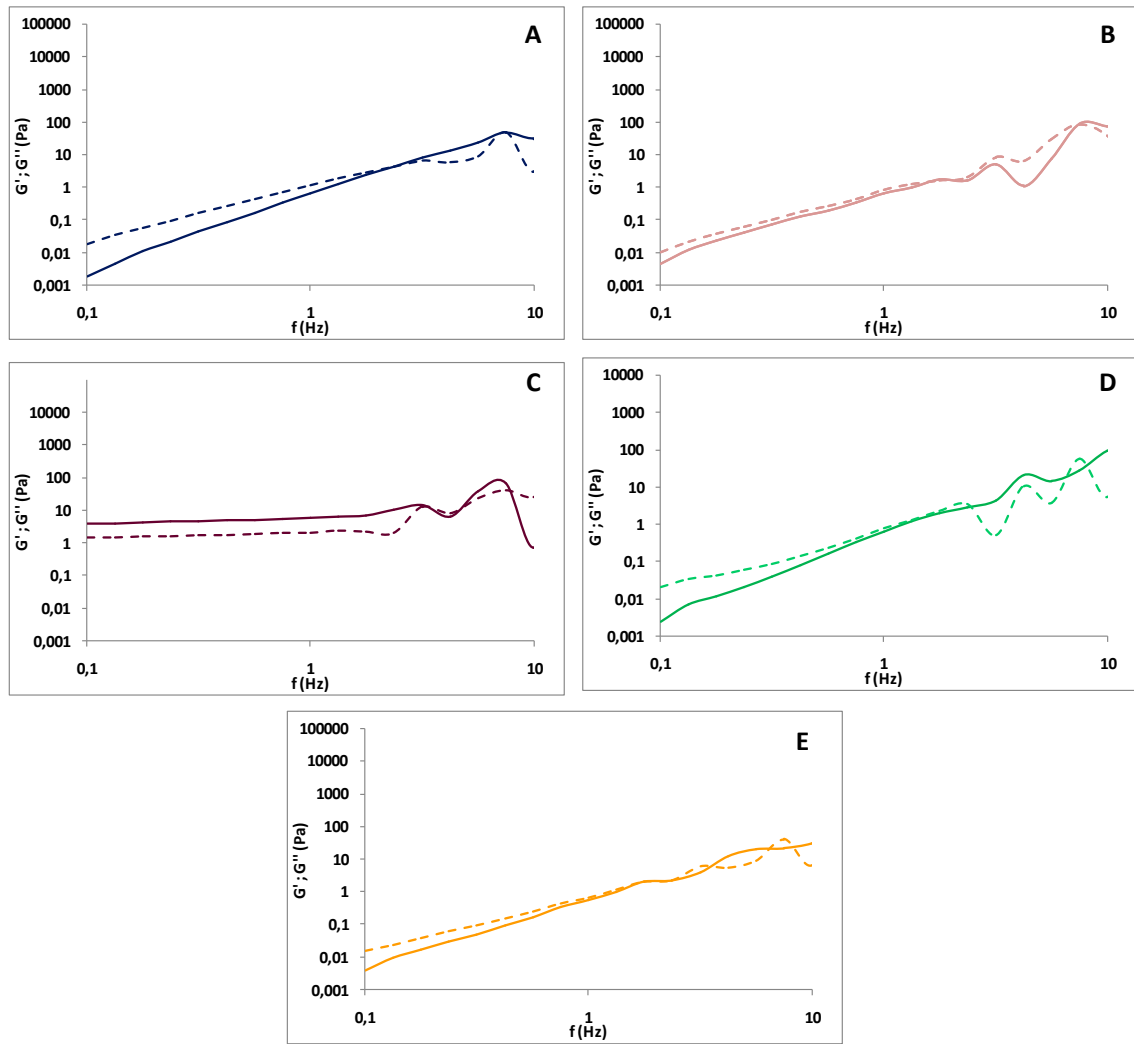


Figura IV.2.16. Curvas del módulo de almacenamiento (G' , —) y del módulo de pérdida (G'' , - - -) vs. f obtenidas mediante ensayos oscilatorios de las emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizadas sólo por proteínas de soja (APS, ■) o por sistemas nanocompuestos formados adicionando 2 % de distintas nanofibras de celulosa a la dispersión proteica: **NCC** (■), **MFC** (■), **MFC-E** (■) y **MFC-Q** (■) al momento inicial.

Tabla IV.2.12. Módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G''), tangente del ángulo de desfase ($\tan \delta$) y viscosidad compleja (η^*) de las emulsiones de aceite de pescado en agua estabilizadas sólo por proteínas de soja (APS, **Control**) o por sistemas nanocompuestos formados adicionando 2 % de distintas nanofibras de celulosa a la dispersión proteica: **NCC**, **MFC**, **MFC-E** y **MFC-Q** al momento inicial. Las mediciones se realizaron a una frecuencia definida (1 Hz).

	G' (Pa)	G'' (Pa)	$\tan \delta$ (G''/G')	η^* (Pa.s)
Control	$0,624 \pm 0,054^a$	$1,009 \pm 0,273^a$	$1,604 \pm 0,299^c$	$0,189 \pm 0,041^a$
NCC	$0,724 \pm 0,046^a$	$0,911 \pm 0,048^a$	$1,260 \pm 0,014^b$	$0,186 \pm 0,011^a$
MFC	$6,323 \pm 0,559^b$	$2,248 \pm 0,223^b$	$0,355 \pm 0,004^a$	$1,068 \pm 0,096^b$
MFC-E	$0,633 \pm 0,010^a$	$0,759 \pm 0,044^a$	$1,199 \pm 0,070^b$	$0,157 \pm 0,006^a$
MFC-Q	$0,606 \pm 0,081^a$	$0,763 \pm 0,144^a$	$1,254 \pm 0,071^b$	$0,155 \pm 0,025^a$

Los valores en las columnas con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según el test de Tukey

Las emulsiones estabilizadas con 2% de **MFC-E** presentaron una distribución bimodal de tamaño de partículas, caracterizada por una población mayoritaria de partículas, que al igual que para MFC, parece ser consecuencia del solapamientos de dos picos que corresponderían a tamaños de 2,5 y 34 μm de diámetro y otra minoritaria alrededor de los 80 μm (**Figura IV.2.12**). Su morfología se muestra en la **Figura IV.2.11**, en donde se aprecian gotas de $\approx 13 \mu\text{m}$ y agregados de MFC-E. Inicialmente, esta emulsión nanocompuesta presentó valores de $D_{3,2} = 1,4 \mu\text{m}$ y $D_{4,3} = 9,8 \mu\text{m}$, un potencial Z negativo (-60mV), sin la presencia de flóculos (IF=0) (**Tabla IV.2.10**) y un $BS_0 \approx 50\%$ uniforme a lo largo del tubo (**Figura IV.2.13**). Esta emulsión nanocompuesta también resultó ser newtoniana ($n=1$), con viscosidad similar a la estabilizada sólo por APS (2,7mPa.s), pero con mayor tixotropía (50 Pa.s^{-1}) (**Figura IV.2.15 y Tabla IV.2.11**). En la emulsión nanocompuesta con 2% de MFC-E no se observó preponderancia de la componente viscosa sobre la elástica ni viceversa (a $f = 1 \text{ Hz}$: $G' \cong G''$; $\delta = 50^\circ$) (**Figura IV.2.16 y Tabla IV.2.12**). Luego de 15 días de almacenamiento a temperatura ambiente, se registró un incremento en el $D_{4,3} = 50 \mu\text{m}$ (**Figura IV.2.14**), una disminución en el BS de la parte inferior del tubo y una incremento notorio en el BS de la parte superior (**Figura IV.2.13**). Esta emulsión se desestabilizó principalmente por coalescencia y en menor medida por cremado, pero no se evidenciaron signos de floculación.

Por último, las emulsiones estabilizadas con 2% de **MFC-Q** presentaron una distribución multimodal de tamaño de partículas, caracterizada por una población de partículas con diámetros de aproximadamente $1 \mu\text{m}$, una población de 40 μm y otra minoritaria alrededor de los 500 μm (**Figura IV.2.12**). Su morfología se muestra en la **Figura IV.2.11**, en donde también se pueden apreciar gotas de 16 μm y agregados de MFC-Q. Inicialmente, esta emulsión nanocompuesta presentó un $D_{3,2} = 1,4 \mu\text{m}$ y un elevado $D_{4,3} = 40 \mu\text{m}$, un potencial Z negativo (-54 mV), cierto grado de floculación (IF=33) (**Tabla IV.2.10**) y un $BS_0 \approx 50\%$ uniforme a lo largo del tubo (**Figura IV.2.13**). Esta emulsión nanocompuesta también resultó ser newtoniana ($n=1$), con viscosidad similar a la estabilizada sólo por APS (2,5mPa.s), pero con mayor tixotropía (120 Pa.s^{-1}) (**Figura IV.2.15 y Tabla IV.2.11**). En la emulsión nanocompuesta con 2% de MFC-Q no se observó preponderancia de la componente viscosa sobre la elástica ni viceversa (a $f = 1 \text{ Hz}$: $G' \cong G''$; $\delta = 50^\circ$) (**Figura IV.2.16 y Tabla IV.2.12**). Luego de 15 días de almacenamiento a temperatura ambiente, se registró un incremento en el $D_{4,3} = 57 \mu\text{m}$ (**Figura IV.2.14**) y una disminución en el BS de la parte inferior del tubo pero no se modificó el BS de la parte superior (**Figura IV.2.13**), indicando cierta desestabilización por cremado, floculación y coalescencia.

Teniendo en cuenta los resultados presentados, podemos resumir que la incorporación de nanofibras en las formulaciones no modificó significativamente el BS_0 de las emulsiones; pero

sí aumentó el valor absoluto del potencial zeta de las emulsiones nanocompuestas, independientemente del tipo de nanofibra agregada, en comparación con las emulsiones estabilizadas sólo por APS. El aumento en el valor del potencial Z de las emulsiones con **NCC** y **MFC-Q** podría atribuirse a la carga neta negativa de estas nanofibras (**Capítulo IV.1**). Pero en el caso de las emulsiones formuladas con **MFC** y **MFC-E**, que no poseían carga neta, el aumento de la carga sugiere que la presencia de las nanofibras podría inducir reordenamientos en las proteínas, ya sea en la interface aceite-agua o en el seno de la fase continua, que lleven a una mayor carga superficial y contribuyan al valor negativo del potencial Z. Otra posible explicación para el aumento del valor absoluto del potencial Z podría ser la formación de complejos solubles de proteínas-polisacáridos mediados por interacciones electrostáticas débiles (McClements y col., 2009; Cabo-Sarmiento y col., 2018).

La presencia de agregados de nanofibras en todas las emulsiones nanocompuestas pudo observarse por microscopía óptica.

El tamaño de partículas de las emulsiones nanocompuestas parece estar relacionado con la longitud de las nanofibras y su carga neta, características que condicionarían su capacidad de acomodarse en la interfase aceite-agua. Así, las emulsiones con **MFC** y **MFC-Q** (las nanofibras con mayores longitudes, **Capítulo IV.1**) presentaron los mayores tamaños de partículas ($D_{4,3}$ sin SDS) y de gotas ($D_{4,3}$ con SDS); sin embargo, la ausencia de carga superficial en **MFC** podría relacionarse con su mayor grado de floculación respecto de la **MFC-Q** que presentaba elevada carga neta (**Capítulo IV.1**).

Por otra parte, las emulsiones con **MFC-E** presentaron gotas con mayor tamaño que las de **NCC** ($D_{4,3}$ con SDS), pero sólo éstas presentaron flóculos. En este caso, las nanofibras **NCC** y **MFC-E** poseen las menores longitudes pero diferente carga neta; **NCC** posee carga negativa mientras que **MFC-E** no posee carga superficial (**Capítulo IV.1**). Es evidente que otras propiedades de las nanofibras, además de su longitud y carga, están afectando estos parámetros de las emulsiones nanocompuestas.

Respecto a las características reológicas de las emulsiones nanocompuestas con **NCC**, **MFC-E** y **MFC-Q**, se observó que presentaron comportamiento de flujo newtoniano, como resultado de la concentración de nanofibras utilizada, que resultó baja como para modificar el tipo de flujo. En el mismo sentido, Costa y col. (2018) describieron que las emulsiones de aceite de girasol en agua estabilizadas con diferentes **MFC-E** presentaron comportamiento de flujo newtoniano, independientemente de las características de las **MFC-E** utilizadas, y también lo atribuyeron a la baja concentración de nanofibras agregada. Pero, las características físico-químicas de estas nanofibras (**NCC**, **MFC-E** y **MFC-Q**) afectaron los parámetros reológicos de las emulsiones nanocompuestas. Así, la mayor cristalinidad de **NCC** (**Capítulo IV.1**), asociada a una

mayor rigidez estructural podría explicar la mayor viscosidad de sus respectivas emulsiones nanocompuestas, mientras que el mayor largo de **MFC-Q (Capítulo IV.1)** resultó en emulsiones con mayor grado de estructuración o tixotropía.

En particular, las emulsiones nanocompuestas con **MFC** presentaron un *overshoot* en los ensayos reológicos rotacionales y un comportamiento de tipo gel en los ensayos dinámicos; esto indicaría que en este sistema se forma una red tridimensional entre las partículas que se agregan por interacciones débiles y que es susceptible a deformarse o romperse por la aplicación de un esfuerzo de corte. Winuprasith y Suphantharika (2013) desarrollaron emulsiones O/W estabilizadas por MFC obtenidas de la corteza de mangostán (*Garcinia mangostana*) y observaron que las mismas también presentaban un comportamiento de gel que lo atribuyeron a la formación de una estructura de red fuertemente enredada y desordenada de las MFC que presentaban una elevada relación de aspecto (L/d).

Las emulsiones nanocompuestas sufrieron distintos mecanismos de desestabilización de acuerdo a las características de las nanofibras agregadas.

Las características de las nanofibras estudiadas, en su conjunto, condicionaron los mecanismos de desestabilización que podrían sufrir las emulsiones nanocompuestas resultantes. No fue posible relacionar de manera unívoca la preponderancia de un determinado mecanismo de desestabilización con alguna de las propiedades de las nanofibras.

En nuestro estudio, el agregado de 2% de NCC o MFC-Q permitió obtener emulsiones de aceite de pescado en agua que se mantuvieron estables durante 15 días a temperatura ambiente.

IV.2.5. Conclusiones

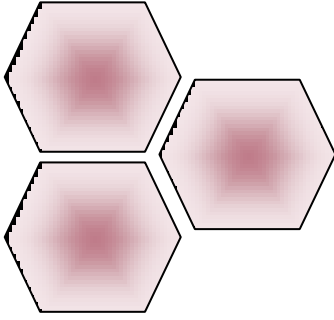
✓ Se lograron obtener emulsiones de aceite de pescado en agua empleando como emulsificantes sistemas nanocompuestos formados por proteínas de soja y nanofibras de celulosa. Estas emulsiones resultaron más estables que aquellas estabilizadas sólo con APS o las estabilizadas por *Pickering* con diferentes concentraciones de NCC.

✓ Las emulsiones nanocompuestas presentaron partículas con mayores tamaños y carga superficial que las de las emulsiones estabilizadas sólo por proteínas de soja. Esto sugiere que la presencia de las nanofibras podría inducir reordenamientos en las

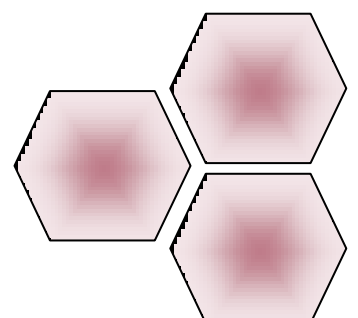
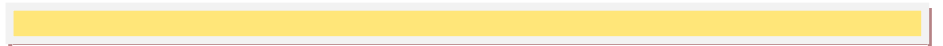
proteínas, ya sea en la interface aceite-agua o en el seno de la fase continua, favoreciendo cierto grado de interacción entre ambos componentes.

✓ La concentración de NCC utilizada en la formulación de las emulsiones nanocompuestas determinó sus propiedades fisicoquímicas y reológicas, así como también los mecanismos de desestabilización intervinientes. La emulsión con 2% de NCC, que presentó un elevado grado de floculación inicial, resultó ser la más estable durante 15 días de almacenamiento a temperatura ambiente.

✓ Las propiedades fisicoquímicas de las nanofibras estudiadas, en su conjunto, condicionaron las propiedades de los sistemas emulsionados nanocompuestos. Sólo las emulsiones con el agregado de 2% de MFC-Q presentaron una estabilidad similar a las emulsiones con 2% de NCC. La carga superficial de estas nanofibras pareciera favorecer la estabilidad de las emulsiones.



IV.3. MICROCÁPSULAS DE ACEITE DE PESCADO FORMADAS POR UNA MATRIZ NANOCOMPUESTA EN BASE A PROTEÍNAS DE SOJA Y NANOFIBRAS DE CELULOSA



IV.3. MICROCÁPSULAS DE ACEITE DE PESCADO FORMADAS POR UNA MATRIZ NANOCOMPUESTA EN BASE A PROTEÍNAS DE SOJA Y NANOFIBRAS DE CELULOSA

IV.3.1. Introducción

La microencapsulación se puede definir como un proceso en el cual se “atrapa” una sustancia, normalmente un ingrediente activo, dentro de otra sustancia que la recubre en el orden de la escala micro (Dickinson, 1992; McClements, 2015). Las industrias de alimentos están constantemente desarrollando y aplicando tecnologías de microencapsulación para la adición de compuestos bioactivos funcionales inestables en nuevos productos alimenticios. Matsuno y Adachi (1993) y McClements (2015) describieron varias ventajas de la microencapsulación de lípidos bioactivos, entre las cuales incluyen el retraso de la autooxidación, la mejora de la estabilidad y el enmascaramiento del sabor y olor de los ingredientes lipídicos. Para los productos alimenticios, es importante que la encapsulación produzca partículas que tengan tamaños en el orden de la escala micro, ya que los ingredientes con tamaños de partícula superiores a aproximadamente 100 μm crean una sensación en la boca no deseada ya que son lo suficientemente grandes para ser detectados (Hansen y col., 2002).

El principal componente utilizado como material de pared para encapsular compuestos activos y aditivos es normalmente una proteína o un polisacárido, pero ambos presentan ciertas limitaciones cuando se usan para microencapsular aceites susceptibles a la oxidación. El uso de sistemas mixtos de microencapsulación ha sido estudiado y se ha encontrado que pueden tener ventajas sobre los encapsulados que utilizan sólo uno de los dos biopolímeros.

Generalmente, los polisacáridos no pueden usarse por sí solos para encapsular compuestos lipídicos debido a sus pobres propiedades interfaciales; pero algunos de ellos, como los carbohidratos de bajo peso molecular tales como lactosa, sacarosa, glucosa y trehalosa, se han incorporado a formulaciones por su capacidad de modificar la temperatura de transición vítrea y acelerar la formación de la corteza seca o cápsula alrededor de las gotas de secado (Sheu y Rosenberg, 1995).

Existen varias publicaciones en las que se encapsula aceite de pescado utilizando como material de pared combinaciones de proteínas con polisacáridos tales como maltodextrina, almidones, jarabe de glucosa (Drusch, 2007; Drusch y col., 2006; Shaw y col., 2007), lactosa (Aghbashlo y col., 2012), trehalosa (Drusch y col., 2006), carboximetilcelulosa sódica (Patrick y col., 2013), metilcelulosa (Davidov-Pardo y col., 2008), polisacáridos solubles de soja (SSPS) (Anwar y Kunz, 2011), entre otros. Aghbashlo y col. (2012) observaron que la sustitución del

30% de leche en polvo descremada por una mezcla de lactosa y sacarosa en encapsulados de aceite de pescado, dio como resultado una mayor eficiencia de encapsulación, mayor contenido de humedad y mayor tamaño de partícula; lo cual lo asociaron con la aceleración de la formación de la cápsula. A su vez, se ha demostrado que la aplicación de productos de la reacción de Maillard de grado alimentario mejora la funcionalidad de las emulsiones y a su vez pueden mejorar la estabilidad de las cápsulas por la formación de enlaces cruzados entre las proteínas y los polisacáridos (Gan y col., 2008). Kagami y col. (2003) también observaron que la combinación de dextrina con proteínas lácteas (caseinato de sodio y aislado proteico de suero) para encapsular aceite de pescado aumentaba la estabilidad oxidativa del aceite (Kagami y col., 2003).

En el capítulo anterior, analizamos la capacidad emulsificante por *Pickering* de nanopartículas derivadas de polisacáridos, en particular de diferentes nanofibras de celulosa, y la posibilidad de que estos sistemas sean usados para transportar compuestos activos. Si bien hay numerosos trabajos donde se evidencia que las nanopartículas emulsifican por *Pickering*, hay pocos trabajos en donde se llegan a obtener microcápsulas. Wang y col. (2017) proponen que las nanopartículas, como los nanocristales de celulosa, atraparían satisfactoriamente el agente de interés por la generación de un material de pared más rígido en comparación con los biopolímeros clásicamente utilizados para tal fin (proteínas y polisacáridos). En el mismo sentido, Hasheminejad y col. (2019) lograron obtener cápsulas de aceite esencial de clavo de olor con nanopartículas de quitosano por emulsificación y posterior gelación iónica, mientras que Zanetti y col. (2019) encapsularon geranil cinamato con nanopartículas de policaprolactona por emulsificación y posterior evaporación del solvente.

A su vez, existen también pocos trabajos en los que se usan matrices nanocompuestas como material de pared de microcápsulas, la mayoría obtenidos por gelación. Wang y col. (2017) demostraron que efectivamente se lograba una buena encapsulación de antocianinas con el uso de quitosano y nanocristales de celulosa como material encapsulante. Hosseini y col. (2013) lograron encapsular satisfactoriamente aceite esencial de orégano con nanofibras de quitosano por formación de emulsiones y gelificación. Thomas y col. (2018) obtuvieron nanopartículas híbridas de alginato y NCC por gelación para controlar la liberación de rifampicina.

Hasta donde sabemos, no hay trabajos en los que se preparen microcápsulas de aceite de pescado de matriz nanocompuesta. En este capítulo estudiaremos la encapsulación de este aceite utilizando proteínas de soja y nanofibras de celulosa como material de pared, suponiendo que las nanofibras refuerzan la matriz proteica, y en consecuencia contribuyen a

aumentar la estabilidad oxidativa del aceite de pescado; encapsulando por emulsificación y posterior secado *spray*, que es la tecnología más utilizada en la industria alimentaria para esta finalidad.

IV.3.2. Objetivo

El objetivo del presente capítulo fue desarrollar encapsulados de aceite de pescado utilizando matrices nanocompuestas de proteínas de soja y nanofibras de celulosa, evaluando el efecto de la concentración y del tipo de nanofibras sobre las propiedades estructurales, y fisicoquímicas de los productos obtenidos y sobre la estabilidad oxidativa del aceite.

IV.3.3. Materiales y métodos

IV.3.3.1. Materiales

Se utilizó un aislado proteico de soja (**APS**, SUPRO 500E, DuPont N & H, Brasil); aceite de pescado (OmegaSur, Mar del Plata, Argentina); y nanocristales de celulosa (**NCC**), celulosa microfibrilada (**MFC**), celulosa microfibrilada modificada previamente por tratamiento enzimático (**MFC-E**) y celulosa microfibrilada modificada previamente por tratamiento químico (**MFC-Q**) obtenidas como se describió en el **Capítulo VI.1**.

El resto de los reactivos utilizados para llevar a cabo las experiencias que se describen a continuación fueron todos de grado analítico.

IV.3.3.2. Obtención de los encapsulados

Los encapsulados se obtuvieron por emulsificación y secado *spray*, al igual que en el **Capítulo III**. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en ese capítulo, donde encontramos que una de las formulaciones óptimas para la obtención de encapsulados resultó ser la que tenía una relación de proteína:aceite de 4:1 p/p, se decidió preparar emulsiones de aceite en agua (O/W) con una única relación de fases aceite:agua de 1,25:98,75 y utilizando aislado proteico de soja (al 5% p/v) como base para preparar las dispersiones proteicas y nanocompuestas.

Inicialmente el aislado proteico de soja (**APS**) se dispersó en agua mezclando con un agitador magnético (DRAGONLAB OS20-Pro, China), durante 45 minutos a temperatura ambiente. Una vez obtenida la dispersión, se adicionaron distintos volúmenes de la suspensiones de nanofibras de manera de alcanzar formulaciones con 0, 2, 4 y 8 g **NCC** /100 g

APS, o con 2 g de **MFC/MFC-E /MFC-Q** cada **100 g de APS** (en este capítulo expresaremos estas concentraciones de nanofibras como porcentajes, %).

Las dispersiones acuosas obtenidas se mezclaron con aceite de pescado manteniendo la relación de aceite:agua mencionada previamente y las emulsiones de aceite en agua (O/W) se obtuvieron por las técnicas de Ultraturrax y ultrasonido (UT+US) como se describió en la **sección III.3.2**: primero con un mezclador de sonda de alto cizallamiento Ultra-Turrax T-25 (IKA®, Werke Gmb H & Co. KG, Alemania) a 13500 rpm durante 90 s y luego con homogeneizador ultrasónico (SONICS Vibra Cell VCX 750, Vibra CellSonics Materials Inc., Estados Unidos) a 50% de potencia, 350 W, por 5 minutos, con pulsos de 30 s.

Posteriormente, el proceso de secado *spray* se realizó en un Mini Spray Dryer de laboratorio Büchi B-290 (Büchi Labortechnik AG, Suiza) equipado con una boquilla atomizadora de 700 µm de diámetro. Las emulsiones se introdujeron en la cámara principal a través de una bomba peristáltica y el caudal de alimentación se controló mediante la velocidad de rotación de la bomba (3,1 ml/min). El caudal de aire de secado fue de 357 l/h y la presión de aire del compresor fue de 6-8 bar. La temperatura del aire de entrada y salida fue de $180 \pm 2^\circ\text{C}$ y $96 \pm 8^\circ\text{C}$, respectivamente.

Los encapsulados obtenidos se almacenaron en frascos color caramelo, envueltos en papel aluminio y en la oscuridad a temperatura ambiente para los posteriores análisis.

Se prepararon dos replicados individuales para cada formulación.

IV.3.3.3. Caracterización de los encapsulados

IV.3.3.3.1. Contenido de humedad y porcentaje de sólidos recuperados

El contenido de humedad (**H**) y porcentaje de sólidos recuperados (**SR**) luego del proceso de secado en *spray* de las microcápsulas se determinó gravimétricamente como se describió en la **sección III.3.5.1**. Las determinaciones se realizaron inmediatamente después del proceso de secado y por duplicado.

IV.3.3.3.2. Color

El color de los encapsulados fue determinado utilizando un colorímetro Minolta Chroma meter (CR 400, Minolta Chroma Co., Osaka, Japón), como se describió en la **sección III.3.5.4**. se realizaron nueve determinaciones para cada muestra.

IV.3.3.3.3. Determinación del contenido de proteínas

El porcentaje de contenido proteico total de las microcápsulas se determinó como se describió en la sección **III.3.5.2.**

IV.3.3.3.4. Determinación del aceite total, del aceite libre (sin encapsular) y de la eficiencia de encapsulación

El contenido de aceite total (**AT**), el contenido de aceite libre (**AL**) y la eficiencia de encapsulación (**EE**) de las microcápsulas nanocompuestas se determinaron como se describió en la sección **III.3.5.3.**

Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

IV.3.3.3.5. Determinación de la actividad acuosa

Se determinó la actividad acuosa de los encapsulados a 25°C por el método higrométrico de la AOAC 978.18 (AOAC, 1990). Se utilizó un equipo AQUALAB (Decagon Devices, Inc, Pullman, Estados Unidos) que utiliza la técnica del punto de rocío. La muestra se colocó en una cámara sellada que contiene un espejo y se esperó a que se equilibre y condense el vapor de agua sobre el mismo. En el equilibrio, la humedad relativa del aire en la cámara es igual a la actividad de agua de la muestra y cuando ocurre la condensación de la humedad en el espejo, se detecta un cambio en la reflectancia mediante un haz de luz.

Se utilizó como patrón para calibrar el equipo una solución saturada de K₂SO₄. El ensayo se realizó por triplicado.

IV.3.3.3.6. Morfología de los encapsulados

Las microcápsulas obtenidas fueron fotografiadas con una cámara digital (Kodak M853, Estados Unidos) con el fin de observar su aspecto macroscópico.

El tamaño de las partículas y la morfología se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) como se describió en la sección **III.3.5.5.**

La estructura y morfología de las microcápsulas nanocompuestas también se observaron utilizando un microscopio láser de barrido confocal (**CSLM**) Fluoview FV1000 Espectral Olympus (Olympus, Latinoamérica, Estados Unidos). Se preparó la dispersión proteica de soja al 5% p/v y se le agregó fluoresceína (10 mg/ml), la cual se utilizó como sonda fluorescente para marcar este polímero. Para teñir las nanofibras de celulosa, se adicionó a la suspensión de las mismas gotas de una solución concentrada del colorante calcoflúor. La tinción del aceite se realizó disolviendo el rojo nilo en el aceite a 0,2 mg/ml. Se dejó en agitación cada suspensión

de polímero por separado con su respectivo colorante por 30 minutos y luego se realizó el proceso de emulsificación y secado *spray* como se describió en la **sección III.3.2 y III.3.4** respectivamente. Finalmente se procedió a realizar la observación microscópica utilizando un aumento de 20x. El sistema estaba equipado con un láser de Argón. La muestra marcada se excitó a 488 nm y se detectó a 500-550 nm la emisión de la fluoresceína, (color verde) correspondiente a la proteína, luego a 600-700 nm se observó la emisión del rojo nilo (color rojo) correspondiente a la fase lipídica y para el registro del colorante calcoflúor la muestra se excitó a 405 nm y se emitió a 410-523 nm (color azul).

IV.3.3.3.7. Estabilidad oxidativa del aceite encapsulado

El estado de oxidación del aceite de pescado luego de ser sometido al proceso de emulsificación y posterior deshidratación por secado *spray* se determinó mediante la cuantificación del índice de peróxidos (IP) y de las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), como se describió en la **sección III.3.5.6**.

IV.3.3.4. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valor medio \pm desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medias fueron evaluadas por el Test de Tukey para comparación de pares, con un nivel de significación $\alpha=0,05$. Para ello se empleó el programa Statgraphics Centurion, versión 16.1.18 (Statgraphics, Estados Unidos).

IV.3.4. Resultados y discusión

IV.3.4.1. Microcápsulas de aceite de pescado preparadas con proteínas de soja y diferentes concentraciones de nanocristales de celulosa como material de pared

Se obtuvieron microcápsulas de aceite de pescado mediante emulsificación y posterior secado *spray*, utilizando como material de pared proteínas de soja con diferentes concentraciones de NCC. Teniendo en cuenta las propiedades de las emulsiones nanocompuestas estudiadas en el **Capítulo IV.2**, se seleccionaron tres concentraciones de NCC (2, 4 y 8%) para evaluar su efecto en las propiedades de los encapsulados de aceite de pescado con proteínas de soja.

Todas las emulsiones pudieron ser secadas por *spray* y no mostraron signos de desestabilización durante el tiempo de su procesamiento. En todos los casos, se obtuvieron

polvos con una coloración amarillenta, similares a los formados usando solo proteínas soja, que no presentaron una apariencia aceitosa al tacto ni el olor característico del aceite de pescado. En la **Figura IV.3.1** se muestra el aspecto visual de los encapsulados resultantes.

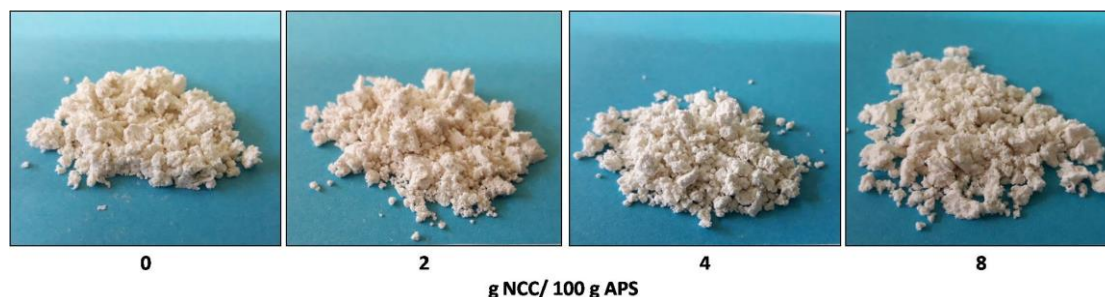


Figura IV.3.1. Aspecto visual de las microcápsulas de aceite de pescado preparadas con **APS** y diferentes concentraciones de **NCC** (0, 2, 4 u 8% p/p con respecto a la cantidad de **APS**) como material de pared.

La **Tabla IV.3.1.** muestra los parámetros de color de las microcápsulas obtenidas. Al modificar la concentración de NCC se observaron pequeñas variaciones en los parámetros de cromaticidad (a^* y b^*) de las muestras, pero sin afectar significativamente su luminosidad (L^*). Se observó que al incrementar la concentración de NCC se produjo un mayor cambio en la coloración de las muestras, evidenciado en el parámetro ΔE^* . Las muestras con 8% de NCC resultaron las más amarillentas.

Tabla IV.3.1. Parámetros de color CIE- $L^*a^*b^*$ (L^* , a^* y b^*) y diferencia de color total (ΔE^*) de las microcápsulas de aceite de pescado preparadas con **APS** y diferentes concentraciones de **NCC** (0, 2, 4 u 8% p/p con respecto a la cantidad de **APS**) como material de pared.

g NCC/100 g APS	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
0	$93,56 \pm 0,59^a$	$-0,34 \pm 0,02^a$	$10,00 \pm 0,28^a$	$9,12 \pm 0,22^{a,b}$
2	$93,58 \pm 0,55^a$	$-0,15 \pm 0,07^b$	$9,51 \pm 0,68^a$	$8,65 \pm 0,78^a$
4	$93,89 \pm 0,66^a$	$-0,37 \pm 0,08^a$	$10,88 \pm 0,50^b$	$9,88 \pm 0,69^{b,c}$
8	$91,30 \pm 0,81^a$	$-0,04 \pm 0,04^c$	$12,51 \pm 0,41^c$	$10,38 \pm 0,58^c$

Los valores informados para cada encapsulado son promedios \pm desviación estándar ($n = 9$). Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), según la prueba de Tukey.

En la **Tabla IV.3.2** se muestra la composición química, el porcentaje de sólidos recuperados y la actividad acuosa de las microcápsulas nanocompuestas.

El contenido de humedad (**H**) de los encapsulados con 2% de **NCC** no presentó diferencias significativas con respecto al de las microcápsulas proteicas. Al aumentar la concentración de

nanocristales de celulosa en la formulación, ya sea 4 u 8% de NCC, se registró una disminución significativa en su contenido de humedad. El mismo comportamiento se observó al comparar los rendimientos del proceso de secado *spray*. Las microcápsulas con 2% de NCC no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de sólidos recuperados (**SR**) con respecto al control (0% NCC). En ambos casos, se logró recuperar aproximadamente 38% de los sólidos iniciales. Mientras que al aumentar la concentración de nanocristales de celulosa en la formulación al 4 u 8% de NCC se obtuvo un aumento significativo en el rendimiento del secado, evidenciándose en mayores porcentajes de recuperación de sólidos ($SR \approx 59\%$).

El contenido de humedad de los encapsulados y el rendimiento del secado dependen considerablemente de las propiedades del material de partida y de las condiciones operativas utilizadas durante el procesamiento (Botrel y col., 2012; Frascareli y col., 2012; Grabowski y col., 2006). En nuestro estudio, las emulsiones con menores concentraciones de NCC (0 y 2%) presentaron comportamiento de flujo newtoniano; mientras que la emulsión con 4% de NCC resultó pseudoplástica y la de 8% de NCC mostró características viscoelásticas (**sección IV.2.4.1**). Pareciera existir una relación directa entre la consistencia/viscosidad de los sistemas emulsionados y el contenido de humedad de los encapsulados resultantes. En este sentido, Kurek y col. (2018) encapsularon aceite de pescado con almidón modificado y β -D-glucano de la fibra soluble de cebada y también observaron una disminución de la humedad de los encapsulados a medida que aumentaba la viscosidad de las emulsiones por el mayor contenido de carbohidratos. Sin embargo, en contraposición, Premi y Sharma (2017) describieron que se producía un aumento de la viscosidad de emulsiones newtonianas de aceite de moringa (*Moringa oleífera*) en agua y del contenido de humedad de los encapsulados resultantes al incrementar la proporción de goma arábiga o concentrado de proteínas de suero de leche y maltodextrina en la formulación. Por otra parte, Botrel y col. (2014) no observaron cambios significativos en la humedad de encapsulados que obtuvieron al deshidratar emulsiones newtonianas de aceite de pescado en agua, utilizando diferentes proporciones de aislado proteico de suero de leche, inulina y maltodextrina como materiales de pared.

Tabla IV.3.2. Contenido de humedad (**H**), porcentaje de sólidos recuperados (**SR**), contenido de proteínas (**P**), aceite total (**AT**) y aceite libre (**AL**) y actividad acuosa (**a_w**) de las microcápsulas de aceite de pescado preparadas con **APS** y diferentes concentraciones de **NCC** (0, 2, 4 u 8% p/p con respecto a la cantidad de **APS**) como material de pared.

g NCC/100 g APS	H (%)	SR (%)	P (%)	AT (%)	AL (%)	a _w
0	4,95 ± 0,41 ^b	38,45 ± 1,56 ^a	58,16 ± 0,84 ^a	17,72 ± 0,34 ^a	4,40 ± 0,42 ^{a,b}	0,29 ± 0,01 ^c
2	3,73 ± 0,89 ^b	38,32 ± 2,31 ^a	57,45 ± 0,68 ^a	16,95 ± 0,10 ^a	5,83 ± 0,87 ^b	0,25 ± 0,01 ^b
4	1,23 ± 0,25 ^a	59,89 ± 3,11 ^b	58,11 ± 1,15 ^a	17,35 ± 1,23 ^a	3,19 ± 0,22 ^a	0,18 ± 0,01 ^a
8	1,09 ± 0,11 ^a	58,37 ± 1,25 ^b	53,14 ± 0,42 ^a	18,32 ± 0,21 ^a	4,43 ± 0,79 ^{a,b}	0,25 ± 0,01 ^b

Los valores informados para cada encapsulado son promedios ± desviación estándar (n = 2). Los valores de H, SR, P, AT y AL están expresados en base seca. Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras (p < 0,05), según la prueba de Tukey.

Los contenidos de proteínas (**P**) y de aceite total (**AT**) no resultaron afectados por la presencia de los nanocristales de celulosa (**Tabla IV.3.2**). Las proporciones proteína:aceite resultantes después del secado *spray* resultaron ser menores (3,3:1; 3,4:1; 3,3:1; 2,9:1) que la relación de la formulación inicial (4:1). Durante el secado *spray* se producen pérdidas de masa por adhesión diferencial de la muestra a las paredes de la cámara de secado y luego a las del ciclón. Estas pérdidas dependen, en gran medida, de las características de la muestra y condicionan el rendimiento del proceso (**SR**) y la relación proteína:aceite.

Si bien el contenido de **AT** presentó valores similares en todas las muestras, se encontraron pequeñas diferencias en cuanto al contenido de aceite libre (**AL**) (**Tabla IV.3.2**). La eficiencia de encapsulación (**EE**) para todas las formulaciones estudiadas se mantuvo alrededor del 75%, tal como se muestra en la **Figura IV.3.2**. Este valor es comparable a los que se presentan en trabajos de encapsulación de aceite de pescado con proteínas o mezcla de proteínas-polisacáridos por secado *spray* (Kurek y col., 2018; Pourashouri y col., 2014; Takeungwongtrakul y col., 2015; Zhang y col., 2015; Aberkane y col., 2014; Chang y col., 2016). Según Encina y col. (2016), el tamaño de las gotas de la emulsión tiene un efecto crítico en la **EE** del aceite de pescado secado por *spray* debido a que la reducción del tamaño de la gota de la emulsión da como resultado una menor cantidad de aceite libre en la superficie de las partículas de polvo. Cuanto menor es el tamaño de gota, mayor será la **EE** porque las gotas de aceite pequeñas podrán ser encerradas más eficientemente dentro del agente de encapsulación de las microcápsulas (Jafari y col., 2008). En nuestro trabajo, no encontramos relación entre los valores de **AL** y **EE** con el tamaño de las partículas de la emulsión inicial.

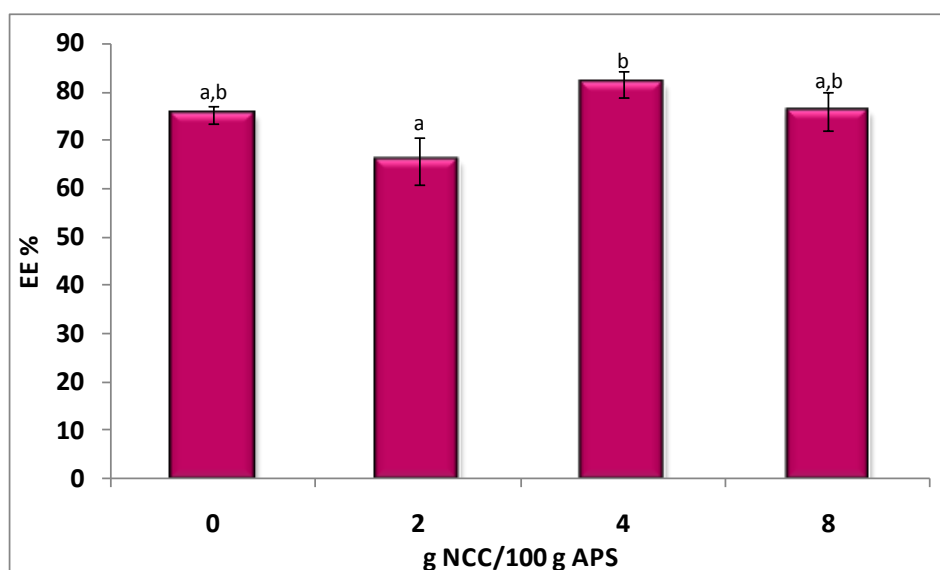


Figura IV.3.2. Eficiencia de encapsulación (EE %) de las microcápsulas de aceite de pescado preparadas con APS y diferentes concentraciones de NCC (0, 2, 4 u 8% p/p con respecto a la cantidad de APS) como material de pared.

Los valores informados para cada encapsulado son promedios \pm desviación estándar ($n = 2$). Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), según la prueba de Tukey.

Los valores de actividad acuosa (a_w) de las microcápsulas se muestran en la **Tabla IV.3.2**. La a_w de las microcápsulas proteicas (control) mostró un valor de 0,29 y si bien no se observó una tendencia clara con la concentración de NCC, todas las microcápsulas nanocompuestas presentaron menores valores (entre 0,18 y 0,25) que el control. En particular, las microcápsulas con 4% de NCC fueron las que presentaron la menor a_w .

Conocer la a_w de un producto permite predecir su estabilidad frente a distintas alteraciones. En la **Figura IV.3.3**, se muestran las velocidades relativas de distintas reacciones de deterioro en alimentos en función de la a_w del producto. Como la a_w de todas las microcápsulas fue menor a 0,6, las mismas no serán susceptibles al deterioro por desarrollo microbiano (hongos, bacterias y levaduras) y reacciones de hidrólisis o enzimáticas (Rahman y Labuza, 1999). Por otra parte, como se puede observar en la **Figura IV.3.3**, existe un rango de a_w (entre 0,20 y 0,30) en el cual la velocidad de oxidación lipídica presenta un mínimo. En los valores de $a_w < 0,2$, el agua asociada a la muestra se puede unir a los hidroperóxidos, interfiriendo con su descomposición y dificultando de esa manera el proceso de oxidación; mientras que en $a_w > 0,3$ se acelera la oxidación por el aumento de la solubilidad del oxígeno y la exposición de los sitios catalíticos de las macromoléculas (Fennema y col., 2010). Teniendo en cuenta esto, las microcápsulas obtenidas en el presente trabajo presentarían baja

susceptibilidad a sufrir reacciones de oxidación lipídica (a_w entre 0,18 y 0,29). Valores similares de a_w se han informado para los productos de la encapsulación por secado *spray* de escualeno con quitosano (Kumar y col., 2017) o de aceite de moringa (*Moringa oleífera*) con proteínas de suero de leche, maltodextrina y goma arábiga (Premi y Sharma, 2017). En este último trabajo destacan que es preferible que las microcápsulas tengan tanto el contenido de humedad como la actividad acuosa relativamente bajas ($H < 4\%$ y $0,2 < a_w < 0,3$), ya que de lo contrario se acelera la oxidación de lípidos y disminuye la fluidez del polvo.

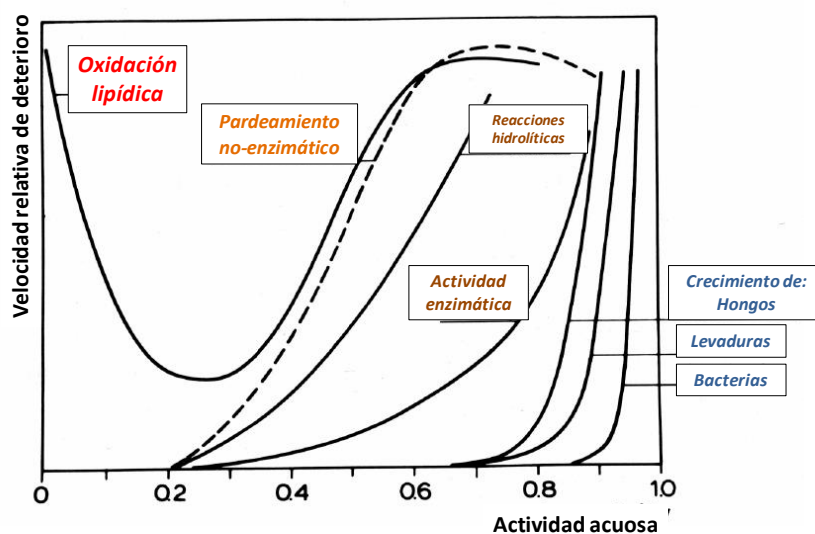


Figura IV.3.3. Representación de la influencia de la actividad acuosa sobre los distintos procesos de deterioro en los alimentos. Imagen adaptada de Labuza y col. (1970).

En la **Figura IV.3.4.** se muestra la morfología externa de las microcápsulas mediante fotografías obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Allí puede observarse la presencia de partículas de forma esférica, lisa, con abolladuras en la superficie (indentaciones) y de diversos tamaños, tanto en las microcápsulas proteicas como en las nanocompuestas. Al incrementar la concentración de NCC pareciera aumentar la rugosidad de la superficie de la microcápsula. Esto se observa claramente en los encapsulados con 8% de NCC, en donde se pueden distinguir pequeñas “arrugas” distribuidas por toda la superficie del encapsulado (observadas en la figura con el aumento de 1000x).

Los diámetros aparentes medios de los encapsulados, estimados a partir de las imágenes, se presentan en la **Tabla IV.3.3.** A pesar que los tamaños de las partículas de las emulsiones de partida fueron diferentes (valores entre 3 y 10 μm ; **Capítulo IV.2**), las microcápsulas no presentaron diferencias significativas en sus diámetros aparentes medios, siendo todos del

orden de 20-26 μm . Las diferencias observadas en el comportamiento reológico de las emulsiones en estudio (**Capítulo IV.2**) tampoco afectaron el tamaño de las microcápsulas resultantes. El tamaño de las microcápsulas está condicionado principalmente por el diámetro de la boquilla utilizada durante el secado *spray*, como se explicó también en el **Capítulo III**.

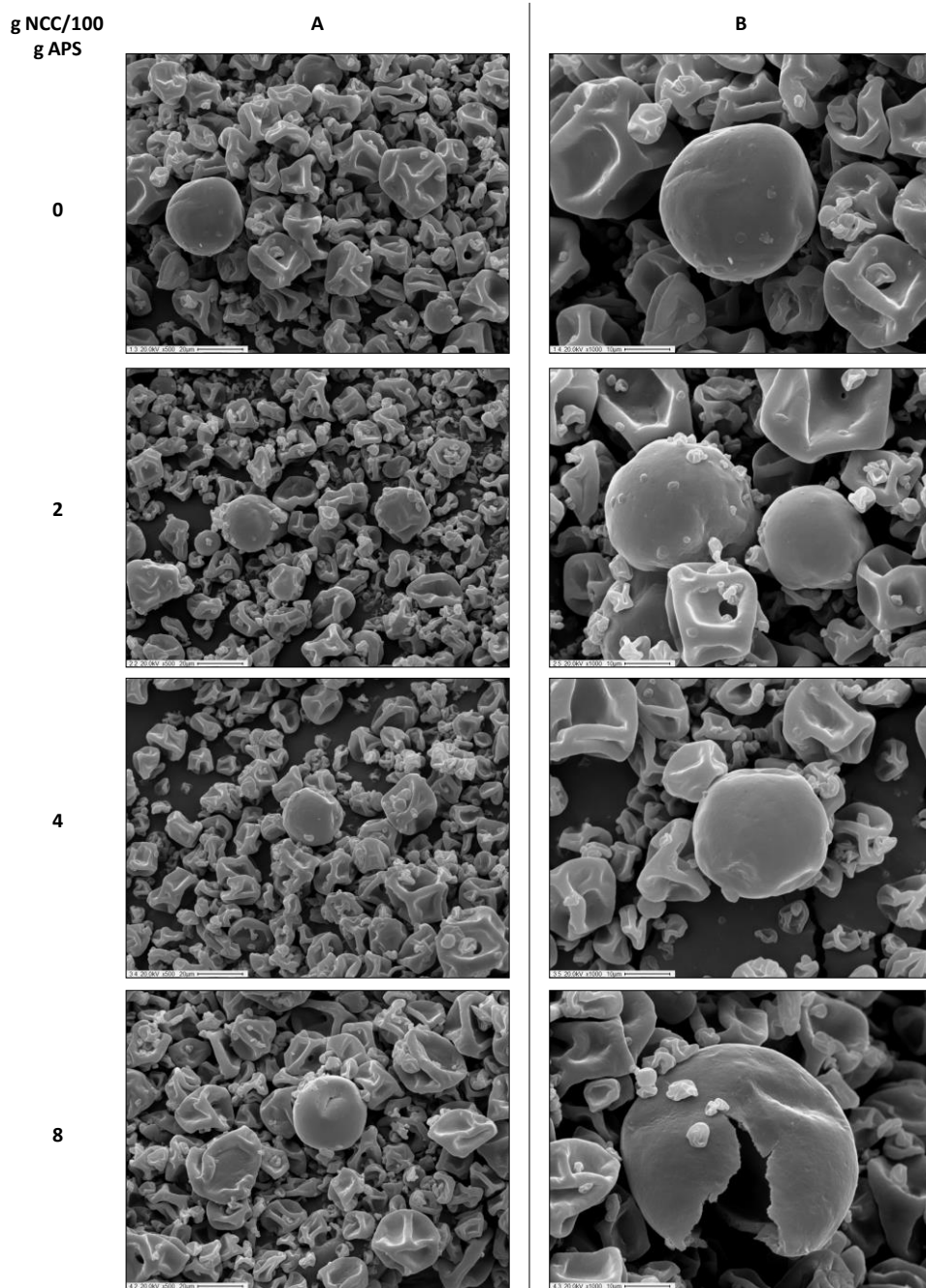


Figura IV.3.4. Micrografías electrónicas de barrido (SEM) de la morfología externa (topografía) de las microcápsulas de aceite de pescado preparadas con **APS** y diferentes concentraciones de **NCC** (0, 2, 4 u 8% p/p con respecto a la cantidad de **APS**) como material de pared, con un aumento de 500x (**Panel A**) y 1000x (**Panel B**).

Tabla IV.3.3. Tamaño de las microcápsulas de aceite de pescado preparadas con **APS** y diferentes concentraciones de **NCC** (0, 2, 4 u 8% p/p con respecto a la cantidad de **APS**) como material de pared.

g NCC/100 g APS	Tamaño de las microcápsulas (μm)
0	24,95 ± 5,81 ^a
2	21,04 ± 5,45 ^a
4	19,87 ± 4,31 ^a
8	23,32 ± 6,85 ^a

Los valores informados para cada encapsulado son promedios ± desviación estándar (n = 15). Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras (p < 0,05), según la prueba de Tukey.

Durante el análisis, fue posible encontrar algunas microcápsulas rotas en todas las formulaciones. En la **Figura IV.3.5** se muestra, a modo de ejemplo, la topografía interna de las microcápsulas obtenidas a partir de las emulsiones con 0 y 2% de NCC. Se observó que en el interior, las microcápsulas estaban huecas y que las gotas de aceite de pescado se adhirieron a la superficie o se incrustaron en la matriz del material de pared. El aceite de pescado pareciera estar distribuido en la pared de las microcápsulas en forma de pequeñas gotas con tamaños de ≈1,45 μm para ambos casos.

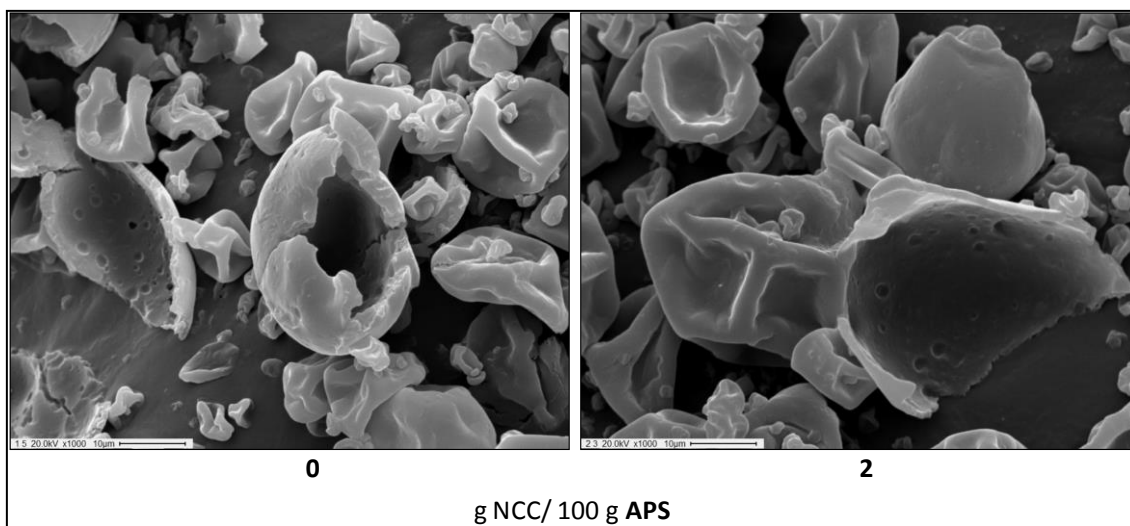


Figura IV.3.5. Micrografías electrónicas de barrido (SEM) de la morfología interna de las microcápsulas de aceite de pescado preparadas con **APS** y diferentes concentraciones de **NCC** (0, 2% p/p con respecto a la cantidad de **APS**) como material de pared con un aumento de 1000x.

La ubicación de cada componente en las microcápsulas se intentó dilucidar por microscopia láser de barrido confocal (CLSM) utilizando sondas fluorescentes específicas que teñían de manera diferencial a las proteínas, los nanocristales de celulosa y los lípidos. En una primera instancia, se pudo verificar que cada colorante efectivamente era compatible con cada matriz utilizada (**Figura IV.3.6**). La fluoresceína tiñó a las proteínas del **APS** en dispersión (**Figura IV.3.6.A**) y el rojo nilo lo hizo con el aceite de pescado, aunque en la **Figura IV.3.6.B** no se distinguen gotas ni ninguna estructura ya que se utilizó aceite líquido puro. A su vez, el colorante calcoflúor logró teñir los nanocristales de celulosa en suspensión (**Figura IV.3.6.C**). En esta última se pueden observar ciertas estructuras alargadas con formas tubulares, las cuales corresponderían a agregados de NCC.

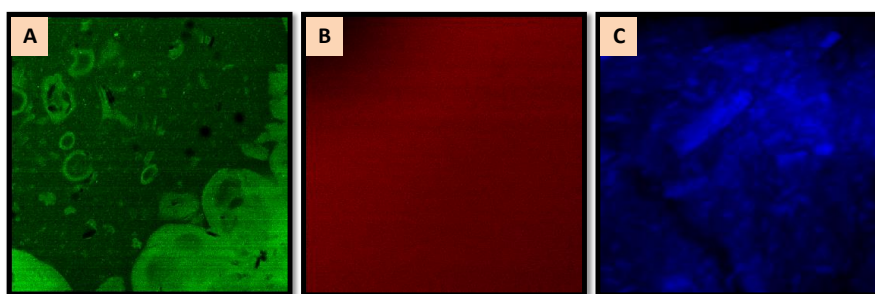


Figura IV.3.6. Micrografías de barrido láser confocal (CLSM) **A)** de la dispersión acuosa de aislado proteico de soja (APS) al 5%p/v teñida con fluoresceína, **B)** del aceite de pescado líquido teñido con rojo nilo, y **C)** de la suspensión acuosa de nanocristales de celulosa (NCC) teñida con calcoflúor. Aumento de 20x.

En la **Figura IV.3.7** se muestra que las proteínas de soja (APS) co-localizaron con las gotas de aceite de pescado, corroborando que las microcápsulas resultantes fueron del tipo matriz donde se integran el aceite y el material de pared. Al analizar los encapsulados con el agregado de 8% de NCC, se observó que todos los componentes de la formulación co-localizaron, esto nos indicaría que estas microcápsulas también son del tipo matriz. Cabe resaltar que en las imágenes de las microcápsulas con 8% de NCC. Se pueden visualizar zonas donde resalta el color azul de la tinción de NCC por sobre los otros componentes y que esas zonas más intensas tienen forma alargada. Esto podría estar indicando que si bien, los NCC están distribuidos por toda la matriz (como se ve en la figura correspondiente al canal de la tinción con calcoflúor, color azul) hay zonas donde se encuentran más concentrados y agregados. Esta suposición se podría hacer ya que al estar utilizando el microscopio con un aumento de 20x y que el tamaño de los NCC es de escala nanométrica (visto por AFM en el **Capítulo IV.1**), no se podrían distinguir los nanocristales individuales. Estos agregados de NCC podrían ser los responsables

de las “arrugas”. Aún así, es posible destacar que los NCC tienen buena adherencia y compactación en la matriz proteica de APS.

Tanto en el encapsulado proteico como en el nanocompuesto, se pudieron observar huecos centrales en las partículas, en concordancia con las observaciones de SEM, los cuales corresponden al colapso de las mismas durante el proceso de secado *spray*, explicado en el **Capítulo III**. Este tipo de estructura se informó en diversos trabajos de encapsulación por secado *spray* de aceite de pescado con proteínas del suero lácteo (Taneja y col., 2013; Wang y col., 2016) así como también con almidón modificado (Silva y col., 2016).

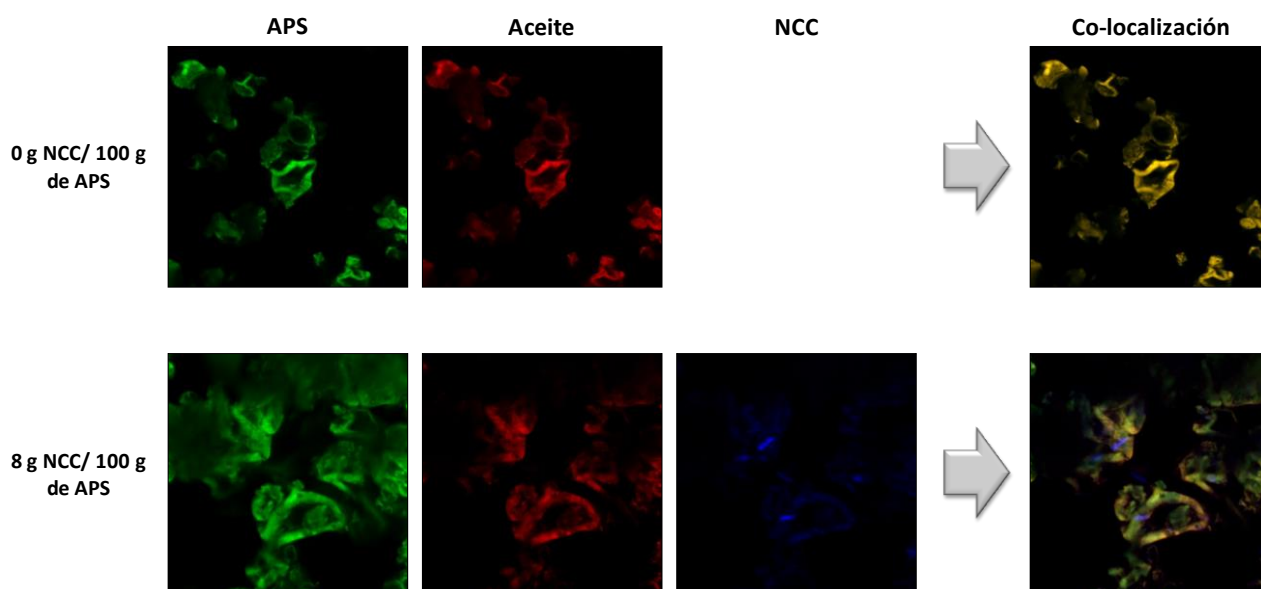


Figura IV.3.7. Micrografías de barrido láser confocal (CLSM) de las microcápsulas de aceite de pescado preparadas con **APS** y diferentes concentraciones de **NCC** (0, 8% p/p con respecto a la cantidad de **APS**) como material de pared. CLSM a 20x de aumento. Triple tinción de la emulsión O/W con: El color verde representa la proteína de soja (APS) teñida con fluoresceína, el color rojo representa el aceite de pescado teñido con rojo Nilo y el color azul representa los nanocristales de celulosa (NCC) teñidos con calcoflúor.

Para evaluar el efecto que causa la presencia de **NCC** en las formulaciones nanocompuestas sobre la oxidación lipídica al aceite de pescado durante su encapsulación, se determinaron los índices de peróxidos (IP) y el valor del ácido tiobarbitúrico (TBARS) para las microcápsulas en estudio y se las comparó con el estado de oxidación del aceite de pescado sin encapsular.

El aceite de pescado se encontraba en un buen estado de conservación, con un bajo contenido de hidroperóxidos (IP = 1,8 meq hidroperóxidos/kg aceite) y ausencia de los productos secundarios de autooxidación lipídica.

La **Figura IV.3.8** muestra el índice de peróxido (**panel A**) y el valor del ácido tiobarbitúrico (**panel B**) para las microcápsulas estudiadas. El proceso de emulsificación y de secado *spray*, afectaron la estabilidad oxidativa del aceite de pescado. Las microcápsulas proteicas presentaron valores de IP y de TBARS mayores que los del aceite sin encapsular indicando que durante la encapsulación el aceite de pescado ha comenzado a sufrir oxidación lipídica.

La incorporación de NCC en las formulaciones produjo una disminución significativa en ambos parámetros sugiriendo que su presencia brinda protección al aceite de pescado durante su encapsulación. La reducción en IP fue significativa (aproximadamente 60%) y resultó independiente de la concentración de NCC en los encapsulados. Pero, los valores de TBARS tendieron a disminuir al aumentar la concentración de estas nanofibras en la formulación. Al incorporar 2% de NCC se logró disminuir el TBARS en un 37% con respecto al encapsulado formado solo por proteínas; mientras que para las formulaciones con concentraciones de 4 y 8% la reducción del TBARS resultó del 65-70%. Estos resultados demuestran que el agregado de NCC logra proteger significativamente al aceite de pescado de las reacciones de oxidación que inevitablemente suceden durante su encapsulación. La formulación con 4% de NCC resultó ser la más eficiente, logrando similar protección que la formulación con mayor concentración de NCC. En este sentido, Kurek y col. (2018) mostraron el efecto de la concentración de β -D-glucano proveniente de cebada sobre los encapsulados con aceite de pescado y almidón modificado. Estos autores observaron que a medida que aumentaba la concentración de β -D-glucano disminuía el valor de TBARS, y lo atribuyeron a la formación de una capa gruesa alrededor de las gotas en las cápsulas de mayor tamaño. Por otra parte, Angkuratipakorn y col. (2017) trabajaron con emulsiones de aceite de salvado de arroz en agua usando mezclas de goma arábica y NCC como agentes emulsificantes, y observaron una disminución del IP al aumentar la concentración de NCC. Estos autores atribuyeron sus resultados a la alta cristalinidad de los NCC, a sus fuertes enlaces de hidrógeno inter e intramolecular y al denso empaquetamiento de la celulosa. A su vez, Cherhal y col. (2016) también observaron una disminución en el IP en emulsiones de O/W utilizando NCC junto con un surfactante no iónico (poliglicerol succinato) como emulsificantes, y lo asociaron a la rigidez de los NCC en la interfaz aceite-agua que reducía la permeabilidad de las moléculas de oxígeno, previniendo de esa manera el deterioro de los dobles enlaces en la estructura del aceite.

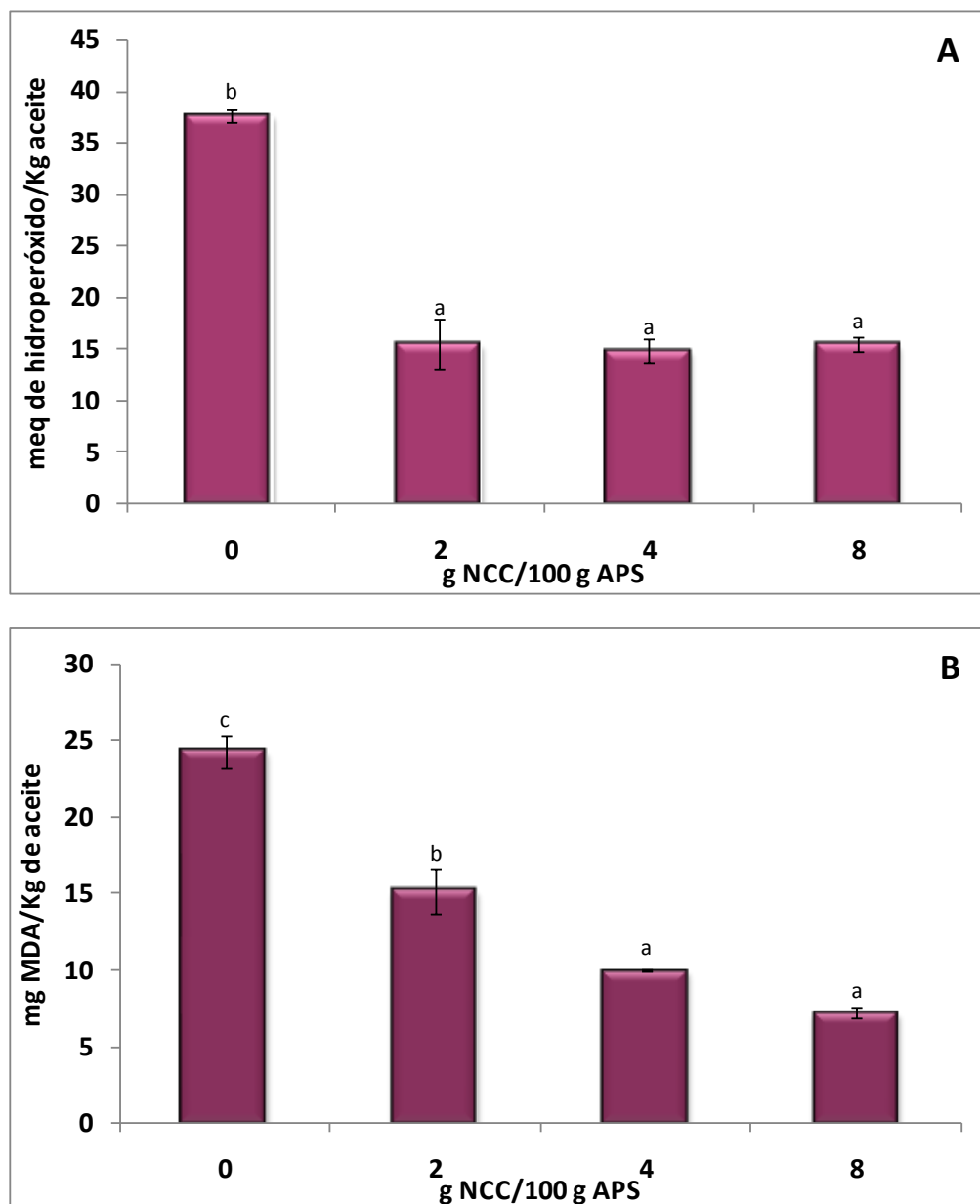


Figura IV.3.8. Índice de peróxidos (A) y TBARS (B) de las microcápsulas de aceite de pescado preparadas con APS y diferentes concentraciones de NCC (0, 2, 4 u 8% p/p con respecto a la cantidad de APS) como material de pared.

Los valores informados para cada encapsulado son promedios \pm desviación estándar ($n = 2$). Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), según la prueba de Tukey.

IV.3.4.2. Microcápsulas de aceite de pescado preparadas con proteínas de soja y distintas nanofibras de celulosa como material de pared

Se obtuvieron microcápsulas de aceite de pescado mediante deshidratación por secado *spray* de las emulsiones O/W estabilizadas sistemas nanocompuestos formados por APS y diferentes nanofibras de celulosa (NCC, MFC, MFC-E y MFC-Q) (estudiadas en el **Capítulo IV.2**).

En esta sección, se evaluó el efecto del tipo de nanofibras sobre las propiedades de los encapsulados de aceite de pescado con proteínas de soja.

Todas las emulsiones resultantes pudieron ser secadas por *spray* y no mostraron signos de desestabilización durante el tiempo de su procesamiento.

Las microcápsulas con el agregado de las distintas MFC no presentaron una apariencia aceitosa al tacto ni el olor característico del aceite de pescado, al igual que lo descrito para los encapsulados con 2% de NCC y el encapsulado proteico (control) (**Figura IV.3.9**).

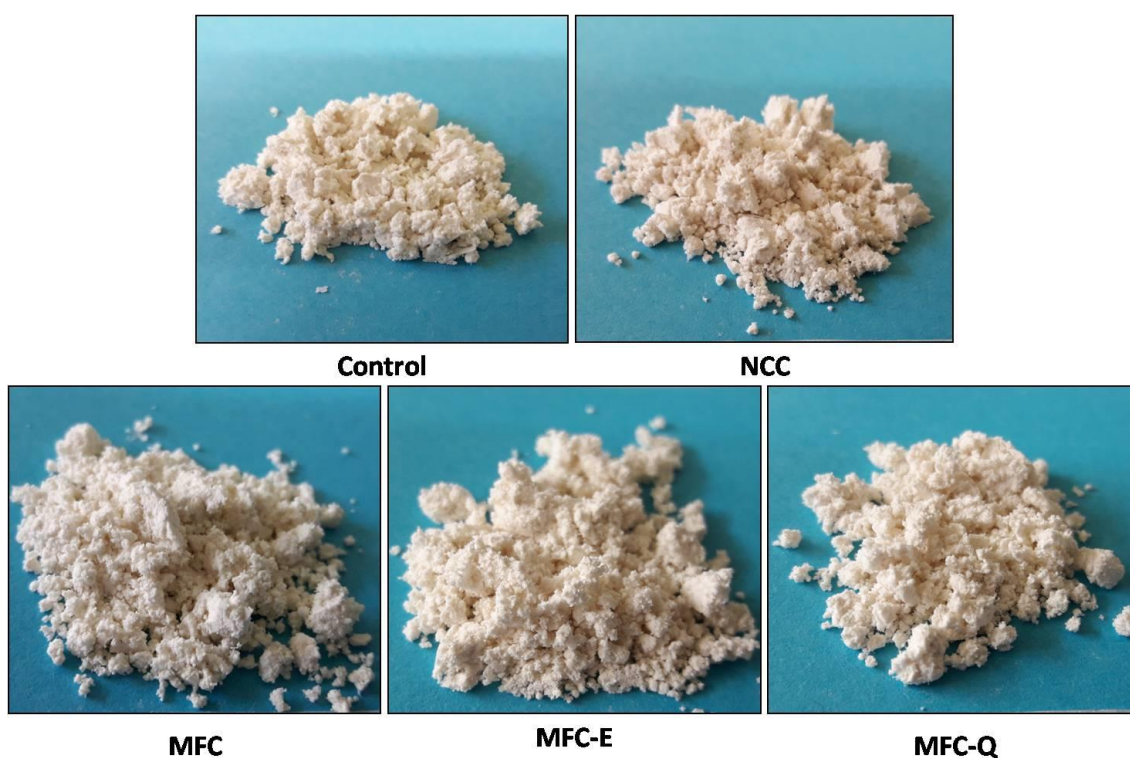


Figura IV.3.9. Aspecto visual de las microcápsulas de aceite de pescado preparadas sólo con **APS** o con el agregado de distintas nanofibras de celulosa (al 2 % con respecto a la cantidad de **APS**) como material de pared: nanocristales (**NCC**), con celulosa microfibrilada (**MFC**), con celulosa microfibrilada previamente modificada por tratamiento enzimático (**MFC-E**) y con celulosa microfibrilada previamente modificada por tratamiento químico (**MFC-Q**).

En la **Tabla IV.3.4.** se muestran los parámetros de color CIE-L*a*b* de las distintas microcápsulas. Allí se puede observar que la coloración de los encapsulados varió según el tipo de nanofibras de celulosa incorporada en las formulaciones. El parámetro a* resultó negativo para todas las muestras y fue afectado por la presencia de las nanofibras, pero en diferentes sentidos según su origen. Así, los **NCC** obtenidos de celulosa microcristalina lo acercaron a cero respecto al encapsulado proteico; mientras que las **MFC** obtenidas de las fibras de formio (**MFC**, **MFC-E** y **MFC-Q**) lo hicieron más negativo (incrementándose el -a*). Por otro lado, sólo

la presencia de MFC aumentó levemente la luminosidad (L^*) de los encapsulados con respecto al control; mientras que sólo la adición de MFC-Q aumentó levemente el valor del parámetro b^* . Si bien todos los encapsulados resultaron amarillentos, se registraron diferencias de coloración entre las muestras (ΔE^*), posiblemente debido a la coloración propia de las suspensiones acuosas de nanofibras. Cabe recordar que las suspensiones de NCC son blanquecinas; mientras que las celulosa microfibrilada (MFC, MFC-E y MFC-Q) son algo más amarillentas (**Capítulo IV.1**).

Tabla IV.3.4. Parámetros de color CIE- $L^*a^*b^*$ (L^* , a^* y b^*) y diferencia de color total (ΔE^*) de las microcápsulas de aceite de pescado preparadas sólo con **APS** o con el agregado de distintas nanofibras de celulosa (al 2 % con respecto a la cantidad de **APS**) como material de pared: nanocristales (**NCC**), con celulosa microfibrilada (**MFC**), con celulosa microfibrilada previamente modificada por tratamiento enzimático (**MFC-E**) y con celulosa microfibrilada previamente modificada por tratamiento químico (**MFC-Q**).

	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
Control	$93,56 \pm 0,59^b$	$-0,34 \pm 0,02^b$	$10,00 \pm 0,28^{a,b}$	$9,12 \pm 0,22^b$
NCC	$93,58 \pm 0,55^b$	$-0,15 \pm 0,07^c$	$9,51 \pm 0,68^a$	$8,65 \pm 0,78^{a,b}$
MFC	$95,55 \pm 0,85^c$	$-0,47 \pm 0,03^a$	$10,52 \pm 0,37^{b,c}$	$9,07 \pm 0,50^b$
MFC-E	$92,64 \pm 0,77^{a,b}$	$-0,46 \pm 0,02^a$	$10,39 \pm 0,35^{b,c}$	$7,95 \pm 0,52^a$
MFC-Q	$92,37 \pm 0,87^a$	$-0,48 \pm 0,04^a$	$10,73 \pm 0,54^c$	$8,36 \pm 0,74^{a,b}$

Los valores informados para cada encapsulado son promedios \pm desviación estándar ($n = 9$). Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), según la prueba de Tukey.

En la **Tabla IV.3.5** se muestra el contenido de humedad (**H**), proteínas (**P**), aceite total (**AT**), aceite libre (**AL**), el porcentaje de sólidos recuperados y la actividad acuosa de las microcápsulas en estudio. El contenido de humedad (**H**) para los encapsulados con 2% de **NCC** y de **MFC-E** no presentaron diferencias significativas con respecto a los encapsulados proteicos sin nanofibras, mientras que los encapsulados con **MFC-Q** y **MFC** (nanofibras con valores de longitud más grandes) presentaron menores valores de humedad que el control. El menor valor de **H** presentado por las microcápsulas con MFC podría estar relacionado con el comportamiento reológico de la emulsión de partida. Esta emulsión había mostrado un comportamiento viscoelástico de tipo gel con preponderancia de la componente elástica sobre la viscosa, mientras que las otras emulsiones nanocompuestas mostraron comportamiento de flujo newtoniano (**Capítulo IV.2**).

En cuanto al rendimiento de sólidos recuperados luego del proceso de secado *spray*, las microcápsulas con nanofibras no presentaron diferencias significativas con respecto al control, excepto las que contenían MFC-Q en su formulación.

Tabla IV.3.5. Contenido de humedad (**H**), porcentaje de sólidos recuperados (**SR**), contenido de proteínas (**P**), aceite total (**AT**) y aceite libre (**AL**), actividad acuosa (**a_w**) de las microcápsulas de aceite de pescado preparadas sólo con **APS** o con el agregado de distintas nanofibras de celulosa (al 2 % con respecto a la cantidad de **APS**) como material de pared: nanocristales (**NCC**), con celulosa microfibrilada (**MFC**), con celulosa microfibrilada previamente modificada por tratamiento enzimático (**MFC-E**) y con celulosa microfibrilada previamente modificada por tratamiento químico (**MFC-Q**).

	H (%)	SR (%)	P (%)	AT (%)	AL (%)	a _w
Control	4,95 ± 0,41 ^b	38,45 ± 1,56 ^a	58,16 ± 0,84 ^a	17,72 ± 0,34 ^b	4,40 ± 0,42 ^{b,c}	0,29 ± 0,01 ^c
NCC	3,73 ± 0,89 ^{a,b}	38,32 ± 2,31 ^a	57,45 ± 0,68 ^a	16,95 ± 0,10 ^{a,b}	5,83 ± 0,87 ^c	0,25 ± 0,01 ^b
MFC	1,99 ± 0,14 ^a	43,34 ± 3,45 ^{a,b}	59,86 ± 3,53 ^a	15,38 ± 0,19 ^{a,b}	2,99 ± 0,68 ^{a,b}	0,20 ± 0,01 ^a
MFC-E	3,57 ± 0,25 ^{a,b}	46,77 ± 2,77 ^{a,b}	56,84 ± 3,03 ^a	14,62 ± 0,75 ^a	1,84 ± 0,07 ^a	0,23 ± 0,01 ^b
MFC-Q	2,83 ± 0,08 ^a	50,47 ± 3,41 ^b	56,14 ± 1,45 ^a	17,26 ± 1,07 ^b	4,91 ± 0,74 ^{b,c}	0,19 ± 0,01 ^a

Los valores informados para cada encapsulado son promedios ± desviación estándar (n = 2). Los valores de H, SR, P, AT y AL están expresados en base seca. Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras (p < 0,05), según la prueba de Tukey.

El contenido de proteínas (**P**) se mantuvo sin cambios con respecto al control, mientras que el contenido de aceite total (**AT**) logró mantenerse en todos los encapsulados, excepto para aquellos con el agregado de 2% de MFC-E, donde se encontró un valor significativamente menor que el del encapsulado proteico.

Las proporciones proteína:aceite resultantes después del secado *spray* resultaron ser menores (3,3:1; 3,4:1; 3,9:1; 3,9:1; 3,3:1) que la relación de la formulación inicial (4:1). Sólo las formulaciones con MFC y MFC-E tener una relación similar a la relación proteína:aceite inicial. Al analizar el contenido de aceite libre (**AL**), sólo las microcápsulas obtenidas con el agregado de MFC-E mostraron el menor valor con respecto al encapsulado control.

La eficiencia de encapsulación (**EE**) se muestra en la **Figura IV.3.10**. Allí se aprecian valores similares de EE en todos los encapsulados (≈70-85%). Estos valores de EE son relativamente altos por lo que tanto el proceso de secado como el material de pared utilizado en todos los casos fueron eficientes para retener el aceite durante el proceso de secado.

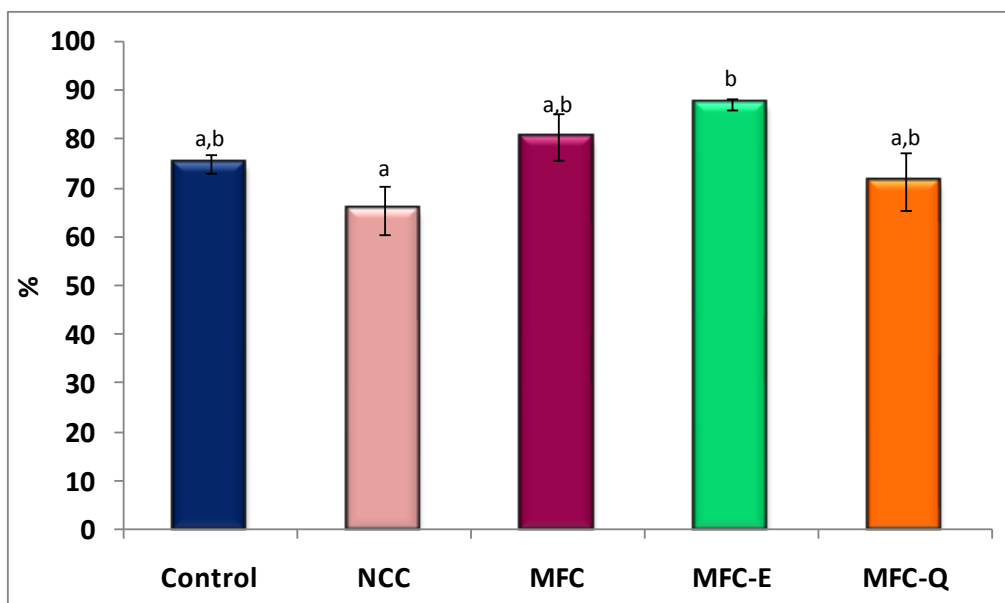


Figura IV.3.10. Eficiencia de encapsulación de las microcápsulas de aceite de pescado preparadas sólo con APS o con el agregado de distintas nanofibras de celulosa (al 2 % con respecto a la cantidad de APS) como material de pared: nanocristales (NCC), con celulosa microfibrilada (MFC), con celulosa microfibrilada previamente modificada por tratamiento enzimático (MFC-E) y con celulosa microfibrilada previamente modificada por tratamiento químico (MFC-Q). Los valores informados para cada encapsulado son promedios \pm desviación estándar ($n = 2$). Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), según la prueba de Tukey.

Por otro lado, todos los encapsulados presentaron valores de a_w entre 0,19 y 0,29 (**Tabla IV.3.5**). Las microcápsulas nanocompuestas presentaron menores valores de a_w que las microcápsulas proteicas y, a su vez, las microcápsulas con el agregado de MFC o MFC-Q presentan un valor más bajo que las NCC o MFC-E. Estos resultados sugieren que la presencia de nanofibras disminuye la disponibilidad del agua que podría participar en diferentes reacciones de deterioro. En particular, se podría esperar que las microcápsulas en estudio presenten baja susceptibilidad a las reacciones de oxidación lipídica.

En la **Figura IV.3.11**, se muestra la morfología de las microcápsulas mediante imágenes de SEM con un aumento de 500x. Todas las muestras presentaron partículas con forma esférica, lisas y con abolladuras en la superficie (indentaciones). En todos los casos se ve además un rango amplio de tamaños de partículas. A partir del análisis de estas imágenes, se pudo obtener el diámetro aparente promedio de estas partículas (**Tabla IV.3.6**) y se observó que no hubo diferencias significativas entre las muestras. Como se explicó anteriormente, el tamaño final que adquieren las microcápsulas se debe principalmente al tamaño de la boquilla utilizada en el proceso de secado *spray*. Todas presentaron un valor de alrededor de 22 μm .

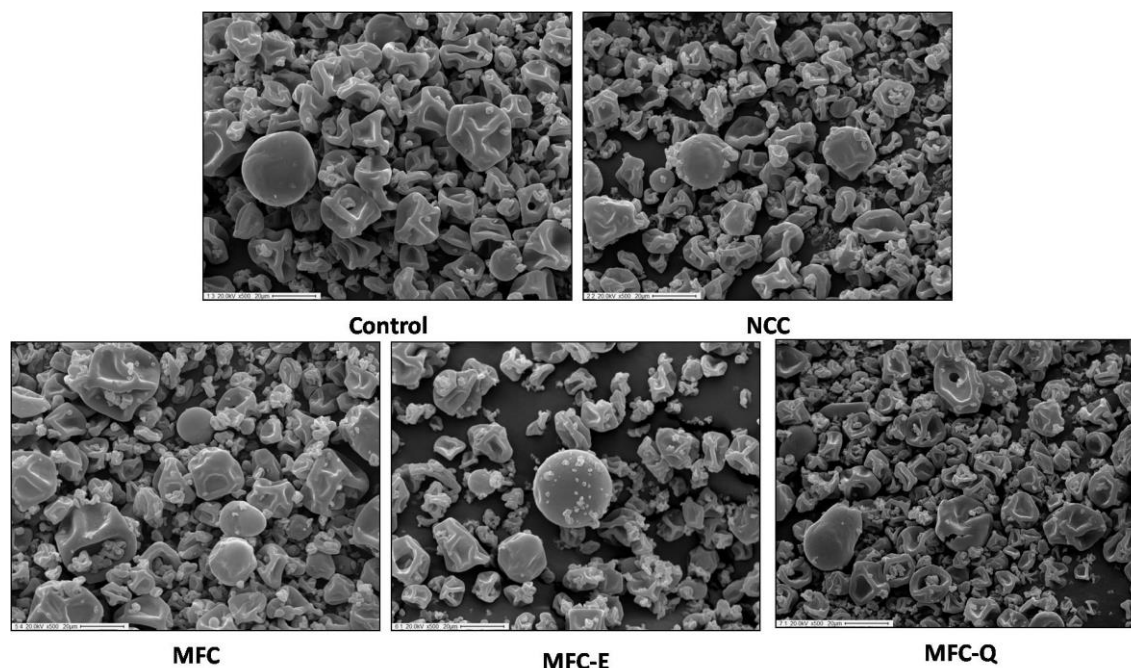


Figura IV.3.11. Micrografías electrónicas de barrido (SEM) de la morfología externa (topografía) de las microcápsulas de aceite de pescado preparadas sólo con **APS** o con el agregado de distintas nanofibras de celulosa (al 2 % con respecto a la cantidad de **APS**) como material de pared: nanocristales (**NCC**), con celulosa microfibrilada (**MFC**), con celulosa microfibrilada previamente modificada por tratamiento enzimático (**MFC-E**) y con celulosa microfibrilada previamente modificada por tratamiento químico (**MFC-Q**) con un aumento de 500x.

Tabla IV.3.6. Tamaño de las microcápsulas de aceite de pescado preparadas sólo con **APS** o con el agregado de distintas nanofibras de celulosa (al 2 % con respecto a la cantidad de **APS**) como material de pared: nanocristales (**NCC**), con celulosa microfibrilada (**MFC**), con celulosa microfibrilada previamente modificada por tratamiento enzimático (**MFC-E**) y con celulosa microfibrilada previamente modificada por tratamiento químico (**MFC-Q**).

	Tamaño de las microcápsulas (μm)
Control	$24,95 \pm 5,81^a$
NCC	$21,04 \pm 5,45^a$
MFC	$25,53 \pm 8,89^a$
MFC-E	$20,98 \pm 5,75^a$
MFC-Q	$23,40 \pm 6,16^a$

Los valores informados para cada encapsulado son promedios \pm desviación estándar ($n = 15$). Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), según la prueba de Tukey.

En cuanto a la morfología interna de las microcápsulas (**Figura IV.3.12**) no se encontraron diferencias entre los encapsulados proteicos y aquellos con el agregado de las distintas nanofibras. En todos los casos, las microcápsulas resultaron huecas y se encontraron gotas de aceite sobre el material encapsulante.

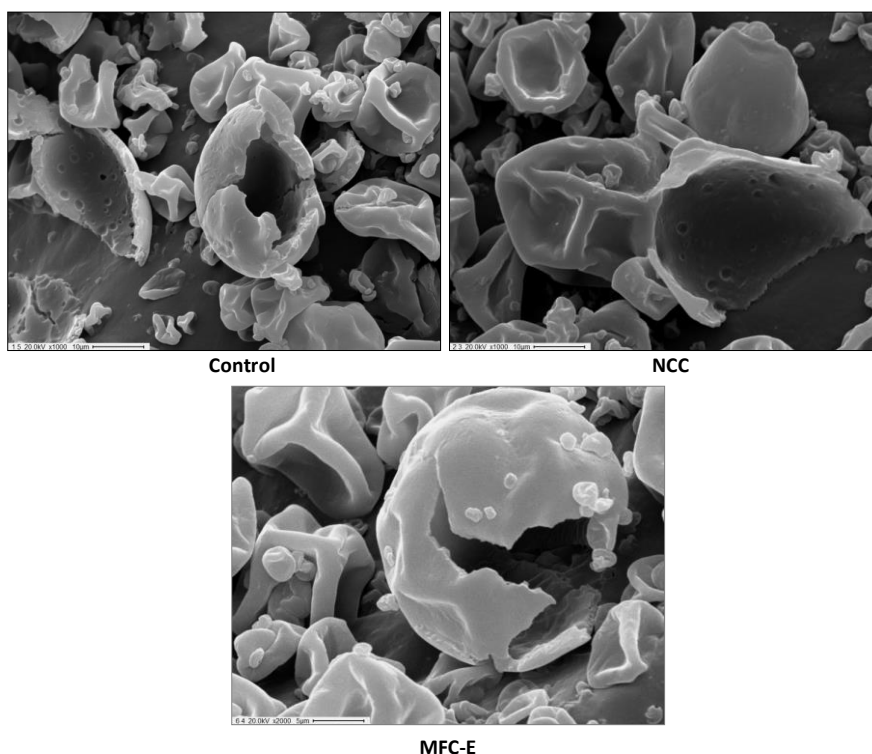


Figura IV.3.12. Micrografías electrónicas de barrido (SEM) de la morfología interna de las morfología externa (topografía) de las microcápsulas de aceite de pescado preparadas sólo con **APS** o con el agregado de distintas nanofibras de celulosa (al 2 % con respecto a la cantidad de **APS**) como material de pared: nanocristales (**NCC**), y con celulosa microfibrilada previamente modificada por tratamiento enzimático (**MFC-E**), con un aumento de 500x.

La ubicación de cada componente en las microcápsulas se detectó por CLSM utilizando las sondas fluorescentes mencionadas en la sección anterior, donde se observó que tanto las proteínas de soja como el aceite de pescado se marcaron satisfactoriamente con el colorante correspondiente. Al tener en cuenta que las características morfológicas de las distintas celulosas microfibriladas eran parecidas, se realizó modo de ejemplo la microscopía de barrido de laser confocal sobre aquellas microcápsulas con el agregado de las MFC-Q, las cuales se tiñeron con el colorante calcoflúor (**Figura IV.3.13**). Se pueden observar ciertas estructuras alargadas y ramificadas, las cuales podrían corresponder a agregados de estas nanofibras.

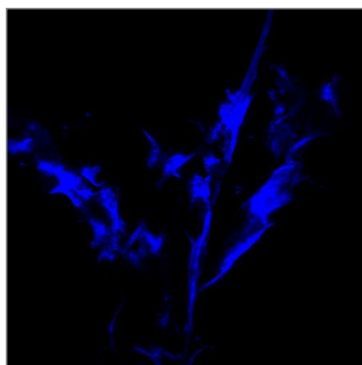


Figura IV.3.13. Micrografías de barrido láser confocal (CLSM) de la suspensión de las nanofibras de celulosa microfibriladas modificadas con TEMPO (**MFC-Q**). Aumento de 20x.

Al observar los encapsulados con el agregado de 2% de MFC-Q (**Figura IV.3.14**), estas nanofibras co-localizaron con las proteínas y el aceite, encontrándose los tres componentes en el mismo sitio. Esto confirmaría que estas microcápsulas son de tipo matriz al igual que las microcápsulas control y las que contenían NCC, descritas anteriormente.

En este caso se pudieron observar huecos centrales en las partículas, al igual que abolladuras, vistas también en las imágenes por SEM, que corresponden al colapso provocado durante el secado *spray* (analizado en el **Capítulo III**).

En la microcápsula ubicada en la parte superior de la Figura, se pueden distinguir pequeños “puntos” de color rojo correspondientes a las gotas de aceite retenidas en la matriz nanocompuesta.

En el caso de estas nanofibras adicionadas el 2%, no se vieron estructuras sobresalientes en toda la superficie analizada, indicando que estaban distribuidas homogéneamente en toda la microcápsula.

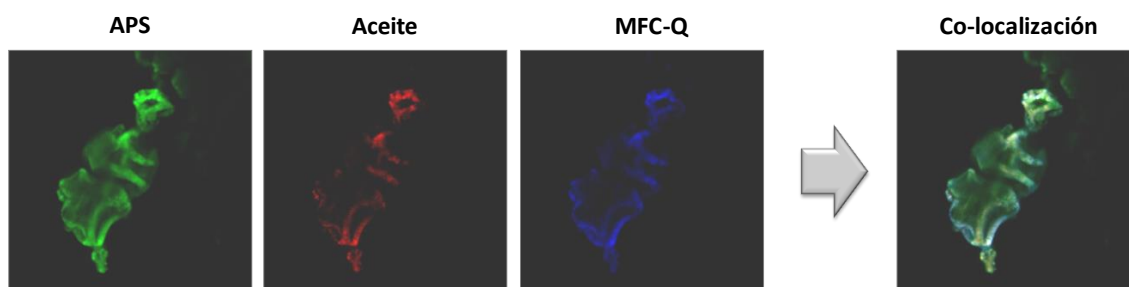


Figura IV.3.14. Micrografías de barrido láser confocal (CLSM) de las microcápsulas de aceite de pescado preparadas con APS y con el agregado de 2% p/p (con respecto a la cantidad de **APS**) de celulosa microfibrilada previamente modificada por tratamiento químico (**MFC-Q**), con un aumento de 20x.

Por último se estudió la estabilidad oxidativa del aceite presente en las microcápsulas. En la **Figura IV.3.15**, se muestra el índice de peróxidos (**A**) y el número de ácido tiobarbitúrico (**B**)

que indican el avance de la oxidación lipídica de las microcápsulas obtenidas. Se puede observar que el tipo de nanofibra incorporada en la formulación afectó la estabilidad del aceite de pescado durante su encapsulación. Las microcápsulas formuladas con **MFC** presentaron mayores valores de IP que los encapsulados proteicos (control), pero similares TBARS. La mayor concentración de hidroperóxidos detectada en sus encapsulados evidencia que los sistemas nanocompuestos con MFC fueron menos efectivos para proteger al aceite de pescado durante su encapsulación que el control. Posiblemente el comportamiento viscoelástico de tipo gel de la emulsión de partida podría interferir en el proceso de secado, produciendo una menor protección del aceite, más allá que la formulación presentó una buena eficiencia de encapsulación. Por otra parte, las microcápsulas con **NCC**, **MFC-E** y **MFC-Q** presentaron menores valores de IP y TBARS que los encapsulados proteicos (control), indicando la mayor eficiencia de estos sistemas nanocompuestos en proteger al aceite durante el proceso de encapsulación. Entre estos, los encapsulados formulados con **MFC-Q** fueron los que presentaron el menor desarrollo de la oxidación lipídica, menores valores de IP (similares a los de los encapsulados con NCC) y de TBARS (45% y 70% menos respectivamente con respecto al control). Estos encapsulados también fueron los que presentaron el mayor porcentaje de sólidos recuperados y el menor contenido de a_w , (menores a 0,2). Esas nanofibras, por su parte, tenían como características su carga negativa, su longitud extensa y un diámetro más pequeño en comparación con las otras nanofibras (**Capítulo IV.1**), lo que probablemente provoque un impedimento estérico y electrostático que produzca esta protección contra los factores externos de oxidación.

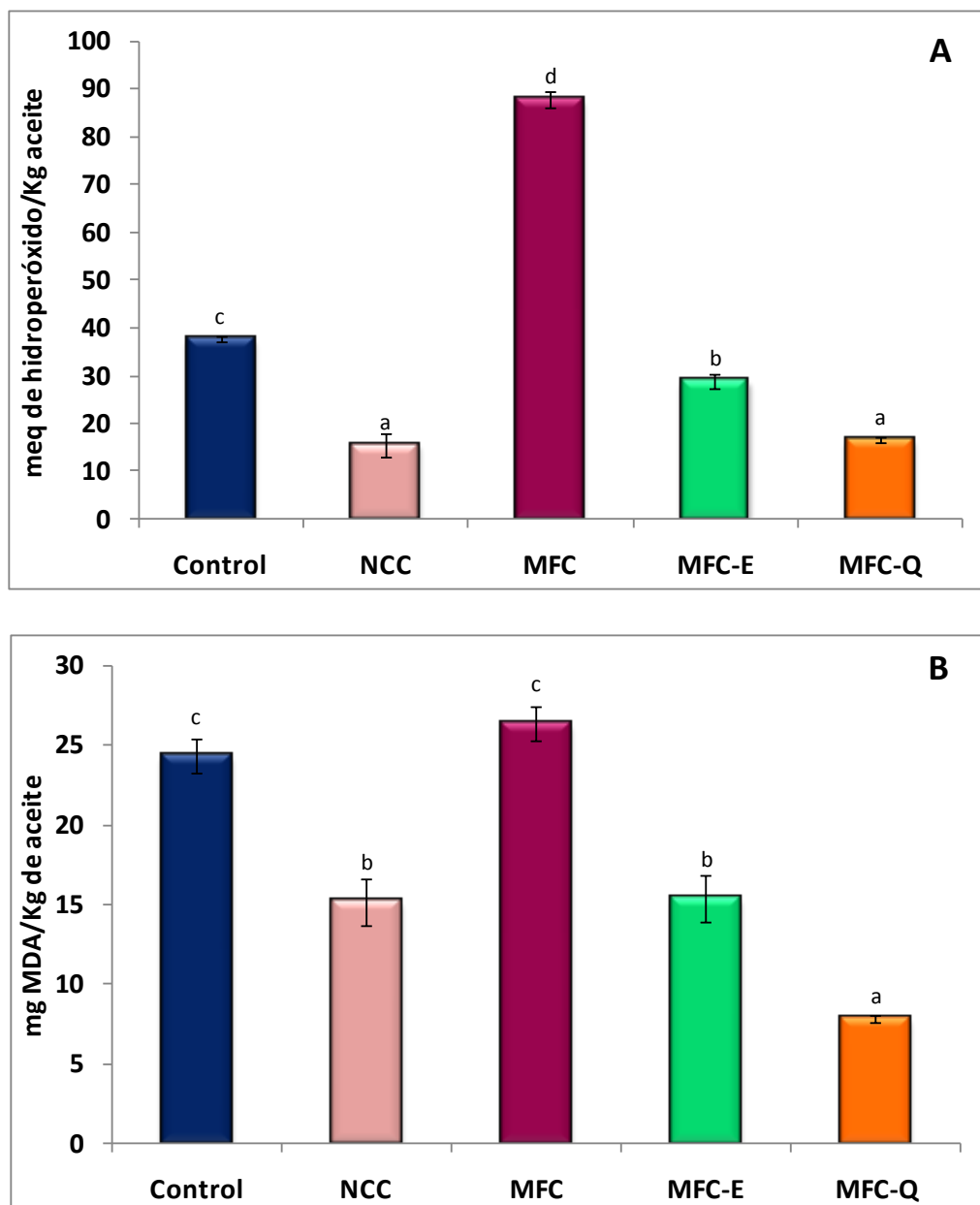


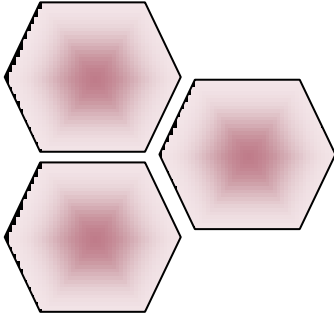
Figura IV.3.15. Índice de peróxido (A) y TBARS (B) de las microcápsulas de aceite de pescado preparadas sólo con APS o con el agregado de distintas nanofibras de celulosa (al 2 % con respecto a la cantidad de APS) como material de pared: nanocristales (NCC), con celulosa microfibrilada (MFC), con celulosa microfibrilada previamente modificada por tratamiento enzimático (MFC-E) y con celulosa microfibrilada previamente modificada por tratamiento químico (MFC-Q).

Los valores informados para cada encapsulado son promedios \pm desviación estándar ($n = 2$). Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$), según la prueba de Tukey.

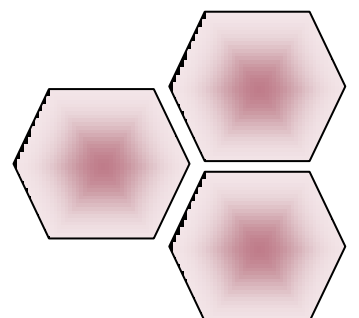
IV.3.5. Conclusiones

✓ Todas las emulsiones estabilizadas por sistemas nanocompuestos pudieron deshidratarse por secado *spray*, produciendo microcápsulas del tipo matriz, huecas adentro, con elevadas eficiencias de encapsulación de aceite de pescado.

- ✓ La co-localización de todos los componentes en las microcápsulas dio indicios de una buena adhesión y compactación de las nanofibras en la matriz proteica.
- ✓ El tipo de nanofibra de celulosa agregada condicionó la estabilidad oxidativa del aceite. La mayor protección del aceite de pescado se logró con los NCC y las MFC-Q, cuyas emulsiones presentaban mayor estabilidad.
- ✓ El incremento en la concentración de NCC hasta un 4% provocó un aumento el rendimiento en sólidos y mejoró la protección del aceite frente a la oxidación. Estos resultados podrían atribuirse a las características propias de dicha nanofibra, en particular a su elevada carga superficial y grado de cristalinidad.
- ✓ La mayor protección del aceite en las microcápsulas formuladas con 2% de MFC-Q podría atribuirse al impedimento estérico y electrostático generado por su elevada relación de aspecto (L/d) y carga negativa.
- ✓ Todas las microcápsulas desarrolladas presentaron bajos valores de a_w (0,2-0,3) indicando que estos sistemas tendrían cierta estabilidad frente a la oxidación lipídica durante su almacenamiento.
- ✓ Los microencapsulados nanocompuestos desarrollados, con mejores propiedades que los obtenidos sólo con proteínas, resultan promisorios para ser utilizados como vehículos de aceite de pescado en la formulación de alimentos funcionales.



IV.4. PELÍCULAS NANOCOMPUESTAS BIOACTIVAS EN BASE A ACEITE DE PESCADO, PROTEÍNAS DE SOJA Y NANOFIBRAS DE CELULOSA



IV.4. PELICULAS NANOCOMPUESTAS BIOACTIVAS EN BASE A ACEITE DE PESCADO, PROTEÍNAS DE SOJA Y NANOFIBRAS DE CELULOSA

IV.4.1. Introducción

El envasado de alimentos desempeña un papel fundamental en la industria alimentaria moderna, ya que es uno de los principales procesos para preservar la calidad de los productos alimenticios desde su fabricación hasta su consumo (Ghaani y col., 2016). Tradicionalmente, el envase cumplía cuatro funciones básicas (Biji y col., 2015): **i)** proteger el producto del deterioro causado por condiciones ambientales externas, como contaminación química y microbiana, vapor de agua, oxígeno, calor, luz, olores, insectos, suciedad, partículas de polvo, etc.; **ii)** actuar como recipientes para productos alimenticios, con diferentes formas y tamaños para optimizar la eficiencia logística; **iii)** establecer una comunicación con el consumidor a través de textos escritos (como la lista de ingredientes, contenido nutricional, instrucciones de preparación, etc.) y logotipos de marcas; y **iv)** adaptarse al estilo de vida de los consumidores, por ejemplo, ahorrar tiempo (apto para contener alimentos listos para el consumo) o facilitar su manejo (que sea fácil de abrir o de volver a sellar). Estas funciones se cumplen minimizando la interacción de los envases con los alimentos, actuando como una barrera pasiva (Robertson, 2012; Yam y Lee, 2012; Vanderroost y col., 2014; Lee y col., 2015; Fuertes y col., 2016).

Actualmente, las nuevas tecnologías de envasado de alimentos van más allá, intentando responder a las demandas de la sociedad. Los cambios en la producción de alimentos, las prácticas de venta y los estilos de vida de los consumidores junto con la preocupación por el cuidado ambiental (especialmente debido a la contaminación ambiental asociada con el uso masivo de plásticos no degradables derivados del petróleo); y los avances en nuevas áreas de conocimiento, como la nanotecnología y la biotecnología, actúan como fuerzas impulsoras para el desarrollo de nuevos y mejores envases (Dainelli y col., 2008, Biji y col., 2015, Lagaron y col., 2015; López- Rubio, 2011).

Por lo tanto, se espera que el envase ayude a prolongar la vida útil de los alimentos, manteniendo y supervisando su inocuidad y calidad, mejorando su impacto en la salud de los consumidores y cuidando el medio ambiente. Por lo tanto, conceptos tales como "envases biodegradables y/o comestibles", "envases inteligentes", "envases activos", "envases inteligentes" y "envases bioactivos" rigen actualmente la investigación y el desarrollo de envases de alimentos.

El uso de polímeros naturales en lugar de los convencionales derivados del petróleo para fabricar materiales biodegradables es una tendencia creciente en el mercado. Las proteínas poseen la capacidad de formar películas y recubrimientos comestibles y/o biodegradables, que se presentan como una alternativa interesante a los polímeros sintéticos, especialmente para aquellas aplicaciones de vida corta o cuando la degradación rápida se presenta como una ventaja, como es el caso de los envases de alimentos. En las últimas décadas han sido estudiadas numerosas proteínas de origen animal (caseínas, proteínas del suero de leche, albúminas, colágeno, gelatina, queratina y proteínas miofibrilares) y vegetal (soja, gluten de trigo, zeínas, de girasol, algodón, amaranto, maní, arroz, arveja, sorgo, pistacho y lupino, etc.) por su capacidad de formar bioplásticos (Dangaran y col., 2009; Denavi y col., 2009; Zhang y Mittal, 2010; Pérez-Gago, 2012; Salgado y col., 2013; Echeverría y col., 2014). De todas ellas, las que se extraen de subproductos agroindustriales son las que presentan mayor atractivo en el desarrollo de materiales biodegradables. Las proteínas de soja, entre otras, cumplen con estas premisas y presentan buena procesabilidad por lo que se encuentran entre los biopolímeros más interesantes para ser utilizados con esta finalidad (Song y col., 2011).

Las películas proteicas de soja presentan excelentes propiedades de barrera al oxígeno, a los lípidos y a los aromas; propiedades mecánicas moderadas, pero comúnmente muestran alta permeabilidad al vapor de agua. Estos materiales además pueden actuar como vehículos de compuestos bioactivos, lo que permite ampliar la funcionalidad de los materiales, entrando en el campo de los envases activos y bioactivos (**Sección I**).

Actualmente, la adición de nanorefuerzos en formulaciones de biopolímeros ha demostrado ser una de las formas más interesantes para mejorar las propiedades mecánicas y de barrera de los materiales resultantes. También se han desarrollado diferentes estrategias en la preparación de materiales nanoestructurados para mejorar la estabilidad, dispersabilidad, disponibilidad y transporte de compuestos bioactivos. Se ha observado que la presencia de los nanorefuerzos modifica las propiedades de transferencia a través de las matrices proteicas (Tunc y col., 2007), favoreciendo el desarrollo de sistemas de liberación controlada, ya que dependiendo del activo se podrían realizar tratamientos prolongados o liberaciones iniciales, como sea necesario en cada caso. Varios autores evidenciaron efectos moduladores en la liberación de diferentes principios activos con el agregado de nanoarcillas o nanofibras a películas proteicas (Mascheroni y col., 2010; Giménez y col., 2012; Echeverría, 2012; Ortiz y col., 2018).

Las nanopartículas preparadas a partir de polisacáridos, como nanocristales de almidón y quitosano, y nanofibras de celulosa, son los nanorefuerzos más prometedores para ser

incorporados en películas y recubrimientos biodegradables y/o comestibles (Condes y col., 2016), y aún más para el desarrollo de envases bioactivos. En el caso de estos envases, podrían facilitar la liberación de los principios activos previo a su consumo, además de poder proteger a los principios activos durante la cocción de los alimentos (en el caso de que este procesamiento fuera necesario) y durante su paso por el tracto gastrointestinal para mejorar su biodisponibilidad.

En un trabajo previo, Ortiz y col. (2018) desarrollaron películas activas nanocompuestas en base a proteínas de soja, celulosa microfibrilada (obtenida a partir de fibras de formio) y aceite esencial de clavo de olor (AEC). En los materiales nanocompuestos resultantes, las nanofibras lograron un marcado efecto de refuerzo que se visualizó a través de la mejora de las propiedades mecánicas y de barrera que podrían atribuirse a la buena compatibilidad entre las MFC y las proteínas de soja y a la posible formación de una red de nanofibras incrustada en la matriz de proteínas para formulaciones que contenían hasta 8% de MFC. A su vez, la presencia de las MFC pareció favorecer la liberación de los compuestos activos del AEC ya que el aumento de la concentración de las MFC en las películas mostró un aumento en las propiedades antioxidantes y en la actividad antimicrobiana de las películas contra diferentes bacterias de importancia en las enfermedades transmitidas por los alimentos. Estas actividades más altas podrían correlacionarse con una mejor distribución del AEC en presencia de las MFC, a través de una mayor cantidad de gotas más pequeñas, que probablemente podrían estar relacionadas con el propio efecto emulsionante de las nanofibras (Costa y col., 2018; Carrillo y col., 2015; Fujisawa y col., 2017).

Resultados similares encontramos en estudios paralelos a esta tesis, donde trabajamos con películas activas nanocompuestas formuladas con proteínas de soja, aceite esencial de clavo y nanocristales de celulosa. Los materiales resultantes fueron evaluados como envases de filetes de salmón rosado durante su almacenamiento refrigerado y lograron retrasar significativamente la autooxidación lipídica y levemente el desarrollo microbiano en el producto (Martin, 2018).

La mayoría de los sistemas nanocompuestos estudiados para el transporte de compuestos bioactivos se han destinado para el desarrollo de envases activos, destinados a preservar alimentos. Hasta donde sabemos, no se han utilizado sistemas proteicos nanocompuestos en el desarrollo de envases bioactivos que hayan vehiculizado aceite de pescado.

IV.4.2. Objetivos

El objetivo del presente capítulo fue desarrollar películas nanocompuestas en base a proteínas de soja y nanofibras de celulosa capaces de transportar aceite de pescado, con el fin de obtener un envase bioactivo, analizando el efecto del tipo de fibra y del procesamiento sobre la funcionalidad de los materiales resultantes y la estabilidad del aceite.

IV.4.3. Materiales y métodos

IV.4.3.1. Materiales

Se utilizó un aislado proteico de soja comercial (**APS**, SUPRO 500E, DuPont N & H, Brasil) como fuente de proteínas; glicerol (Anedra, Argentina) como plastificante; suspensiones de nanocristales de celulosa (**NCC**), celulosa microfibrilada (**MFC**), celulosa microfibrilada modificada previamente por tratamiento enzimático (**MFC-E**) y celulosa microfibrilada modificada previamente por tratamiento químico (**MFC-Q**) obtenidas como se describió en el **Capítulo IV.1.** como nanorefuerzos; y aceite de pescado (OmegaSur, Mar del Plata, Argentina) como compuesto bioactivo.

El resto de los reactivos utilizados para llevar a cabo las experiencias que se describen a continuación fueron todos de calidad analítica.

IV.4.3.2. Preparación de las películas

Los materiales estudiados en este capítulo fueron procesados por casting. Inicialmente se prepararon las dispersiones filmogénicas, dispersando en agua destilada el aislado proteico de soja (**APS**, 5%p/v), glicerol (25 g/100 g de APS), y las distintas nanofibras (**NCC**, **MFC**, **MFC-E** o **MFC-Q**, 8 g/100 g de APS). El pH de las dispersiones se mantuvo naturalmente en aproximadamente 7, y el sistema se mantuvo en agitación magnética con un equipo DRAGONLAB OS20-Pro (DRAGONLAB, China) durante 24 h para facilitar la dispersión de las fibras y la eliminación de posibles burbujas. Posteriormente, se adicionó el aceite de pescado (25 g/100 g de APS) a la solución filmogénica y se lo emulsificó siguiendo el procedimiento descrito en el **Capítulo III**: primero con un mezclador de sonda de alto cizallamiento Ultra-Turrax T-25 (IKA®, WerkeGmbH& Co. KG, Alemania) a 13500 rpm durante 90 s y luego con homogeneizador ultrasónico (SONICS Vibra Cell VCX 750, Vibra CellSonicsMaterials Inc., EE. UU.) a 50% de potencia, 350 W, por 5 minutos, con pulsos de 30 s). Las dispersiones/emulsiones filmogénicas se dejaron en agitación magnética otros 20 minutos hasta su moldeo. Finalmente, 10 ml de las mismas se dispusieron sobre cajas de Petri de

poliestireno (64 cm²) y se secaron en estufa con convección forzada (Yamato, DKN600, Estados Unidos) a 60°C durante 3 horas. Las películas obtenidas se acondicionaron a 20°C y 58% HR (en un desecador conteniendo una solución saturada de NaBr) durante 72 horas previo a su caracterización.

Con el fin de analizar el efecto que causa el agregado de nanofibras, el tipo de fibras, el agregado del aceite de pescado y el procesamiento sobre la funcionalidad de los materiales resultantes, se trabajó con tres series de películas formadas por una película proteica y cuatro nanocompuestas aditivadas con los cuatro tipos de nanofibras NCC, MFC, MFC-E y MFC-Q:

- i) Procesadas por casting a partir de las dispersiones filmogénicas acuosas,
- ii) Procesadas por casting a partir de las dispersiones filmogénicas acuosas homogeneizadas por UT+US,
- iii) Procesadas por casting a partir de los sistemas emulsionados con aceite de pescado homogeneizadas por UT+US

La **Tabla IV.4.1** resume las formulaciones y el procesamiento de las películas estudiadas, y presenta la nomenclatura que se utilizará para diferenciarlas.

Tabla IV.4.1. Nomenclatura de las películas estudiadas indicando formulaciones y condiciones de procesamiento estudiadas

Serie	Nomenclatura	APS (%p/v)	Glicerol (g/100 g APS)	Tipo de nanofibra	% Nanofibra	Aceite de pescado (g/100 g APS)	UT+US
1	S	5	25	-	-	-	-
	S + NCC	5	25	NCC	8	-	-
	S + MFC	5	25	MFC	8	-	-
	S + MFC-E	5	25	MFC-E	8	-	-
	S + MFC-Q	5	25	MFC-Q	8	-	-
2	S	5	25	-	-	-	✓
	S + NCC	5	25	NCC	8	-	✓
	S + MFC	5	25	MFC	8	-	✓
	S + MFC-E	5	25	MFC-E	8	-	✓
	S + MFC-Q	5	25	MFC-Q	8	-	✓
3	S	5	25	-	-	25	✓
	S + NCC	5	25	NCC	8	25	✓
	S + MFC	5	25	MFC	8	25	✓
	S + MFC-E	5	25	MFC-E	8	25	✓
	S + MFC-Q	5	25	MFC-Q	8	25	✓

IV.4.3.3. Caracterización de las películas

Espesor

El espesor de las películas se determinó con un medidor digital SC 117 (Schwyz, Suiza) para materiales no conductores ni ferrosos (**Figura IV.4.1**). Las medidas se realizaron en cinco posiciones a lo largo de las probetas rectangulares utilizadas para medir las propiedades mecánicas en tracción y opacidad; y en el centro y en ocho posiciones alrededor del perímetro de las muestras utilizadas para determinar la permeabilidad al vapor de agua (WVP). Posteriormente las propiedades mencionadas se calcularon utilizando el espesor promedio para cada réplica de película.



Figura IV.4.1. Medidor de espesor digital empleado para realizar las determinaciones.

Color

El color de las películas fue determinado utilizando un colorímetro Minolta Chroma meter (CR 400, Minolta Chroma Co., Osaka, Japón) como se describió en la **sección III.3.5.4.** Se realizaron nueve determinaciones para cada muestra.

Opacidad

Las películas fueron colocadas sobre una placa de 96 pocillos (cubriendo cuidadosamente cada pocillo seleccionado para la medida) y se midió la absorbancia desde 200 a 800 nm en un lector de placas Sinergy HT (BioTeK, Estados Unidos). Para calcular la opacidad (UA/mm), el valor de absorbancia obtenido a 500 nm se dividió por el espesor de la película expresado en mm (Ortiz y col., 2018). Las medidas se realizaron por quintuplicado.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Se analizó la microestructura de la sección transversal y de la superficie de las películas por SEM. Para las observaciones de las secciones transversales, las películas fueron criofracturadas

por inmersión en nitrógeno líquido. Las muestras se colocaron sobre tacos de bronce con una cinta adhesiva doble faz, se metalizaron con oro en un Sputter Coater S150B (Edwards, Inglaterra) y se observaron en un microscopio electrónico de barrido SEM 505 (Philips, Holanda), con un voltaje de aceleración de 20 kV.

Contenido de agua

Las películas se cortaron en pequeños trozos que se colocaron en cajas de Petri de vidrio previamente pesadas. Las muestras se pesaron antes y después de ser secadas en estufa a 105°C durante 24 horas según la norma ASTM D644-99 (2004). Los resultados se expresaron como porcentaje de pérdida de peso en relación al peso inicial. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Solubilidad en agua

La solubilidad en agua de las películas se determinó de acuerdo con el método propuesto por Gontard y col. (1994). Tres probetas circulares de película (2 cm de diámetro) se colocaron en un Erlenmeyer con 100 ml de agua destilada y se llevaron a agitación por 24 h a 100 rpm (modelo TT400, Ferca, Argentina) a temperatura ambiente. Luego de ese tiempo se filtraron con papel de filtro Whatman 1 previamente seco, utilizando un Buchner conectado a un kitasato y a una bomba de vacío (Dosivac, DVP-2A, Argentina). La fracción insoluble (retenida en el papel de filtro) se secó en una estufa de aire forzado (Yamato, DKN600, Estados Unidos) a 105°C durante 24 h y se pesó.

La solubilidad se calculó según la **Ecuación IV.4.1**.

$$S (\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100$$

Ecuación IV.4.1

Donde: S es la solubilidad de la película (%), m_i y m_f son los pesos de la muestra de película antes y después de la solubilización, secados en estufa 24 h a 105 °C, respectivamente.

Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

Las determinaciones se realizaron siguiendo el método ASTM E96-00 (2004) con las modificaciones propuestas por Gennadios y col. (1994). Las películas se colocaron en una celda

de permeación con una abertura circular de $0,00185 \text{ m}^2$. La determinación se realizó a 20°C , colocando las celdas en un desecador. La fuerza impulsora a través de la película, expresada como el gradiente de presión parcial de vapor, fue de $1754,45 \text{ Pa}$. Para mantener dicha fuerza impulsora se utilizó sílica anhidra ($\text{HRc}=0$) en la celda de permeación, y solución saturada de NaCl ($\text{HRd}=0,75$ a 20°C) en el desecador (**Figura IV.4.2.A**). La permeación de vapor de agua a través de la película fue determinada por la ganancia de peso en la celda de permeación. Luego de alcanzar el estado estacionario (aproximadamente 1 hora), se realizaron aproximadamente 8 determinaciones del peso de la celda de permeación, al cabo de al menos 6 horas. Los cambios en el peso de la celda fueron registrados y graficados en función del tiempo. Se determinó la pendiente del gráfico obtenido por medio de regresión lineal (Microsoft Office Excel 2007), siendo ésta la velocidad de permeación del vapor de agua ($\Delta m/\Delta t$) (**Figura IV.4.2.B**). La permeabilidad al vapor de agua se calculó según la ecuación IV.4.2.:

$$\text{WVP} = [(\Delta m/\Delta t) \times d] / [P_{\text{vH}_2\text{O}} \times (\text{HR}_d - \text{HR}_c) \times A] \quad \text{Ecuación IV.4.2}$$

Donde: WVP: permeabilidad al vapor de agua ($\text{g}_{\text{H}_2\text{O}} \text{ Pa}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-1}$); $\Delta m/\Delta t$: velocidad de permeación del vapor de agua ($\text{g}_{\text{H}_2\text{O}} \text{ s}^{-1}$); d : espesor de la película (m); $P_{\text{vH}_2\text{O}}$: presión de vapor de agua a 20°C ($=2339,27 \text{ Pa}$); HR_c : Humedad relativa en la celda de permeación; HR_d : Humedad relativa en el desecador; A : área de permeación (m^2).

Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

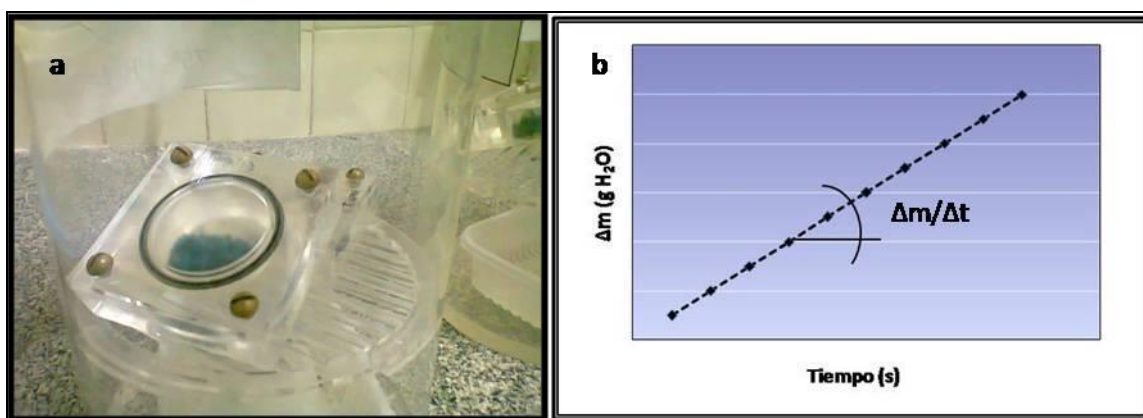


Figura IV.4.2. A) Película proteica colocada en la celda de permeación (con sílica en su interior, $\text{HRc}=0$) dentro de una cámara con humedad relativa controlada (con solución saturada de NaCl , $\text{HRd}=0,75$). **B)** Representación de la velocidad de permeación del vapor de agua a través de la película proteica ($\Delta m/\Delta t$).

Ángulo de contacto

Mediante la medida del ángulo de contacto se evaluó la hidrofobicidad superficial de las películas a temperatura ambiente con un goniómetro Ramé-Hart Modelo 550 (Ramé-Hart Instrument Co., Estados Unidos). Una gota de agua desmineralizada (5 μ L) se colocó sobre la superficie de la película con una jeringa y se fotografió al instante. Se utilizó un analizador de imágenes (DROPImage Software) para medir el ángulo formado entre la base, compuesta por la superficie de la película (cara opaca) en contacto con la gota de agua, y la tangente a la gota de agua. Cada valor de ángulo de contacto considerado corresponde al valor medio de los ángulos de contacto iniciales medidos en ambos lados de la gota. Los resultados informados son los valores promedio de ocho mediciones para cada formulación.

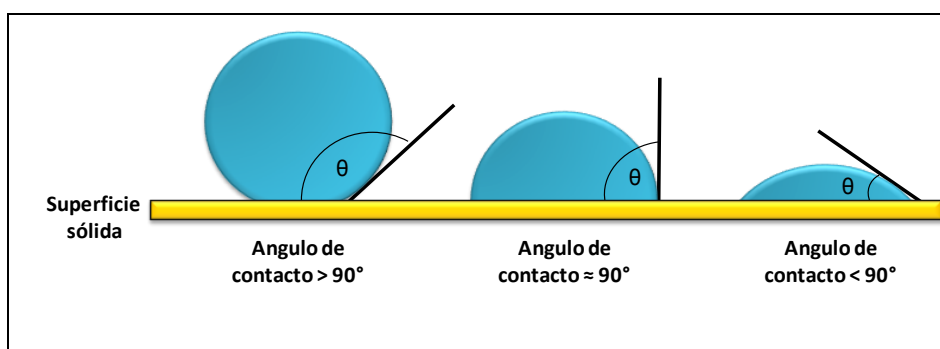


Figura IV.4.3. Esquema de gotas de líquido colocadas sobre la superficie de un sólido y la medida de sus ángulos de contacto.

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se determinaron en ensayos de tracción, de acuerdo a la norma ASTM D882-91 (1991), empleando un texturómetro (TA.XT2i, Stable Micro Systems, Inglaterra), equipado con un sistema de mordazas para tensión A/TG y acoplado a un software específico (TexturExpert V.1.22, Stable Micro Systems, Inglaterra) (**Figura IV.4.4.A**).

Se ensayaron probetas rectangulares de 70 mm de largo por 6 mm de ancho, utilizando una separación inicial de mordazas de 50 mm y una velocidad de separación de las mismas de 0,5 mm/s. Se registró la curva fuerza vs. distancia, que se transformó en tensión (σ = fuerza/área transversal de la película) vs. elongación (ϵ = porcentaje de elongación respecto de la separación de mordazas inicial) (**Figura IV.4.4.B**). De las mismas se obtuvo la resistencia a la tracción al momento de rotura (σ_r), la elongación a la rotura (ϵ_r) y el módulo de Young (E) como la pendiente de la recta tangente a la curva tensión-deformación en su sección lineal inicial (a bajas deformaciones).

Se realizaron seis determinaciones por cada película evaluada, empleando al menos dos películas por formulación.

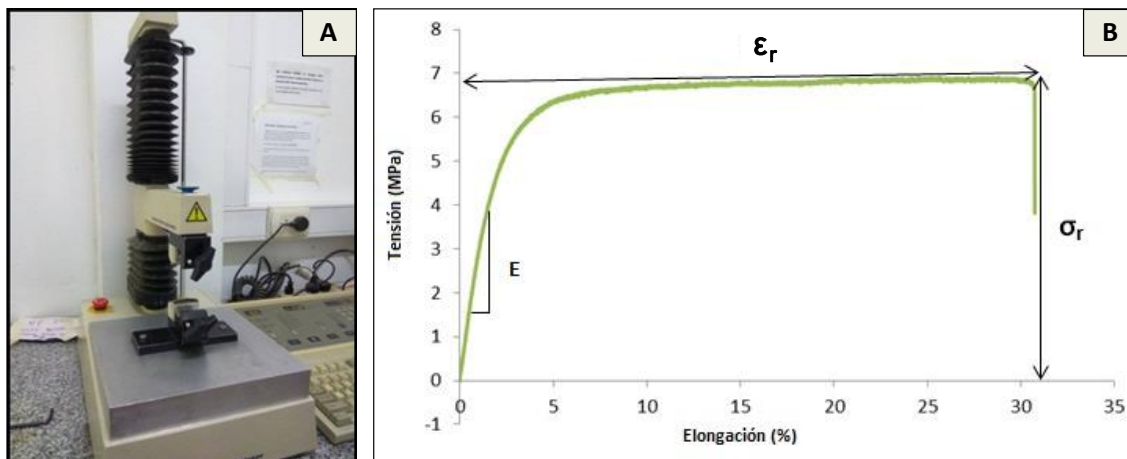


Figura IV.4.4. A) Equipo empleado para determinar las propiedades mecánicas en ensayos de tracción. **B)** Curva tensión vs. elongación para una película proteica de soja, en donde se pueden observar los parámetros evaluados: módulo de Young (E), resistencia máxima a la tracción al momento de rotura (σ_r), y la elongación a la rotura (ϵ_r).

Solubilidad diferencial

Se determinó la solubilidad diferencial de las proteínas presentes en las películas sin aceite según el método descrito por Mauri y col. (2006), con algunas modificaciones menores. Pequeñas porciones de las películas (50 mg) fueron pesadas y colocadas en tubos conteniendo 1 ml de solvente. Se estudió la solubilidad en agua y cinco sistemas *buffer* diferentes: i) BF: *buffer* fosfato 0,1M, ii) BF+SDS: BF con dodecil sulfato de sodio 0,1% p/v (SDS, Anedra, Argentina), iii) BF+U: BF con urea 6M (Riedel-deHaën, Alemania), iv) BF+SDS+U: BF con dodecil sulfato de sodio 0,1% p/v y urea 6M, v) BF+SDS+U+ β Me: BFSU con mercaptoetanol 2,5% v/v (Sigma-Aldrich, Alemania), todos a pH 7,5. Los tubos fueron agitados a temperatura ambiente durante 24 horas y posteriormente las suspensiones fueron centrifugadas a 9000xg durante 20 minutos. La concentración de proteínas en los sobrenadantes fue determinada utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976), realizando curvas de calibración con seroalbúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos) en agua y en cada uno de los sistemas *buffer* analizados, y expresada como porcentaje (%p/p) respecto a la cantidad total de proteína presente en cada película. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa

Se analizó el perfil de ácidos grasos que presentaba el aceite presente en las películas con el fin de evaluar el efecto del procesamiento sobre la calidad del aceite y la efectividad de las películas para actuar como sistema de transporte de estos compuestos bioactivos. Para esto, el

aceite se extrajo de las películas, se derivatizó para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos y se determinó la composición de los mismos de acuerdo al método descrito por Guardianelli y col. (2019) con algunas modificaciones. Brevemente, el aceite de pescado se extrajo de las películas de la serie **S₃**, (**Tabla IV.4.1**) según el método de Folch, usando una mezcla de cloroformo:metanol en relación 2:1. Los aceites de pescado extraídos y el puro (usado como control) fueron derivatizados con una solución de HCl en metanol (5% v/v) en tubos tapados herméticamente, que se agitaron vigorosamente y se colocaron en baño María durante 10 minutos. Después de enfriar, se agregaron 2 ml de agua destilada milli-Q y 1 ml de hexano. Los tubos se taparon, se agitaron y se centrifugaron (1333 xg, 15 min) hasta que ambas capas quedaron transparentes. La capa superior con los ésteres metílicos se filtró (0,45 µm). Finalmente, los ésteres metílicos (1 µL) se inyectaron en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, SA) con detectores de ionización de llama. Se utilizó una columna capilar DB 23 (30 m de largo; 0,25mm de diámetro x 250 µm espesor). El programa de temperatura del horno fue: isoterma 1 min a 50 °C, de 50 a 175 °C a 25 °C/min, de 175 a 230 °C a 4 °C/min, isoterma a 230 °C durante 15 min. Se usó un caudal de helio de 25 ml/min y las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron a 250 y 280 °C, respectivamente.

Se utilizó un estándar externo marca Supelco 37 component FAME MIX, el cual contiene ésteres metílicos de 37 ácidos grasos. A partir del cromatograma obtenido, se determinaron los picos correspondientes a cada ácido graso, y se calcularon las áreas de cada uno para lograr obtener el perfil porcentual de ácidos grasos de cada muestra.

IV.4.3.4. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valor medio \pm desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medias fueron evaluadas con el Test de Tukey para comparación de pares, con un nivel de significación $\alpha=0,05$. Para ello se empleó el programa Statgraphics Centurion, versión 16.1.18 (Statgraphics, Estados Unidos).

IV.4.4. Resultados y discusión

Teniendo en cuenta resultados previos (Ortiz y col., 2018, y Martín, 2018) en los que se estudió el agregado de distintas concentraciones de celulosa microfibrilada preparadas a partir de fibras de formio (con características diferentes a las MFC utilizadas en este trabajo que pueden atribuirse a modificaciones en el procesamiento utilizado para su obtención) y de

nanocristales de celulosa sintetizados a partir de una MCC mas económica, se optó trabajar con una concentración fija de nanorefuerzos igual a 8 % (g/ 100 g de APS) y comparar el efecto que las distintas nanofibras estudiadas en esta tesis provocan inicialmente en las películas proteicas de soja, y posteriormente cuando además vehiculizan aceite de pescado en su formulación.

IV.4.4.1. Efecto del agregado de nanofibras de celulosa sobre la funcionalidad de las películas proteicas de soja.

En esta sección se muestra como influyó el agregado de las diferentes nanofibras sobre las propiedades fisicoquímicas de las películas proteicas de soja. Para poder obtener estas películas, las dispersiones filmogénicas acuosas se homogeneizaron solamente mediante agitación magnética y las formulaciones analizadas corresponden a la Serie 1 de la **Tabla IV.4.1**

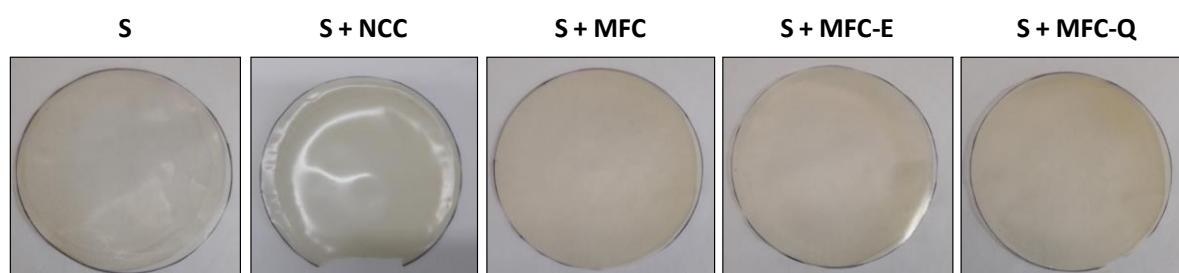


Figura IV.4.5. Películas proteicas de soja (**S**), y películas nanocompuestas con el agregado de nanofibras de celulosa al 8% p/p con respecto a la cantidad de **APS**: con nanocristales (**S + NCC**), con celulosa microfibrilada (**S + MFC**), con celulosa microfibrilada y tratamiento enzimático (**S + MFC-E**) y con celulosa microfibrilada y tratamiento químico (**S + MFC-Q**).

Todas las películas proteicas y por el agregado de las distintas nanofibras de celulosa NCC, MFC, MFC-E y MFC-Q, obtenidas por *casting* resultaron delgadas, continuas, homogéneas y flexibles. En la **Figura IV.4.5** se muestra su apariencia y en la **Tabla IV.4.2** sus espesores, los parámetros de color que las caracterizan y su opacidad.

La película proteica presentó un espesor de aproximadamente 46 μm , que se incrementó con la presencia de las nanofibras en todos los films nanocompuestos (**Tabla IV.4.2**). En el caso de las películas con el agregado de **NCC** y **MFC-E** el aumento de espesor fue de $\approx 20\%$ mientras que para las películas con **MFC** y **MFC-Q** fue de un $\approx 40\%$, probablemente debido a que la mayor longitud de estas fibras que podría conducir la formación de una matriz menos

compacta. Wang y col. (2017) compararon los espesores de películas de alginato con nanocristales de celulosa y con celulosa microfibrilada y observaron resultados similares atribuyendo la diferencia a que la estructura de la MFC era más voluminosa que los NCC. Los porcentajes de aumento en el espesor de los materiales se encuentra en el rango de otros encontrados en bibliografía, y la variabilidad puede atribuirse a las características propias de las fibras, a su afinidad con la matriz, y al procesamiento utilizado para obtener los materiales. A modo de ejemplo, al trabajar con películas de proteínas de soja, González y col. (2019) informaron un aumento del espesor del $\approx 30\%$ al agregar MFC obtenidas de la cascara del poroto de soja; Yu y col. (2018) observaron un aumento del $\approx 12\%$ con el agregado de nanocristales de celulosa extraídos de pulpa de madera, y Ortiz y col. (2018) reportaron un aumento de $\approx 10\%$ al agregar 8% de celulosa microfibrilada obtenidas de las hojas de formio.

Las películas proteicas de soja presentaron una coloración amarillenta clara tenue, propia del aislado proteico (Denavi y col., 2009; Echeverría y col., 2014), caracterizada por altos valores de L^* y b^* . En general todas las películas de origen vegetal presentan cierta coloración que debe atribuirse a los compuestos y pigmentos que son co-extraídos con las proteínas al obtener el aislado (Condes y col., 2013; Salgado y col., 2010). Las películas nanocompuestas presentaron una apariencia similar a las de soja. El agregado de **NCC** y **MFC-E** a la formulación no afectó significativamente la coloración, mostrando valores de L^* , b^* y ΔE^* estadísticamente similares a los de las películas proteicas, y variaciones muy pequeñas en a^* , que en el caso de las películas con NCC tendieron a disminuir la coloración. En este sentido, Condes y col. (2018) tampoco observaron variación en la coloración al agregar nanocristales de almidón a películas de proteínas de amaranto. En las películas formuladas con **MFC** y **MFC-Q**, en el que las fibras tenían mayor longitud, la coloración amarillenta se intensificó significativamente (b^*) y los parámetros L^* y a^* se modificaron levemente de manera diferencial, conduciendo a un cambio de coloración significativo (ΔE^*). Algunos de los cambios observados, pueden correlacionarse con la coloración de las dispersiones de nanofibras, analizada en el **Capítulo IV.1**. Resultados similares fueron reportados por Ortiz y col. (2018) al incorporar MFC a películas proteicas de soja.

Tabla IV.4.2. Espesor, parámetros de color L^* , a^* , b^* , variación de color (ΔE^*), y opacidad de las películas proteicas de soja (**S**), y películas nanocompuestas con el agregado de nanofibras de celulosa al 8% p/p con respecto a la cantidad de **APS**: con nanocristales (**S + NCC**), con celulosa microfibrilada (**S + MFC**), con celulosa microfibrilada y tratamiento enzimático (**S + MFC-E**) y con celulosa microfibrilada y tratamiento químico (**S + MFC-Q**).

S_1	Espesor (μm)	L^*	a^*	b^*	ΔE^*	Opacidad (UA/mm)
S	46,71 \pm 4,34 ^a	90,82 \pm 1,12 ^{b,c}	-1,01 \pm 0,07 ^b	11,69 \pm 2,31 ^a	9,93 \pm 2,55 ^a	3,54 \pm 0,15 ^b
S + NCC	55,01 \pm 4,98 ^b	91,09 \pm 0,66 ^c	-0,66 \pm 0,07 ^c	12,02 \pm 1,72 ^a	10,09 \pm 1,82 ^a	4,48 \pm 0,22 ^c
S + MFC	66,32 \pm 6,53 ^c	89,49 \pm 0,83 ^{a,b}	-1,47 \pm 0,07 ^a	17,13 \pm 2,31 ^c	15,46 \pm 2,42 ^b	3,00 \pm 0,06 ^a
S + MFC-E	54,36 \pm 5,44 ^b	91,11 \pm 0,73 ^c	-1,37 \pm 0,12 ^a	12,23 \pm 2,42 ^{a,b}	10,33 \pm 2,51 ^a	3,48 \pm 0,10 ^b
S + MFC-Q	63,94 \pm 4,12 ^c	88,74 \pm 1,60 ^a	-0,98 \pm 0,04 ^b	15,21 \pm 2,62 ^{b,c}	14,00 \pm 3,04 ^b	3,68 \pm 0,21 ^b

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

La naturaleza de las nanofibras afectó de manera distinta a la opacidad de los materiales resultantes, que se presenta en la **Tabla IV.4.2**. El agregado de **MFC-E** y **MFC-Q** no modificó la opacidad de las películas, evidenciando que estas nanofibras se encontraban bien dispersas en la matriz proteica y que existía una buena afinidad entre ambas. Petersson y Oksman (2006) sugirieron que el grado de exfoliación y la fracción de volumen de los nanorefuerzos tienen una gran influencia en la transmisión de luz visible y UV. Informaron que la ausencia de reducción en la cantidad de luz que se transmite a través de la película nanocompuesta es una indicación de que el nanorefuerzo está totalmente exfoliado y que como consecuencia, no debería haber una gran diferencia en la cantidad de luz que se transmite a través de las películas nanocompuestas en comparación con la matriz polimérica. Resultados similares se observaron en el trabajo publicado por Yu y col., 2017 en películas de quitosano y almidón con MFC extraídas de pulpa de madera blanqueada hasta una concentración de 40%.

Por su parte, las películas con **MFC** provocaron una disminución de la opacidad de las películas. Posiblemente, el buen grado de intercalación-dispersión alcanzado por las MFC y su afinidad con la matriz proteica, podrían incluso conducir a arreglos moleculares en la matriz proteica que otorgaría mayor transparencia a las películas nanocompuestas resultantes. Efectos similares fueron informados por Echeverría y col. (2014) al observar una disminución en la opacidad de películas nanocompuestas basadas en proteínas de soja y montmorillonita (MMT) respecto de las películas proteicas control, y sugiriendo la posibilidad de que la presencia de las nanopartículas en la dispersión filmogénica podría contribuir a mejorar la dispersión de la proteína, conduciendo luego a la formación de una matriz más transparente. Estos resultados dan indicios de que la presencia de estas fibras podría estar influyendo en el entrecruzamiento proteico que estabiliza a la película.

Finalmente, las películas nanocompuestas con **NCC** resultaron ser mas opacas que las películas proteicas. Los NCC dispersados en la matriz estarían obstruyen el paso de la luz posiblemente por la acumulación o formación de agregados de nanocristales de celulosa o por la mayor cristalinidad de estas partículas. El aumento de la opacidad con el agregado de nanocristales de celulosa ya ha sido verificado por varios autores. Abdollahi y col. (2013) para películas de alginato con NCC provenientes de MCC, Sukyai y col. (2018) con películas de proteínas de suero de leche y NCC obtenidos a partir del bagazo de caña de azúcar y Reddy y Rhim (2014) en películas de agar con NCC obtenidos de las ramillas del árbol de moras (*Broussonetia kazinoki* Siebold). Muhamad y col. (2015) observó que la opacidad de las películas de almidón aumentó significativamente con el agregado de concentraciones de nanocristales superiores al 6%, y lo atribuyó a la inhomogenea dispersión de los mismos, dado que al analizar la morfología de las películas observó que ocurría cierta aglomeración de los nanorefuerzos al aumentar su concentración, y sostuvo que estas aglomeraciones podían causar dispersión de luz y finalmente aumentar la opacidad de las películas. La cristalinidad de los nanocristales también podría afectar la opacidad debido a que se puede generar dispersión de la luz en la interfase entre las regiones amorfas y cristalinas de estas nanopartículas (Menges y col., 2002). Teniendo en cuenta la gran superficie que se genera con el nanorefuerzo el efecto de estas superficies podría llegar a ser importante.

En las **Figuras IV.4.6.A y B** se observan los cortes transversales y las superficies de las películas desarrolladas observadas por SEM. El corte de la película proteica resultó liso y denso, mientras que en la superficie se observa cierta porosidad distribuida por toda la película, en concordancia con observaciones previas de estas películas (Salgado y col., 2017). Con el agregado de las nanofibras aparecen ciertas irregularidades bien adheridas a la matriz, que sigue siendo densa y una disminución de la porosidad superficial. Esas irregularidades podrían atribuirse a la presencia de agregados de nanofibras, ya que por sus diámetros nanométricos no sería posible observar esta dimensión de las fibras por SEM (debido a que la resolución es baja) (Krishnamachari y col., 2011). Tanto en las imágenes superficiales como en el corte trasversal se observa que estos agregados se encuentran dispersos y adheridos a la matriz proteica. En el caso de los **NCC** no se distinguen tan fácilmente como en el caso de las **MFC** posiblemente por su menor tamaño, siendo estas películas bastante similares en apariencia a las películas proteicas. En las películas nanocompuestas con los tres tipos de MFC, algunas de las fibras parecen impregnadas en la matriz proteica, mientras algunas parecieran estar en la superficie. Se observa en ellas la naturaleza fibrosa de estas nanofibras, ya que se

distingue el aspecto de fibras largas. A su vez, en el caso de las películas con MFC-E se pueden percibir que son de menor longitud que las dos restantes. Imágenes y efectos similares a los observados en este trabajo fueron informados por otros autores. Yu y col. (2017) observaron que al aumentar las concentraciones de MFC provenientes de fibras de madera blanqueadas en las películas, se observaban estructuras de fibras agregadas en la superficie las cuales estaban fuertemente incorporadas en la matriz. A medida que se agregaron más MFC, las películas se volvieron más densas y los poros y grietas que aparecían en la película control de almidón-quitosano desaparecieron o se hicieron mucho más pequeños y lo atribuyeron al buen efecto del relleno en la estructura de las películas.

Ilyas y col. (2018) observaron que a medida que aumentaba el porcentaje de NCC en películas de almidón aumentaba la agregación de estas nanofibras, provocando que la superficie se vea menos homogénea al igual que en el corte transversal de estas películas. Zhang y col. (2016) también observaron que al agregar NCC a películas de aislado proteico de soja, la superficie de las películas se volvía mas lisa (las de APS presentaban una superficie mas rugosa), lo que daba indicios de que había una buena dispersión de los NCC en la matriz. Por su parte Pelissari y col. (2017) reportaron que películas de almidón con nanofibras de cáscara de banana obtenidas por combinación de procesos mecánicos e hidrólisis ácida tenían superficies irregulares con imperfecciones y en sus cortes transversales exhibían estructuras poliméricas menos densas y homogéneas con pequeñas grietas, en comparación con la película control. Wang y col. (2018) también coincidieron que agregados superiores al 5% de MFC proveniente de paja de arroz a películas de poli-vinilalcohol producía la aparición de partículas alargadas visibles por las micrografías de SEM impregnadas en la superficie, con una distribución de las fibras más heterogénea. Por su parte González y col. (2019) observaron que con la presencia de MFC en películas de aislado proteico de soja la superficie era más rugosa y lograron identificar la presencia de estas nanofibras.

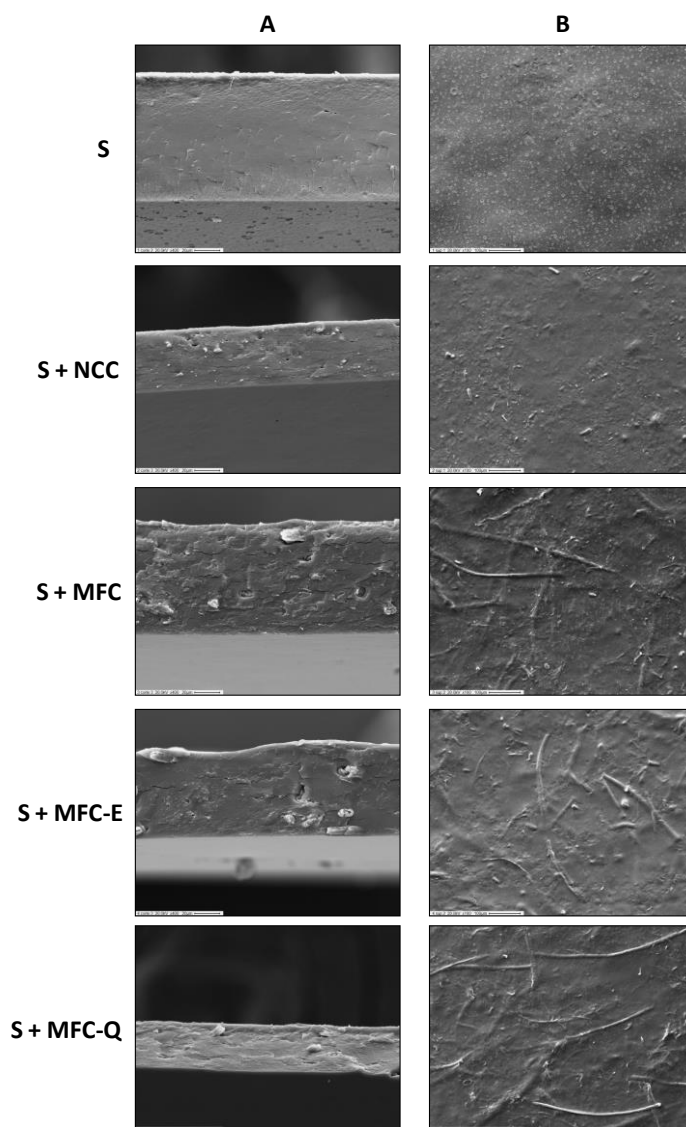


Figura IV.4.6. Microscopía electrónica de barrido de las películas proteicas de soja (**S**), y películas nanocompuestas con el agregado de nanofibras de celulosa al 8% p/p con respecto a la cantidad de **APS**: con nanocristales (**S + NCC**), con celulosa microfibrilada (**S + MFC**), con celulosa microfibrilada y tratamiento enzimático (**S + MFC-E**) y con celulosa microfibrilada y tratamiento químico (**S + MFC-Q**). **A)** Corte transversal con aumento de 400x. **B)** Superficie con aumento de 100x.

La susceptibilidad al agua de las películas proteicas y nanocompuestas se estudió a través de las determinaciones de contenido de agua, solubilidad en agua, permeabilidad al vapor de agua (WVP) y ángulo de contacto (AA). Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla IV.4.3**. Los valores encontrados para las películas proteicas de soja están en el rango de los encontrados previamente en nuestro laboratorio (Ortiz, 2015), y muestran que de la naturaleza química hidrofílica, las proteínas de soja logran formar materiales con características interesante para utilizarlos en distintas aplicaciones. El agregado de las nanofibras pareciera afectar en cierto grado la susceptibilidad al agua de las películas, en

distinta manera dependiendo del tipo de fibra. En particular el efecto de los **NCC** se diferencia del resto de las nanofibras. Su presencia conduce a películas con menor contenido de agua y mayor hidrofobicidad superficial, pero similares WVP y solubilidades en agua. Posiblemente el entrecruzamiento entre los **NCC** y la matriz proteica ocurra a través de puentes de hidrógeno y de interacciones electrostáticas -dada su carga superficial-, dejando menos sitios libres disponibles para retener agua (Zhang y col., 2016; Popescu, 2017; Wu y col., 2013), y afectando la conformación de las proteínas de manera que la superficie de la película se vuelve más hidrofóbica, siendo estas interacciones sensibles a la presencia de agua.

Por su parte, si bien con el agregado de nanofibras preparadas mecánicamente se observa una tendencia general a disminuir el contenido de agua y la solubilidad en agua de las películas y a aumentar WVP y la hidrofiliidad superficial, las diferencias con la película proteica no siempre fueron estadísticamente diferentes. Las tendencias observadas en la solubilidad y el contenido de agua evidencian que existe entrecruzamiento entre las proteínas y la matriz y coinciden con observaciones de otros autores (Abdollahi y col., 2013, Pereda y col., 2014; Qazanfarzadeh y Kadivar, 2016; Rafieian y col., 2014), pero la presencia de las fibras en la superficie o cerca de ella (según lo observado por SEM) podría ser la responsable de la menor hidrofobicidad superficial (menor ángulo de contacto) de estos materiales, especialmente para el caso de las fibras más largas (**MFC** y **MFC-Q**). Resultados similares fueron observados por otros autores al trabajar con celulosas microfibriladas de otras fuentes vegetales, y lo atribuyeron a la hidrofiliidad de las fibras (Pereda y col., 2011; Wang y col., 2017; Otoni y col., 2018). Las características mencionadas anteriormente, aparentemente favorecerían el paso del vapor de agua a través de la película a pesar que el aumento en WVP solo es significativo para las **MFC**. Estos resultados evidencian, que existe cierto entrecruzamiento entre las fibras y la matriz proteica, así como un cambio en el entrecruzamiento proteico que conduce a cambios en las conformaciones de las proteínas que afecta tanto el interior como la superficie de la película. Este entrecruzamiento contribuyó a mantener la integridad y forma original de todas las películas durante el ensayo de solubilidad (24 h sumergidas en agua y sometidas en agitación), solubilizándose solo los componentes que se encontraban más libres dentro de la matriz o enlazados a través de interacciones sensibles al agua (Stuchell y col., 1994, Shabanpour y col., 2018).

La alta cristialinidad de los **NCC** (ICr de $\approx 96\%$) podría ser uno de los factores predominantes que diferencia su comportamiento con el resto de las nanofibras (con $ICr \leq 61\%$), dado que el agua no puede penetrar en las zonas cristalinas de la celulosa pero si en las partes amorfas (Aulin y col., 2009), y en consecuencia, las películas con estas nanopartículas presentan el

menor contenido de agua, la mayor hidrofobicidad superficial, y no muestran aumentos en la WVP (Shabanpour y col.; 2018, Abdollahi, y col., 2013; Cao y col., 2008; Han y col., 2018).

Es significativo, que a pesar del menor contenido de agua que disminuiría el efecto plastificante y la cristalinidad propia de las distintas fibras, estas fibras no provocan un efecto barrera al vapor de agua. Al respecto, González e Igarzabal (2015) y González y col. (2019) también observaron que la WVP de las películas proteicas de soja no se modificaban al agregar 5% de NCC (aunque sí lo hacía con concentraciones cercanas al 20%) o MFC provenientes de las cáscaras y vainas de porotos de soja. Por su parte, Bilbao-Sainz y col. (2011) también observaron (al igual que en este trabajo) que el agregado de MFC provocaba un aumento en la WVP de sus materiales y lo atribuyeron a la posibilidad de que estas fibras largas formaran una red interconectada entre ellas dentro de la película, creando un camino preferencial para el pasaje de vapor de agua. Sin embargo, en otros trabajos se ha publicado que es posible mejorar la WVP con el agregado de nanofibras (Sukyai y col., 2018, Pelissari y col., 2017). Sánchez-García y col. (2008) informaron que la presencia de celulosa cristalina impermeable podría aumentar la tortuosidad en la matriz de la película, lo que llevaría a procesos de difusión más lentos y, por lo tanto, a una menor permeabilidad.

Ortiz y col., 2018 informaron que al adicionar MFC proveniente de fibras de formio y películas con APS, lograban disminuir la permeabilidad al vapor de agua de $14 \text{ a } 9 \times 10^{-11} \text{ g H}_2\text{O s}^{-1}\text{m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. Es evidente que la naturaleza de las fibras y de la matriz polimérica, así como la afinidad entre ambas, junto con las condiciones de procesamiento para obtener las películas determinan el comportamiento final del material.

Tabla IV.4.3. Contenido de agua, solubilidad en agua, ángulo de contacto y permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas proteicas de soja (**S**), y películas nanocompuestas con el agregado de nanofibras de celulosa al 8% p/p con respecto a la cantidad de **APS**: con nanocristales (**S + NCC**), con celulosa microfibrilada (**S + MFC**), con celulosa microfibrilada y tratamiento enzimático (**S + MFC-E**) y con celulosa microfibrilada y tratamiento químico (**S + MFC-Q**).

	Contenido de agua (%)	Solubilidad (%)	Angulo de contacto (°)	WVP ($10^{-11} - \text{g H}_2\text{O s}^{-1}\text{m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$)
S	19,74± 1,74 ^d	41,27± 3,90 ^{a,b}	46,61 ± 1,84 ^b	6,55 ± 0,28 ^a
S + NCC	13,98± 0,09 ^a	43,72± 3,04 ^b	52,60± 2,13 ^d	7,47 ± 1,01 ^{a,b}
S + MFC	18,29 ± 0,43 ^{c,d}	35,78± 1,64 ^{a,b}	40,45 ± 2,98 ^a	10,35 ± 1,23 ^b
S + MFC-E	16,91 ± 0,26 ^{b,c}	35,26± 1,64 ^{a,b}	50,44 ± 5,92 ^{b,c}	8,30 ± 0,27 ^{a,b}
S + MFC-Q	15,66± 0,44 ^{a,b}	34,40 ± 2,85 ^a	46,22 ± 3,49 ^b	9,26 ± 0,32 ^{a,b}

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Las propiedades mecánicas de las películas proteicas de soja con las distintas nanofibras fueron evaluadas en ensayos de tracción y los resultados se muestran en la **Figura IV.4.7**. Las películas proteicas de soja presentaron propiedades mecánicas moderadas (tensión de 4,22 MPa, elongación de 44,35 %, y módulo de Young de 1,39 MPa), similares a las descritas por Echeverría y col. (2014). El agregado de las nanofibras provocó un importante efecto refuerzo a estas películas que se reflejó en un aumento significativo del módulo de Young (mayor a 150%) y de la resistencia a la tracción (por encima de 100%) en detrimento de la elongación a la rotura ($\approx 70\%$ menor) de las películas y que puede atribuirse a las fuertes interacciones interfaciales entre las cadenas peptídicas y las nanofibras. El efecto más significativo se observó con los **NCC** y **MFC-Q**, que lograron incrementar el valor del Módulo de Young en un $\approx 250\%$ y la resistencia a la tracción en un 100 y 200% respectivamente, favorecido por la mayor área de contacto expuesta por estas nanofibras dado por sus diámetros menores y su superficie funcionalizada con grupos sulfatos en el caso de los **NCC** y carboxilatos en el caso de los **MFC-Q**. En particular, la carga superficial también favorecería la dispersión de las nanofibras en la matriz, contribuyendo a mejorar las propiedades mecánicas. Estas características parecieran además conducir a matrices más densas y lisas, observadas por SEM (**Figura IV.4.6**). El refuerzo de los NCC también se ha atribuido a la capacidad de estos para formar una red continua tridimensional estabilizada por puentes de hidrógeno por encima de un umbral de percolación que provoca cierta rigidez en el nanocompuesto (Siqueira y col., 2009; Dufresne; 2018). En la bibliografía se ha reportado la mejora en el comportamiento mecánico a través del agregado de nanofibras de celulosa a distintas matrices poliméricas. En cuanto a su efecto sobre películas proteicas, Martin y col. (2018) y Sukyai y col. (2018) observaron que el agregado de NCC en concentraciones similares a las de este trabajo ($\approx 8\%$) a películas de APS y suero de leche mejoraba significativamente la resistencia a la tracción y el módulo de Young, atribuyendo el efecto observado a la buena dispersión de las fibras en la matriz proteica y a la capacidad de que las fibras interaccionen a través de puentes de hidrógeno con las proteínas (Qazanfarzadeh y Kadivar, 2016).

No existen demasiados trabajos que comparen el efecto de nanofibras diferentes. En este sentido y en concordancia con nuestros resultados, Claro y col., (2018) analizaron las propiedades mecánicas de películas de NCC y MFC provenientes de eucalipto, y notaron que las preparadas con NCC eran más rígidas y presentaban mayores valores de tensión y modulo de Young que las que contenían MFC, y lo atribuyeron a la rigidez propia de los NCC, dada por su mayor cristalinidad. Por su parte Nie y col. (2018) observaron que al utilizar nanofibras provenientes de pulpa blanqueada de eucalipto previamente tratadas con xilanasa (enzima

que cataliza la hidrólisis de la hemicelulosa) y luego homogeneizadas mecánicamente con un microfluidizador mejoraban la resistencia a la tracción y el módulo de Young de las películas de MFC y lo atribuyeron a que el proceso enzimático además favorecía la eliminación de ligninas que bloquean la formación de enlaces de hidrógeno impidiendo la posibilidad de entrecruzamiento entre la MFC y la matriz polimérica (Spence y col., 2010). Y Soni y col. (2018) observaron que MFC tratadas con TEMPO mejoraban las propiedades mecánicas de películas de quitosano debido a su alta relación de aspecto, a la buena resistencia mecánica de las MFC-Q y a la fuerte interacción entre los grupos carboxilato de las MFC-Q y los grupos amino de la molécula de quitosano. Las interacciones entre los componentes de la películas nanocompuestas (matriz y nanorefuerto) podrían restringir la movilidad segmentaria de las cadenas de polímeros en la proximidad del nanorefuerto y la destrucción de la interfaz, provocando un mayor efecto refuerzo (Siqueira y col., 2008).

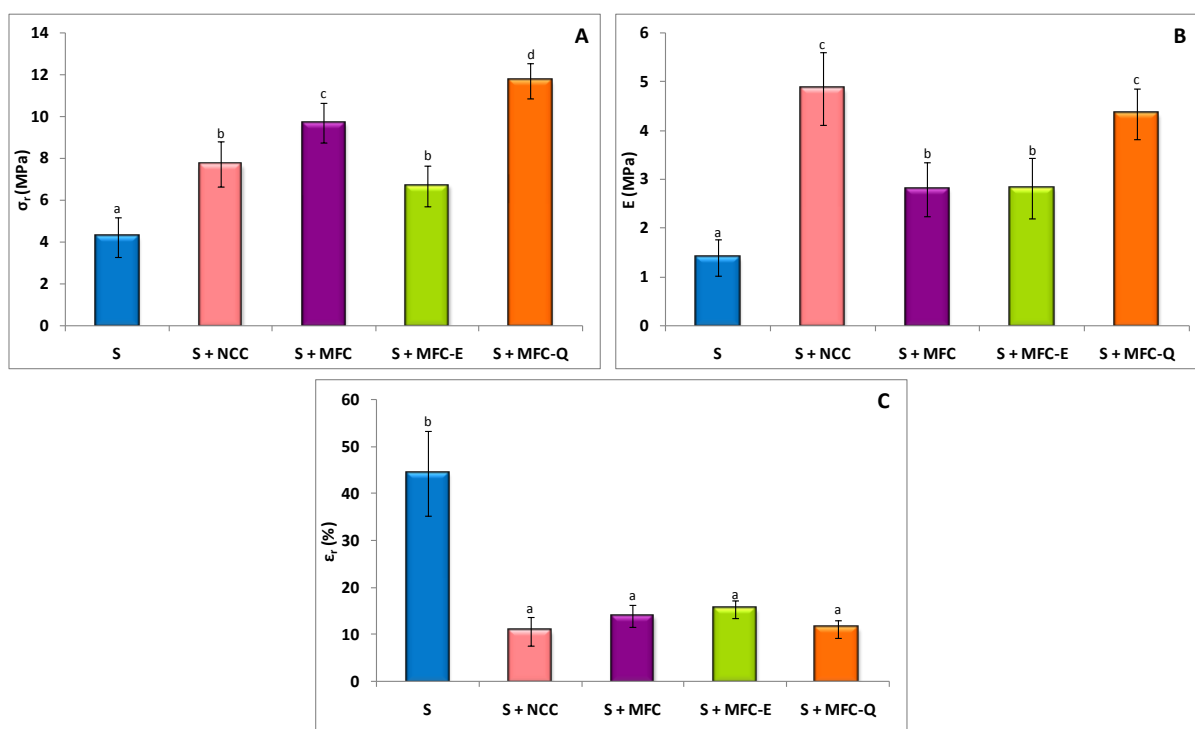


Figura IV.4.7. Propiedades mecánicas de las películas proteicas de soja (S), y películas nanocompuestas con el agregado de nanofibras de celulosa al 8% p/p con respecto a la cantidad de APS: con nanocristales (S + NCC), con celulosa microfibrilada (S + MFC), con celulosa microfibrilada y tratamiento enzimático (S + MFC-E) y con celulosa microfibrilada y tratamiento químico (S + MFC-Q). A) Tensión a la rotura (σ_r), B) Módulo de Young (E) y C) elongación a la rotura (ϵ_r). Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Con el fin de intentar profundizar en el tipo y la proporción de interacciones involucradas en la estabilización de la red proteica, se estudió la solubilidad diferencial de las proteínas en sistemas *buffers* que tienen la capacidad de desestabilizar distintos tipos de interacciones

(Figura IV.4.8). Los sistemas utilizados fueron: i) agua, capaz de disolver los polipéptidos libres que no están unidos fuertemente a la matriz; ii) *buffer* fosfato (BF), que permite evidenciar la importancia de las interacciones electrostáticas; iii) *buffer* fosfato con agregado de SDS (BF+SDS) que desestabiliza las interacciones hidrofóbicas y también interactúa con las proteínas modificando su carga neta superficial; iv) *buffer* fosfato con urea (BF+U), que modifica principalmente la capacidad de formar puentes de hidrógeno; y v) *buffer* fosfato con urea, SDS y 2-Mercaptoetanol $-\beta$ -Me- (BF+SDS+U+ β Me), que desestabiliza interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y enlaces disulfuro. La película control en base a proteína de soja mostró un perfil de solubilidad con una tendencia similar al informado por Salgado y col. (2010 y 2018). Esta película presentó una baja solubilidad proteica en agua ($\approx 10\%$), debida a la solubilización de polipéptidos libres que no están fuertemente ligados a la matriz que forma la película, y que señala el buen entrecruzamiento entre cadenas polipeptídicas que favorece la formación de películas resistentes y con microestructuras densas como las observadas anteriormente. La solubilidad proteica disminuyó levemente en *buffer* fosfato (BF, 0,1 M, pH 7,5) con respecto al agua, posiblemente debido a que el *buffer* favorece las interacciones iónicas entre las proteínas, produciendo un efecto *salting out* y señalando que las fuerzas electrostáticas no jugaban un rol importante en la estabilización de la matriz proteica. Pero aumentó significativamente con el agregado de SDS y urea al buffer, marcando la importancia de las interacciones hidrofóbicas y especialmente los puentes de hidrogeno en la formación de la película, teniendo en cuenta que la solubilidad en el buffer que contenía ambos compuestos (urea y SDS) resultó ser similar a la que contenía solo urea ($\approx 60\%$). Probablemente el efecto de la urea sobre los puentes de hidrogeno modifica la estructura de la proteína favoreciendo el desplegamiento de las cadenas peptídicas, también asociadas por interacciones hidrofóbicas, enmascarando así el efecto del SDS. Por último, la adición de 2- β mercaptoetanol al buffer provocó un aumento de la solubilidad a un 80% aproximadamente, evidenciando la importancia de los enlaces disulfuro en la estabilización de la matriz polimérica, que está favorecida cuando las proteínas se encuentran desnaturalizadas (Darby y col., 1995) y cuya formación se ha relacionado con películas más resistentes y elongables (Pérez-Gago y col., 2001; Choi y col., 2003). El hecho que no se logre solubilizar la totalidad de las proteínas presentes en la película en el último buffer (BF+SDS+U+ β Me) da indicio también de la existencia de que otras interacciones covalentes estarían estabilizando la matriz proteica o que las condiciones establecidas del ensayo no fueron suficientes para desestabilizar la totalidad de los enlaces presentes.

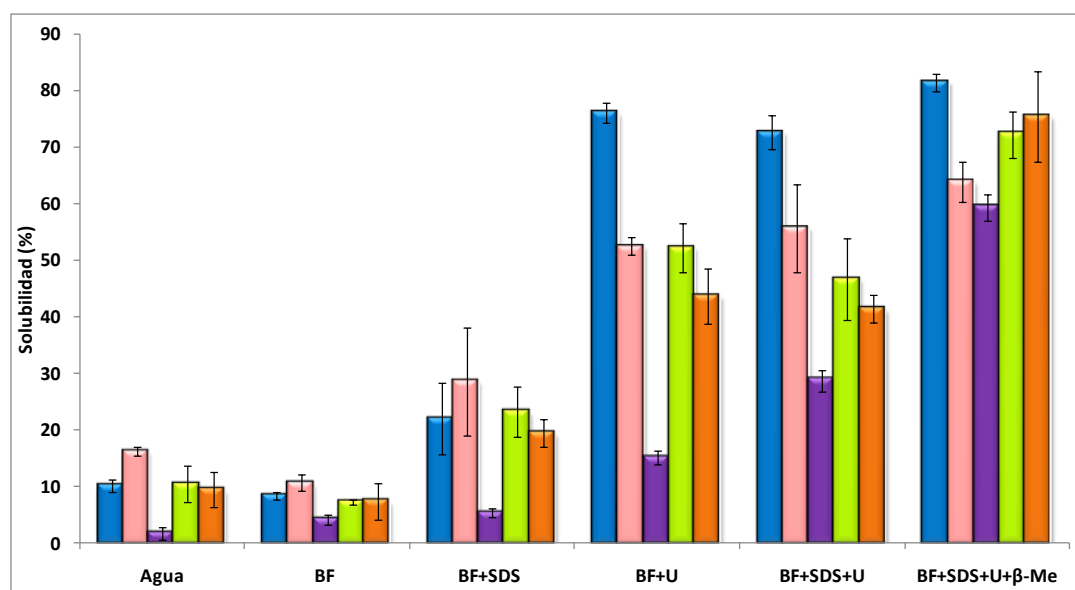


Figura IV.4.8. Solubilidad diferencial de las películas proteicas de soja (**S**, ■), y películas nanocompuestas con el agregado de nanofibras de celulosa al 8% p/p con respecto a la cantidad de **APS**: con nanocristales (**S+NCC**, ■), con celulosa microfibrilada (**S+MFC**, ■), con celulosa microfibrilada y tratamiento enzimático (**S+MFC-E**, ■) y con celulosa microfibrilada y tratamiento químico (**S+MFC-Q**, ■). Se muestran los porcentajes de proteína soluble en medios con distinta actividad química: Agua, Buffer Fosfato de sodio 0,1M (BF), BF con SDS 0,1 % p/v (BF+SDS), BF con urea 6M (BF+U), BF con SDS 0,1 % p/v y urea 6M (BF+SDS+U), BFDU con β- mercaptoetanol 2,5 % v/v (BF+SDS+U+β-Me), todos a pH 7,5.

El agregado de nanofibras a la formulación, modificó los perfiles de solubilidad de las proteínas demostrando que las proteínas interaccionaron con las fibras de manera tal que modificaron su conformación y en consecuencia la forma en que podían interaccionar las cadenas polipeptídicas entre sí al formar la matriz. Respecto a las películas proteicas, aquellas formuladas con nanocristales mostraron por un lado una proporción de polipéptidos libres solubles en agua levemente superior, pero por otro que la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas polipeptídicas se volvió menos importantes probablemente debido a que los grupos funcionales involucrados en esas interacciones estén en este sistema interaccionando con las fibras a través de interacciones que no llegan a romperse en las condiciones del ensayo. La matriz proteica de estas películas también estaría estabilizada con puentes disulfuro, pero la proporción de proteínas no afectada por los sistemas buffers estudiados resultó mayor que en las películas proteicas, evidenciando el entrecruzamiento de las proteínas con las fibras y responsables de la buena adherencia de las fibras con la matriz y del efecto refuerzo alcanzado. Por su parte las nanofibras **MFC-E** y **MFC-Q** mostraron un comportamiento bastante similar a los **NCC**, con excepción que en estos sistemas la cantidad de polipéptidos libres solubles en agua no se modificó respecto de las películas proteicas, y

que en estos el peso de los puentes disulfuro pareciera tener un efecto más importante en la estabilización de las películas. Por último, el efecto más marcado se observó con el agregado de MFC a las películas, disminuyendo la solubilidad de las proteínas considerablemente en todos los *buffers*. La disminución de la solubilidad proteica en agua, con buffer fosfato y con SDS es muy notoria, evidenciando que la presencia de las **MFC** disminuye la disponibilidad de los polipéptidos libres y que las interacciones electroestáticas e hidrofóbicas no estarían provocando una gran estabilización de la película. Sí se observa un efecto de la urea en la solubilidad de las proteínas (menor que para las otras películas), que se incrementa con la mezcla de U+SDS y aún más en presencia de β -Me, sugiriendo que la ruptura de los puentes disulfuros además de favorecer la solubilización debe permitir la acción de los otros reactivos con capacidad de romper las otras interacciones.

IV.4.4.2. Efecto del agregado de aceite de pescado a películas proteicas y nanocompuestas.

Frente a la posibilidad de transportar aceite de pescado en las películas y a partir de los resultados obtenidos previamente, se decidió trabajar con emulsiones formadoras de películas preparadas con una relación proteína:aceite de 4:1 por **UT+US** y con el agregado de 8 % de nanofibras (g/100 g de APS). Teniendo en cuenta que el proceso de homogeneización podría también modificar a las proteínas y a las fibras, y en consecuencia a la funcionalidad de las películas, se analizó también una serie de películas (**Serie 2** de la **Tabla IV.4.1**) procesada por UT+US pero sin el agregado de aceite. Por lo tanto, en esta sección se estudiarán el efecto del procesamiento de homogeneización (**S₂**) y el efecto de la adición de aceite homogeneizado por UT+US (**S₃**) sobre las películas proteicas y nanocompuestas y se las comparó con las películas nanocompuestas estudiadas en la sección anterior.

Todas las películas proteicas y nanocompuestas, con y sin el agregado de aceite de pescado, resultaron continuas, homogéneas y flexibles. Su apariencia se presenta en la **Figura IV.4.10**.

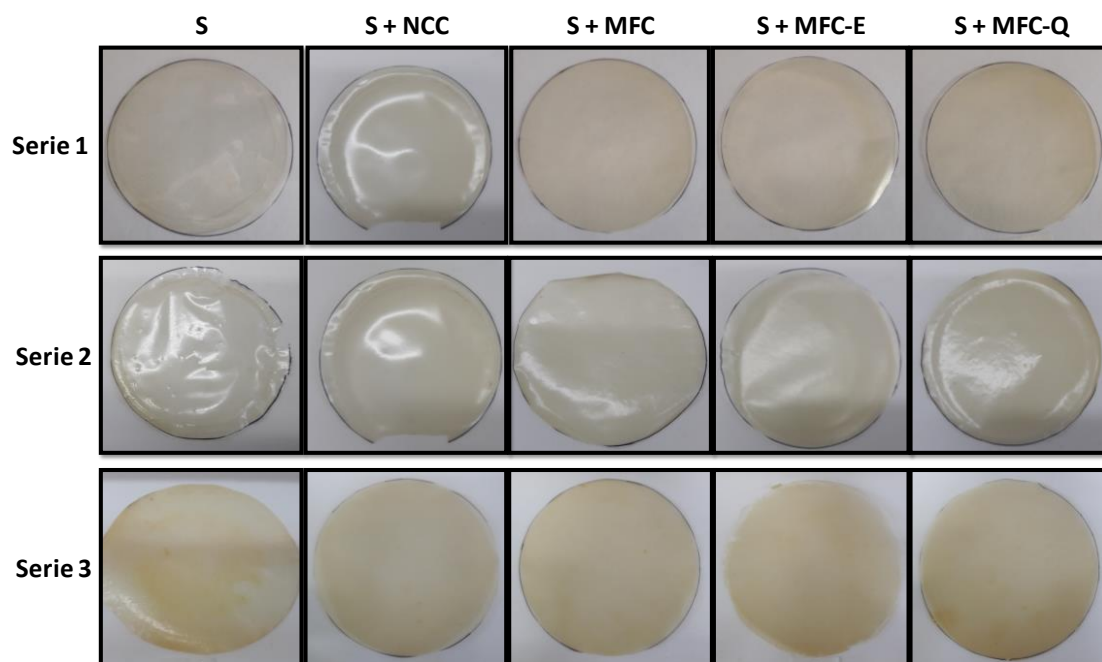


Figura IV.4.10. Películas proteicas de soja (**Control**), y películas nanocompuestas con el agregado de nanofibras de celulosa al 8% p/p con respecto a la cantidad de **APS**: con nanocristales (**S + NCC**), con celulosa microfibrilada (**S + MFC**), con celulosa microfibrilada y tratamiento enzimático (**S + MFC-E**) y con celulosa microfibrilada y tratamiento químico (**S + MFC-Q**).

Serie 1: Procesadas por casting a partir de las dispersiones filmogénicas acuosas, **Serie 2:** procesadas por casting a partir de las dispersiones filmogénicas acuosas homogeneizadas por UT+US y **Serie 3:** Procesadas por casting a partir de los sistemas emulsionados con aceite de pescado homogeneizadas por UT+US.

Luego del almacenamiento, las películas proteicas formuladas con aceite (sin agregado de nanofibras) presentaron una apariencia oleosa al tacto. En la **Figura IV.4.11** se logran observar las pequeñas gotitas de aceite en la superficie. Si bien se ha demostrado que las proteínas de soja tienen buenas propiedades emulsificantes tanto para formar como para estabilizar emulsiones de aceite en agua (O/W) (Ventureira, 2010), estas no estarían siendo suficiente para mantener las gotas de aceite dentro de la matriz proteica luego del proceso de obtención y almacenamiento de las películas. Por otro lado, las películas nanocompuestas resultaron continuas y sin exudado, logrando retener eficientemente la cantidad de aceite agregado.

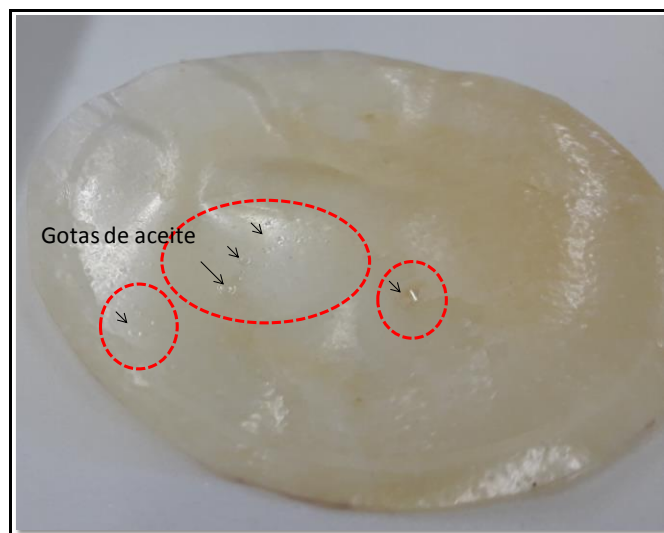


Figura IV.4.11. Película proteica de soja (S) procesada por casting a partir de los sistemas emulsionados con aceite de pescado homogeneizadas por UT+US.

En la **Tabla IV.4.3.** se presentan los parámetros de color CIE $L^*a^*b^*$ y ΔE^* y la opacidad de las películas estudiadas. Las películas proteicas y nanocompuestas homogeneizadas por UT y US sin el agregado de aceite mostraron una apariencia y coloración similar a la de las películas obtenidas sin el proceso de emulsificación, verificándose en este sistema el efecto de las nanofibras en la coloración de las películas resultantes.

Con el agregado de aceite, las películas proteicas y nanocompuestas con nanofibras obtenidas de formio (**MFC**, **MFC-E** y **MFC-Q**) incrementaron su tonalidad, lo que se verificó principalmente en el incremento del parámetro b^* y una disminución de L^* , que condujeron a un aumento en ΔE^* . Posiblemente, el color más blanquecino de la suspensión de **NCC** este enmascarando la coloración propia del aceite, lo que conduce a no observar variaciones significativas en la coloración.

En cuanto a la opacidad de las películas, ésta disminuyó significativamente con el tratamiento de UT+US para todas las películas de la **Serie 2**, no observándose diferencias en esta propiedades entre las películas proteicas y nanocompuestas e indicando en consecuencia que el proceso estaría favoreciendo la disolución de las proteínas así como la dispersión de las nanofibras. En muchos casos, se usan procesos de ultrasonido para mejorar la dispersión de las nanofibras o nanorefuerzos, lo cual puede favorecer a la formación de una matriz nanocompuesta (Echeverría y col., 2014). Por el contrario, la adición del aceite de pescado a las formulaciones aumentó significativamente la opacidad en todas las formulaciones con respecto a la **Serie 2**, siendo ese aumento significativamente mayor para las películas proteicas que para las películas nanocompuestas. Se ha informado que las diferencias en la opacidad de

películas con agregado de lípidos son determinadas por las propiedades ópticas de los mismos (Yang y Paulson, 2000, Ortiz y col., 2018). Se conoce que la presencia de una fase dispersa no miscible promueve el aumento de la opacidad por la diferencia en el índice de refracción de las fases, al tamaño de partícula y a la concentración de la fase dispersa (Monedero y col., 2009; Pérez-Mateos y col., 2009; Pereda y col., 2010).

La mayor transparencia de las películas emulsionadas en presencia de las fibras, puede relacionarse con la superficie oleosa de las películas proteicas, y con la mejor capacidad emulsificante de los sistemas nanocompuestos. Pereda y col. (2014) observaron una disminución en la opacidad de películas de quitosano con nanocristales de celulosa que atribuyeron a la capacidad de las nanofibras para rodear las gotas de aceite y hacerlas más pequeñas, limitando su coalescencia, aumentando su estabilidad y conduciendo a valores de opacidad más bajos. En otras palabras, lo atribuyeron a la formación y estabilización de emulsiones por efecto de Pickering que para el caso de nanofibras de celulosa ya ha sido analizado previamente en capítulos previos y en la bibliografía (Andresen y Stenius, 2007; Kalashnikova y col., 2013; Klemm y col., 2011). Propiedades como la hidrofobicidad, la forma y el tamaño de la partícula pueden tener un efecto en la estabilidad de la emulsión (Kalashnikova y col., 2013), y algunas de estas características podrían estar influyendo en los valores observados para las distintas nanofibras analizadas. En principio, al igual que en la sección anterior, las películas con NCC presentaron mayor opacidad que las formuladas con celulosa microfibriladas, efecto que atribuimos principalmente a la cristalinidad de los nanocristales y a la posibilidad de cierto grado de agregación.

Tabla IV.4.4. Parámetros de color L^* , a^* , b^* , variación de color (ΔE^*) y opacidad de las películas proteicas de soja (S), y películas nanocompuestas con el agregado de nanofibras de celulosa al 8% p/p con respecto a la cantidad de APS: con nanocristales (S + NCC), con celulosa microfibrilada (S + MFC), con celulosa microfibrilada y tratamiento enzimático (S + MFC-E) y con celulosa microfibrilada y tratamiento químico (S + MFC-Q).

Serie 1: Procesadas por casting a partir de las dispersiones filmogénicas acuosas, **Serie 2:** procesadas por casting a partir de las dispersiones filmogénicas acuosas homogeneizadas por UT+US y **Serie 3:** Procesadas por casting a partir de los sistemas emulsionados con aceite de pescado homogeneizadas por UT+US.

		L^*	a^*	b^*	ΔE^*	Opacidad (UA/mm)
Serie 1	S	90,82 ± 1,12 ^{d,e,f}	-1,01 ± 0,07 ^{e,f}	11,69 ± 2,31 ^b	9,93 ± 2,55 ^{a,b}	3,57 ± 0,15 ^e
	S + NCC	91,09 ± 0,66 ^{e,f,g}	-0,66 ± 0,07 ^g	12,02 ± 1,72 ^b	10,09 ± 1,82 ^{a,b}	4,48 ± 0,22 ^f
	S + MFC	89,49 ± 0,83 ^{a,b,c}	-1,47 ± 0,07 ^a	17,13 ± 2,31 ^d	15,46 ± 2,42 ^{e,f,g}	3,00 ± 0,06 ^{c,d}
	S + MFC-E	91,11 ± 0,73 ^{e,f,g}	-1,37 ± 0,17 ^{a,b}	12,23 ± 2,42 ^b	10,33 ± 2,51 ^{a,b,c}	3,48 ± 0,10 ^{d,e}
	S + MFC-Q	88,74 ± 1,60 ^a	-0,98 ± 0,21 ^f	15,21 ± 2,62 ^{c,d}	14,00 ± 3,04 ^{d,e,f}	3,68 ± 0,21 ^e
Serie 2	S	92,25 ± 0,81 ^g	-0,96 ± 0,07 ^f	9,10 ± 0,35 ^a	9,04 ± 0,63 ^a	2,11 ± 0,52 ^{a,b}
	S + NCC	91,43 ± 0,47 ^{f,g}	-0,97 ± 0,05 ^f	11,89 ± 0,72 ^b	11,81 ± 0,85 ^{b,c,d}	2,11 ± 0,11 ^{a,b}
	S + MFC	91,47 ± 0,27 ^{f,g}	-1,31 ± 0,03 ^{b,c}	12,09 ± 0,36 ^b	11,99 ± 0,43 ^{b,c,d}	1,72 ± 0,07 ^a
	S + MFC-E	90,81 ± 0,73 ^{d,e,f}	-1,14 ± 0,12 ^{d,e}	13,09 ± 1,46 ^{b,c}	13,16 ± 1,61 ^{d,e}	1,72 ± 0,06 ^a
	S + MFC-Q	90,53 ± 0,35 ^{c,d,e,f}	-1,22 ± 0,04 ^{c,d}	12,55 ± 0,49 ^b	12,85 ± 0,57 ^{c,d,e}	1,81 ± 0,04 ^a
Serie 3	S	90,63 ± 0,63 ^{c,d,e,f}	-1,20 ± 0,06 ^{c,d}	13,16 ± 1,32 ^{b,c}	13,32 ± 1,43 ^{d,e}	5,42 ± 0,48 ^g
	S + NCC	91,26 ± 0,58 ^{f,g}	-0,96 ± 0,03 ^f	12,25 ± 1,13 ^b	12,20 ± 1,26 ^{b,c,d}	3,77 ± 0,07 ^e
	S + MFC	89,82 ± 0,34 ^{a,b,c,d}	-1,20 ± 0,02 ^{c,d}	16,15 ± 0,64 ^d	16,32 ± 0,72 ^{f,g}	2,97 ± 0,53 ^{c,d}
	S + MFC-E	90,03 ± 0,41 ^{b,c,d,e}	-1,24 ± 0,02 ^{b,c,d}	15,22 ± 0,77 ^{c,d}	15,40 ± 0,87 ^{e,f,g}	3,42 ± 0,15 ^{d,e}
	S + MFC-Q	88,84 ± 0,26 ^{a,b}	-0,97 ± 0,04 ^f	16,43 ± 0,42 ^d	17,01 ± 0,49 ^g	2,67 ± 0,08 ^{b,c}

Letras distintas en la misma columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ según el test de Tukey.

En la **Figura IV.4.12.** se presentan los espesores de las películas estudiadas. Tanto el procesamiento por UT+US como el agregado de aceite provocaron un aumento del espesor de las películas, evidenciando por un lado una menor compactación en las películas, especialmente para el caso de las películas formuladas con celulosas microfibriladas, y por el otro un mayor contenido de sólidos. Por otra parte, para todas las series, se observó que la presencia de las fibras provocaba un aumento en el espesor, siendo este efecto superior para las fibras microfibriladas, de mayor longitud.

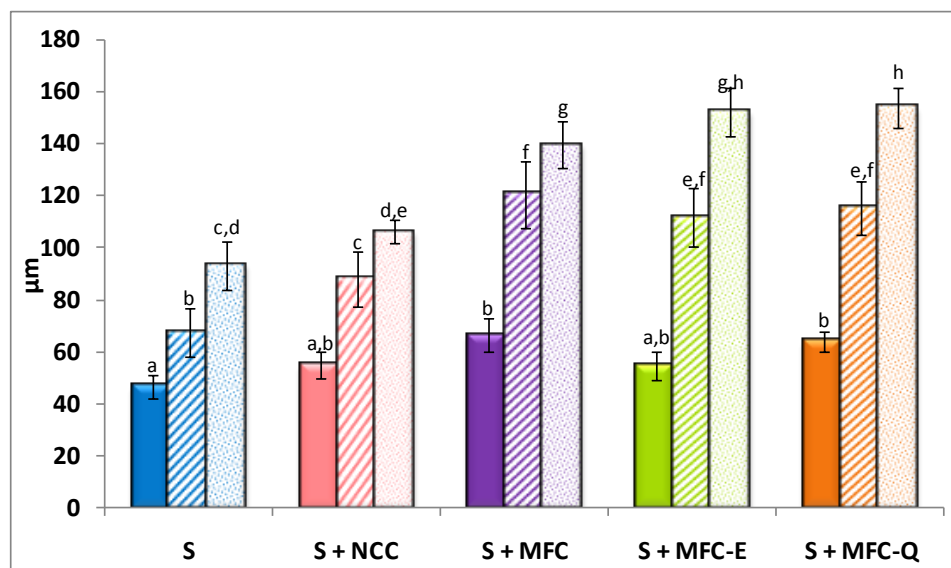


Figura IV.4.12. Espesores de las películas proteicas de soja (S), y películas nanocompuestas con el agregado de nanofibras de celulosa al 8% p/p con respecto a la cantidad de APS: con nanocristales (S + NCC), con celulosa microfibrilada (S + MFC), con celulosa microfibrilada y tratamiento enzimático (S + MFC-E) y con celulosa microfibrilada y tratamiento químico (S + MFC-Q).

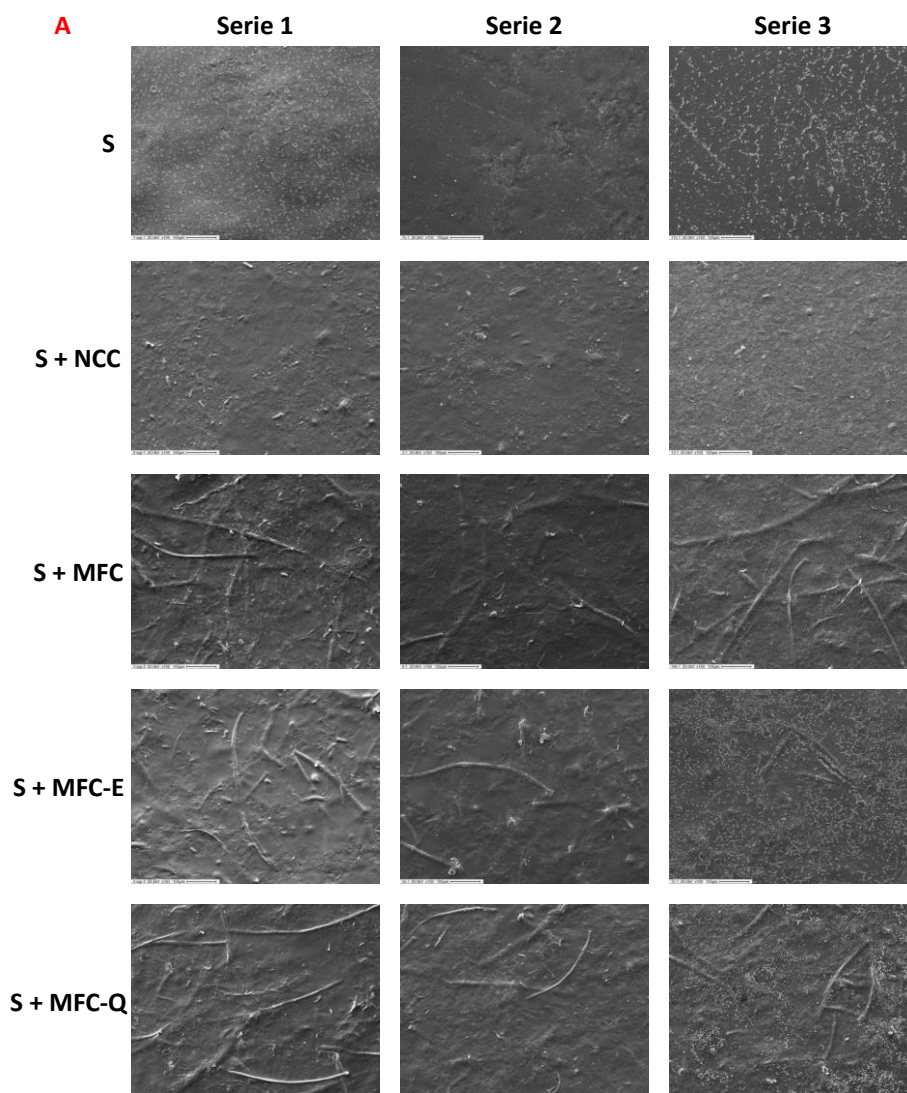
Serie 1: Procesadas por casting a partir de las dispersiones filmogénicas acuosas (■■■■■), **Serie 2:** procesadas por casting a partir de las dispersiones filmogénicas acuosas homogeneizadas por UT+US (▣▣▣▣) y **Serie 3:** Procesadas por casting a partir de los sistemas emulsionados con aceite de pescado homogeneizadas por UT+US (▤▤▤▤).

Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ según el test de Tukey.

En la **Figura IV.4.13.A** y **Figura IV.4.13.B** se presentan las microscopías electrónicas de barrido (SEM) que muestran la superficie y el corte transversal de las películas estudiadas. Aquellas obtenidas a partir de las dispersiones acuosas proteicas y nanocompuestas sometidas a la homogeneización UT+US (sin el agregado de aceite, **Serie 2**) dan la apariencia de ser más lisas y menos porosas que las de la **Serie 1** (estudiada en la sección anterior), no observándose ni grietas ni burbujas en su interior que podrían quedar remanentes del proceso de homogeneización. Incluso en la caso de las películas nanocompuestas, en las que se siguen percibiendo la presencia de las fibras, estas parecieran estar mejor recubiertas o adheridas a la matriz proteica, en concordancia con los resultados obtenidos al analizar la opacidad de los materiales.

Al agregar el aceite, se observa en casi todas las formulaciones la presencia de pequeños “glóbulos” que podrían ser las gotas de aceite recubiertas por las proteínas de soja. Estos glóbulos parecieran tener menor tamaño y estar más embebidos en las matrices nanocompuestas que en las proteicas, especialmente en los sistemas preparados con **NCC** y **MFC**, en cuyas superficies prácticamente no se observan esos glóbulos. La presencia de esos glóbulos de mayor tamaño en la superficie de las películas proteicas, puede asociarse a su apariencia oleosa al tacto descripta anteriormente. El menor tamaño de los glóbulos, y su

mejor distribución, evidencia las mejores propiedades emulsificantes de los sistemas nanocompuestos, discutidos al analizar la opacidad de las películas y su capacidad de proteger mejor al aceite. En la **Figura IV.4.15.** se presentan imágenes con mayor aumento de las superficies de los sistemas que transportan aceite de pescado (**Serie 3**), en donde se visualizan con más claridad la apariencia de los glóbulos en las películas proteicas y las preparadas con **MFC-E** y **MFC-Q**, que si bien están homogéneamente dispersos en la matriz, parecieran también ubicarse en las huellas de las nanofibras (marcadas en la figura). Al respecto, Ortiz y col. (2018) informaron que la presencia de MFC en películas de APS y aceite de clavo de olor, disminuyó el tamaño y la dispersión de las gotas de aceite, características estructurales que luego pudieron correlacionarse con un aumento en las propiedades bioactivas (antioxidantes y antimicrobianas) del aceite de clavo.



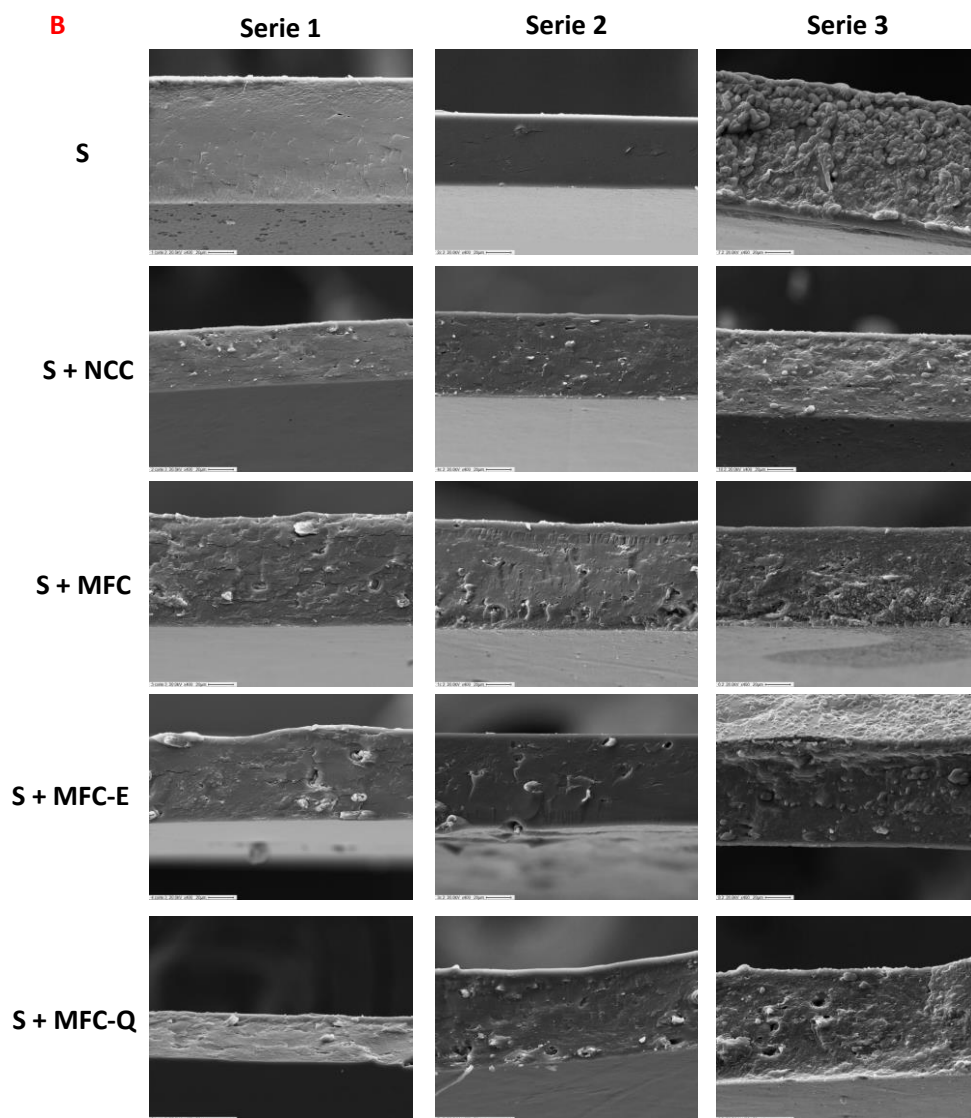


Figura IV.4.14. Superficie (A) y Cortes transversales (B) de las películas proteicas de soja (S), y películas nanocompuestas con el agregado de nanofibras de celulosa al 8% p/p con respecto a la cantidad de APS: con nanocristales (S + NCC), con celulosa microfibrilada (S + MFC), con celulosa microfibrilada y tratamiento enzimático (S + MFC-E) y con celulosa microfibrilada y tratamiento químico (S + MFC-Q).

Serie 1: Procesadas por casting a partir de las dispersiones filmogénicas acuosas, **Serie 2:** procesadas por casting a partir de las dispersiones filmogénicas acuosas homogeneizadas por UT+US y **Serie 3:** Procesadas por casting a partir de los sistemas emulsionados con aceite de pescado homogeneizadas por UT+US. Aumento: 400X.

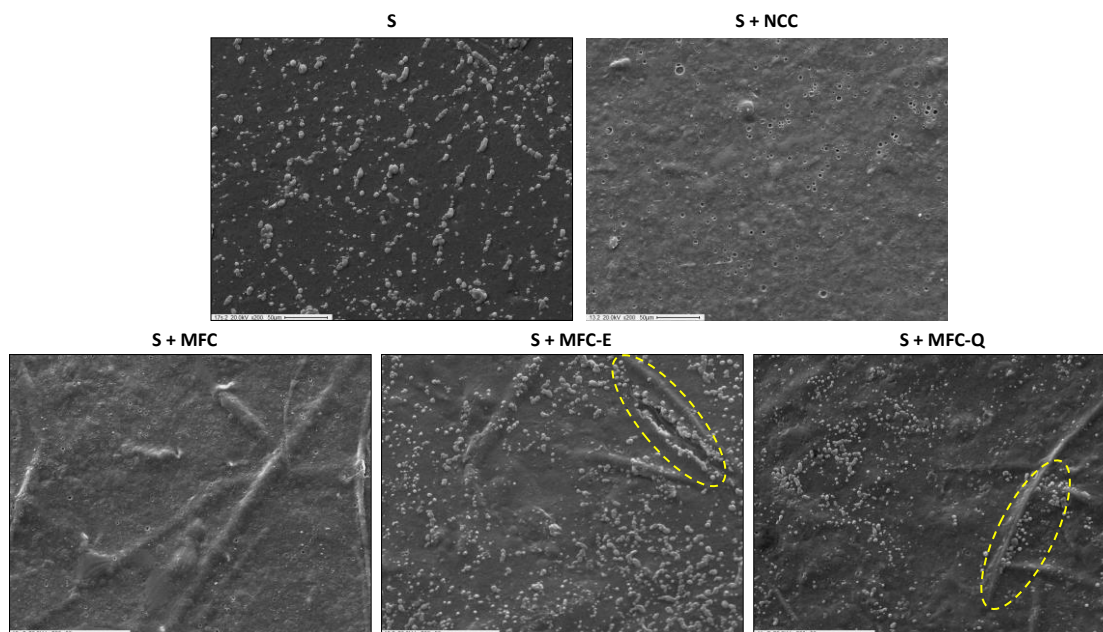


Figura IV.4.15. Superficies de las películas proteicas de soja (**S**), y películas nanocompuestas con el agregado de nanofibras de celulosa al 8% p/p con respecto a la cantidad de **APS**: con nanocrisales (**S + NCC**), con celulosa microfibrilada (**S + MFC**), con celulosa microfibrilada y tratamiento enzimático (**S + MFC-E**) y con celulosa microfibrilada y tratamiento químico (**S + MFC-Q**).

Serie 3: Procesadas por casting a partir de los sistemas emulsionados con aceite de pescado homogeneizadas por UT+US. Aumento: 200X.

En la Figura **IV.4.16** se aprecia como el proceso de emulsificación aumentó la susceptibilidad al agua de las películas proteicas y nanocompuestas, que se corrobora al observar sus aumentos en el contenido de agua, en la solubilidad, permeabilidad al vapor de agua y las disminuciones en las hidrofobicidades superficiales (medidas a través del ángulo de contacto), con excepción de la película preparada con MFC, que presentó una mayor hidrofobicidad posiblemente debido a que la homogeneización permitió recubrir mejor con la matriz proteica a las nanofibras que quedaban en la superficie. Pero la magnitud de estas modificaciones fue diferente para cada sistema y cada propiedad. Así, el aumento en el contenido de agua fue significativamente mayor para las películas nanocompuestas; el incremento en la solubilidad fue superior para las muestras formuladas solo con proteínas o con **NCC** y **MFC-E**, que además se desintegraron durante el ensayo a diferencia del resto de las películas que mantuvieron su integridad; mientras que el aumento en las WVP pareció ser más importante en las muestras preparadas con celulosas microfibriladas. Al comparar todas las películas homogeneizadas, el efecto observado con el agregado de las nanofibras fue similar al observado en la sección anterior con excepción que el contenido de agua se mantuvo, y el ángulo de contacto de la muestra que contenía NCC disminuyó mientras que la formulada con MFC aumentó. Es evidente, que el proceso de homogeneización conduce a una estructuración

diferente del material proteico y del nanocompuesto, siendo este menos compacto (con mayores espesores) y con mayor capacidad de retener agua. Estos fenómenos parecieran plastificar a las películas, aumentando su WVP y su solubilidad, y haciendo sus superficies más hidrofílicas.

El agregado de aceite de pescado, por el contrario, produjo una disminución del contenido de agua, de la solubilidad y de la permeabilidad al vapor de agua y un aumento en la hidrofobicidad de las películas (con excepción de las muestras con **MFC-E**, que mostraron mayores solubilidades y menores hidrofobicidades superficiales), debido a la hidrofobicidad propia del aceite.

Para esta serie (**S3**), el agregado de fibras no modificó el contenido de agua, disminuyó la solubilidad solo de las películas formuladas con **MFC** y **MFC-Q**, aumentó la WVP y aumentó la hidrofobicidad superficial para todas las películas nanocompuestas excepto para el **MFC-E**. Al comparar el efecto neto del agregado de aceite (respecto de la **Serie 1**), las películas proteicas presentaron menor contenido de agua, pero mayor permeabilidad y menor hidrofobicidad superficial e igual solubilidad. Entre las nanocompuestas, las preparadas con **NCC**, **MFC** y **MFC-Q** mantuvieron o disminuyeron levemente (**MFC**) su contenido de agua, disminuyeron su solubilidad y aumentaron su hidrofobicidad superficial pero incrementaron su WVP; mientras que las preparadas con **MFC-E** incrementaron la susceptibilidad al agua de las películas ya que aumentaron su solubilidad y su WVP, disminuyeron su hidrofobicidad superficial sin modificar su contenido de agua.

En general, los lípidos realmente actúan como una barrera efectiva contra la humedad en las películas de dos capas formadas al recubrir una película de proteína seca con dispersión de lípidos (Weller y col., 1998). Además, se ha informado que cuando los lípidos se dispersan en la matriz polimérica, su efecto sobre la WVP depende de varios factores, como el tipo y la concentración de los lípidos, la hidrofobicidad, el tamaño de las partículas y la estabilidad de la emulsión (Debeaufort y Voilley, 1995; Kim y col., 2003; Pérez-Gago y Krochta, 2001; Weller y col., 1998).

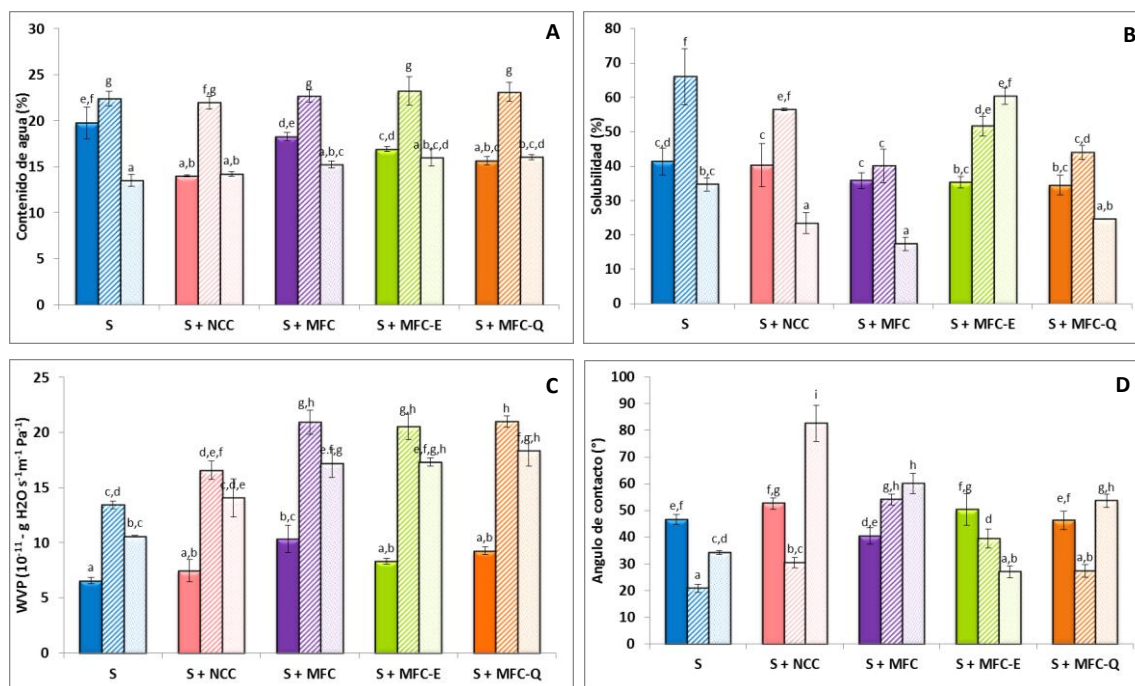


Figura IV.4.16. Contenido de agua (A), solubilidad en agua (B), permeabilidad al vapor de agua (WVP) (C) y ángulo de contacto (D) de las películas proteicas de soja (S), y películas nanocompuestas con el agregado de nanofibras de celulosa al 8% p/p con respecto a la cantidad de APS: con nanocristales (S + NCC), con celulosa microfibrilada (S + MFC), con celulosa microfibrilada y tratamiento enzimático (S + MFC-E) y con celulosa microfibrilada y tratamiento químico (S + MFC-Q).

Serie 1: Procesadas por casting a partir de las dispersiones filmogénicas acuosas (■ ■ ■ ■ ■), **Serie 2:** procesadas por casting a partir de las dispersiones filmogénicas acuosas homogeneizadas por UT+US (■ ■ ■ ■ ■) y **Serie 3:** Procesadas por casting a partir de los sistemas emulsionados con aceite de pescado homogeneizadas por UT+US (■ ■ ■ ■ ■).

Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ según el test de Tukey.

Las propiedades mecánicas de las películas estudiadas en este capítulo fueron evaluadas en ensayos de tracción y los resultados se muestran en la **Figura IV.4.17**.

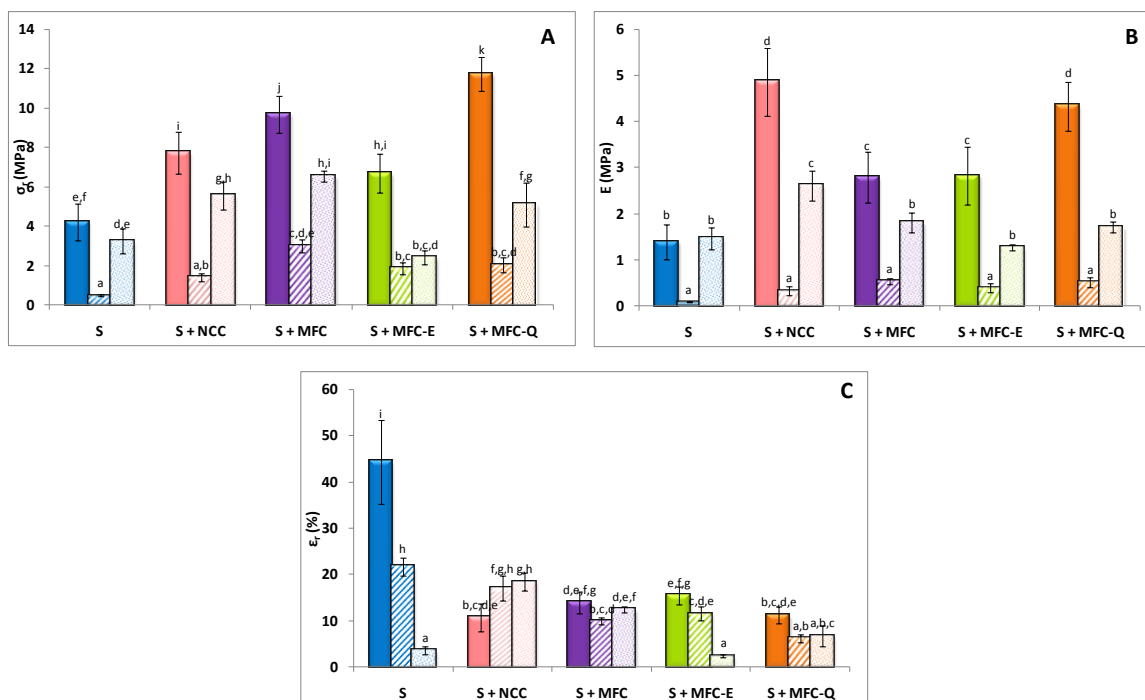


Figura IV.4.17. Propiedades mecánicas medidas en tracción de las películas proteicas de soja (S), y películas nanocompuestas con el agregado de nanofibras de celulosa al 8% p/p con respecto a la cantidad de APS: con nanocrisales (S + NCC), con celulosa microfibrilada (S + MFC), con celulosa microfibrilada y tratamiento enzimático (S + MFC-E) y con celulosa microfibrilada y tratamiento químico (S + MFC-Q).

Serie 1: Procesadas por casting a partir de las dispersiones filmogénicas acuosas (■■■■■), **Serie 2:** procesadas por casting a partir de las dispersiones filmogénicas acuosas homogeneizadas por UT+US (▨■■■■) y **Serie 3:** Procesadas por casting a partir de los sistemas emulsionados con aceite de pescado homogeneizadas por UT+US (▨■■■■).

A) Tensión a la ruptura (σ_r), **B)** Modulo de Young (E) y **C)** elongación a la rotura (ϵ_r).

Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ según el test de Tukey.

El proceso de homogeneización provocó una disminución muy significativa en la resistencia a la tracción, en el módulo de Young y en la elongación de las películas proteicas y nanocompuestas (con la excepción de las películas que contenían **NCC**, donde la elongación aumentó levemente). Si bien este comportamiento podría relacionarse con el mayor contenido de agua y su efecto plastificante mencionado anteriormente, el hecho que la elongación a la rotura haya también disminuido da idea de una matriz menos entrecruzada y más débil. En estudios preliminares realizados con películas emulsionadas con cera de abeja observamos resultados similares que se correlacionaron con inhomogeneidades en la interfase formada por las proteínas y la cera. Las microscopías analizadas anteriormente no dieron indicios de la presencia de grietas, poros o imperfecciones que pudieran estar actuando como concentradores de tensiones, pudiendo iniciar y anticipar la rotura. Es evidente que el proceso afecta la conformación de las proteínas, y conduce a un menor entrecruzamiento de las cadenas peptídicas, que se correspondería con un cambio en el patrón de enlaces que

estabilizan a las películas, responsables de una menor resistencia mecánica. Con el fin de avanzar en este sentido, se analizó la solubilidad diferencial de las películas proteicas y nanocompuestas homogeneizadas por UT+US (**Figura IV.4.18**). Las películas proteicas presentaron un perfil de solubilidad significativamente diferente al analizado en la sección anterior. Su solubilidad en agua resultó significativamente mayor que la presentada en la **Serie 1** ($\approx 60\%$ vs 10% respectivamente) correspondiente a la mayor cantidad de polipéptidos libres, débilmente ligados a la matriz proteica que constituye la película, y ya dando indicio de un menor entrecruzamiento entre las cadenas polipeptídicas. Su solubilidad disminuyó en *buffer* fosfato ($\approx 40\%$), posiblemente debido al efecto *salting out* antes mencionado, pero se volvió a incrementar por acción de SDS (hasta un $\approx 60\%$) y de urea (hasta más del 80%), evidenciando la importancia de las interacciones no covalentes, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, en la estabilización de estas películas. El agregado de β -ME, no aumentó la solubilidad de las proteínas, demostrando la poca relevancia de las uniones disulfuro en la estabilización de estas matrices proteicas, y responsables en gran medida de la resistencia y elongación de las películas proteicas. Estos resultados evidencian que el proceso de homogeneización afectó la conformación de las proteínas de manera tal que durante la obtención de las películas, las cadenas polipeptídicas se entrecizaron en una menor extensión, principalmente a través de interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, a diferencia de las películas proteicas estudiadas en la **Serie 1**, en las que los puentes disulfuro tenían un peso importante en la estabilización de la red.

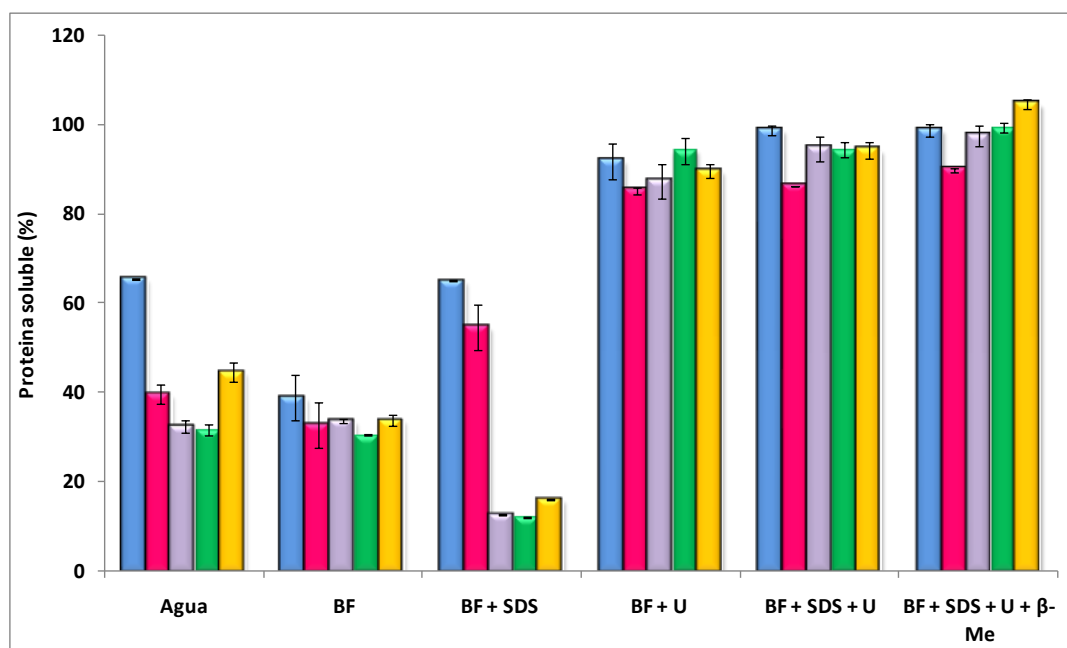


Figura IV.4.18. Solubilidad diferencial de las películas proteicas de soja (S, ■), y películas nanocompuestas con el agregado de nanofibras de celulosa al 8% p/p con respecto a la cantidad de APS: con nanocristales (S + NCC, ■), con celulosa microfibrilada (S + MFC, ■), con celulosa microfibrilada y tratamiento enzimático (S + MFC-E, ■) y con celulosa microfibrilada y tratamiento químico (S + MFC-Q, ■).

Serie 3: Procesadas por casting a partir de los sistemas emulsionados con aceite de pescado homogeneizadas por UT+US.

Porcentajes de proteína soluble en medios con distinta actividad química: Agua (A), Buffer fosfato de sodio 0,1M (BF), BF con SDS 0,1% p/v (BF + SDS), BF con urea 6M, BF con SDS 0,1% p/v y urea 6M (BF+SDS+U), BF+SDS+U con β- mercaptoetanol 2,5% v/v (BF+SDS+U+β-Me), todos a pH 7,5.

El agregado de las nanofibras a la formulaciones homogeneizadas (**Serie 2**) volvió a ejercer un efecto refuerzo muy importante, mejorando la resistencia a la rotura al menos en un 289%, el módulo de Young en 300 % y disminuyendo la elongación entre un 21 y 72%. En estos sistemas el mayor efecto se observó con la **MFC**, alcanzando mejoras en las propiedades antes mencionadas de 525, 567 % y disminuciones de las elongaciones de 54%. En este sistema, las nanofibras más largas y neutras parecieran poder reforzar en mayor magnitud a la matriz proteica. El efecto de las fibras pareciera ser más significativo que en la **Serie 1**, y se correlaciona con la mayor adhesión de las fibras a la matriz proteica (observada por SEM), posiblemente favorecida por la mejor dispersión de las nanofibras como consecuencia del proceso de homogeneización, que también se reflejó en la disminución de la opacidad de las películas.

Al analizar la solubilidad diferencial de las películas nanocompuestas (**Figura IV.4.18**) se observó que estas presentaban una menor solubilidad de las proteínas en agua respecto a las de las películas proteicas, indicando que la presencia de nanofibras en la formulación

contribuía a disminuir el contenido de polipéptidos libres débilmente unidos a la matriz. Solo en el caso de las películas formuladas con **NCC**, las interacciones hidrofóbicas tuvieron importancia (verificado por el aumento en la solubilidad de las proteínas en el buffer B + SDS). Pero para todas estas películas, la solubilidad máxima se alcanzó con el buffer que contenía urea, indicando la importancia de los puentes de hidrógeno y la menor significación de los puentes disulfuros en la estabilización de las películas.

Al agregar aceite de pescado en las formulaciones proteicas y nanocompuestas se produjo un aumento significativo en la tensión y en el módulo de Young, sin modificaciones en la elongación para las películas formuladas con **NCC**, **MFC** y **MFC-Q** y con disminuciones significativas para las películas proteicas y nanocompuestas con **MFC-E** (en comparación con la serie **S2**). El mayor efecto se observó para las películas proteicas, para las cuales se registró un aumento en el módulo de Young de 1000% y en la tensión a la rotura de 500% (alcanzando valores similares a los de la **Serie 1**), acompañado por una disminución de la elongación de 83%. Entre las nanocompuestas, el efecto fue más marcado para las películas que contenían **NCC** y **MFC**, que mejoraron sus módulos de Young 700 y 300% y sus tensiones a la rotura en 300 y 200% respectivamente, logrando retener todo el aceite dentro de la matriz proteica. Por otra parte, el efecto del agregado de aceite fue menos marcado en la matriz que contenía **MFC-E**, en donde si bien se observó un aumento del módulo de $\approx 300\%$, no se modificó significativamente la tensión a la rotura, y la elongación disminuyó significativamente. El efecto observado puede atribuirse por un lado al menor contenido de agua en estos sistemas, y por el otro a la buena encapsulación del aceite de pescado en la matriz proteica, especialmente en presencia de **NCC** y **MFC**. Al comparar los materiales de la **Serie 3**, solo los **NCC** lograron mejorar el módulo de Young de las películas proteicas (80 %), mientras que todas las nanofibras menos las **MFC-E** llegaron a incrementar la tensión a la rotura de estos materiales (al menos en un 57%). El menor efecto refuerzo que ejercen las nanofibras a las matrices proteicas en presencia de aceite de pescado podría dar indicio de cierta interacción entre estos compuestos (lípidos y nanofibras), como se sugirió al observar las microscopias.

Al respecto, cabe señalar que se ha reportado que el efecto que causa el agregado de aceite sobre las propiedades mecánicas puede variar dependiendo de los materiales (tanto estructural como del tipo de compuesto lipídico), la concentración de la fase lipídica incluida, el tamaño de gota y la distribución, entre otros parámetros. Al igual que en este estudio, algunos autores han observado un efecto refuerzo en películas proteicas por agregado de aceite (Atarés y col., 2010; Hopkins y col., 2015) que lo atribuyeron a que la inclusión del aceite

causaba una reestructuración de la matriz, mientras que otros verificaron cierto efecto plastificante (Fabra y col., 2008; Shaw y col., 2002; Ortiz y col., 2018).

Con el fin de analizar el estado del aceite de pescado presente en las películas, específicamente si el proceso de formación de los materiales afectó a los ácidos grasos poliinsaturados, muy sensibles a la oxidación, se extrajo el aceite de las películas, se cuantificaron sus ácidos grasos y se los comparó con los del aceite puro. En la **Tabla IV.4.5** se muestra el perfil porcentual de ácidos grasos presentes en el aceite de pescado puro y extraído de las películas proteicas y nanocompuestas.

Tabla IV.4.5. Perfil porcentual de ácidos grasos del aceite de pescado inicial y del extraído de las películas proteicas de soja (S), y de las películas nanocompuestas con el agregado de nanofibras de celulosa al 8% p/p con respecto a la cantidad de APS: con nanocristales (S + NCC), con celulosa microfibrilada (S + MFC), con celulosa microfibrilada y tratamiento enzimático (S + MFC-E) y con celulosa microfibrilada y tratamiento químico (S + MFC-Q).

Ácido Graso	Aceite de pescado	S	S + NCC	S + MFC	S + MFC-E	S + MFC-Q
13:0	10,71	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
14:0	4,48	5,90	N/D	5,90	5,71	7,70
16:0	22,23	18,20	18,33	27,73	22,50	18,52
16:1	9,55	5,20	N/D	8,95	6,53	7,75
18:0	1,71	5,22	12,92	5,60	6,12	7,85
18:1 n9 CIS	23,16	10,59	12,09	11,18	14,62	11,18
18:2 n6	4,22	32,98	17,87	24,32	22,78	19,42
18:3 n3	1,46	9,02	12,57	5,51	5,85	7,69
20:0	1,20	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
20:1 n9	2,50	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
20:4 n6	1,43	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
EPA	8,13	6,22	13,62	5,87	8,35	8,44
DHA	9,21	6,68	12,60	4,93	7,53	11,44

N/D: no determinado

El perfil porcentual de ácidos grasos obtenido para el aceite de pescado coincide con lo publicado en bibliografía, donde el porcentaje de EPA y DHA es $\approx 8\%$ y $\approx 9\%$ respectivamente (Indarti y col., 2005; Mondello y col., 2006). En concordancia con nuestro análisis, Indarti y col. (2009) informaron que el porcentaje de los ácidos grasos 16:0 y 18:1 n9 CIS en muestras de aceite de pescado, eran los mayoritarios. A su vez, también encontraron porcentajes bajos de 18:0, 20:1 n9 y 20:4 n6.

En los aceites extraídos de las películas se puede evidenciar un aumento notable en la cantidad del ácido graso saturado 18:0, así como también en el 18:2 y 18:3 con respecto al

aceite de pescado y un descenso notorio del ácido graso 18:1. En el mismo sentido, Rodríguez y col., 2015 y De Leonardi y Macciola (2012) describieron la disminución de los ácidos grasos poli-insaturados y el aumento de los saturados al tratar térmicamente muestras de aceite de sachu inchi (*Plukenetia volubilis* L.). En nuestro caso, el tratamiento térmico producido durante la obtención de las películas (60°C, por 3 h), podría ser el responsable del comportamiento observado.

En todas las películas se cuantificaron los EPA y DHA, que son los ácidos grasos de interés por su efecto beneficioso en la salud y los que se pretenden transportar en estas películas bioactivas. Los aceites extraídos de las películas proteicas y nanocompuestas formuladas con **MFC** presentaron menores concentraciones de estos ácidos grasos que el aceite puro, las que contenían con **MFC-E** presentaron concentraciones similares, pero las reforzadas con **MFC-Q** y **NCC** presentaron concentraciones superiores. En particular, las películas con **NCC** mostraron una concentración mayor de ambos ácidos grasos. El mayor efecto protector de esta última película, podría correlacionarse con la estructura de la misma, que presentaron superficies lisas y más homogéneas, reteniendo todo el aceite en el interior de la película; y por el mayor efecto refuerzo, que a su vez podría relacionarse con un efecto protector considerando que se sugirió cierta interacción especial entre lípidos y nanofibras. El aumento del porcentaje de ácidos grasos en estas películas indicarían que es posible vehiculizarlos y que fue los mismos resistieron el procesamiento llevado a cabo para producir la película.

IV.4.5. Conclusiones

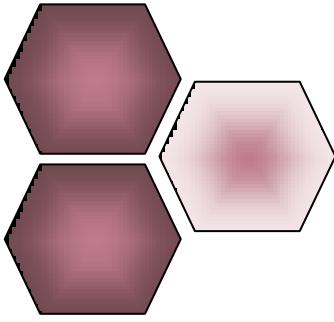
- ✓ Se logró obtener películas proteicas y nanocompuestas en base a proteínas de soja y nanofibras de celulosa capaces de transportar aceite de pescado.
- ✓ El agregado de nanofibras provocó un efecto refuerzo muy significativo en los materiales proteicos, siendo los **NCC** y los **MFC-Q** los que provocaron el mayor efecto, posiblemente debido a sus menores diámetros y a sus cargas superficiales que les permitieron dispersarse mejor en la matriz.
- ✓ El proceso de emulsificación utilizado para incorporar el aceite provocó una modificación estructural muy significativa en las proteínas que afectaron su capacidad formadora de películas, generando materiales menos resistentes y más hidrofílicos, estabilizados principalmente por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. Pero este

proceso favoreció la dispersión de las nanofibras en la matriz proteica, incrementando su efecto refuerzo así como la transparencia de los materiales.

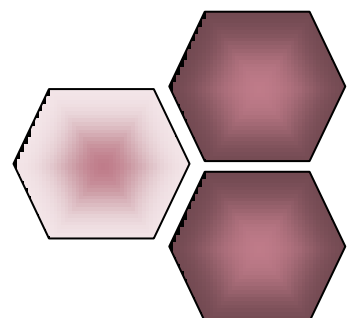
✓ El agregado de aceite de pescado mejoró la susceptibilidad al agua y las propiedades mecánicas de las películas proteicas y nanocompuestas. La presencia de nanofibras en la formulación favoreció la retención del aceite en las películas, a través de su mejor dispersión en gotas de menor tamaño. La buena adhesión del aceite a la matriz, posiblemente favorecida por las nanofibras, fue la causante de las mejoras en las propiedades de las películas.

✓ Las películas nanocompuestas formuladas con **NCC** y **MFC-Q** retuvieron una mayor concentración de los ácidos grasos omega-3. Nuevamente, los sistemas formulados con estas nanofibras fueron las que lograron mayor protección del aceite de pescado.

A futuro se evaluará la biodisponibilidad de los ácidos grasos presentes en las películas, así como el efecto protector que las películas ejercen durante su paso por el tracto gastrointestinal, con el fin de verificar si estos materiales pueden actuar verdaderamente como envases bioactivos.



V. CONCLUSIONES



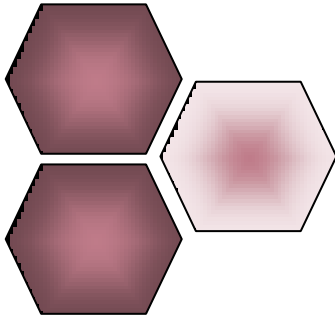
V. Conclusiones generales

- ✓ Se desarrollaron distintos sistemas de encapsulación para aceite de pescado (emulsiones, microcápsulas y películas), utilizando proteínas de soja y nanofibras de celulosa como material encapsulante, con el fin de proteger y vehiculizar los ácidos grasos omega-3 del aceite en alimentos saludables.
- ✓ Se obtuvieron nanofibras de celulosa con diferentes propiedades fisicoquímicas (cristalinidad, tamaño, morfología y carga superficial) por hidrólisis ácida de celulosa microcristalina o por fibrilación mecánica de fibras de formio modificadas o no previamente con tratamientos químicos y enzimáticos.
- ✓ Las proteínas de soja lograron encapsular el aceite de pescado en microcápsulas de tipo matriz enmascarando su olor característico y su textura aceitosa. Tanto la formulación como los procesos de emulsificación y deshidratación afectaron las propiedades estructurales, funcionales y fisicoquímicas de los productos obtenidos, así como la estabilidad oxidativa del aceite. Si bien, todos los sistemas de encapsulación estudiados mostraron cierta oxidación inicial del aceite, algunos presentaron una buena perspectiva de su estabilidad oxidativa a lo largo del tiempo.
- ✓ Se obtuvieron emulsiones de aceite de pescado en agua empleando sistemas nanocompuestos formados por proteínas de soja y nanofibras de celulosa como emulsificantes que resultaron más estables que aquellas estabilizadas sólo con APS o por *Pickering* con diferentes concentraciones de **NCC**. Estas emulsiones formuladas con nanofibras presentaron mayores tamaños de partícula y carga superficial que las de las emulsiones proteicas, sugiriendo que la presencia de las nanofibras induciría un reordenamiento en las proteínas, ya sea en la interface aceite-agua o en el seno de la fase continua, favoreciendo cierto grado de interacción entre ambos componentes.
- ✓ Las propiedades fisicoquímicas de las nanofibras estudiadas así como su concentración, condicionaron las propiedades de los sistemas emulsionados nanocompuestos. Las emulsiones con el agregado de 2% de **MFC-Q** y **NCC** (cargadas superficialmente) resultaron ser las más estables durante 15 días de almacenamiento a temperatura ambiente.

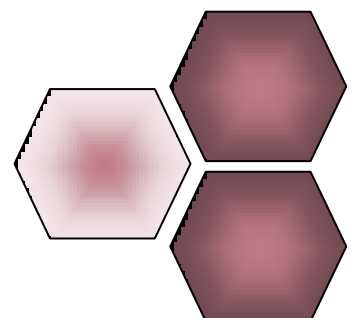
- ✓ Todas las emulsiones estabilizadas por sistemas nanocompuestos pudieron deshidratarse por secado *spray*, produciendo microcápsulas del tipo matriz, huecas adentro, con elevadas eficiencias de encapsulación de aceite de pescado. La co-localización de todos los componentes en las microcápsulas dio indicios de una buena adhesión y compactación de las nanofibras en la matriz proteica.
- ✓ El tipo de nanofibra de celulosa agregada determinó la estabilidad oxidativa del aceite durante su encapsulación. La mayor protección del aceite de pescado se logró con 4% de **NCC** y 2% de **MFC-Q**, lo cual podría atribuirse a las características propias de estas nanofibras, en particular a su elevada carga superficial y grado de cristalinidad en el primer caso y a su elevada relación de aspecto (L/d) y carga superficial en el segundo. Los bajos valores de a_w (0,20-0,30) obtenidos para estos sistemas permitirían predecir una baja susceptibilidad a la oxidación lipídica durante su almacenamiento.
- ✓ Se logró obtener películas proteicas y nanocompuestas bioactivas en base a proteínas de soja y nanofibras de celulosa capaces de transportar aceite de pescado.
- ✓ El agregado de nanofibras provocó un efecto refuerzo muy significativo en los materiales proteicos, siendo los **NCC** y los **MFC-Q** los que provocaron el mayor efecto, posiblemente debido a sus menores diámetros y a sus cargas superficiales que les permitieron dispersarse mejor en la matriz.
- ✓ El proceso de emulsificación utilizado para incorporar el aceite provocó una modificación estructural muy significativa en las proteínas que afectaron su capacidad formadora de películas, generando materiales menos resistentes y más hidrofílicos, estabilizados principalmente por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. Pero este proceso favoreció la dispersión de las nanofibras en la matriz proteica, incrementando su efecto refuerzo así como la transparencia de los materiales.
- ✓ El agregado de aceite de pescado mejoró la susceptibilidad al agua y las propiedades mecánicas de las películas proteicas y nanocompuestas. La presencia de nanofibras en la formulación favoreció la retención del aceite en las películas, a través de su mejor dispersión en gotas de menor tamaño. La buena adhesión del aceite a la matriz, posiblemente favorecida por las nanofibras, fue la causante de las mejoras en las propiedades de las películas.

- ✓ Las películas nanocompuestas formuladas con **NCC** y **MFC-Q** retuvieron una mayor concentración de los ácidos grasos omega-3. Nuevamente, los sistemas formulados con estas nanofibras fueron las que lograron mayor protección del aceite de pescado.

A futuro se evaluará la biodisponibilidad de los ácidos grasos presentes en los distintos sistemas encapsulantes estudiados (emulsiones, microcápsulas y películas bioactivas), así como el efecto protector que estos sistemas ejercen durante su paso por el tracto gastrointestinal, con el fin de verificar si pueden utilizarse en la formulación de alimentos funcionales.



VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahi, M., Alboofetileh, M., Rezaei, M., & Behrooz, R. (2013). Comparing physico-mechanical and thermal properties of alginate nanocomposite films reinforced with organic and/or inorganic nanofillers. *Food Hydrocolloids*, 32(2), 416–424.
- Abdollahi, M., Rezaei, M., & Farzi, G. (2012). A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *Journal of Food Engineering*, 111(2), 343–350.
- Abdul Khalil, H. P. S., Davoudpour, Y., Islam, M. N., Mustapha, A., Sudesh, K., Dungani, R., & Jawaidd, M. (2014). Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. *Carbohydrate Polymers*, 99, 649–665. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.069>
- Abitbol, T., Rivkin, A., Cao, Y., Nevo, Y., Abraham, E., Ben-Shalom, T., ... Shoseyov, O. (2016). Nanocellulose, a tiny fiber with huge applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 39, 76–88.
- Abo-Elseoud, W. S., Hassan, M. L., Sabaa, M. W., Basha, M., Hassan, E. A., & Fadel, S. M. (2018). Chitosan nanoparticles/cellulose nanocrystals nanocomposites as a carrier system for the controlled release of repaglinide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 604–613. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.044>
- Aghbashlo, M., Mobli, H., Madadlou, A., & Rafiee, S. (2012). The correlation of wall material composition with flow characteristics and encapsulation behavior of fish oil emulsion. *Food Research International*, 49(1), 379–388.
- Aghbashlo, M., Mobli, H., Madadlou, A., & Rafiee, S. (2013). Fish oil microencapsulation as influenced by spray dryer operational variables. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(8), 1707–1713. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12141>
- Alemdar, A., & Sain, M. (2008). Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues—Wheat straw and soy hulls. *Bioresource Technology*, 99(6), 1664–1671.
- Alliet, P., Scholtens, P., Raes, M., Hensen, K., Jongen, H., Rummens, J.-L., ... Vandenplas, Y. (2007). Effect of prebiotic galacto-oligosaccharide, long-chain fructo-oligosaccharide infant formula on serum cholesterol and triacylglycerol levels. *Nutrition*, 23(10), 719–723.
- Alvarenga Botrel, D., Victória de Barros Fernandes, R., Soraia Vilela Borges, S., & Yoshida, M. I. (2014). Influence of wall matrix systems on the properties of spray-dried microparticles containing fish oil. *Food Research International*, 62, 344–352.
- Alzate, A., Pérez-Conde, M. C., Gutiérrez, A. M., & Cámara, C. (2010). Selenium-enriched fermented milk: A suitable dairy product to improve selenium intake in humans. *International Dairy Journal*, 20(11), 761–769.
- Amnuaikit, T., Phadungkarn, T., Wattanapiromsakul, C., & Boonme, P. (2012). Formulation development of antibacterial films containing mangosteen peel extract. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 5(8), 1058–1065.
- Anandharamakrishnan, C., Rielly, C. D., & Stapley, A. G. F. (2010). Spray-freeze-drying of whey proteins at sub-atmospheric pressures. *Dairy Science & Technology*, 90(2), 321–334. <https://doi.org/10.1051/dst/2010013>

- Ander, B. P., Dupasquier, C. M. C., Prociuk, M. A., & Pierce, G. N. (2003). Polyunsaturated fatty acids and their effects on cardiovascular disease. *Experimental & Clinical Cardiology*, 8(4), 164–172. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2719153/>
- Andersen, N. (2007). Enzymatic hydrolysis of cellulose: experimental and modeling studies.
- Andresen, M., & Stenius, P. (2007). Water-in-oil emulsions stabilized by hydrophobized microfibrillated cellulose. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 28(6), 837–844.
- Angkuratipakorn, T., Sriprai, A., Tantrawong, S., Chaiyasit, W., & Singkhonrat, J. (2017). Fabrication and characterization of rice bran oil-in-water Pickering emulsion stabilized by cellulose nanocrystals. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 522, 310–319. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.03.014>
- Annunziata, A., & Vecchio, R. (2011). Functional foods development in the European market: A consumer perspective. *Journal of Functional Foods*, 3(3), 223–228.
- Anton, M., Beaumal, V., Brossard, C., Llamas, G., & Le Denmat, M. (2002). Droplet flocculation and physical stability of oil-in-water emulsions prepared with hen egg yolk. *Food Emulsions and Dispersions*, 15–28.
- Anwar, S. H., & Kunz, B. (2011). The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules: Comparison of spray granulation, spray drying, and freeze drying. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 367–378. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.047>
- Anwar, S. H., Weissbrodt, J., & Kunz, B. (2010). Microencapsulation of fish oil by spray granulation and fluid bed film coating. *Journal of Food Science*, 75(6), E359–E371.
- Arab-Tehrany, E., Jacquot, M., Gaiani, C., Imran, M., Desobry, S., & Linder, M. (2012). Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Trends in Food Science & Technology*, 25(1), 24–33.
- Araki, J., & Kuga, S. (2001). Effect of Trace Electrolyte on Liquid Crystal Type of Cellulose Microcrystals. *Langmuir*, 17(15), 4493–4496. <https://doi.org/10.1021/la0102455>
- Ashby, N. P., & Binks, B. P. (2000). Pickering emulsions stabilised by Laponite clay particles. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2(24), 5640–5646.
- Asnaashari, M., Farhoosh, R., & Sharif, A. (2014). Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion. *Food Chemistry*, 159, 439–444.
- Assis, R. Q., Lopes, S. M., Costa, T. M. H., Flôres, S. H., & Rios, A. de O. (2017). Active biodegradable cassava starch films incorporated lycopene nanocapsules. *Industrial Crops and Products*, 109, 818–827. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2017.09.043>
- Atef, M., Rezaei, M., & Behrooz, R. (2014). Preparation and characterization agar-based nanocomposite film reinforced by nanocrystalline cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 537–544.
- Aulin, C., Ahola, S., Josefsson, P., Nishino, T., Hirose, Y., Österberg, M., & Wågberg, L. (2009). Nanoscale Cellulose Films with Different Crystallinities and Messtructures—Their Surface Properties and Interaction with Water. *Langmuir*, 25(13), 7675–7685. <https://doi.org/10.1021/la900323n>

- Avramenko, N. A., Chang, C., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2016). Encapsulation of flaxseed oil within native and modified lentil protein-based microcapsules. *Food Research International*, 81, 17–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.028>
- Azizi Samir, M. A. S., Alloin, F., Gorecki, W., Sanchez, J.-Y., & Dufresne, A. (2004). Nanocomposite polymer electrolytes based on poly (oxyethylene) and cellulose nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(30), 10845–10852.
- Bae, E. K., & Lee, S. J. (2008). Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of Microencapsulation*, 25(8), 549–560.
- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., & Liang, L. (2016). Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 143–182. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12179>
- Barrow, C. J., Nolan, C., & Jin, Y. (2007). Stabilization of highly unsaturated fatty acids and delivery into foods. *Lipid Technology*, 19(5), 108–111.
- Barrow, C. J., Wang, B., Adhikari, B., & Liu, H. (2013). 6 - Spray drying and encapsulation of omega-3 oils. In C. Jacobsen, N. S. Nielsen, A. F. Horn, & A.-D. M. Sørensen (Eds.), *Food Enrichment with Omega-3 Fatty Acids* (pp. 194–225). Woodhead Publishing. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1533/9780857098863.2.194>
- Beck-Candanedo, S., Roman, M., & Gray, D. G. (2005). Effect of Reaction Conditions on the Properties and Behavior of Wood Cellulose Nanocrystal Suspensions. *Biomacromolecules*, 6(2), 1048–1054. <https://doi.org/10.1021/bm049300p>
- Benhamou, K., Dufresne, A., Magnin, A., Mortha, G., & Kaddami, H. (2014). Control of size and viscoelastic properties of nanofibrillated cellulose from palm tree by varying the TEMPO-mediated oxidation time. *Carbohydrate Polymers*, 99, 74–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.032>
- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2004). Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108, 29–41.
- Benjamin, O., Silcock, P., Beauchamp, J., Buettner, A., & Everett, D. W. (2014). Emulsifying Properties of Legume Proteins Compared to β -Lactoglobulin and Tween 20 and the Volatile Release from Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Food Science*, 79(10), E2014–E2022.
- Berton-Carabin, C. C., & Schroën, K. (2015). Pickering Emulsions for Food Applications: Background, Trends, and Challenges. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 263–297. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-081114-110822>
- Besbes, I., Alila, S., & Boufi, S. (2011). Nanofibrillated cellulose from TEMPO-oxidized eucalyptus fibres: Effect of the carboxyl content. *Carbohydrate Polymers*, 84(3), 975–983. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.052>
- Besbes, I., Vilar, M. R., & Boufi, S. (2011). Nanofibrillated cellulose from Alfa, Eucalyptus and Pine fibres: Preparation, characteristics and reinforcing potential. *Carbohydrate Polymers*, 86(3), 1198–1206. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.015>
- Betoret, E., Betoret, N., Vidal, D., & Fito, P. (2011). Functional foods development: Trends and technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 22(9), 498–508.

- Bettaieb, F., Khiari, R., Hassan, M. L., Belgacem, M. N., Bras, J., Dufresne, A., & Mhenni, M. F. (2015). Preparation and characterization of new cellulose nanocrystals from marine biomass *Posidonioceanica*. *Industrial Crops and Products*, 72, 175–182.
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential—What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351.
- Bigliardi, B., & Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), 118–129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.03.006>
- Biji, K. B., Ravishankar, C. N., Mohan, C. O., & Gopal, T. K. S. (2015). Smart packaging systems for food applications: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6125–6135.
- Bilbao-Sainz, C., Bras, J., Williams, T., Sénechal, T., & Orts, W. (2011). HPMC reinforced with different cellulose nano-particles. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1549–1557. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.060>
- Biliuta, G., Fras, L., Drobota, M., Persin, Z., Kreze, T., Stana-Kleinschek, K., ... Coseri, S. (2013). Comparison study of TEMPO and phthalimide-N-oxyl (PINO) radicals on oxidation efficiency toward cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 91(2), 502–507. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.047>
- Binks, B. P. (2002). Particles as surfactants—similarities and differences. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(1–2), 21–41.
- Binks, B. P., & Lumsdon, S. O. (2001). Pickering emulsions stabilized by monodisperse latex particles: effects of particle size. *Langmuir*, 17(15), 4540–4547.
- Binks, B. P., Rodrigues, J. A., & Frith, W. J. (2007). Synergistic interaction in emulsions stabilized by a mixture of silica nanoparticles and cationic surfactant. *Langmuir*, 23(7), 3626–3636.
- Binsi, P. K., Nayak, N., Sarkar, P. C., Jeyakumari, A., Ashraf, P. M., Ninan, G., & Ravishankar, C. N. (2017). Structural and oxidative stabilization of spray dried fish oil microencapsulates with gum arabic and sage polyphenols: Characterization and release kinetics. *Food Chemistry*, 219, 158–168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.126>
- Bloomer, J. J. (2000). *Practical fluid mechanics for engineering applications*. Marcel Dekker New York.
- Bondeson, D., Mathew, A., & Oksman, K. (2006). Optimization of the isolation of nanocrystals from microcrystalline cellulose by acid hydrolysis. *Cellulose*, 13(2), 171–180. <https://doi.org/10.1007/s10570-006-9061-4>
- Boon, C. S., Xu, Z., Yue, X., McClements, D. J., Weiss, J., & Decker, E. A. (2008). Factors affecting lycopene oxidation in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1408–1414.
- Borel, T., & Sabliov, C. M. (2014). Nanodelivery of bioactive components for food applications: types of delivery systems, properties, and their effect on ADME profiles and toxicity of nanoparticles. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 197–213.
- Börjesson, M., & Westman, G. (2015). Crystalline nanocellulose—preparation, modification, and properties. In *Cellulose-fundamental aspects and current trends*. IntechOpen.

- Borneo, R., Kocer, D., Ghai, G., Tepper, B. J., & Karwe, M. V. (2007). Stability and consumer acceptance of long-chain omega-3 fatty acids (eicosapentaenoic acid, 20: 5, n-3 and docosahexaenoic acid, 22: 6, n-3) in cream-filled sandwich cookies. *Journal of Food Science*, 72(1), S049–S054.
- Borsoi, C., Zimmermann, M. V. G., Zattera, A. J., Santana, R. M. C., & Ferreira, C. A. (2016). Thermal degradation behavior of cellulose nanofibers and nanowhiskers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 126(3), 1867–1878. <https://doi.org/10.1007/s10973-016-5653-x>
- Botrel, D. A., Borges, S. V., de Barros Fernandes, R. V., Antoniassi, R., de Faria-Machado, A. F., de Andrade Feitosa, J. P., & de Paula, R. C. M. (2017). Application of cashew tree gum on the production and stability of spray-dried fish oil. *Food Chemistry*, 221, 1522–1529. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.141>
- Bufalino, L., de Sena Neto, A. R., Tonoli, G. H. D., de Souza Fonseca, A., Costa, T. G., Marconcini, J. M., ... Mendes, L. M. (2015). How the chemical nature of Brazilian hardwoods affects nanofibrillation of cellulose fibers and film optical quality. *Cellulose*, 22(6), 3657–3672. <https://doi.org/10.1007/s10570-015-0771-3>
- Cabezas, D. M., Madoery, R., Diehl, B. W. K., & Tomás, M. C. (2012). Emulsifying properties of hydrolyzed sunflower lecithins by phospholipases A2 of different sources. In *Food Industrial Processes- Methods and Equipment*. InTech.
- Calabrese, V., Courtenay, J. C., Edler, K. J., & Scott, J. L. (2018). Pickering emulsions stabilized by naturally derived or biodegradable particles. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 12, 83–90. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.07.002>
- Calvo, P., Castaño, Á. L., Lozano, M., & González-Gómez, D. (2012). Influence of the microencapsulation on the quality parameters and shelf-life of extra-virgin olive oil encapsulated in the presence of BHT and different capsule wall components. *Food Research International*, 45(1), 256–261.
- Can Karaca, A., Low, N., & Nickerson, M. (2013). Encapsulation of flaxseed oil using a benchtop spray dryer for legume protein–maltodextrin microcapsule preparation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(21), 5148–5155.
- Cano-Sarmiento, C., Téllez-Medina, D. I., Viveros-Contreras, R., Cornejo-Mazón, M., Figueroa-Hernández, C. Y., García-Armenta, E., ... Gutiérrez-López, G. F. (2018). Zeta Potential of Food Matrices. *Food Engineering Reviews*, 10(3), 113–138. <https://doi.org/10.1007/s12393-018-9176-z>
- Cao, X., Chen, Y., Chang, P. R., Stumborg, M., & Huneault, M. A. (2008). Green composites reinforced with hemp nanocrystals in plasticized starch. *Journal of Applied Polymer Science*, 109(6), 3804–3810.
- Cao, X., Ding, B., Yu, J., & Al-Deyab, S. S. (2012). Cellulose nanowhiskers extracted from TEMPO-oxidized jute fibers. *Carbohydrate Polymers*, 90(2), 1075–1080. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.046>
- Capadona, J. R., Shanmuganathan, K., Trittschuh, S., Seidel, S., Rowan, S. J., & Weder, C. (2009). Polymer Nanocomposites with Nanowhiskers Isolated from Microcrystalline Cellulose. *Biomacromolecules*, 10(4), 712–716. <https://doi.org/10.1021/bm8010903>
- Carneiro, H. C. F., Tonon, R. V., Grosso, C. R. F., & Hubinger, M. D. (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 443–451. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.03.033>

- Carr, D. J., Cruthers, N. M., Laing, R. M., & Niven, B. E. (2005). Fibers from three cultivars of New Zealand flax (*Phormium tenax*). *Textile Research Journal*, 75(2), 93–98.
- Carrillo, C. A., Nypelö, T. E., & Rojas, O. J. (2015). Cellulose nanofibrils for one-step stabilization of multiple emulsions (W/O/W) based on soybean oil. *Journal of Colloid and Interface Science*, 445, 166–173. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.12.028>
- Chanamai, R., & McClements, D. J. (2000). Dependence of creaming and rheology of monodisperse oil-in-water emulsions on droplet size and concentration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 172(1), 79–86. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00551-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00551-3)
- Chang, C., Wang, T., Hu, Q., & Luo, Y. (2017). Caseinate-zein-polysaccharide complex nanoparticles as potential oral delivery vehicles for curcumin: Effect of polysaccharide type and chemical cross-linking. *Food Hydrocolloids*, 72, 254–262. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.039>
- Chang, C., Wang, T., Hu, Q., & Luo, Y. (2017). Zein/caseinate/pectin complex nanoparticles: Formation and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 117–124. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.178>
- Chang, H. W., Tan, T. B., Tan, P. Y., Abas, F., Lai, O. M., Wang, Y., ... Tan, C. P. (2018). Microencapsulation of fish oil using thiol-modified β -lactoglobulin fibrils/chitosan complex: A study on the storage stability and in vitro release. *Food Hydrocolloids*, 80, 186–194. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.002>
- Charreau, H., L Foresti, M., & Vázquez, A. (2013). Nanocellulose patents trends: a comprehensive review on patents on cellulose nanocrystals, microfibrillated and bacterial cellulose. *Recent Patents on Nanotechnology*, 7(1), 56–80.
- Chee, C. P., Djordjevic, D., Faraji, H., Decker, E. A., Hollender, R., McClements, D. J., ... Coupland, J. N. (2007). Sensory properties of vanilla and strawberry flavored ice cream supplemented with omega-3 fatty acids. *Milchwissenschaft*, 62(1), 66–69.
- Chee, C. P., Gallaher, J. J., Djordjevic, D., Faraji, H., McClements, D. J., Decker, E. A., ... Coupland, J. N. (2005). Chemical and sensory analysis of strawberry flavoured yogurt supplemented with an algae oil emulsion. *Journal of Dairy Research*, 72(3), 311–316.
- Chen, H., & Zhong, Q. (2014). Processes improving the dispersibility of spray-dried zein nanoparticles using sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 35, 358–366. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.012>
- Chen, H., & Zhong, Q. (2015). A novel method of preparing stable zein nanoparticle dispersions for encapsulation of peppermint oil. *Food Hydrocolloids*, 43, 593–602. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.018>
- Chen, J., Vogel, R., Werner, S., Heinrich, G., Clausse, D., & Dutschk, V. (2011). Influence of the particle type on the rheological behavior of Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 382(1), 238–245. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.02.003>
- Chen, Q., Zhong, F., Wen, J., McGillivray, D., & Quek, S. Y. (2013). Properties and Stability of Spray-Dried and Freeze-Dried Microcapsules Co-Encapsulated with Fish Oil, Phytosterol Esters, and Limonene. *Drying Technology*, 31(6), 707–716. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.755541>

- Cheng, L., Zhang, D., Gu, Z., Li, Z., Hong, Y., & Li, C. (2018). Preparation of acetylated nanofibrillated cellulose from corn stalk microcrystalline cellulose and its reinforcing effect on starch films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 959–966. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.056>
- Chesworth, W. (n.d.). RJ Zasoski.
- Chevalier, Y., & Bolzinger, M.-A. (2013). Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 439, 23–34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.02.054>
- Chew, S. C., Tan, C. P., & Nyam, K. L. (2018). Effect of Gum Arabic, β -Cyclodextrin, and Sodium Caseinate as Encapsulating Agent on the Oxidative Stability and Bioactive Compounds of Spray-Dried Kenaf Seed Oil. *Journal of Food Science*, 83(9), 2288–2294. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14291>
- Chhabra, R. P., & Richardson, J. F. (2011). *Non-Newtonian flow and applied rheology: engineering applications*. Butterworth-Heinemann.
- Cho, Y. H., Shim, H. K., & Park, J. (2003). Encapsulation of fish oil by an enzymatic gelation process using transglutaminase cross-linked proteins. *Journal of Food Science*, 68(9), 2717–2723.
- Choi, J., Tamaki, R., Kim, S. G., & Laine, R. M. (2003). Organic/inorganic imide nanocomposites from aminophenylsilsesquioxanes. *Chemistry of Materials*, 15(17), 3365–3375.
- Choi, M.-J., Ruktanonchai, U., Min, S.-G., Chun, J.-Y., & Sootittantawat, A. (2010). Physical characteristics of fish oil encapsulated by β -cyclodextrin using an aggregation method or polycaprolactone using an emulsion–diffusion method. *Food Chemistry*, 119(4), 1694–1703.
- Cian, R. E., Salgado, P. R., Drago, S. R., & Mauri, A. N. (2015). Effect of glycerol and Ca^{+2} addition on physicochemical properties of edible carrageenan/porphyran-based films obtained from the red alga, *Pyropia columbina*. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1699–1708. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0449-5>
- Claro, P. I. C., Corrêa, A. C., de Campos, A., Rodrigues, V. B., Luchesi, B. R., Silva, L. E., ... Marconcini, J. M. (2018). Curaua and eucalyptus nanofibers films by continuous casting: Mechanical and thermal properties. *Carbohydrate Polymers*, 181, 1093–1101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.037>
- Čolić, M., Mihajlović, D., Mathew, A., Naseri, N., & Kokol, V. (2015). Cytocompatibility and immunomodulatory properties of wood based nanofibrillated cellulose. *Cellulose*, 22(1), 763–778.
- Collazo-Bigliardi, S., Ortega-Toro, R., & Boix, A. C. (2018). Isolation and characterisation of microcrystalline cellulose and cellulose nanocrystals from coffee husk and comparative study with rice husk. *Carbohydrate Polymers*, 191, 205–215. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.022>
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78(1), 90–103.
- Comas, D. I., Wagner, J. R., & Tomás, M. C. (2006). Creaming stability of oil in water (O/W) emulsions: Influence of pH on soybean protein–lecithin interaction. *Food Hydrocolloids*, 20(7), 990–996. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.11.006>

- Comunian, T. A., & Favaro-Trindade, C. S. (2016). Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. *Food Hydrocolloids*, 61, 442–457. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.003>
- Condés, M. C., Añón, M. C., Dufresne, A., & Mauri, A. N. (2018). Composite and nanocomposite films based on amaranth biopolymers. *Food Hydrocolloids*, 74, 159–167. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.07.013>
- Condés, M. C., Echeverría, I., Añón, M. C., & Mauri, A. N. (2016). Nanocompounds as Formulating Aids. In *Edible Films and Coatings* (pp. 259–280). CRC Press.
- Condes, C. (2012). Películas compuestas y nanocompuestas, biodegradables y/o comestibles, en base a proteínas de amaranto y almidones de distinto origen botánico. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, 243 págs.
- Costa, A. L. R., Gomes, A., Tibolla, H., Menegalli, F. C., & Cunha, R. L. (2018). Cellulose nanofibers from banana peels as a Pickering emulsifier: High-energy emulsification processes. *Carbohydrate Polymers*, 194, 122–131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.001>
- Costa, P. F. P. da, Ferraz, M. B. M., Ros-Polski, V., Quast, E., Collares Queiroz, F. P., & Steel, C. J. (2010). Functional extruded snacks with lycopene and soy protein. *Food Science and Technology*, 30(1), 143–151.
- Couret, L., Irle, M., Belloncle, C., & Cathala, B. (2017). Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from post-consumer wood fiberboard waste. *Cellulose*, 24(5), 2125–2137.
- Cunha, A. G., Mougel, J.-B., Cathala, B., Berglund, L. A., & Capron, I. (2014). Preparation of double Pickering emulsions stabilized by chemically tailored nanocelluloses. *Langmuir*, 30(31), 9327–9335.
- da Cruz, M. C. R., Dagostin, J. L. A., Perussello, C. A., & Masson, M. L. (2019). Assessment of physicochemical characteristics, thermal stability and release profile of ascorbic acid microcapsules obtained by complex coacervation. *Food Hydrocolloids*, 87, 71–82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.043>
- Dainelli, D., Gontard, N., Spyropoulos, D., Zondervan-van den Beuken, E., & Tobback, P. (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science & Technology*, 19, S103–S112.
- Dammström, S., Salmén, L., & Gatenholm, P. (2009). On the interactions between cellulose and xylan, a biomimetic simulation of the hardwood cell wall. *BioResources*, 4(1), 3–14.
- Dangaran, K., Tomasula, P. M., & Qi, P. (2009). Structure and function of protein-based edible films and coatings. In *Edible films and coatings for food applications* (pp. 25–56). Springer.
- Darby, N. J., & Creighton, T. E. (1995). Characterization of the active site cysteine residues of the thioredoxin-like domains of protein disulfide isomerase. *Biochemistry*, 34(51), 16770–16780. <https://doi.org/10.1021/bi00051a027>
- Day, L. (2013). Proteins from land plants—potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science & Technology*, 32(1), 25–42.
- Day, L., Xu, M., Hoobin, P., Bugar, I., & Augustin, M. A. (2007). Characterisation of fish oil emulsions stabilised by sodium caseinate. *Food Chemistry*, 105(2), 469–479. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.013>

- de Folter, J. W. J., van Ruijven, M. W. M., & Velikov, K. P. (2012). Oil-in-water Pickering emulsions stabilized by colloidal particles from the water-insoluble protein zein. *Soft Matter*, 8(25), 6807–6815. <https://doi.org/10.1039/C2SM07417F>
- de Moraes Teixeira, E., Corrêa, A. C., Manzoli, A., de Lima Leite, F., de Oliveira, C. R., & Mattoso, L. H. C. (2010). Cellulose nanofibers from white and naturally colored cotton fibers. *Cellulose*, 17(3), 595–606. <https://doi.org/10.1007/s10570-010-9403-0>
- De Rosa, I. M., Iannoni, A., Kenny, J. M., Puglia, D., Santulli, C., Sarasini, F., & Terenzi, A. (2011). Poly (lactic acid)/Phormium tenax composites: Morphology and thermo-mechanical behavior. *Polymer Composites*, 32(9), 1362–1368.
- De Rosa, I. M., Kenny, J. M., Puglia, D., Santulli, C., & Sarasini, F. (2010). Tensile behavior of New Zealand flax (Phormium tenax) fibers. *Journal of Reinforced Plastics and Composites*, 29(23), 3450–3454.
- De Rosa, I. M., Santulli, C., & Sarasini, F. (2010). Mechanical and thermal characterization of epoxy composites reinforced with random and quasi-unidirectional untreated Phormium tenax leaf fibers. *Materials & Design (1980-2015)*, 31(5), 2397–2405.
- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292–302.
- Debeaufort, F., & Voilley, A. (1995). Effect of surfactants and drying rate on barrier properties of emulsified edible films. *International Journal of Food Science & Technology*, 30(2), 183–190.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2010). Healthier lipid combination as functional ingredient influencing sensory and technological properties of low-fat frankfurters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(8), 859–870.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Solas, M. T., Triki, M., & Jiménez-Colmenero, F. (2011). Low-fat frankfurters formulated with a healthier lipid combination as functional ingredient: Microstructure, lipid oxidation, nitrite content, microbiological changes and biogenic amine formation. *Meat Science*, 89(1), 65–71.
- Demetriades, K., Coupland, J. N., & McClements, D. J. (1997). Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl. *Journal of Food Science*, 62(2), 342–347.
- Demetriades, K., Coupland, J. N., & McClements, D. J. (1997). Physicochemical properties of whey protein-stabilized emulsions as affected by heating and ionic strength. *Journal of Food Science*, 62(3), 462–467.
- Denavi, G. A., Pérez-Mateos, M., Añón, M. C., Montero, P., Mauri, A. N., & Gomez-Guillen, M. C. (2009). Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2094–2101.
- Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361–1394.
- Desmaisons, J., Boutonnet, E., Rueff, M., Dufresne, A., & Bras, J. (2017). A new quality index for benchmarking of different cellulose nanofibrils. *Carbohydrate Polymers*, 174, 318–329. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.032>

- Desobry, S. A., Netto, F. M., & Labuza, T. P. (1997). Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for β -carotene encapsulation and preservation. *Journal of Food Science*, 62(6), 1158–1162.
- Destribats, M., Rouvet, M., Gehin-Delval, C., Schmitt, C., & Binks, B. P. (2014). Emulsions stabilised by whey protein microgel particles: towards food-grade Pickering emulsions. *Soft Matter*, 10(36), 6941–6954.
- Devi, N., Sarmah, M., Khatun, B., & Maji, T. K. (2017). Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science*, 239, 136–145. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.05.009>
- Dickinson, E. (1992). Faraday research article. Structure and composition of adsorbed protein layers and the relationship to emulsion stability. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 88(20), 2973–2983.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17(1), 25–39.
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1473–1482. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.08.005>
- Dickinson, E. (2012). Use of nanoparticles and microparticles in the formation and stabilization of food emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 24(1), 4–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.09.006>
- Dickinson, E., & Stainsby, G. (1982). *Colloids in food*. Applied Science Publishers.
- Dickinson, E., & Walstra, P. (1993). *Food colloids and polymers: stability and mechanical properties*. Elsevier.
- do Nascimento, D. M., Almeida, J. S., Vale, M. do S., Leitão, R. C., Muniz, C. R., de Figueirêdo, M. C. B., ... Rosa, M. de F. (2016). A comprehensive approach for obtaining cellulose nanocrystal from coconut fiber. Part I: Proposition of technological pathways. *Industrial Crops and Products*, 93, 66–75.
- do Vale Morais, A. R., do Nascimento Alencar, É., Júnior, F. H. X., de Oliveira, C. M., Marcelino, H. R., Barratt, G., ... Elaissari, A. (2016). Freeze-drying of emulsified systems: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 503(1), 102–114. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.047>
- Dong, X. M., Revol, J.-F., & Gray, D. G. (1998). Effect of microcrystallite preparation conditions on the formation of colloid crystals of cellulose. *Cellulose*, 5(1), 19–32.
- Downes, L. S., & Myers, F. (2010). Further validation of the motivators and barriers of a healthy lifestyle scale. *Southern Online Journal of Nursing Research*, 10(4), 1049–1054.
- Drelich, A., Gomez, F., Clausse, D., & Pezron, I. (2010). Evolution of water-in-oil emulsions stabilized with solid particles: Influence of added emulsifier. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 365(1), 171–177. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.01.042>
- Drusch, S. (2007). Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying. *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1223–1228.

- Drusch, S., & Berg, S. (2008). Extractable oil in microcapsules prepared by spray-drying: Localisation, determination and impact on oxidative stability. *Food Chemistry*, 109(1), 17–24. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.016>
- Drusch, S., & Schwarz, K. (2006). Microencapsulation properties of two different types of n-octenylsuccinate-derivatised starch. *European Food Research and Technology*, 222(1–2), 155–164.
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 11044–11051. <https://doi.org/10.1021/jf072536a>
- Drusch, S., Serfert, Y., Van Den Heuvel, A., & Schwarz, K. (2006). Physicochemical characterization and oxidative stability of fish oil encapsulated in an amorphous matrix containing trehalose. *Food Research International*, 39(7), 807–815.
- Duan, J., Jiang, Y., & Zhao, Y. (2011). Chitosan–whey protein isolate composite films for encapsulation and stabilization of fish oil containing ultra pure omega-3 fatty acids. *Journal of Food Science*, 76(1), C133–C141.
- Dufresne, A. (2008). Chapter 19 - Cellulose-Based Composites and Nanocomposites. In M. N. Belgacem & A. Gandini (Eds.), *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources* (pp. 401–418). Amsterdam: Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045316-3.00019-3>
- Dufresne, A. (2010). Processing of polymer nanocomposites reinforced with polysaccharide nanocrystals. *Molecules*, 15(6), 4111–4128.
- Dufresne, A. (2012). *Nanocellulose: From Nature to High Performance Tailored Materials*. De Gruyter. Retrieved from <https://books.google.com.ar/books?id=xa56tgAACAAJ>
- Dufresne, A. (2017). *Nanocellulose: from nature to high performance tailored materials*. Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
- Dufresne, A. (2018). Cellulose nanomaterials as green nanoreinforcements for polymer nanocomposites. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 376(2112), 20170040. <https://doi.org/10.1098/rsta.2017.0040>
- Ebrahimi, B., Mohammadi, R., Rouhi, M., Mortazavian, A. M., Shojaei-Aliabadi, S., & Koushki, M. R. (2018). Survival of probiotic bacteria in carboxymethyl cellulose-based edible film and assessment of quality parameters. *LWT - Food Science and Technology*, 87(Supplement C), 54–60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.066>
- Echeverría, I., Eisenberg, P., & Mauri, A. N. (2014). Nanocomposites films based on soy proteins and montmorillonite processed by casting. *Journal of Membrane Science*, 449, 15–26.
- Echeverría, I., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N., & Montero, M. P. (2016). Structure, Functionality, and Active Release of Nanoclay–Soy Protein Films Affected by Clove Essential Oil. *Food and Bioprocess Technology*, 9(11), 1937–1950.
- Echeverría, I., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N., & Montero, M. P. (2018). Active nanocomposite films based on soy proteins-montmorillonite- clove essential oil for the preservation of refrigerated bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 142–149. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2017.10.003>

- Echeverría I. (2012). Materiales biodegradables en base a proteínas de soja y montmorillonitas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, 275 págs.
- Eichhorn, S. J., Dufresne, A., Aranguren, M., Marcovich, N. E., Capadona, J. R., Rowan, S. J., ... Renneckar, S. (2010). Current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. *J Mater Sci*, 45(1), 1–33.
- Encina, C., Vergara, C., Giménez, B., Oyarzún-Ampuero, F., & Robert, P. (2016). Conventional spray-drying and future trends for the microencapsulation of fish oil. *Trends in Food Science & Technology*, 56, 46–60. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.014>
- Eskandar, N. G., Simovic, S., & Prestidge, C. A. (2007). Synergistic effect of silica nanoparticles and charged surfactants in the formation and stability of submicron oil-in-water emulsions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9(48), 6426–6434.
- Evans, M., Ratcliffe, I., & Williams, P. A. (2013). Emulsion stabilisation using polysaccharide–protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(4), 272–282.
- Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., Chhanwal, N., & Anandharamakrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 628–647.
- Fäldt, P., & Bergenståhl, B. (1996). Spray-dried whey protein/lactose/soybean oil emulsions. 2. Redispersability, wettability and particle structure. *Food Hydrocolloids*, 10(4), 431–439. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(96\)80021-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0268-005X(96)80021-X)
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2012). 4 - Spray drying, freeze drying and related processes for food ingredient and nutraceutical encapsulation. In N. Garti & D. J. McClements (Eds.), *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals* (pp. 73–109). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9780857095909.2.73>
- Faraji, A. H., & Wipf, P. (2009). Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(8), 2950–2962.
- Faraji, H., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2004). Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4558–4564.
- Farias, M. C., Moura, M. L., Andrade, L., & Leão, M. H. M. R. (2007). Encapsulation of the alpha-tocopherol in a glassy food model matrix. *Materials Research*, 10(1), 57–62.
- Favaro-Trindade, C. S., Santana, A. S., Monterrey-Quintero, E. S., Trindade, M. A., & Netto, F. M. (2010). The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 336–340. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.012>
- Feng, Y., & Lee, Y. (2016). Surface modification of zein colloidal particles with sodium caseinate to stabilize oil-in-water pickering emulsion. *Food Hydrocolloids*, 56, 292–302. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.12.030>
- Fennema, O. R., Damodaran, S., & Parkin, K. L. (2010). Food Chemistry of Fennema. *Porto Alegre*, 4, 366–374.
- Fortunati, E., Luzi, F., Puglia, D., Petrucci, R., Kenny, J. M., & Torre, L. (2015). Processing of PLA nanocomposites with cellulose nanocrystals extracted from Posidonia oceanica waste: innovative reuse of coastal plant. *Industrial Crops and Products*, 67, 439–447.

- Fortunati, E., Puglia, D., Monti, M., Peponi, L., Santulli, C., Kenny, J. M., & Torre, L. (2013). Extraction of Cellulose Nanocrystals from Phormium tenax Fibres. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(2), 319–328. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0543-1>
- Fournier, C.-O., Fradette, L., & Tanguy, P. A. (2009). Effect of dispersed phase viscosity on solid-stabilized emulsions. *Chemical Engineering Research and Design*, 87(4), 499–506.
- Frascareli, E. C., Silva, V. M., Tonon, R. V., & Hubinger, M. D. (2012). Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), 413–424. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.002>
- Frelichowska, J., Bolzinger, M.-A., & Chevalier, Y. (2009). Pickering emulsions with bare silica. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 343(1–3), 70–74.
- Frelichowska, J., Bolzinger, M.-A., & Chevalier, Y. (2010). Effects of solid particle content on properties of o/w Pickering emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 351(2), 348–356.
- Friberg, S., Larsson, K., & Sjöblom, J. (2003). *Food emulsions*. CRC Press.
- Fuentes, G., Soto, I., Carrasco, R., Vargas, M., Sabattin, J., & Lagos, C. (2016). Intelligent packaging systems: sensors and nanosensors to monitor food quality and safety. *Journal of Sensors*, 2016.
- Fujisawa, S., Togawa, E., & Kuroda, K. (2017). Nanocellulose-stabilized Pickering emulsions and their applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 18(1), 959–971. <https://doi.org/10.1080/14686996.2017.1401423>
- Fuqua, M. A., Huo, S., & Ulven, C. A. (2012). Natural fiber reinforced composites. *Polymer Reviews*, 52(3), 259–320.
- Galazka, V. B., Dickinson, E., & Ledward, D. A. (2000). Emulsifying properties of ovalbumin in mixtures with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength, heat and high-pressure treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(8), 1219–1229.
- Gan, C.-Y., Cheng, L.-H., & Easa, A. M. (2008). Evaluation of microbial transglutaminase and ribose cross-linked soy protein isolate-based microcapsules containing fish oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), 563–569. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.04.004>
- Gao, H., Duan, B., Lu, A., Deng, H., Du, Y., Shi, X., & Zhang, L. (2018). Fabrication of cellulose nanofibers from waste brown algae and their potential application as milk thickeners. *Food Hydrocolloids*, 79, 473–481. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.01.023>
- Gao, Z.-M., Yang, X.-Q., Wu, N.-N., Wang, L.-J., Wang, J.-M., Guo, J., & Yin, S.-W. (2014). Protein-based pickering emulsion and oil gel prepared by complexes of zein colloidal particles and stearate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(12), 2672–2678.
- García-Moreno, P. J., Pérez-Gálvez, R., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2013). Influence of the parameters of the Rancimat test on the determination of the oxidative stability index of cod liver oil. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 303–308. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.11.002>
- Garg, M. L., Wood, L. G., Singh, H., & Moughan, P. J. (2006). Means of delivering recommended levels of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in human diets. *Journal of Food Science*, 71(5), R66–R71.

- Garside, P., & Wyeth, P. (2003). Identification of cellulosic fibres by FTIR spectroscopy-thread and single fibre analysis by attenuated total reflectance. *Studies in Conservation*, 48(4), 269–275.
- Garti, N., & Bisperink, C. (1998). Double emulsions: progress and applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 3(6), 657–667.
- GEJL-HANSEN, F., & FLINK, J. M. (1977). Freeze-dried carbohydrate containing oil-in-water emulsions: microstructure and fat distribution. *Journal of Food Science*, 42(4), 1049–1055.
- Gennadios, A., McHugh, T. H., Weller, C. L., Krochta, J. M., Krochta, J. M., Baldwin, E. A., & Nisperos-Carriedo, M. O. (1994). Edible coatings and films to improve food quality. *Technomic, New York*, 201–303.
- Georg Menges, Edmund Haberstroh, Walter Michaeli, Ernst Schmachtenberg: *Plastics Materials Science* Hanser Verlag, 2002, ISBN 3-446-21257-4
- Gestranius, M., Stenius, P., Kontturi, E., Sjöblom, J., & Tammelín, T. (2017). Phase behaviour and droplet size of oil-in-water Pickering emulsions stabilised with plant-derived nanocellulosic materials. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 519, 60–70. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.04.025>
- Ghaani, M., Cozzolino, C. A., Castelli, G., & Farris, S. (2016). An overview of the intelligent packaging technologies in the food sector. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 1–11.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40, 1107–1121.
- Gibbs, F., Selim Kermasha, Inteaz Alli, & Mulligan, B. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3), 213–224.
- Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., Gómez-Estaca, J., & Montero, P. (2012). Role of sepiolite in the release of active compounds from gelatin–egg white films. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 475–486.
- Gökmen, V., Mogol, B. A., Lumaga, R. B., Fogliano, V., Kaplun, Z., & Shimoní, E. (2011). Development of functional bread containing nanoencapsulated omega-3 fatty acids. *Journal of Food Engineering*, 105(4), 585–591.
- Goldberg, I. (2012). *Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals*. Springer Science & Business Media.
- Gómez-Estaca, J., Giménez, B., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *Journal of Food Engineering*, 92(1), 78–85. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2008.10.024>
- Gontard, N., Duchez, C., CUQ, J., & Guilbert, S. (1994). Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science & Technology*, 29(1), 39–50.
- González, A., & Igarzabal, C. I. A. (2015). Nanocrystal-reinforced soy protein films and their application as active packaging. *Food Hydrocolloids*, 43, 777–784. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.08.008>
- González, A., Gastelú, G., Barrera, G. N., Ribotta, P. D., & Igarzabal, C. I. Á. (2019). Preparation and characterization of soy protein films reinforced with cellulose nanofibers obtained from soybean

- by-products. *Food Hydrocolloids*, 89, 758–764.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.051>
- González, A., Martínez, M. L., Paredes, A. J., León, A. E., & Ribotta, P. D. (2016). Study of the preparation process and variation of wall components in chia (*Salvia hispanica* L.) oil microencapsulation. *Powder Technology*, 301, 868–875.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2016.07.026>
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7), 330–347.
- Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2012). A method for pomegranate seed application in food industries: Seed oil encapsulation. *Food and Bioprocess Processing*, 90(4), 639–652.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.06.001>
- Grumezescu, A. (2016). *Nutrient Delivery*. Elsevier Science. Retrieved from
<https://books.google.com.ar/books?id=Eox4CgAAQBAJ>
- Gu, X., Campbell, L. J., & Euston, S. R. (2009). Effects of different oils on the properties of soy protein isolate emulsions and gels. *Food Research International*, 42(8), 925–932.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.04.015>
- Guardianelli, L. M., Salinas, M. V, & Puppo, M. C. (2019). Chemical and thermal properties of flours from germinated amaranth seeds. *Journal of Food Measurement and Characterization*.
<https://doi.org/10.1007/s11694-018-00023-1>
- Gülseren, İ., & Corredig, M. (2013). Interactions of chitin nanocrystals with β -lactoglobulin at the oil–water interface, studied by drop shape tensiometry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 672–679. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.06.058>
- Guterres, S. S., Beck, R. C. R., & Pohlmann, A. R. (2009). Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: a brief overview. *Brazilian Journal of Physics*, 39(1A), 205–209.
- Guzey, D., & McClements, D. J. (2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 128, 227–248.
- Habibi, Y., Lucia, L. A., & Rojas, O. J. (2010). Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications. *Chemical Reviews*, 110(6), 3479–3500. <https://doi.org/10.1021/cr900339w>
- Han, J. H. (2014). Edible films and coatings: a review. In *Innovations in Food Packaging (Second Edition)* (pp. 213–255). Elsevier.
- Han, Y., Yu, M., & Wang, L. (2018). Soy protein isolate nanocomposites reinforced with nanocellulose isolated from licorice residue: Water sensitivity and mechanical strength. *Industrial Crops and Products*, 117, 252–259. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.028>
- Hansen, L. T., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y.-L., & Paulson, A. T. (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19(1), 35–45.
- Hasenhuettl, G. L. (2008). Overview of food emulsifiers. In *Food emulsifiers and their applications* (pp. 1–9). Springer.

- Hashaikheh, R., & Abushammala, H. (2011). Acid mediated networked cellulose: Preparation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 83(3), 1088–1094. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.081>
- Hasheminejad, N., Khodaiyan, F., & Safari, M. (2019). Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. *Food Chemistry*, 275, 113–122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.085>
- Hassan, M. L., Mathew, A. P., Hassan, E. A., El-Wakil, N. A., & Oksman, K. (2012). Nanofibers from bagasse and rice straw: process optimization and properties. *Wood Science and Technology*, 46(1), 193–205. <https://doi.org/10.1007/s00226-010-0373-z>
- Hay, M. B. (2007). *Advances in the molecular-scale understanding of geochemical processes: Carboxyl structures in natural organic matter, organosulfur cycling in soils, and the coordination chemistry of aqueous aluminum*. Princeton University.
- Hazwan Hussin, M., Trache, D., Chuin, C. T. H., Nurul Fazita, M. R., Mohamad Haafiz, M. K., & Hossain, M. S. (2019). Extraction of Cellulose Nanofibers and Their Eco-friendly Polymer Composites. In Inamuddin, S. Thomas, R. Kumar Mishra, & A. M. Asiri (Eds.), *Sustainable Polymer Composites and Nanocomposites* (pp. 653–691). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-05399-4_23
- Hedjazi, S., & Razavi, S. H. (2018). A comparison of Canthaxanthine Pickering emulsions, stabilized with cellulose nanocrystals of different origins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 489–497. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.030>
- Heinzelmann, K., & Franke, K. (1999). Using freezing and drying techniques of emulsions for the microencapsulation of fish oil to improve oxidation stability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12(3), 223–229. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(98\)00077-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0927-7765(98)00077-0)
- Heinzelmann, K., Franke, K., Jensen, B., & Haahr, A. (2000). Protection of fish oil from oxidation by microencapsulation using freeze-drying techniques. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102(2), 114–121.
- Heinzelmann, K., Franke, K., Velasco, J., & Márquez-Ruiz, G. (2000). Microencapsulation of fish oil by freeze-drying techniques and influence of process parameters on oxidative stability during storage. *European Food Research and Technology*, 211(4), 234–239. <https://doi.org/10.1007/s002170000167>
- Henriksson, M., Henriksson, G., Berglund, L. A., & Lindström, T. (2007). An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers. *European Polymer Journal*, 43(8), 3434–3441. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.05.038>
- Hillyer, J. F., & Albrecht, R. M. (2001). Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(12), 1927–1936.
- Hoeng, F., Denneulin, A., & Bras, J. (2016). Use of nanocellulose in printed electronics: a review. *Nanoscale*, 8(27), 13131–13154.
- Hojilla-Evangelista, M. P. (2014). Improved Solubility and Emulsification of Wet-Milled Corn Germ Protein Recovered by Ultrafiltration–Diafiltration. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(9), 1623–1631.

- Hopkins, E. J., Chang, C., Lam, R. S. H., & Nickerson, M. T. (2015). Effects of flaxseed oil concentration on the performance of a soy protein isolate-based emulsion-type film. *Food Research International*, 67, 418–425. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.040>
- Hospodarova, V., Singovszka, E., & Stevulova, N. (2018). Characterization of Cellulosic Fibers by FTIR Spectroscopy for Their Further Implementation to Building Materials. *American Journal of Analytical Chemistry*, 9(06), 303.
- Hosseini, S. F., Zandi, M., Rezaei, M., & Farahmandghavi, F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 50–56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.031>
- Hu, K., & McClements, D. J. (2015). Fabrication of biopolymer nanoparticles by antisolvent precipitation and electrostatic deposition: Zein-alginate core/shell nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 44, 101–108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.015>
- Hu, L., Zhang, J., Hu, Q., Gao, N., Wang, S., Sun, Y., & Yang, X. (2016). Microencapsulation of brucea javanica oil: Characterization, stability and optimization of spray drying conditions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 36, 46–54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.09.008>
- Huang, X., Huang, X., Gong, Y., Xiao, H., McClements, D. J., & Hu, K. (2016). Enhancement of curcumin water dispersibility and antioxidant activity using core–shell protein–polysaccharide nanoparticles. *Food Research International*, 87, 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.009>
- Hubbe, M. A., Rojas, O. J., Lucia, L. A., & Sain, M. (2008). Cellulosic nanocomposites: a review. *BioResources*, 3(3), 929–980.
- Hunter, R. J. (2013). *Zeta potential in colloid science: principles and applications* (Vol. 2). Academic press.
- I Ré, M. (1998). MICROENCAPSULATION BY SPRAY DRYING. *Drying Technology*, 16(6), 1195–1236. <https://doi.org/10.1080/07373939808917460>
- Ibarguren, C., Celiz, G., Díaz, A. S., Bertuzzi, M. A., Daz, M., & Audisio, M. C. (2015). Gelatine based films added with bacteriocins and a flavonoid ester active against food-borne pathogens. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 28, 66–72.
- Ifuku, S., Tsuji, M., Morimoto, M., Saimoto, H., & Yano, H. (2009). Synthesis of Silver Nanoparticles Templated by TEMPO-Mediated Oxidized Bacterial Cellulose Nanofibers. *Biomacromolecules*, 10(9), 2714–2717. <https://doi.org/10.1021/bm9006979>
- Iijima, H., & Takeo, K. (2000). Microcrystalline cellulose: an overview. *Handbook of Hydrocolloids*, 331–346.
- Ilyas, R. A., Sapuan, S. M., Ishak, M. R., & Zainudin, E. S. (2019). Sugar palm nanofibrillated cellulose (*Arenga pinnata* (Wurmb.) Merr): Effect of cycles on their yield, physic-chemical, morphological and thermal behavior. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 379–388. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.124>
- Ilyas, R. A., Sapuan, S. M., Ishak, M. R., & Zainudin, E. S. (2018). Development and characterization of sugar palm nanocrystalline cellulose reinforced sugar palm starch bionanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 202, 186–202. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.002>

- Islam, M. T., Alam, M. M., & Zoccola, M. (2013). Review on modification of nanocellulose for application in composites. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol*, 2(10), 5444–5451.
- Isogai, A. (2013). Wood nanocelluloses: fundamentals and applications as new bio-based nanomaterials. *Journal of Wood Science*, 59(6), 449–459.
- Iturriaga, L., Olabarrieta, I., Castellan, A., Gardrat, C., & Coma, V. (2014). Active naringin-chitosan films: Impact of UV irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 110, 374–381. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.03.062>
- Ixtaina, V. Y., Julio, L. M., Wagner, J. R., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2015). Physicochemical characterization and stability of chia oil microencapsulated with sodium caseinate and lactose by spray-drying. *Powder Technology*, 271(0), 26–34. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2014.11.006>
- Jafari, S. M. (2017). *Nanoencapsulation of food bioactive ingredients: principles and applications*. Academic Press.
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., Bhandari, B., & He, Y. (2008). Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Research International*, 41, 172–183.
- Jahanbaani, A. R., Behzad, T., Borhani, S., & Darvanjooghi, M. H. K. (2016). Electrospinning of cellulose nanofibers mat for laminated epoxy composite production. *Fibers and Polymers*, 17(9), 1438–1448.
- Jani, P., Halbert, G. W., LANGRIDGE, J., & Florence, A. T. (1990). Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 42(12), 821–826.
- Jayaraman, K., & Halliwell, R. (2009). Harakeke (phormium tenax) fibre–waste plastics blend composites processed by screwless extrusion. *Composites Part B: Engineering*, 40(7), 645–649.
- Jiménez-Martín, E., Gharsallaoui, A., Pérez-Palacios, T., Ruiz Carrascal, J., & Antequera Rojas, T. (2015). Volatile compounds and physicochemical characteristics during storage of microcapsules from different fish oil emulsions. *Food and Bioprocess Processing*, 96, 52–64. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2015.07.005>
- Jiménez-Martín, E., Gharsallaoui, A., Pérez-Palacios, T., Ruiz Carrascal, J., & Antequera Rojas, T. (2015). Volatile compounds and physicochemical characteristics during storage of microcapsules from different fish oil emulsions. *Food and Bioprocess Processing*, 96, 52–64. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2015.07.005>
- John, M. J., & Thomas, S. (2008). Biofibres and biocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 71(3), 343–364. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.05.040>
- Jones, P. J., & Jew, S. (2007). Functional food development: concept to reality. *Trends in Food Science & Technology*, 18(7), 387–390.
- Joonobi, M., Harun, J., Md Tahir, P., Zaini, L. H., SaifulAzry, S., & Davoodi Makinejad, M. (2010). CHARACTERISTIC OF NANOFIBERS EXTRACTED FROM KENAF CORE. *BioResources; Vol 5, No 4 (2010)*. Retrieved from http://stargate.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_05_4_2556_Jonoobi_HTZAM_1136_Charac_Nanofiber_Kenaf_Core/758

- Julio, L. M., Ixtaina, V. Y., Fernández, M., Torres Sánchez, R. M., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2016). Development and characterization of functional O/W emulsions with chia seed (*Salvia hispanica* L.) by-products. *Journal of Food Science and Technology*, 53(8), 3206–3214. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2295-8>
- Kabalnov, A. S., & Shchukin, E. D. (1992). Ostwald ripening theory: applications to fluorocarbon emulsion stability. *Advances in Colloid and Interface Science*, 38, 69–97.
- Kafle, K., Shin, H., Lee, C. M., Park, S., & Kim, S. H. (2015). Progressive structural changes of Avicel, bleached softwood, and bacterial cellulose during enzymatic hydrolysis. *Scientific Reports*, 5, 15102. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/srep15102>
- Kagami, Y., Sugimura, S., Fujishima, N., Matsuda, K., Kometani, T., & Matsumura, Y. (2003). Oxidative Stability, Structure, and Physical Characteristics of Microcapsules Formed by Spray Drying of Fish Oil with Protein and Dextrin Wall Materials. *Food Engineering and Physical Properties*, 68, 2248–2255.
- Kalashnikova, I., Bizot, H., Bertoncini, P., Cathala, B., & Capron, I. (2013). Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water Pickering emulsions. *Soft Matter*, 9(3), 952–959.
- Kalashnikova, I., Bizot, H., Cathala, B., & Capron, I. (2011). Modulation of cellulose nanocrystals amphiphilic properties to stabilize oil/water interface. *Biomacromolecules*, 13(1), 267–275.
- Kalashnikova, I., Bizot, H., Cathala, B., & Capron, I. (2011). New Pickering emulsions stabilized by bacterial cellulose nanocrystals. *Langmuir*, 27(12), 7471–7479.
- Kanmani, P., & Rhim, J.-W. (2014). Development and characterization of carrageenan/grapefruit seed extract composite films for active packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.011>
- Karaaslan, M., Ozden, M., Vardin, H., & Turkoglu, H. (2011). Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 44(4), 1065–1072.
- Karaca, A. C., Nickerson, M., & Low, N. H. (2013). Microcapsule production employing chickpea or lentil protein isolates and maltodextrin: Physicochemical properties and oxidative protection of encapsulated flaxseed oil. *Food Chemistry*, 139(1), 448–457. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.040>
- Kargar, M., Fayazmanesh, K., Alavi, M., Spyropoulos, F., & Norton, I. T. (2012). Investigation into the potential ability of Pickering emulsions (food-grade particles) to enhance the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 366(1), 209–215. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.09.073>
- Kargarzadeh, H., Mariano, M., Gopakumar, D., Ahmad, I., Thomas, S., Dufresne, A., ... Lin, N. (2018). Advances in cellulose nanomaterials. *Cellulose*, 25(4), 2151–2189. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1723-5>
- Kaschuk, J. J., & Frollini, E. (2018). Effects of average molar weight, crystallinity, and hemicelluloses content on the enzymatic hydrolysis of sisal pulp, filter paper, and microcrystalline cellulose. *Industrial Crops and Products*, 115, 280–289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.011>
- Kasiri, N., & Fathi, M. (2018). Production of cellulose nanocrystals from pistachio shells and their application for stabilizing Pickering emulsions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 1023–1031. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.112>

- Katouzian, I., & Jafari, S. M. (2016). Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. *Trends in Food Science & Technology*, 53, 34–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.05.002>
- Kaushik, P., Dowling, K., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2015). Microencapsulation of omega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods. *Journal of Functional Foods*, 19, 868–881. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2014.06.029>
- Kaya, M., Ravikumar, P., Ilk, S., Mujtaba, M., Akyuz, L., Labidi, J., ... Erkul, S. K. (2018). Production and characterization of chitosan based edible films from *Berberis crataegina*'s fruit extract and seed oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 45, 287–297. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.11.013>
- Keogh, M. K., O'Kennedy, B. T., Kelly, J., Auty, M. A., Kelly, P. M., Fureby, A., & Haahr, A. M. (2001). Stability to Oxidation of Spray-Dried Fish Oil Powder Microencapsulated Using Milk Ingredients. *Journal of Food Science*, 66(2), 217–224. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb11320.x>
- Khalil, H. P. S. A., Ismail, H., Rozman, H. D., & Ahmad, M. N. (2001). The effect of acetylation on interfacial shear strength between plant fibres and various matrices. *European Polymer Journal*, 37(5), 1037–1045.
- Khan, R. S., Grigor, J., Winger, R., & Win, A. (2013). Functional food product development – Opportunities and challenges for food manufacturers. *Trends in Food Science & Technology*, 30(1), 27–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.004>
- Khandelwal, S., Kelly, L., Malik, R., Prabhakaran, D., & Reddy, S. (2013). Impact of omega-6 fatty acids on cardiovascular outcomes: A review. *Journal of Preventive Cardiology*, 2(3), 325–336. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4062196/>
- Kharismi, R. R. A. Y., Sutriyo, H. S., & Suryadi, H. (2018). Preparation and Characterization of Microcrystalline Cellulose Produced from Betung Bamboo (*Dendrocalamus asper*) through Acid Hydrolysis. *Journal of Young Pharmacists*, 10(2), S79.
- Kian, L. K., Jawaid, M., Ariffin, H., & Karim, Z. (2018). Isolation and characterization of nanocrystalline cellulose from roselle-derived microcrystalline cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 54–63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.065>
- Kim, H.-J., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2006). Preparation of multiple emulsions based on thermodynamic incompatibility of heat-denatured whey protein and pectin solutions. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 586–595.
- Kim, H.-W., Choi, Y.-S., Choi, J.-H., Kim, H.-Y., Hwang, K.-E., Song, D.-H., ... Kim, C.-J. (2013). Antioxidant effects of soy sauce on color stability and lipid oxidation of raw beef patties during cold storage. *Meat Science*, 95(3), 641–646.
- Kim, J., Ko, Y., Park, Y.-K., Kim, N.-I., Ha, W.-K., & Cho, Y. (2010). Dietary effect of lactoferrin-enriched fermented milk on skin surface lipid and clinical improvement of acne vulgaris. *Nutrition*, 26(9), 902–909.
- Kim, K. M., Marx, D. B., Weller, C. L., & Hanna, M. A. (2003). Influence of sorghum wax, glycerin, and sorbitol on physical properties of soy protein isolate films. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(1), 71–76.

- Kim, Y. D., & Morr, C. V. (1996). Microencapsulation Properties of Gum Arabic and Several Food Proteins: Spray-Dried Orange Oil Emulsion Particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5), 1314–1320. <https://doi.org/10.1021/jf9503927>
- Kinsella, J. E. (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3Part1), 242–258.
- Klang, V., & Valenta, C. (2011). Lecithin-based nanoemulsions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 21(1), 55–76.
- Klaypradit, W., & Huang, Y.-W. (2008). Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. *LWT-Food Science and Technology*, 41(6), 1133–1139.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(22), 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D., & Dorris, A. (2011). Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(24), 5438–5466.
- Ko, J. K., Kim, Y., Ximenes, E., & Ladisch, M. R. (2015). Effect of liquid hot water pretreatment severity on properties of hardwood lignin and enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(2), 252–262. <https://doi.org/10.1002/bit.25349>
- Kolanowski, W., & Laufenberg, G. (2006). Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition. *European Food Research and Technology*, 222(3–4), 472–477. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0089-8>
- Kolanowski, W., & Laufenberg, G. (2006). Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition. *European Food Research and Technology*, 222(3–4), 472–477.
- Kolanowski, W., & Weißbrodt, J. (2007). Sensory quality of dairy products fortified with fish oil. *International Dairy Journal*, 17(10), 1248–1253.
- Kolanowski, W., Jaworska, D., & Weißbrodt, J. (2007). Importance of instrumental and sensory analysis in the assessment of oxidative deterioration of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid-rich foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(2), 181–191.
- Kotilainen, L., Rajalahti, R., Ragasa, C., & Pehu, E. (2006). Health Enhancing Foods. Opportunities for Strengthening the Sector in Developing Countries. Agriculture and Rural Development. The World Bank. *The World Bank*, 1–33.
- Kowalczyk, D., Kazmierczak, W., Zięba, E., Mężyńska, M., Basiura-Cembala, M., Lisiecki, S., ... Baraniak, B. (2018). Ascorbic acid- and sodium ascorbate-loaded oxidized potato starch films: Comparative evaluation of physicochemical and antioxidant properties. *Carbohydrate Polymers*, 181(Supplement C), 317–326. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.063>
- Kralova, I., & Sjöblom, J. (2009). Surfactants used in food industry: a review. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 30(9), 1363–1383.
- Kralovec, J. A., Zhang, S., Zhang, W., & Barrow, C. J. (2012). A review of the progress in enzymatic concentration and microencapsulation of omega-3 rich oil from fish and microbial sources. *Food Chemistry*, 131(2), 639–644.

- Krishnamachari, P., Hashaikeh, R., & Tiner, M. (2011). Modified cellulose morphologies and its composites; SEM and TEM analysis. *Micron*, 42(8), 751–761.
- Krokida, M. K., & Philippopoulos, C. (2006). Volatility of apples during air and freeze drying. *Journal of Food Engineering*, 73(2), 135–141.
- Kumar, L. R. G., Chatterjee, N. S., Tejpal, C. S., Vishnu, K. V, Anas, K. K., Asha, K. K., ... Mathew, S. (2017). Evaluation of chitosan as a wall material for microencapsulation of squalene by spray drying: Characterization and oxidative stability studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 1986–1995. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.114>
- Kuna, A., & Achinna, P. (2013). Mono unsaturated fatty acids for CVD and diabetes: A healthy choice. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 3(3), 236–248. <https://doi.org/10.4103/2231-0738.114841>
- Kurek, M. A., Moczkowska, M., Pieczykolan, E., & Sobieralska, M. (2018). Barley β -d-glucan – modified starch complex as potential encapsulation agent for fish oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 596–602. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.131>
- Küster-Boluda, I., & Vidal-Capilla, I. (2017). Consumer attitudes in the election of functional foods. *Spanish Journal of Marketing - ESIC*, 21, 65–79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjme.2017.05.002>
- Labuza, T. P. (1970). Water content and stability of low moisture and intermediate moisture foods. *Food Technol*, 24, 543–550.
- Lagarón, J. M., López-Rubio, A., & José Fabra, M. (2016). Bio-based packaging. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(2).
- Lam, R. S. H., & Nickerson, M. T. (2013). Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. *Food Chemistry*, 141(2), 975–984. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.038>
- Lamaming, J., Hashim, R., Sulaiman, O., Leh, C. P., Sugimoto, T., & Nordin, N. A. (2015). Cellulose nanocrystals isolated from oil palm trunk. *Carbohydrate Polymers*, 127, 202–208.
- Lane, K. E., Li, W., Smith, C., & Derbyshire, E. (2014). The bioavailability of an omega-3-rich algal oil is improved by nanoemulsion technology using yogurt as a food vehicle. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(5), 1264–1271.
- Launay, B., Doublier, J. L., & Cuvelier, G. (1986). Functional properties of food macromolecules. *Eds. JR Mitchell and DA Ledward*, 70.
- Lavoine, N., Desloges, I., Dufresne, A., & Bras, J. (2012). Microfibrillated cellulose—Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers*, 90(2), 735–764.
- Lavoine, N., Desloges, I., Dufresne, A., & Bras, J. (2012). Microfibrillated cellulose—Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers*, 90(2), 735–764.
- Le Troedec, M., Sedan, D., Peyratout, C., Bonnet, J. P., Smith, A., Guinebretiere, R., ... Krausz, P. (2008). Influence of various chemical treatments on the composition and structure of hemp fibres. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 39(3), 514–522.

- Lee, G. J., Am Son, H., Cho, J. W., Choi, S. K., Kim, H. T., & Kim, J. W. (2014). Stabilization of Pickering emulsions by generating complex colloidal layers at liquid–liquid interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 413, 100–105.
- Lee, S. Y., Lee, S. J., Choi, D. S., & Hur, S. J. (2015). Current topics in active and intelligent food packaging for preservation of fresh foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(14), 2799–2810.
- Lee, S., Decker, E. A., Faustman, C., & Mancini, R. A. (2005). The effects of antioxidant combinations on color and lipid oxidation in n– 3 oil fortified ground beef patties. *Meat Science*, 70(4), 683–689.
- Lee, S., Faustman, C., Djordjevic, D., Faraji, H., & Decker, E. A. (2006). Effect of antioxidants on stabilization of meat products fortified with n– 3 fatty acids. *Meat Science*, 72(1), 18–24.
- Legako, J., & Dunford, N. T. (2010). Effect of spray nozzle design on fish oil–whey protein microcapsule properties. *Journal of Food Science*, 75(6), E394–E400.
- Li, H., Wang, D., Liu, C., Zhu, J., Fan, M., Sun, X., Cao, Y. (2019). Fabrication of stable zein nanoparticles coated with soluble soybean polysaccharide for encapsulation of quercetin. *Food Hydrocolloids*, 87, 342–351. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.002>
- Li, H., Xu, Y., Sun, X., Wang, S., Wang, J., Zhu, J., Zhao, L. (2018). Stability, bioactivity, and bioaccessibility of fucoxanthin in zein-caseinate composite nanoparticles fabricated at neutral pH by antisolvent precipitation. *Food Hydrocolloids*, 84, 379–388. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.032>
- Li, M.-F., Chen, L., Xu, M.-Z., Zhang, J.-L., Wang, Q., Zeng, Q.-Z., Yuan, Y. (2018). The formation of zein-chitosan complex coacervated particles: Relationship to encapsulation and controlled release properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, 1232–1239. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.107>
- Li, R., Fei, J., Cai, Y., Li, Y., Feng, J., & Yao, J. (2009). Cellulose whiskers extracted from mulberry: A novel biomass production. *Carbohydrate Polymers*, 76(1), 94–99. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.09.034>
- Li, X., & de Vries, R. (2018). Interfacial stabilization using complexes of plant proteins and polysaccharides. *Current Opinion in Food Science*, 21, 51–56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.012>
- Lian, G., Malone, M. E., Homan, J. E., & Norton, I. T. (2004). A mathematical model of volatile release in mouth from the dispersion of gelled emulsion particles. *Journal of Controlled Release*, 98(1), 139–155.
- Limpisophon, K., Tanaka, M., & Osako, K. (2010). Characterisation of gelatin–fatty acid emulsion films based on blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin. *Food Chemistry*, 122(4), 1095–1101.
- Liu, D., Chen, X., Yue, Y., Chen, M., & Wu, Q. (2011). Structure and rheology of nanocrystalline cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 316–322. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.039>
- Liu, F., & Tang, C.-H. (2016). Soy glycinin as food-grade Pickering stabilizers: Part. I. Structural characteristics, emulsifying properties and adsorption/arrangement at interface. *Food Hydrocolloids*, 60, 606–619. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.025>
- Liu, S., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2010). Entrapment of flaxseed oil within gelatin-gum arabic capsules. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(7), 809–815.

- Liu, X.-D., Atarashi, T., Furuta, T., Yoshii, H., Aishima, S., Ohkawara, M., & Linko, P. (2001). Microencapsulation of emulsified hydrophobic flavors by spray drying. *Drying Technology*, 19(7), 1361–1374.
- Liu, Y., & Kim, H.-J. (2017). Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and simple algorithm analysis for rapid and non-destructive assessment of developmental cotton fibers. *Sensors*, 17(7), 1469.
- Liu, Z., Zhou, J., Zeng, Y., & Ouyang, X. (2004). The enhancement and encapsulation of *Agaricus bisporus* flavor. *Journal of Food Engineering*, 65(3), 391–396.
- Löbmann, K., & Svagan, A. J. (2017). Cellulose nanofibers as excipient for the delivery of poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 533(1), 285–297. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.064>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Long, L., Tian, D., Hu, J., Wang, F., & Saddler, J. (2017). A xylanase-aided enzymatic pretreatment facilitates cellulose nanofibrillation. *Bioresource Technology*, 243, 898–904. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.037>
- Lopez-Rubio, A. (2011). Bioactive food packaging strategies. In *Multifunctional and Nanoreinforced Polymers for Food Packaging* (pp. 460–482). Elsevier.
- Lu, X., Zhang, H., Li, Y., & Huang, Q. (2018). Fabrication of milled cellulose particles-stabilized Pickering emulsions. *Food Hydrocolloids*, 77, 427–435.
- Luo, L.-J., Liu, F., & Tang, C.-H. (2013). The role of glycinin in the formation of gel-like soy protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 97–105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.031>
- Luyten, H., Jonkman, M., Klok, W., & Van Vliet, T. (1993). Creaming Behaviour of Dispersed. *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties*, 113, 224.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66(3), 506–577.
- Macosko, C. W., & Mewis, J. (1994). Suspension Rheology.
- Madivala, B., Vandebril, S., Fransaer, J., & Vermant, J. (2009). Exploiting particle shape in solid stabilized emulsions. *Soft Matter*, 5(8), 1717–1727.
- Malhotra, A., & Coupland, J. N. (2004). The effect of surfactants on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 18(1), 101–108. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00047-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00047-X)
- Mancuso, J. R., McClements, D. J., & Decker, E. A. (1999). The Effects of Surfactant Type, pH, and Chelators on the Oxidation of Salmon Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4112–4116. <https://doi.org/10.1021/jf990203a>
- Mancuso, J. R., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Iron-accelerated cumene hydroperoxide decomposition in hexadecane and trilaurin emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 213–219.

- Mandal, A., & Chakrabarty, D. (2011). Isolation of nanocellulose from waste sugarcane bagasse (SCB) and its characterization. *Carbohydrate Polymers*, 86(3), 1291–1299.
- Maniglia, B. C., Domingos, J. R., de Paula, R. L., & Tapia-Blácido, D. R. (2014). Development of bioactive edible film from turmeric dye solvent extraction residue. *LWT - Food Science and Technology*, 56(2), 269–277. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2013.12.011>
- Mariano, M., El Kissi, N., & Dufresne, A. (2014). Cellulose nanocrystals and related nanocomposites: review of some properties and challenges. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 52(12), 791–806.
- Martelli, S. M., Motta, C., Caon, T., Alberton, J., Bellettini, I. C., do Prado, A. C. P., ... Soldi, V. (2017). Edible carboxymethyl cellulose films containing natural antioxidant and surfactants: α -tocopherol stability, in vitro release and film properties. *LWT-Food Science and Technology*, 77, 21–29.
- Martin, L., Di Giorgio, L., Salgado P.R., Mauri, A.N. (2018). Desarrollo de películas en base a proteínas de soja y nanocristales de celulosa activadas con aceite esencial de clavo para prolongar la vida útil de filetes de pescado. Tesis final de grado. Universidad Nacional de La Plata, 111 págs.
- Martucci, J. F., Gende, L. B., Neira, L. M., & Ruseckaite, R. A. (2015). Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Industrial Crops and Products*, 71, 205–213. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.03.079>
- Masalova, I., Foudazi, R., & Malkin, A. Y. (2011). The rheology of highly concentrated emulsions stabilized with different surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 375(1–3), 76–86.
- Mascheroni, E., Chalier, P., Gontard, N., & Gastaldi, E. (2010). Designing of a wheat gluten/montmorillonite based system as carvacrol carrier: Rheological and structural properties. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 406–413.
- Masters, K. (1991). Spray drying handbook, 5th edn, Harlow, UK.
- Mateos-Aparicio, I., Redondo Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M. J., & Zapata-Revilla, M. A. (2008). Soybean, a promising health source. *Nutricion Hospitalaria*, 23(4).
- Matsuno, R., & Adachi, S. (1993). Lipid encapsulation technology-techniques and applications to food. *Trends in Food Science & Technology*, 4(8), 256–261.
- McClements, D. J. (2004). Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(5), 305–313. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.09.003>
- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8(6), 1719–1729. <https://doi.org/10.1039/c2sm06903b>
- McClements, D. J. (2014). *Nanoparticle-and microparticle-based delivery systems: Encapsulation, protection and release of active compounds*. CRC Press.
- McClements, D. J. (2015). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press.
- McClements, D. J. (2015). Reduced-Fat Foods: The Complex Science of Developing Diet-Based Strategies for Tackling Overweight and Obesity—. *Advances in Nutrition*, 6(3), 338S–352S.

- McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. *Journal of Food Science*, 65(8), 1270–1282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10596.x>
- McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components. *Journal of Food Science*, 72(8), R109–R124. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x>
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., & Weiss, J. (2009). Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(6), 577–606.
- Mendanha, D. V., Molina Ortiz, S. E., Favaro-Trindade, C. S., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E. S., & Thomazini, M. (2009). Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International*, 42(8), 1099–1104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.007>
- Menrad, K. (2004). Innovations in the food industry in Germany. *Research Policy*, 33(6–7), 845–878.
- Michell, A. J., & Higgins, H. G. (2002). Infrared spectroscopy in Australian forest products research. *CSIRO Forestry*.
- Millone, M. V., Olagnero, G. F., & Santana, E. C. (2011). Alimentos funcionales: análisis de la recomendación en la práctica diaria. *Diaeta*, 29(134), 7–15.
- Miranda, L. T., Rakovski, C., & Were, L. M. (2012). Effect of Maillard reaction products on oxidation products in ground chicken breast. *Meat Science*, 90(2), 352–360.
- Miriam, de S. L. M., & Redouane, B. (2004). Rodlike Cellulose Microcrystals: Structure, Properties, and Applications. *Macromolecular Rapid Communications*, 25(7), 771–787. <https://doi.org/doi:10.1002/marc.200300268>
- Mis Solval, K., Bankston, J. D., Bechtel, P. J., & Sathivel, S. (2016). Physicochemical Properties of Microencapsulated ω -3 Salmon Oil with Egg White Powder. *Journal of Food Science*, 81(3), E600–E609. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13228>
- Mishra, R. K., Ha, S. K., Verma, K., & Tiwari, S. K. (2018). Recent progress in selected bio-nanomaterials and their engineering applications: An overview. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 3(3), 263–288. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2018.05.003>
- Mishra, R. K., Sabu, A., & Tiwari, S. K. (2018). Materials chemistry and the futurist eco-friendly applications of nanocellulose: Status and prospect. *Journal of Saudi Chemical Society*, 22(8), 949–978. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jscs.2018.02.005>
- Mishra, S., Kharkar, P. S., & Pethe, A. M. (2018). Biomass and waste materials as potential sources of nanocrystalline cellulose: Comparative review of preparation methods (2016-Till date). *Carbohydrate Polymers*.
- Missoum, K., Belgacem, M., & Bras, J. (2013). Nanofibrillated cellulose surface modification: a review. *Materials*, 6(5), 1745–1766.
- Mohanty, A. K., Liu, W., Tummala, P., Drzal, L. T., Misra, M., & Narayan, R. (2005). Soy protein-based plastics, blends, and composites. *Natural Fibers, Biopolymers and Their Biocomposites*. CRC Press Books: Boca Raton, FL.

- Mohd, N. H., Ismail, N. F. H., Zahari, J. I., Fathilah, W., Kargarzadeh, H., Ramli, S., ... Othaman, R. (2016). Effect of aminosilane modification on nanocrystalline cellulose properties. *Journal of Nanomaterials*, 2016.
- Monedero, F. M., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2009). Effect of oleic acid–beeswax mixtures on mechanical, optical and water barrier properties of soy protein isolate based films. *Journal of Food Engineering*, 91(4), 509–515. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.09.034](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.09.034)
- Montanari, S., Roumani, M., Heux, L., & Vignon, M. R. (2005). Topochemistry of Carboxylated Cellulose Nanocrystals Resulting from TEMPO-Mediated Oxidation. *Macromolecules*, 38(5), 1665–1671. <https://doi.org/10.1021/ma048396c>
- Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., & Youngblood, J. (2011). Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, 40(7), 3941–3994. <https://doi.org/10.1039/C0CS00108B>
- Morgado, J., Cavaco-Paulo, A., & Rousselle, M.-A. (2000). Enzymatic treatment of lyocell—clarification of depilling mechanisms. *Textile Research Journal*, 70(8), 696–699.
- Morr, C. V. (1982). Recalculated Nitrogen Conversion Factors for Several Soybean Protein Products. *Journal of Food Science*, 47(5), 1751–1752. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1982.tb05032.x>
- Muhamad, I. I., Salehudin, M. H., & Salleh, E. (2015). Cellulose nanofiber for eco-friendly polymer nanocomposites. In *Eco-friendly polymer nanocomposites* (pp. 323–365). Springer.
- Naahidi, S., Jafari, M., Edalat, F., Raymond, K., Khademhosseini, A., & Chen, P. (2013). Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 166(2), 182–194.
- Nacos, M. K., Katapodis, P., Pappas, C., Daferera, D., Tarantilis, P. A., Christakopoulos, P., & Polissiou, M. (2006). Kenaf xylan—a source of biologically active acidic oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 66(1), 126–134.
- Naik, A., Meda, V., & Lele, S. S. (2014). Freeze drying for microencapsulation of α -linolenic acid rich oil: A functional ingredient from *Lepidium sativum* seeds. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(7), 837–846. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300305>
- Nakagaito, A. N., & Yano, H. (2004). The effect of morphological changes from pulp fiber towards nano-scale fibrillated cellulose on the mechanical properties of high-strength plant fiber based composites. *Applied Physics A*, 78(4), 547–552.
- Nakagawa, K., Surassmo, S., Min, S.-G., & Choi, M.-J. (2011). Dispersibility of freeze-dried poly (epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by gelatin and the effect of freezing. *Journal of Food Engineering*, 102(2), 177–188.
- Nascimento, D. M., Almeida, J. S., Dias, A. F., Figueirêdo, M. C. B., Morais, J. P. S., Feitosa, J. P. A., & Rosa, M. de F. (2014). A novel green approach for the preparation of cellulose nanowhiskers from white coir. *Carbohydrate Polymers*, 110, 456–463. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.053>
- Nasrin, T. A. A., & Anal, A. K. (2014). Resistant starch III from culled banana and its functional properties in fish oil emulsion. *Food Hydrocolloids*, 35, 403–409.
- Nasrin, T. A. A., & Anal, A. K. (2015). Enhanced oxidative stability of fish oil by encapsulating in culled banana resistant starch-soy protein isolate based microcapsules in functional bakery products. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 5120–5128.

- Nesterenko, A., Drelich, A., Lu, H., Clause, D., & Pezron, I. (2014). Influence of a mixed particle/surfactant emulsifier system on water-in-oil emulsion stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 457, 49–57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.05.044>
- Newman, R. H., Clauss, E. C., Carpenter, J. E. P., & Thumm, A. (2007). Epoxy composites reinforced with deacetylated Phormium tenax leaf fibres. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 38(10), 2164–2170.
- Newman, R. H., Le Guen, M. J., Battley, M. A., & Carpenter, J. E. P. (2010). Failure mechanisms in composites reinforced with unidirectional Phormium leaf fibre. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 41(3), 353–359.
- Ng, H.-M., Sin, L. T., Tee, T.-T., Bee, S.-T., Hui, D., Low, C.-Y., & Rahmat, A. R. (2015). Extraction of cellulose nanocrystals from plant sources for application as reinforcing agent in polymers. *Composites Part B: Engineering*, 75, 176–200. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2015.01.008>
- Nicolai, T., & Murray, B. (2017). Particle stabilized water in water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 68, 157–163.
- Nie, S., Zhang, K., Lin, X., Zhang, C., Yan, D., Liang, H., & Wang, S. (2018). Enzymatic pretreatment for the improvement of dispersion and film properties of cellulose nanofibrils. *Carbohydrate Polymers*, 181, 1136–1142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.020>
- Nijdam, J. J., & Langrish, T. A. G. (2006). The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. *Journal of Food Engineering*, 77(4), 919–925. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.08.020>
- Nishinari, K., Fang, Y., Guo, S., & Phillips, G. O. (2014). Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids*, 39, 301–318. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.013>
- Nishinari, K., Fang, Y., Guo, S., & Phillips, G. O. (2014). Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids*, 39, 301–318.
- Niu, X., Liu, Y., Song, Y., Han, J., & Pan, H. (2018). Rosin modified cellulose nanofiber as a reinforcing and co-antimicrobial agents in polylactic acid /chitosan composite film for food packaging. *Carbohydrate Polymers*, 183, 102–109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.079>
- Norton, I. T., & Frith, W. J. (2001). Microstructure design in mixed biopolymer composites. *Food Hydrocolloids*, 15(4–6), 543–553.
- Norton, I. T., Frith, W. J., & Ablett, S. (2006). Fluid gels, mixed fluid gels and satiety. *Food Hydrocolloids*.
- Novaes, E., Kirst, M., Chiang, V., Winter-Sederoff, H., & Sederoff, R. (2010). Lignin and biomass: a negative correlation for wood formation and lignin content in trees. *Plant Physiology*, 154(2), 555–561.
- O'Dwyer, S. P., O'Beirne, D., Eidhin, D. N., Hennessy, A. A., & O'Kennedy, B. T. (2013). Formation, rheology and susceptibility to lipid oxidation of multiple emulsions (O/W/O) in table spreads containing omega-3 rich oils. *LWT-Food Science and Technology*, 51(2), 484–491.
- Oetjen, G.-W., & Haseley, P. (2004). *Freeze-drying*. John Wiley & Sons.

- Ohwoavworhua, F. O., Adelakun, T. A., & Okhamafe, A. O. (2009). Processing pharmaceutical grade microcrystalline cellulose from groundnut husk: Extraction methods and characterization. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, 3(2).
- Ortiz, C. M., Salgado, P. R., Dufresne, A., & Mauri, A. N. (2018). Microfibrillated cellulose addition improved the physicochemical and bioactive properties of biodegradable films based on soy protein and clove essential oil. *Food Hydrocolloids*.
- Ortiz, C. (2015). Estrategias para mejorar la funcionalidad y aplicabilidad de películas en base a proteínas de soja. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, 243 págs.
- Otoni, C. G., Lodi, B. D., Lorevice, M. V., Leitão, R. C., Ferreira, M. D., de Moura, M. R., & Mattoso, L. H. C. (2018). Optimized and scaled-up production of cellulose-reinforced biodegradable composite films made up of carrot processing waste. *Industrial Crops and Products*, 121, 66–72. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.003>
- Ouattara, B., Simard, R. E., Piette, G., Bégin, A., & Holley, R. A. (2000). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1), 139–148.
- Ozturk, B., & McClements, D. J. (2016). Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Current Opinion in Food Science*, 7, 1–6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.008>
- Pääkkö, M., Ankerfors, M., Kosonen, H., Nykänen, A., Ahola, S., Österberg, M., ... Ikkala, O. (2007). Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. *Biomacromolecules*, 8(6), 1934–1941.
- Palazolo, G. G., Sorgentini, D. A., & Wagner, J. R. (2004). Emulsifying properties and surface behavior of native and denatured whey soy proteins in comparison with other proteins. Creaming stability of oil-in-water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(7), 625–632. <https://doi.org/10.1007/s11746-004-953-0>
- Panaiteescu, D. M., Frone, A. N., & Nicolae, C. (2013). Micro-and nano-mechanical characterization of polyamide 11 and its composites containing cellulose nanofibers. *European Polymer Journal*, 49(12), 3857–3866.
- Pappas, C., Tarantilis, P. A., Daliani, I., Mavromoustakos, T., & Polissiou, M. (2002). Comparison of classical and ultrasound-assisted isolation procedures of cellulose from kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) and eucalyptus (*Eucalyptus rostratus* Sm.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 9(1), 19–23.
- Pappu, A., Patil, V., Jain, S., Mahindrakar, A., Haque, R., & Thakur, V. K. (2015). Advances in industrial prospective of cellulosic macromolecules enriched banana biofibre resources: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 449–458.
- Park, S., Baker, J. O., Himmel, M. E., Parilla, P. A., & Johnson, D. K. (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*, 3, 10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-10>
- Partanen, R., Hakala, P., Sjövall, O., Kallio, H., & Forssell, P. (2005). Effect of Relative Humidity on the Oxidative Stability of Microencapsulated Sea Buckthorn Seed Oil. *Journal of Food Science*, 70(1), E37–E43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09035.x>

- Pasquini, D., de Moraes Teixeira, E., da Silva Curvelo, A. A., Belgacem, M. N., & Dufresne, A. (2010). Extraction of cellulose whiskers from cassava bagasse and their applications as reinforcing agent in natural rubber. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 486–490.
- Patino, J. M. R., & Pilosof, A. M. R. (2011). Protein–polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1925–1937. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.023>
- Pavlath, A. E., & Orts, W. (2009). Edible Films and Coatings: Why, What, and How?, Edilbe Films and Coatings for Food Applications, Embuscado, ME, Huber, K. New York, Springer.
- Pelissari, F. M., Andrade-Mahecha, M. M., do Amaral Sobral, P. J., & Menegalli, F. C. (2017). Nanocomposites based on banana starch reinforced with cellulose nanofibers isolated from banana peels. *Journal of Colloid and Interface Science*, 505, 154–167. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.05.106>
- Pelissari, F. M., Grossmann, M. V. E., Yamashita, F., & Pineda, E. A. G. (2009). Antimicrobial, Mechanical, and Barrier Properties of Cassava Starch–Chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7499–7504. <https://doi.org/10.1021/jf9002363>
- Peng, F., Peng, P., Xu, F., & Sun, R.-C. (2012). Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology Advances*, 30(4), 879–903.
- Peng, Y., Wu, Y., & Li, Y. (2013). Development of tea extracts and chitosan composite films for active packaging materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.IJBIOMAC.2013.04.019>
- Penttilä, P. A., Várnai, A., Pere, J., Tammelin, T., Salmén, L., Siika-aho, M., ... Serimaa, R. (2013). Xylan as limiting factor in enzymatic hydrolysis of nanocellulose. *Bioresource Technology*, 129, 135–141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.017>
- Pereda, M., Amica, G., Rácz, I., & Marcovich, N. E. (2011). Structure and properties of nanocomposite films based on sodium caseinate and nanocellulose fibers. *Journal of Food Engineering*, 103(1), 76–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.10.001>
- Pereda, M., Aranguren, M. I., & Marcovich, N. E. (2010). Effect of crosslinking on the properties of sodium caseinate films. *Journal of Applied Polymer Science*, 116(1), 18–26.
- Pereda, M., Dufresne, A., Aranguren, M. I., & Marcovich, N. E. (2014). Polyelectrolyte films based on chitosan/olive oil and reinforced with cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 101, 1018–1026.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De la Rubia, T., & Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5(2), 53–63.
- Pérez-Gago, M. B. (2012). Protein-based films and coatings. *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*, 13–77.
- Pérez-Gago, M. B., & Krochta, J. M. (2001). Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 996–1002.
- Pérez-Mateos, M., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Formulation and stability of biodegradable films made from cod gelatin and sunflower oil blends. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 53–61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.11.011>

- Petersson, L., & Oksman, K. (2006). Biopolymer based nanocomposites: comparing layered silicates and microcrystalline cellulose as nanoreinforcement. *Composites Science and Technology*, 66(13), 2187–2196.
- Petersson, L., Kvien, I., & Oksman, K. (2007). Structure and thermal properties of poly(lactic acid)/cellulose whiskers nanocomposite materials. *Composites Science and Technology*, 67(11), 2535–2544. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2006.12.012>
- Pichot, R., Watson, R., & Norton, I. (2013). Phospholipids at the interface: current trends and challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11767–11794.
- Pickering, S. U. (1907). Emulsions. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 91, 2001–2021.
- Piermaria, J., Diosma, G., Aquino, C., Garrote, G., & Abraham, A. (2015). Edible kefir films as vehicle for probiotic microorganisms. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 32, 193–199.
- Ponginebbi, L., & Publisi, C. (2008). Coating for oxygen sensitive materials. *EP1920633 & US2008112987*.
- Popescu, M.-C., Dogaru, B.-I., Goanta, M., & Timpu, D. (2018). Structural and morphological evaluation of CNC reinforced PVA/Starch biodegradable films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, 385–393. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.036>
- Pothakamury, U. R., & Barbosa-Cánovas, G. V. (1995). Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 6(12), 397–406.
- Premi, M., & Sharma, H. K. (2017). Effect of different combinations of maltodextrin, gum arabic and whey protein concentrate on the encapsulation behavior and oxidative stability of spray dried drumstick (*Moringa oleifera*) oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1232–1240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.160>
- Qazanfarzadeh, Z., & Kadivar, M. (2016). Properties of whey protein isolate nanocomposite films reinforced with nanocellulose isolated from oat husk. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 1134–1140. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.077>
- Qi, F., Wu, J., Sun, G., Nan, F., Ngai, T., & Ma, G. (2014). Systematic studies of Pickering emulsions stabilized by uniform-sized PLGA particles: preparation and stabilization mechanism. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(43), 7605–7611.
- Quispe-Condori, S., Saldaña, M. D. A., & Temelli, F. (2011). Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. *LWT - Food Science and Technology*, 44(9), 1880–1887. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.01.005>
- Rafieian, F., Shahedi, M., Keramat, J., & Simonsen, J. (2014). Mechanical, thermal and barrier properties of nano-biocomposite based on gluten and carboxylated cellulose nanocrystals. *Industrial Crops and Products*, 53, 282–288. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.016>
- Rahman, M. S., & Labuza, T. P. (1999). Water activity and food preservation. *Handbook of Food Preservation*, 339–382.
- Rascón, M. P., Beristain, C. I., García, H. S., & Salgado, M. A. (2011). Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and Soy protein isolate as wall materials. *LWT - Food Science and Technology*, 44(2), 549–557. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.08.021>

- Raybaudi-Massilia, R. M., & Mosqueda-Melgar, J. (2012). Polysaccharides as Carriers and Protectors of Additives and Bioactive Compounds in Foods. In D. N. Karunaratne (Ed.), *The Complex World of Polysaccharides* (p. Ch. 16). Rijeka: InTech. <https://doi.org/10.5772/50206>
- Rayner, M., Marku, D., Eriksson, M., Sjöö, M., Dejmek, P., & Wahlgren, M. (2014). Biomass-based particles for the formulation of Pickering type emulsions in food and topical applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 458, 48–62. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.03.053>
- Reddy, J. P., & Rhim, J.-W. (2014). Characterization of bionanocomposite films prepared with agar and paper-mulberry pulp nanocellulose. *Carbohydrate Polymers*, 110, 480–488. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.056>
- Rha, C., & Pradipasena, P. (1986). Viscosity of proteins. *Functional Properties of Food Macromolecules*, 79–120.
- Rhim, J.-W., Park, H.-M., & Ha, C.-S. (2013). Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*, 38(10), 1629–1652.
- Roberfroid, M. B. (2000). Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6), 1660S–1664S.
- Robertson, G. L. (2012). *Food Packaging: Principles and Practice*. CRC Press.
- Rol, F., Belgacem, M. N., Gandini, A., & Bras, J. (2019). Recent advances in surface-modified cellulose nanofibrils. *Progress in Polymer Science*, 88, 241–264. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.09.002>
- Rosa, I. M. De, Santulli, C., & Sarasini, F. (2010). Mechanical and thermal characterization of epoxy composites reinforced with random and quasi-unidirectional untreated Phormium tenax leaf fibers. *Materials & Design (1980-2015)*, 31(5), 2397–2405. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matdes.2009.11.059>
- Rosenberg, M., Talmon, Y., & Kopelman, I. J. (1988). The microstructure of spray-dried microcapsules. *Food Structure*, 7(1), 14.
- Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., Sara, M., Sanz, M. T., & Carballido, J. R. (2010). Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 1–12.
- Rümler, K., & Jacob, M. (1998). Continuous coating in fluidized bed. *Food Market Technology*, 12, 41–43.
- Rusli, J. K., Sanguansri, L., & Augustin, M. A. (2006). Stabilization of oils by microencapsulation with heated protein-glucose syrup mixtures. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(11), 965–972. <https://doi.org/10.1007/s11746-006-5054-6>
- Ruxton, C. H. S., Reed, S. C., Simpson, M. J. A., & Millington, K. J. (2004). The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 17(5), 449–459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-277X.2004.00552.x>
- Saelee, K., Yingkamhaeng, N., Nimchua, T., & Sukyai, P. (2016). An environmentally friendly xylanase-assisted pretreatment for cellulose nanofibrils isolation from sugarcane bagasse by high-pressure homogenization. *Industrial Crops and Products*, 82, 149–160. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.064>

- Saito, T., & Isogai, A. (2004). TEMPO-Mediated Oxidation of Native Cellulose. The Effect of Oxidation Conditions on Chemical and Crystal Structures of the Water-Insoluble Fractions. *Biomacromolecules*, 5(5), 1983–1989. <https://doi.org/10.1021/bm0497769>
- Saito, T., Nishiyama, Y., Putaux, J. L., Vignon, M., & Isogai, A. (2006). Homogeneous suspensions of individualized microfibrils from TEMPO-catalyzed oxidation of native cellulose. *Biomacromolecules*, 7(6), 1687–1691. <https://doi.org/10.1021/bm060154s>
- Salgado, P. R., Di Giorgio, L., Musso, Y. S., & Mauri, A. N. (2019). Bioactive Packaging: Combining Nanotechnologies With Packaging for Improved Food Functionality. In *Nanomaterials for Food Applications* (pp. 233–270). Elsevier.
- Salgado, P. (2010). Proteínas de Girasol: aislamiento, caracterización y aplicación en la industria alimentaria. . Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, 234 págs.
- Salgado P.R., Molina Ortiz S.E., Denavi G.A, Bosch M.A., Añón, M.C., y Mauri, A.N. (2018). Influence of protein conformation on the properties of soybean protein edible films". En "Soy-Based Bioplastics", editado por Kumar Thakur, V., Kumari Thakur, M., and Kessler, M.R., publicado por UK Publisher. ISBN: 9781910242223.Publisher. 2017. 75-98
- Salgado, P. R., Fernández, G. B., Drago, S. R., & Mauri, A. N. (2011). Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1433–1440.
- Salgado, P. R., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N., & Montero, M. P. (2013). Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 74–84. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.008>
- Salgado, P. R., Ortiz, C. M., Musso, Y. S., Di Giorgio, L., & Mauri, A. N. (2015). Edible films and coatings containing bioactives. *Current Opinion in Food Science*, 5, 86–92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.09.004>
- Sanchez-Garcia, M. D., Gimenez, E., & Lagarón, J. M. (2008). Morphology and barrier properties of solvent cast composites of thermoplastic biopolymers and purified cellulose fibers. *Carbohydrate Polymers*, 71(2), 235–244.
- Sánchez-Navarro, M. M., Cuesta-Garrote, N., Arán-Aís, F., & Orgilés-Barceló, C. (2011). Microencapsulation of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil as biocide for footwear applications. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 32(12), 1722–1727.
- Sarkar, A., Juan, J.-M., Kolodziejczyk, E., Acquistapace, S., Donato-Capel, L., & Wooster, T. J. (2015). Impact of protein gel porosity on the digestion of lipid emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(40), 8829–8837.
- Sarkar, A., Li, H., Cray, D., & Boxall, S. (2017). Composite whey protein–cellulose nanocrystals at oil-water interface: Towards delaying lipid digestion. *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.020>
- Sarkar, A., Murray, B., Holmes, M., Ettelaie, R., Abdalla, A., & Yang, X. (2016). In vitro digestion of Pickering emulsions stabilized by soft whey protein microgel particles: influence of thermal treatment. *Soft Matter*, 12(15), 3558–3569.

- Sarkar, A., Zhang, S., Murray, B., Russell, J. A., & Boxal, S. (2017). Modulating in vitro gastric digestion of emulsions using composite whey protein-cellulose nanocrystal interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 158, 137–146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.037>
- Satyamurthy, P., Jain, P., Balasubramanya, R. H., & Vigneshwaran, N. (2011). Preparation and characterization of cellulose nanowhiskers from cotton fibres by controlled microbial hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 83(1), 122–129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.029>
- Savadekar, N. R., & Mhaske, S. T. (2012). Synthesis of nano cellulose fibers and effect on thermoplastics starch based films. *Carbohydrate Polymers*, 89(1), 146–151.
- Savadekar, N. R., Karande, V. S., Vigneshwaran, N., Bharimalla, A. K., & Mhaske, S. T. (2012). Preparation of nano cellulose fibers and its application in kappa-carrageenan based film. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), 1008–1013. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.014>
- Sbiai, A., Kaddami, H., Sautereau, H., Maazouz, A., & Fleury, E. (2011). TEMPO-mediated oxidation of lignocellulosic fibers from date palm leaves. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1445–1450. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.005>
- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., & Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(8), 689–753.
- Schwingshackl, L., & Hoffmann, G. (2012). Monounsaturated Fatty Acids and Risk of Cardiovascular Disease: Synopsis of the Evidence Available from Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Nutrients*, 4(12), 1989–2007. <https://doi.org/10.3390/nu4121989>
- Schwingshackl, L., & Hoffmann, G. (2014). Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Lipids in Health and Disease*, 13(1), 154. <https://doi.org/10.1186/1476-511x-13-154>
- Semenova, M. (2017). Protein–polysaccharide associative interactions in the design of tailor-made colloidal particles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 28, 15–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.12.003>
- Serfert, Y., Drusch, S., & Schwarz, K. (2009). Chemical stabilisation of oils rich in long-chain polyunsaturated fatty acids during homogenisation, microencapsulation and storage. *Food Chemistry*, 113(4), 1106–1112. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.079>
- Serfert, Y., Drusch, S., & Schwarz, K. (2009). Chemical stabilisation of oils rich in long-chain polyunsaturated fatty acids during homogenisation, microencapsulation and storage. *Food Chemistry*, 113(4), 1106–1112. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.079>
- Sgriccia, N., Hawley, M. C., & Misra, M. (2008). Characterization of natural fiber surfaces and natural fiber composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 39(10), 1632–1637.
- Shabanpour, B., Kazemi, M., Ojagh, S. M., & Pourashouri, P. (2018). Bacterial cellulose nanofibers as reinforce in edible fish myofibrillar protein nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 742–751. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.038>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2010). Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(9), 930–940.

- Shao, Y., & Tang, C.-H. (2014). Characteristics and oxidative stability of soy protein-stabilized oil-in-water emulsions: Influence of ionic strength and heat pretreatment. *Food Hydrocolloids*, 37, 149–158. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.030>
- Sharma, R. (2005). Market trends and opportunities for functional dairy beverages. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60(2), 195.
- Shaw, L. A., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2007). Spray-Dried Multilayered Emulsions as a Delivery Method for ω -3 Fatty acids into Food Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 3112–3119. <https://doi.org/10.1021/jf063068s>
- Shaw, L. A., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2007). Spray-Dried Multilayered Emulsions as a Delivery Method for ω -3 Fatty acids into Food Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 3112–3119. <https://doi.org/10.1021/jf063068s>
- Sheltami, R. M., Abdullah, I., Ahmad, I., Dufresne, A., & Kargarzadeh, H. (2012). Extraction of cellulose nanocrystals from mengkuang leaves (*Pandanus tectorius*). *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 772–779. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.062>
- Shen, Z., Augustin, M. A., Sanguansri, L., & Cheng, L. J. (2010). Oxidative stability of microencapsulated fish oil powders stabilized by blends of chitosan, modified starch, and glucose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4487–4493.
- Sherman, P. (1970). Industrial rheology with particular reference to foods, pharmaceuticals, and cosmetics. *Industrial Rheology with Particular Reference to Foods, Pharmaceuticals, and Cosmetics*.
- Sherman, P. (1970). Industrial rheology.
- Sheu, T., & Rosenberg, M. (1995). Microencapsulation by spray drying ethyl caprylate in whey protein and carbohydrate wall systems. *Journal of Food Science*, 60(1), 98–103.
- Shi, J., Shi, S. Q., Barnes, H. M., & Pittman Jr, C. U. (2011). A chemical process for preparing cellulosic fibers hierarchically from kenaf bast fibers. *BioResources*, 6(1), 879–890.
- Silva, E. K., Azevedo, V. M., Cunha, R. L., Hubinger, M. D., & Meireles, M. A. A. (2016). Ultrasound-assisted encapsulation of annatto seed oil: Whey protein isolate versus modified starch. *Food Hydrocolloids*, 56, 71–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.12.006>
- Silva, K. A., Coelho, M. A. Z., Calado, V. M. A., & Rocha-Leão, M. H. M. (2013). Olive oil and lemon salad dressing microencapsulated by freeze-drying. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 569–574. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.005>
- Silvestre, M. P. C., Chaiyasit, W., Brannan, R. G., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Ability of surfactant headgroup size to alter lipid and antioxidant oxidation in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2057–2061.
- Simopoulos, A. P. (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6: omega-3 ratio, and gene expression. *Phytochemicals: Nutrient-Gene Interactions*. CRC Press Center for Genetics, Nutrition, and Health: Washington, DC, 137–160.
- Singh, H. (2011). Aspects of milk-protein-stabilised emulsions. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1938–1944.

- Sinha, V. R., Agrawal, M. K., Kumria, R., & Bhinge, J. R. (2007). Influence of operational variables on properties of piroxicam pellets prepared by extrusion-spheronization: A technical note. *AAPS PharmSciTech*, 8(1), E137–E141.
- Siqueira, G., Bras, J., & Dufresne, A. (2008). Cellulose whiskers versus microfibrils: influence of the nature of the nanoparticle and its surface functionalization on the thermal and mechanical properties of nanocomposites. *Biomacromolecules*, 10(2), 425–432.
- Siqueira, G., Bras, J., & Dufresne, A. (2009). Cellulose Whiskers versus Microfibrils: Influence of the Nature of the Nanoparticle and its Surface Functionalization on the Thermal and Mechanical Properties of Nanocomposites. *Biomacromolecules*, 10(2), 425–432. <https://doi.org/10.1021/bm801193d>
- Siqueira, G., Tapin-Lingua, S., Bras, J., da Silva Perez, D., & Dufresne, A. (2010). Morphological investigation of nanoparticles obtained from combined mechanical shearing, and enzymatic and acid hydrolysis of sisal fibers. *Cellulose*, 17(6), 1147–1158. <https://doi.org/10.1007/s10570-010-9449-z>
- Siró, I., & Plackett, D. (2010). Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose*, 17(3), 459–494.
- Siro, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*, 51(3), 456–467.
- Song, F., Tang, D.-L., Wang, X.-L., & Wang, Y.-Z. (2011). Biodegradable soy protein isolate-based materials: a review. *Biomacromolecules*, 12(10), 3369–3380.
- Song, H. Y., Shin, Y. J., & Song, K. Bin. (2012). Preparation of a barley bran protein–gelatin composite film containing grapefruit seed extract and its application in salmon packaging. *Journal of Food Engineering*, 113(4), 541–547.
- Soni, B., Hassan, E. B., Schilling, M. W., & Mahmoud, B. (2016). Transparent bionanocomposite films based on chitosan and TEMPO-oxidized cellulose nanofibers with enhanced mechanical and barrier properties. *Carbohydrate Polymers*, 151, 779–789. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.022>
- Sosnik, A., & Seremeta, K. P. (2015). Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 223, 40–54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.05.003>
- Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Yonekura, L., Parmenter, C., & Fisk, I. D. (2014). Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in prebiotic edible films. *Food Chemistry*, 159, 302–308.
- Spence, K. L., Venditti, R. A., Habibi, Y., Rojas, O. J., & Pawlak, J. J. (2010). The effect of chemical composition on microfibrillar cellulose films from wood pulps: Mechanical processing and physical properties. *Bioresource Technology*, 101(15), 5961–5968. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.104>
- Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering*. Freeman press.
- Stone, A. K., Avarmenko, N. A., Warkentin, T. D., & Nickerson, M. T. (2015). Functional properties of protein isolates from different pea cultivars. *Food Science and Biotechnology*, 24(3), 827–833.
- STUCHELL, Y. M., & KROCHTA, J. M. (1994). Enzymatic treatments and thermal effects on edible soy protein films. *Journal of Food Science*, 59(6), 1332–1337.

- Sui, X., Bi, S., Qi, B., Wang, Z., Zhang, M., Li, Y., & Jiang, L. (2017). Impact of ultrasonic treatment on an emulsion system stabilized with soybean protein isolate and lecithin: Its emulsifying property and emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 63, 727–734. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.024>
- Sukyai, P., Anongjanya, P., Bunyahwuthakul, N., Kongsin, K., Harnkarnsujarit, N., Sukatta, U., ... Chollakup, R. (2018). Effect of cellulose nanocrystals from sugarcane bagasse on whey protein isolate-based films. *Food Research International*, 107, 528–535. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.052>
- Swanson, D., Block, R., & Mousa, S. A. (2012). Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 3(1), 1–7. <https://doi.org/10.3945/an.111.000893>
- Taha, A., Hu, T., Zhang, Z., Bakry, A. M., Khalifa, I., Pan, S., & Hu, H. (2018). Effect of different oils and ultrasound emulsification conditions on the physicochemical properties of emulsions stabilized by soy protein isolate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 49, 283–293. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.08.020>
- Tan, K. Y., Gautrot, J. E., & Huck, W. T. S. (2011). Island brushes to control adhesion of water in oil droplets on planar surfaces. *Soft Matter*, 7(15), 7013–7020.
- Tang, C.-H. (2017). Emulsifying properties of soy proteins: A critical review with emphasis on the role of conformational flexibility. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(12), 2636–2679. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1067594>
- Tang, C.-H., & Li, X.-R. (2013). Microencapsulation properties of soy protein isolate and storage stability of the correspondingly spray-dried emulsions. *Food Research International*, 52(1), 419–428. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.010>
- Tang, Y., Yang, S., Zhang, N., & Zhang, J. (2014). Preparation and characterization of nanocrystalline cellulose via low-intensity ultrasonic-assisted sulfuric acid hydrolysis. *Cellulose*, 21(1), 335–346. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0158-2>
- Tapiero, H., Nguyen Ba, G., Couvreur, P., & Tew, K. D. (2002). Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(5), 215–222. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00193-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00193-2)
- Tatar, B. C., Sumnu, G., & Sahin, S. (2017). Chapter 17 - Rheology of Emulsions A2 - Ahmed, J. In P. Ptazsek & S. Basu (Eds.), *Advances in Food Rheology and its Applications* (pp. 437–457). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100431-9.00017-6>
- Tavares, L., & Noreña, C. P. Z. (2019). Encapsulation of garlic extract using complex coacervation with whey protein isolate and chitosan as wall materials followed by spray drying. *Food Hydrocolloids*, 89, 360–369. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.052>
- Tavernier, I., Heyman, B., der Meeren, P. Van, Ruysen, T., & Dewettinck, K. (2019). Oil powders stabilized with soy protein used to prepare oil-in-fat dispersions. *Journal of Food Engineering*, 244, 136–141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.09.029>
- Tayeb, A., Amini, E., Ghasemi, S., & Tajvidi, M. (2018). Cellulose Nanomaterials—Binding Properties and Applications: A Review. *Molecules*, 23(10), 2684.
- Teixeira, B., Marques, A., Pires, C., Ramos, C., Batista, I., Saraiva, J. A., & Nunes, M. L. (2014). Characterization of fish protein films incorporated with essential oils of clove, garlic and origanum:

- Physical, antioxidant and antibacterial properties. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 533–539. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.04.024>
- Thakur, V. K. (2014). *Lignocellulosic polymer composites: Processing, characterization, and properties*. John Wiley & Sons.
- Thakur, V. K. (2014). *Nanocellulose polymer nanocomposites: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons.
- Thomas, D., Latha, M. S., & Thomas, K. K. (2018). Synthesis and in vitro evaluation of alginate-cellulose nanocrystal hybrid nanoparticles for the controlled oral delivery of rifampicin. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 46, 392–399. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.06.004>
- Thrane, M., Paulsen, P. V, Orcutt, M. W., & Krieger, T. M. (2017). Chapter 2 - Soy Protein: Impacts, Production, and Applications. In S. R. Nadathur, J. P. D. Wanasundara, & L. Scanlin (Eds.), *Sustainable Protein Sources* (pp. 23–45). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00002-0>
- Tian, H., Guo, G., Fu, X., Yao, Y., Yuan, L., & Xiang, A. (2018). Fabrication, properties and applications of soy-protein-based materials: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 475–490. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.110>
- Tian, X., Lu, P., Song, X., Nie, S., Liu, Y., Liu, M., & Wang, Z. (2017). Enzyme-assisted mechanical production of microfibrillated cellulose from Northern Bleached Softwood Kraft pulp. *Cellulose*, 24(9), 3929–3942. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1382-y>
- Tibolla, H., Pelissari, F. M., & Menegalli, F. C. (2014). Cellulose nanofibers produced from banana peel by chemical and enzymatic treatment. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2, Part 2), 1311–1318. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.011>
- Tibolla, H., Pelissari, F. M., Martins, J. T., Vicente, A. A., & Menegalli, F. C. (2018). Cellulose nanofibers produced from banana peel by chemical and mechanical treatments: Characterization and cytotoxicity assessment. *Food Hydrocolloids*, 75, 192–201. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.027>
- Tibolla, H., Pelissari, F. M., Rodrigues, M. I., & Menegalli, F. C. (2017). Cellulose nanofibers produced from banana peel by enzymatic treatment: Study of process conditions. *Industrial Crops and Products*, 95, 664–674. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.035>
- Tingaut, P., Zimmermann, T., & Sèbe, G. (2012). Cellulose nanocrystals and microfibrillated cellulose as building blocks for the design of hierarchical functional materials. *Journal of Materials Chemistry*, 22(38), 20105–20111.
- Tironi, V. A., Tomás, M. C., & Añón, M. C. (2007). Lipid and protein deterioration during the chilled storage of minced sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(12), 2239–2246. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2949>
- Tonoli, G. H. D., Teixeira, E. M., Corrêa, A. C., Marconcini, J. M., Caixeta, L. A., Pereira-da-Silva, M. A., & Mattoso, L. H. C. (2012). Cellulose micro/nanofibres from Eucalyptus kraft pulp: Preparation and properties. *Carbohydrate Polymers*, 89(1), 80–88. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.052>

- Torres-Giner, S., Martínez-Abad, A., Ocio, M. J., & Lagaron, J. M. (2010). Stabilization of a nutraceutical omega-3 fatty acid by encapsulation in ultrathin electrosprayed zein prolamine. *Journal of Food Science*, 75(6), N69–N79.
- Trache, D., Hussin, M. H., Haafiz, M. K. M., & Thakur, V. K. (2017). Recent progress in cellulose nanocrystals: sources and production. *Nanoscale*, 9(5), 1763–1786. <https://doi.org/10.1039/C6NR09494E>
- Tunc, S., Angellier, H., Cahyana, Y., Chalier, P., Gontard, N., & Gastaldi, E. (2007). Functional properties of wheat gluten/montmorillonite nanocomposite films processed by casting. *Journal of Membrane Science*, 289(1–2), 159–168.
- Tzoumaki, M. V., Moschakis, T., Scholten, E., & Biliaderis, C. G. (2013). In vitro lipid digestion of chitin nanocrystal stabilized o/w emulsions. *Food & Function*, 4(1), 121–129.
- Ubbink, J., & Krüger, J. (2006). Physical approaches for the delivery of active ingredients in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17(5), 244–254.
- Ushikubo, F. Y., & Cunha, R. L. (2014). Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions. *Food Hydrocolloids*, 34, 145–153. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.016>
- Valentinotti, S., Armanet, L., & Porret, J. (2006). Encapsulated polyunsaturated fatty acids. *WO2006/067647*.
- Valenzuela B, A., Sanhueza C, J., & de la Barra D, F. (2012). EL ACEITE DE PESCADO: AYER UN DESECHO INDUSTRIAL, HOY UN PRODUCTO DE ALTO VALOR NUTRICIONAL. *Revista Chilena de Nutrición*, 39, 201–209. Retrieved from https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182012000200009&nrm=iso
- van der Graaf, S., Schroën, C., & Boom, R. M. (2005). Preparation of double emulsions by membrane emulsification—a review. *Journal of Membrane Science*, 251(1–2), 7–15.
- Vanderroost, M., Ragaert, P., Devlieghere, F., & De Meulenaer, B. (2014). Intelligent food packaging: The next generation. *Trends in Food Science & Technology*, 39(1), 47–62.
- Varka, E.-M., Ampatzidis, C., Kostoglou, M., Karapantsios, T., & Dutschk, V. (2010). On the use of electrical conductance measurements for the stability of oil-in-water Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 365(1–3), 181–188.
- Vazquez, A., Foresti, M. L., Cerrutti, P., & Galvagno, M. (2013). Bacterial cellulose from simple and low cost production media by *Gluconacetobacter xylinus*. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(2), 545–554.
- Vazquez, A., Foresti, M. L., Moran, J. I., & Cyras, V. P. (2015). Extraction and production of cellulose nanofibers. In *Handbook of polymer nanocomposites. Processing, performance and application* (pp. 81–118). Springer.
- Velikov, K. P., & Pelan, E. (2008). Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. *Soft Matter*, 4(10), 1964–1980.
- Veneranda, M., Hu, Q., Wang, T., Luo, Y., Castro, K., & Madariaga, J. M. (2018). Formation and characterization of zein-caseinate-pectin complex nanoparticles for encapsulation of eugenol. *LWT*, 89, 596–603. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.040>

- Vhangani, L. N., & Van Wyk, J. (2013). Antioxidant activity of Maillard reaction products (MRPs) derived from fructose–lysine and ribose–lysine model systems. *Food Chemistry*, 137(1–4), 92–98.
- Walker, R., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2015). Development of food-grade nanoemulsions and emulsions for delivery of omega-3 fatty acids: opportunities and obstacles in the food industry. *Food & Function*, 6(1), 41–54.
- Walstra, P. (2002). *Physical chemistry of foods*. CRC Press.
- Wan, Y., Bankston Jr, J. D., Bechtel, P. J., & Sathivel, S. (2011). Microencapsulation of Menhaden Fish Oil Containing Soluble Rice Bran Fiber Using Spray Drying Technology. *Journal of Food Science*, 76(4), E348–E356. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02111.x>
- Wang, L.-F., Shankar, S., & Rhim, J.-W. (2017). Properties of alginate-based films reinforced with cellulose fibers and cellulose nanowhiskers isolated from mulberry pulp. *Food Hydrocolloids*, 63, 201–208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.041>
- Wang, Q. Q., Zhu, J. Y., Gleisner, R., Kuster, T. A., Baxa, U., & McNeil, S. E. (2012). Morphological development of cellulose fibrils of a bleached eucalyptus pulp by mechanical fibrillation. *Cellulose*, 19(5), 1631–1643.
- Wang, R., Tian, Z., & Chen, L. (2011). A novel process for microencapsulation of fish oil with barley protein. *Food Research International*, 44(9), 2735–2741. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.013>
- Wang, R., Tian, Z., & Chen, L. (2011). Nano-encapsulations liberated from barley protein microparticles for oral delivery of bioactive compounds. *International Journal of Pharmaceutics*, 406(1–2), 153–162. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.039>
- Wang, W., Du, G., Li, C., Zhang, H., Long, Y., & Ni, Y. (2016). Preparation of cellulose nanocrystals from asparagus (*Asparagus officinalis* L.) and their applications to palm oil/water Pickering emulsion. *Carbohydrate Polymers*, 151, 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.052>
- Wang, W., Jung, J., & Zhao, Y. (2017). Chitosan-cellulose nanocrystal microencapsulation to improve encapsulation efficiency and stability of entrapped fruit anthocyanins. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1246–1253. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.005>
- Wang, W., Yang, H., Johnson, D., Gensler, C., Decker, E., & Zhang, G. (2017). Chemistry and biology of ω -3 PUFA peroxidation-derived compounds. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 132, 84–91. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2016.12.004>
- Wang, Y., Liu, W., Chen, X. D., & Selomulya, C. (2016). Micro-encapsulation and stabilization of DHA containing fish oil in protein-based emulsion through mono-disperse droplet spray dryer. *Journal of Food Engineering*, 175, 74–84. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.12.007>
- Wang, Z., Qiao, X., & Sun, K. (2018). Rice straw cellulose nanofibrils reinforced poly(vinyl alcohol) composite films. *Carbohydrate Polymers*, 197, 442–450. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.025>
- Waraho, T., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2011). Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends in Food Science & Technology*, 22(1), 3–13.

- Watanabe, Y., Yoshimoto, K., Okada, Y., & Nomura, M. (2011). Effect of impregnation using sucrose solution on stability of anthocyanin in strawberry jam. *LWT-Food Science and Technology*, 44(4), 891–895.
- Weiss, J., Takhistov, P., & McClements, D. J. (2006). Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71(9).
- Weller, C. L., Gennadios, A., & Saraiva, R. A. (1998). Edible bilayer films from zein and grain sorghum wax or carnauba wax. *LWT-Food Science and Technology*, 31(3), 279–285.
- Wilson, R. F. (2008). Soybean: Market Driven Research Needs. In G. Stacey (Ed.), *Genetics and Genomics of Soybean* (pp. 3–15). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72299-3_1
- Win, K. Y., & Feng, S.-S. (2005). Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 26(15), 2713–2722.
- Winuprasith, T., & Suphantharika, M. (2013). Microfibrillated cellulose from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) rind: Preparation, characterization, and evaluation as an emulsion stabilizer. *Food Hydrocolloids*, 32(2), 383–394. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01.023>
- Winuprasith, T., & Suphantharika, M. (2015). Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by microfibrillated cellulose from mangosteen rind. *Food Hydrocolloids*, 43, 690–699. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.027>
- Wongkongkatep, P., Manopwisedjaroen, K., Tiposoth, P., Archakunakorn, S., Pongtharangkul, T., Suphantharika, M., ... Wongkongkatep, J. (2012). Bacteria interface pickering emulsions stabilized by self-assembled bacteria–chitosan network. *Langmuir*, 28(13), 5729–5736.
- Wooster, T. J., & Augustin, M. A. (2006). β -Lactoglobulin–dextran Maillard conjugates: Their effect on interfacial thickness and emulsion stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 303(2), 564–572.
- Wu, Q., Meng, Y., Concha, K., Wang, S., Li, Y., Ma, L., & Fu, S. (2013). Influence of temperature and humidity on nano-mechanical properties of cellulose nanocrystal films made from switchgrass and cotton. *Industrial Crops and Products*, 48, 28–35.
- Xhanari, K., Syverud, K., & Stenius, P. (2011). Emulsions stabilized by microfibrillated cellulose: the effect of hydrophobization, concentration and o/w ratio. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 32(3), 447–452.
- Yam, K. L., & Lee, D. S. (2012). *Emerging food packaging technologies: Principles and practice*. Elsevier.
- Yan, H., Chen, X., Song, H., Li, J., Feng, Y., Shi, Z., ... Lin, Q. (2017). Synthesis of bacterial cellulose and bacterial cellulose nanocrystals for their applications in the stabilization of olive oil pickering emulsion. *Food Hydrocolloids*, 72, 127–135. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.044>
- Yang, L., & Paulson, A. T. (2000). Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food Research International*, 33(7), 571–578. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00093-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00093-4)
- Yang, Y., Marshall-Breton, C., Leser, M. E., Sher, A. A., & McClements, D. J. (2012). Fabrication of ultrafine edible emulsions: Comparison of high-energy and low-energy homogenization methods. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 398–406.

- Yashodhara, B. M., Umakanth, S., Pappachan, J. M., Bhat, S. K., Kamath, R., & Choo, B. H. (2009). Omega-3 fatty acids: a comprehensive review of their role in health and disease. *Postgrad Med J*, 85(1000), 84–90. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2008.073338>
- Yazicioglu, B., Sahin, S., & Sumnu, G. (2015). Microencapsulation of wheat germ oil. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3590–3597. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1428-1>
- Ye, Q., Georges, N., & Selomulya, C. (2018). Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 167–179. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.025>
- Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 176–186. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>
- Yu, C., Wang, W., Yao, H., & Liu, H. (2007). Preparation of Phospholipid Microcapsule by Spray Drying. *Drying Technology*, 25(4), 695–702. <https://doi.org/10.1080/07373930701291017>
- Yu, H., Qin, Z., Liang, B., Liu, N., Zhou, Z., & Chen, L. (2013). Facile extraction of thermally stable cellulose nanocrystals with a high yield of 93% through hydrochloric acid hydrolysis under hydrothermal conditions. *Journal of Materials Chemistry A*, 1(12), 3938–3944.
- Yu, Z., Alsammarraie, F. K., Nayigiziki, F. X., Wang, W., Vardhanabhuti, B., Mustapha, A., & Lin, M. (2017). Effect and mechanism of cellulose nanofibrils on the active functions of biopolymer-based nanocomposite films. *Food Research International*, 99, 166–172. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.009>
- Zainuddin, S. Y. Z., Ahmad, I., Kargarzadeh, H., Abdullah, I., & Dufresne, A. (2013). Potential of using multiscale kenaf fibers as reinforcing filler in cassava starch-kenaf biocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 2299–2305.
- Zanetti, M., Mazon, L. R., de Meneses, A. C., Silva, L. L., de Araújo, P. H. H., Fiori, M. A., & de Oliveira, D. (2019). Encapsulation of geranyl cinnamate in polycaprolactone nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 97, 198–207. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.005>
- Zare, F., Boye, J. I., Orsat, V., Champagne, C., & Simpson, B. K. (2011). Microbial, physical and sensory properties of yogurt supplemented with lentil flour. *Food Research International*, 44(8), 2482–2488.
- Zarena, A. S., Bhattacharya, S., & Kadimi, U. S. (2012). Mangosteen oil-in-water emulsions: rheology, creaming, and microstructural characteristics during storage. *Food and Bioprocess Technology*, 5(8), 3007–3013.
- Zbicinski, I., Delag, A., Strumillo, C., & Adamiec, J. (2002). Advanced experimental analysis of drying kinetics in spray drying. *Chemical Engineering Journal*, 86(1–2), 207–216.
- Zhang, F., Khan, M. A., Cheng, H., & Liang, L. (2019). Co-encapsulation of α -tocopherol and resveratrol within zein nanoparticles: Impact on antioxidant activity and stability. *Journal of Food Engineering*, 247, 9–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.11.021>
- Zhang, H., & Mittal, G. (2010). Biodegradable protein-based films from plant resources: A review. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 29(2), 203–220.
- Zhang, J., Wu, N., Lan, T., & Yang, X. (2014). Improvement in emulsifying properties of soy protein isolate by conjugation with maltodextrin using high-temperature, short-time dry-heating Maillard reaction. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(2), 460–467.

- Zhang, L., Zhang, F., Fang, Y., & Wang, S. (2019). Alginate-shelled SPI nanoparticle for encapsulation of resveratrol with enhanced colloidal and chemical stability. *Food Hydrocolloids*, 90, 313–320. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.042>
- Zhang, S., Xia, C., Dong, Y., Yan, Y., Li, J., Shi, S. Q., & Cai, L. (2016). Soy protein isolate-based films reinforced by surface modified cellulose nanocrystal. *Industrial Crops and Products*, 80, 207–213. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.070>
- Zhang, Y., Niu, Y., Luo, Y., Ge, M., Yang, T., Yu, L. (Lucy), & Wang, Q. (2014). Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate–chitosan hydrochloride double layers. *Food Chemistry*, 142, 269–275. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.058>
- Zhang, Y., Tan, C., Abbas, S., Eric, K., Xia, S., & Zhang, X. (2015). Modified SPI improves the emulsion properties and oxidative stability of fish oil microcapsules. *Food Hydrocolloids*, 51, 108–117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.001>
- Zhang, Y., Tan, C., Abbas, S., Eric, K., Zhang, X., Xia, S., & Jia, C. (2014). The effect of soy protein structural modification on emulsion properties and oxidative stability of fish oil microcapsules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 120, 63–70. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.006>
- Zhao, R., Torley, P., & Halley, P. J. (2008). Emerging biodegradable materials: starch-and protein-based bio-nanocomposites. *Journal of Materials Science*, 43(9), 3058–3071.
- Zou, S., Yang, Y., Liu, H., & Wang, C. (2013). Synergistic stabilization and tunable structures of Pickering high internal phase emulsions by nanoparticles and surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 436, 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.06.013>