




**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

# **UAB**

**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Microencapsulación de aceites vegetales mediante emulsiones O/W usando mazada como emulgente y diferentes tecnologías homogeneización. Aplicación a una fórmula láctea líquida UHT**

**Libni Mariot Turitich Cantero**

Tesis Doctoral

Directores:

**Dr. ANTONIO JOSÉ TRUJILLO MESA**

**Dra. ANTONIA M<sup>a</sup> CANO SARABIA**

Programa de doctorado en Ciencias de los Alimentos  
Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos  
Facultad de Veterinaria

2024



# **Microencapsulación de aceites vegetales mediante emulsiones O/W usando mazada como emulgente y diferentes tecnologías homogeneización. Aplicación a una fórmula láctea líquida UHT**

Tesis doctoral presentada por

**Libni Mariot Turitich Cantero**

Dirigida por

**Dr. Antonio José Trujillo Mesa<sup>1</sup>**

**Dra. Antonia M<sup>a</sup> Cano Sarabia<sup>2</sup>**

Realizada en el

**Centro de Innovación, Investigación y Transferencia en**

**Tecnología de los Alimentos (CIRTTA-UAB)<sup>1</sup>**

**Catalan Institute of Nanoscience and Nanotechnology (ICN2)<sup>2</sup>**

Para acceder al grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos de la

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

Bellaterra, enero 2024



La autora de esta tesis ha disfrutado de una beca por el “Programa Nacional de Becas de Posgrado en el Exterior “Don Carlos Antonio López” (BECAL), dependiente del Ministerio de Economía y Finanzas (MEF)-Paraguay”

La investigación de la presente tesis doctoral se ha financiado gracias al proyecto AGL2017-83331-R (MINECO): “*Emulsionantes bioactivos funcionalizados por homogeneización a ultra alta presión (UHPH) para la microencapsulación de aceites vegetales. aplicación a productos de base láctea*”.

Dr. ANTONIO JOSÉ TRUJILLO MESA, Catedrático de Universidad en el Área de Tecnología de los alimentos del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona, y

Dra. ANTONIA M<sup>a</sup> CANO SARABIA, Investigadora Senior del grupo Supramolecular Nanochemistry and Materials del Catalan Institute of Nanoscience and Nanotechnology (ICN2)

HACEN CONSTAR:

Que la memoria titulada “**Microencapsulación de aceites vegetales mediante emulsiones O/W usando mazada como emulgente y diferentes tecnologías homogeneización. Aplicación a una fórmula láctea líquida UHT**”, presentada por Libni Mariot Turitich Cantero para optar al grado de Doctor por la “Universitat Autònoma de Barcelona”, ha sido realizada bajo su dirección y considerándola finalizada, autorizan su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Bellaterra, a 17 de enero de 2024.

.....  
Dra. Antonia M<sup>a</sup> Cano Sarabia

.....  
Dr. Antonio José Trujillo Mesa



## Agradecimientos

Queridos Mary y Toni, en este momento de culminación académica, no puedo dejar de expresar mi profundo agradecimiento a ambos por haber sido los faros que guiaron mi travesía doctoral. **Toni**, tu constante orientación y sabiduría fueron fundamentales para mi desarrollo académico, y estoy verdaderamente agradecida por tu dedicación y conocimiento que contribuyeron de manera significativa a mi tesis. **Mary** tu paciencia infinita y apoyo emocional fueron mi ancla en los momentos más desafiantes. Gracias por ser no solo una mentora académica excepcional, sino también un pilar emocional crucial durante todo este viaje.

**Rafa**, tu papel en este proceso ha sido insustituible. Agradezco tu paciencia infinita, que me motivó a superar los obstáculos y finalizar esta tesis. Tu inspiración y aliento fueron determinantes para alcanzar este logro académico.

A la **BECAL**, mi gratitud por creer en mí y brindarme la oportunidad de capacitarme en el extranjero. Esta beca no solo representó un respaldo financiero, sino también la materialización de un sueño que hoy se hace realidad gracias a su generoso apoyo.

A mi querida **tía Norma y prima Diana**, su presencia ha sido mi refugio en la distancia. Gracias por hacer que esos kilómetros lejanos se sientan como un hogar cercano. Su apoyo incondicional ha sido invaluable.

A mis amigos: **Aga, Alvin, Brayan, Clari, Elba, Fabi, Genis, Karol, Lore, Pati y Tina**; ustedes han sido mi fuente constante de alegría. Gracias por sacarme del aislamiento académico y hacer mi estancia en Barcelona inolvidable. A **Diego y Cristian**, mis hermanos de corazón, gracias por estar conmigo en las buenas y las malas. Vuestra amistad ha sido un regalo preciado durante esta etapa de mi vida.

Agradezco también al personal de la planta piloto **Joan Miquel y Ramón**, a aquellos que tuve el privilegio de conocer en el laboratorio y al **grupo Supramolecular Nanochemistry and Materials del ICN2** por su motivación constante y su influencia positiva en mi desarrollo académico.

**Tina, Carolina, Elba y Karina**, su amistad y colaboración en el laboratorio han sido invaluable. Agradezco sinceramente su ayuda, compañerismo y los buenos momentos compartidos en el entorno científico. Su contribución ha añadido un valor significativo a mi experiencia en el laboratorio.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento al **Profesor Rafael Jimenez-Flores** del Department of Food Science and Technology en The Ohio State University, por proporcionarnos muestras de mazadas y brindarnos valiosos consejos. Agradezco también al **Dr. Javier Fontecha**, director del Grupo de Biomarcadores Lipídicos en Alimentación y Salud del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación de Madrid, por realizar las analíticas de composición lipídica de las mazadas. Su generosa colaboración y experiencia han sido fundamentales para el éxito de este proyecto.

Finalmente, agradezco a **Dios** por brindarme la fuerza y fortaleza necesarias para superar los desafíos y por darme la oportunidad de cumplir un sueño tan anhelado.

Este logro no solo es mío, sino de todos aquellos que han sido parte de mi viaje académico y personal. Gracias a cada uno de ustedes por ser parte esencial de esta travesía.

## Resumen

El objetivo principal de esta tesis doctoral se centra en la evaluación del efecto que ejercen diferentes tecnologías de homogeneización (convencional, microfluidización, ultra alta presión y ultrasonidos) sobre las propiedades fisicoquímicas de emulsiones tipo aceite en agua (O/W), empleando aceites vegetales ricos en ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6. Esta investigación profundiza en el impacto que tiene las concentraciones de la fase oleosa y el agente emulsionante sobre estas emulsiones, con atención en el rol desempeñado por el emulsionante de tipo mazada o un producto enriquecido en membrana del glóbulo graso (MFGMP). Además, se analiza cómo estas emulsiones, en particular aquellas con mazada, influyen en las propiedades fisicoquímicas de una fórmula líquida para alimentación infantil.

En un primer estudio se evaluó el papel de la mazada como agente emulgente en la creación de emulsiones O/W. Se determinó que una concentración del 7% de mazada era óptima para obtener emulsiones con un balance ideal entre el tamaño de partícula y la estabilidad fisico-oxidativa para las técnicas de homogeneización utilizadas, subrayando la relevancia de una precisa concentración de mazada y fase oleosa (10% y 20%) para obtener emulsiones estables. Las emulsiones con un 20% de fase oleosa presentaron una reducción en la oxidación, un aumento en la viscosidad y una estabilidad física mejorada, en comparación con las de 10%, independientemente de la técnica de homogeneización utilizada. Además, se compararon diferentes tecnologías de homogeneización, determinando que las formulaciones con un 10% de mezcla de aceites y un 7% de mazada, procesadas mediante microfluidización a 100 MPa y homogeneización a ultra alta presión (UHPH) a 200 MPa, eran las más efectivas. Estos métodos proporcionaron emulsiones con tamaños de partícula ideales, mayor estabilidad física y menor oxidación comparado con otras tecnologías de homogeneización. La elección adecuada de la tecnología de homogeneización demostró ser crucial para cumplir con los objetivos específicos del proceso.

En un segundo estudio, se prepararon y caracterizaron emulsiones O/W con 10% de fase oleosa, comparando un MFGMP con la mazada, y utilizando las tecnologías de homogeneización descritas. Las emulsiones con MFGMP, producidas por microfluidización y UHPH, mostraron tamaños de partícula uniformes y una estabilidad física superior, mientras que las emulsiones preparadas por homogeneización convencional (CH) y ultrasonidos fueron más inestables y de mayor tamaño de partícula. La selección del emulsionante influyó en la consistencia, estabilidad física y resistencia a la oxidación de las emulsiones. Utilizando el MFGMP, la microfluidización a 100 MPa y la UHPH a 200 MPa demostraron ser procesos de emulsificación prometedores, resaltando la importancia en la elección de la tecnología de homogeneización y del tipo de emulsionante para lograr emulsiones O/W con propiedades mejoradas.

En un tercer estudio, se elaboraron y caracterizaron fórmulas lácteas infantiles (FLIs) líquidas UHT, compuestas por emulsiones con aceites vegetales ricos en ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, mazada como emulsionante y sometiénolas a CH y UHPH. Aunque la UHPH logró una reducción del tamaño de partícula en las emulsiones, ambas FLIs exhibieron tamaños similares debido a la presencia de agregados lipoproteicos, más notables en la FLI con emulsión UHPH. Durante el almacenamiento se observaron cambios en el color, presentando las FLIs adicionadas de emulsiones UHPH, índices de blancura más elevados. Por otra parte, la FLI con emulsión UHPH presentó mayor estabilidad física, con menores fenómenos de separación de fases y una menor susceptibilidad a la oxidación en comparación con la FLI

adicionada de emulsión CH. Este estudio sugiere la producción de FLIs mediante el uso de aceites vegetales, mazada y tecnología de UHPH, ofreciendo beneficios nutricionales, mejoras en su estabilidad física y resistencia a la oxidación lipídica, extendiendo significativamente su vida útil comercial.

**Palabras clave:** Emulsión aceite en agua, mazada, aceites omega-3 y 6, homogeneización convencional, homogeneización a ultra alta presión, microfluidización, ultrasonidos, producto enriquecido en membrana del glóbulo graso, fórmula láctea infantil.

## Resum

L'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral se centra en l'avaluació de l'efecte que exerceixen diferents tecnologies d'homogeneïtzació (convencional, microfluïdització, ultra alta pressió i ultrasons) sobre les propietats fisicoquímiques d'emulsions tipus oli en aigua (O/W), emprant olis vegetals rics en àcids grassos  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6. Aquesta recerca aprofundeix en l'impacte que té les concentracions de la fase oliosa i l'emulsionant sobre aquestes emulsions, posant atenció en el rol exercit per l'emulsionant sèrum de mantega (SM) o un producte enriquit en membrana del glòbul gras (MFGMP). A més, s'analitza de manera exhaustiva com aquestes emulsions, en particular aquelles amb SM, influeixen en les propietats fisicoquímiques d'una fórmula líquida per a alimentació infantil.

En un primer estudi es va avaluar el paper essencial del SM com a agent emulgent en la creació d'emulsions. Es va determinar que una concentració del 7% de SM era òptima per a obtenir emulsions amb un balanç ideal entre la grandària de partícula i l'estabilitat fisico-oxidativa per a les tècniques d'homogeneïtzació utilitzades, subratllant la rellevància d'una precisa concentració de SM i fase oliosa (10% i 20%) per a obtenir emulsions estables. Les emulsions amb un 20% de fase oliosa van presentar una reducció en l'oxidació, un augment en la viscositat i una estabilitat física millorada, en comparació amb les de 10%, independentment de la tècnica d'homogeneïtzació utilitzada. A més, es van comparar diferents tecnologies d'homogeneïtzació, determinant que les formulacions amb un 10% de mescla d'olis i un 7% de SM, processades mitjançant microfluïdització a 100 MPa i homogeneïtzació a ultra alta pressió (UHPH) a 200 MPa, eren les més efectives. Aquests mètodes van proporcionar emulsions amb grandàries de partícula ideals, una major estabilitat física i menor oxidació comparat amb altres tecnologies d'homogeneïtzació. L'elecció adequada de la tecnologia d'homogeneïtzació va demostrar ser crucial per a complir amb els objectius específics del procés.

En un segon estudi, es van preparar i van caracteritzar emulsions O/W amb 10% de fase oliosa, comparant un MFGMP amb el xerigot de mantega, i utilitzant les tecnologies d'homogeneïtzació descrites. Les emulsions amb MFGMP, produïdes per microfluïdització i UHPH, van mostrar grandàries de partícula uniformes i una estabilitat física superior, mentre que les emulsions preparades amb per homogeneïtzació convencional (CH) i ultrasons van ser més inestables i de major grandària de partícula. La selecció de l'emulsionant va influir en la consistència, estabilitat física i resistència a l'oxidació de les emulsions. Utilitzant el MFGMP, la microfluïdització a 100 MPa i la UHPH a 200 MPa van demostrar ser processos d'emulsionament prometedors, ressaltant la importància en l'elecció de la tecnologia d'homogeneïtzació i del tipus d'emulsionant per a aconseguir emulsions O/W amb propietats millorades.

En un tercer estudi, es van elaborar i van caracteritzar fórmules làcties infantils (FLIs) líquides UHT, compostes per emulsions amb olis vegetals rics en àcids grassos  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6, SM com a emulsionant i sotmetent-les a CH i UHPH. Encara que la UHPH va aconseguir una reducció de la grandària de partícula en les emulsions, totes dues FLIs van exhibir grandàries similars a causa de la presència d'agregats lipoproteics, més notables en la FLI amb emulsió UHPH. Durant l'emmagatzematge es van observar canvis de color, presentant les FLIs addicionades d'emulsions UHPH, índexs de blancor més elevats. D'altra banda, la FLI amb emulsió UHPH van presentar major estabilitat física, amb menors fenòmens de separació de fases i una menor susceptibilitat a l'oxidació en comparació amb

la FLI addicionada d'emulsió CH. Aquest estudi suggereix la producció de FLIs mitjançant l'ús d'olis vegetals, SM i tecnologia de UHPH, oferint beneficis nutricionals, millores en la seva estabilitat física i resistència a l'oxidació lipídica, estenent significativament la seva vida útil comercial.

**Paraules clau:** Emulsió oli en aigua, sèrum de mantega, olis omega-3 i 6, homogeneïtzació convencional, homogeneïtzació a ultra alta pressió, microfluidització, ultrasons, producte enriquit en membrana del glòbul gras, fórmula làctia infantil.

## Abstract

The main objective of this doctoral thesis is focused on evaluating the effect generated by different homogenization technologies (conventional, microfluidization, ultra-high pressure, and ultrasound) on the physicochemical properties of oil-in-water (O/W) emulsions, using vegetable oils rich in  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 fatty acids. This research delves into the impact of variations in the concentration of the oily phase and the emulsifying agent on these emulsions, paying special attention to the role played by either a buttermilk-based emulsifier or one product enriched in milk fat globule membrane (MFGMP). Additionally, it comprehensively analyses how these emulsions, especially those with buttermilk-based emulsifiers, influence the physicochemical properties of liquid formula for infant nutrition. In a first study, the essential role of buttermilk-based emulsifier in the creation of O/W emulsions was evaluated. It was determined that a concentration of 7% buttermilk was optimal for obtaining emulsions with an ideal balance between particle size and physical-oxidative stability for all homogenization techniques used. This underscores the importance of precise concentrations of both buttermilk-based emulsifier and oil phase (10% and 20%) to achieve stable emulsions. Emulsions with a 20% oil phase showed reduced oxidation, increased viscosity, and improved physical stability compared to those with 10%, regardless of the homogenization technique used. Furthermore, different homogenization technologies were compared, revealing that formulations with a 10% oil blend and 7% buttermilk, processed through microfluidization at 100 MPa and ultra-high-pressure homogenization (UHPH) at 200 MPa, were the most effective. These methods yielded emulsions with ideal particle sizes, greater physical stability, and lower oxidation compared to other homogenization technologies. The appropriate choice of homogenization technology proved to be crucial in meeting the specific objectives of the process.

In a second study, O/W emulsions were prepared and characterized with a 10% oil phase, comparing the MFGMP and buttermilk-based emulsifier using the homogenization technologies described earlier. Emulsions with MFGMP, produced by microfluidization and UHPH, exhibited uniform particle sizes and superior physical stability, while emulsions prepared with conventional homogenization (CH) and ultrasonication processes were more unstable and had larger particle sizes. The choice of emulsifier influenced the consistency, physical stability, and resistance to oxidation of the emulsions. Using MFGMP, both microfluidization at 100 MPa and UHPH at 200 MPa technologies proved to be promising emulsification processes, highlighting the importance of selecting the right homogenization technology and emulsifier type to achieve O/W emulsions with enhanced properties.

In a third study, UHT liquid infant formulae (LIF) composed of emulsions based on vegetable oils rich in  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 fatty acids, buttermilk-based emulsifier and subjected to the homogenization treatments CH and UHPH, were elaborated and characterized. Although UHPH achieved a reduction in particle size in the emulsions, both LIF exhibited similar sizes due to the presence of lipoprotein aggregates, more pronounced in the LIF with UHPH emulsion. During storage, perceptible changes in color were observed, with those produced with UHPH emulsion showing higher whiteness indices. On the other hand, the LIF with UHPH emulsion demonstrated greater physical stability, with fewer phase separation phenomena and lower susceptibility to oxidation compared to the LIF containing CH emulsion. This study suggests the production of LIF using vegetable oils, buttermilk-based emulsifier, and UHPH technology, offering nutritional benefits, improvement in physical stability, and resistance to lipid oxidation, significantly extending its commercial shelf life.

**Key words:** Oil-in-water emulsion, buttermilk, omega-3 and 6 oils, conventional homogenization, ultra-high pressure homogenization, microfluidization, ultrasounds, fat globule membrane-enriched product, infant milk formula.

# Índice

## Capítulo 1

<b>Hipótesis, Objetivos y Plan de trabajo</b> .....	<b>1</b>
1.1 Objetivo General .....	2
1.2 Objetivos Específicos .....	3
1.3 Plan de Trabajo .....	3
1.4 Referencias bibliográficas .....	9

## Capítulo 2

<b>Revisión bibliográfica</b> .....	<b>11</b>
2.1 Emulsión .....	11
2.2 Emulsiones aceite-en-agua (O/W) .....	14
2.3 Formación de una emulsión aceite-en-agua .....	23
2.4 Métodos de preparación de emulsiones .....	25
2.5 Estabilidad física de una emulsión .....	35
2.6 Estabilidad oxidativa de una emulsión .....	38
2.7 Referencias bibliográficas .....	40

## Capítulo 3

<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>57</b>
3.1 Materiales .....	57
3.2 Caracterización lipídica de los emulgentes .....	58
3.3 Elaboración de las emulsiones y fórmulas lácteas infantiles .....	62
3.4 Caracterización composicional de las emulsiones y fórmulas infantiles .....	68
3.5 Técnicas e instrumentación utilizadas para la caracterización fisicoquímica de las emulsiones y fórmulas infantiles .....	69
3.6 Análisis estadístico .....	74
3.7 Referencias bibliográficas .....	75

## Capítulo 4

### **Encapsulación de aceites vegetales mediante emulsiones O/W usando mazada como emulgente y diferentes tecnologías de homogeneización ..... 77**

4.1 Introducción .....	77
4.2 Preparación y caracterización de las emulsiones .....	80
4.3 Comparación de emulsiones preparadas mediante diferentes técnicas de homogeneización.....	112
4.4 Conclusiones .....	123
4.5 Referencias bibliográficas .....	125

## Capítulo 5

### **Encapsulación de aceites vegetales mediante emulsiones O/W usando un producto comercial enriquecido en membrana de glóbulo graso como emulgente y diferentes tecnologías de homogeneización ..... 137**

5.1 Introducción .....	137
5.2 Preparación de las emulsiones.....	140
5.3. Caracterización de las emulsiones con MFGMP .....	140
5.4 Estudio comparativo fisicoquímico entre emulgentes .....	146
5.5 Conclusiones .....	153
5.6 Referencias bibliográficas .....	155

## Capítulo 6

### **Emulsiones O/W con mazada y aceites ricos en omega-3 y 6 para fórmulas lácteas infantiles UHT: Homogeneización Convencional vs. Ultra Alta Presión ..... 159**

6.1 Introducción .....	159
6.2 Caracterización de las fórmulas lácteas infantiles.....	196
6.3 Conclusiones .....	215
6.4 Referencias bibliográficas .....	216

## CAPÍTULO 7

### **Conclusiones generales ..... 223**

## Comunicaciones Científicas

1. Turitich, L., Cano-Sarabia, M., & Trujillo, A. J. (2022). *Physico-chemical behavior of liquid infant formulae based on o/w emulsions formulated with buttermilk and processed by ultra-high pressure homogenisation (UHPH)*. Presentado en la 36th EFFoST International Conference, Dublin, Ireland. Póster.
2. Turitich, L., Cano-Sarabia, M., Ferragut, V., & Trujillo, A. J. (2021). *Physical stability of emulsions formulated with milk fat globule membrane materials from different dairy byproducts prepared by ultra-high-pressure homogenization*. Presentado en el 6th International ISEKI-Food Conference, On-line. Póster.
3. Turitich, L., Cano-Sarabia, M., & Trujillo, A. J. (2020). *Comparative study of buttermilk-based emulsions prepared by high pressure homogenization and ultrasonication technologies*. Presentado en la 34th EFFoST International Conference, On-line. Póster.
4. Turitich, L., Cano-Sarabia, M., & Trujillo, A. J. (2019). *Microencapsulation of vegetable oils in buttermilk-based emulsions*. Presentado en el 11th NIZO Dairy Conference- Milk Protein Functionality, Arnhem, Netherlands. Póster.
5. Turitich, L., Cano-Sarabia, M., & Trujillo, A. J. (2019). *Estabilidad física de emulsiones o/w formuladas con aceites vegetales y mazada como agente emulgente*. Presentado en el II Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias. Almería, España. Póster.



## Lista de Abreviaturas

%	Por ciento
°C	Grados Celsius
μg	Microgramo
μL	Microlitro
A	Absorbancia
AA	Ácido araquidónico
ALA	Ácido α-linolénico
ANOVA	Análisis de Varianza
BS	Backscattering/ Retrodispersión
CH	Homogeneización convencional
CLA	Ácido linoleico conjugado
D <sub>3.2</sub>	Diámetro medio en relación a la superficie-peso
D <sub>4.3</sub>	Diámetro medio en relación al volumen-peso
DHA	Ácido docosahexaenoico
ELSD	Detector evaporativo de dispersión de luz
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FLI	Fórmula láctea infantil
g	Gramo
K	Índice de consistencia
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
kg	Kilogramo
L	Litro
L/h	Litro por hora
MDA	Malondialdehído
mEq	Miliequivalente
MF	Microfluidación
MFGM	Membrana del glóbulo graso de la leche
MFGMP	Producto enriquecido en membrana del glóbulo graso de la leche
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MPa	Megapascales
MZ	Mazada
<i>n</i>	Índice de comportamiento al flujo
nm	Nanómetro
O/W	Aceite en agua
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volumen
Pa	Pascal
pH	Potencial de hidrogeno
Rpm	Revoluciones por minuto

S	Segundo
SDS	Dodecilsulfato sódico
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TSI	Turbiscan Stability Index / Índice de estabilidad del Turbiscan
UHPH	Ultra High Pressure Homogenization / Homogenización Ultra alta presión
UHT	Ultra alta temperatura
US	Ultrasonidos
v/v	Volumen/volumen
WPC80	Proteína de suero concentrada, 80% de proteína
$\gamma$	Velocidad de deformación o cizallamiento
$\mu\text{m}$	Micrómetro
$\tau$	Esfuerzo cortante
$\omega$ -3	Omega 3
$\omega$ -6	Omega 6
$\omega$ -9	Omega 9

## Lista de Tablas

### Capítulo 2

**Tabla 2.1.** Propiedades de macro-, nano- y microemulsiones de naturaleza alimentaria.

**Tabla 2.2.** Composición de la leche desnatada en polvo, la mazada dulce, ácida o de suero.

### Capítulo 3

**Tabla 3.1.** Caracterización de la clase lipídica de los emulgentes.

**Tabla 3.2.** Composición y nomenclatura de las emulsiones O/W preparadas con mazada.

**Tabla 3.3.** Equipos de homogeneización y condiciones de trabajo utilizados en la producción de emulsiones O/W con mazada.

**Tabla 3.4.** Equipos y condiciones de trabajo utilizados en la elaboración de emulsiones O/W con producto enriquecido en membrana del glóbulo graso (MFGMP).

### Capítulo 4

**Tabla 4.1.** Diseño experimental de las emulsiones elaboradas en este estudio.

**Tabla 4.2.** Tamaño medio de partícula, índice de polidispersión (Pdl) y potencial zeta de las emulsiones preparadas mediante homogeneización convencional.

**Tabla 4.3.** Parámetros reológicos de índice de consistencia (K), índice de comportamiento de flujo ( $n$ ), e índice de correlación ( $R^2$ ) de las emulsiones elaboradas por homogeneización convencional.

**Tabla 4.4.** Índice de estabilidad Turbiscan Global (TSI) de las emulsiones elaboradas mediante la técnica de homogeneización convencional en función del tiempo de almacenamiento.

**Tabla 4.5.** Concentración de hidroperóxidos obtenida en las emulsiones preparadas mediante homogeneización convencional a 30 y 100 MPa en función del tiempo de almacenamiento a 50 °C.

**Tabla 4.6.** Concentración de malondialdehído (MDA) obtenida en las emulsiones preparadas mediante homogeneización convencional a 30 y 100 MPa en función del tiempo de almacenamiento a 50 °C.

**Tabla 4.7.** Tamaño medio de partícula, índice de polidispersión (Pdl) y potencial zeta de las emulsiones preparadas mediante la técnica de homogeneización por *Microfluidizer*®.

**Tabla 4.8.** Parámetros reológicos de índice de consistencia (K), índice de comportamiento al fluido ( $n$ ), e índice de correlación ( $R^2$ ) de las emulsiones elaboradas por *Microfluidizer*®.

**Tabla 4.9.** Índice de estabilidad Turbiscan Global (TSI) de las emulsiones elaboradas mediante la técnica de homogeneización por *Microfluidizer*® a lo largo de 15 días de almacenamiento.

**Tabla 4.10.** Concentraciones de hidroperóxidos (mM/kg aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas por *Microfluidizer*®, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

**Tabla 4.11.** Concentraciones de malondialdehído (MDA) ( $\mu$ M/kg aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas por *Microfluidizer*®, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

**Tabla 4.12.** Temperaturas registradas por el equipo en las emulsiones durante el proceso de homogeneización UHPH.

**Tabla 4.13.** Tamaño medio de partícula, índice de polidispersión (PdI) y potencial zeta de las emulsiones preparadas mediante la técnica de homogeneización a (ultra) alta presión.

**Tabla 4.14.** Parámetros reológicos de índice de consistencia (K), índice de comportamiento al fluido ( $n$ ), e índice de correlación ( $R^2$ ) de las emulsiones elaboradas por homogeneización a (ultra) alta presión.

**Tabla 4.15.** Índice de estabilidad Turbiscan (TSI) de las emulsiones elaboradas mediante la técnica de homogeneización a (ultra) alta presión a lo largo de 15 días de almacenamiento.

**Tabla 4.16.** Concentraciones de hidroperóxidos (mM/kg aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas por homogeneización a (ultra) alta presión, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

**Tabla 4.17.** Concentraciones de malondialdehído (MDA) ( $\mu$ M/kg aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas por homogeneización a (ultra) alta presión, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

**Tabla 4.18.** Tamaño medio de partícula, índice de polidispersión (PdI) y Potencial zeta de las emulsiones preparadas mediante la técnica de homogeneización por ultrasonidos.

**Tabla 4.19.** Parámetros reológicos de índice de consistencia (K), índice de comportamiento al fluido ( $n$ ), e índice de correlación ( $R^2$ ) de las emulsiones elaboradas por ultrasonidos.

**Tabla 4.20.** Índice de estabilidad Turbiscan (TSI) de las emulsiones elaboradas mediante la técnica de homogeneización por ultrasonidos a lo largo de 15 días de almacenamiento.

**Tabla 4.21.** Concentraciones de hidroperóxidos (mM/kg aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas por ultrasonidos, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

**Tabla 4.22.** Concentraciones de malondialdehído (MDA) ( $\mu$ M/kg aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas por ultrasonidos, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

**Tabla 4.23.** Tamaño medio de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta de las emulsiones elaboradas con 7% de mazada y 10% de aceites, homogenizadas por diferentes tecnologías.

**Tabla 4.24.** Parámetros reológicos de índice de consistencia (K), índice de comportamiento al fluido ( $n$ ), e índice de correlación ( $R^2$ ) de las emulsiones elaboradas con 7% de mazada y 10% de aceites, homogenizadas por diferentes tecnologías.

**Tabla 4.25.** Índice de estabilidad Turbiscan (TSI) de las emulsiones elaboradas con 7% de mazada y 10% de aceites, homogenizadas por diferentes tecnologías, a lo largo de 1,7 y 15 días de almacenamiento.

**Tabla 4.26.** Concentraciones de hidroperóxidos (mM/kg aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas con 7% de mazada y 10% de aceites, homogenizadas por diferentes tecnologías, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

**Tabla 4.27.** Concentraciones de malondialdehído (MDA) ( $\mu$ M/kg aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas con 7% de mazada y 10% de aceites, homogenizadas por diferentes tecnologías, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

## Capítulo 5

**Tabla 5.1.** Tamaño medio de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta de las emulsiones elaboradas con el producto comercial enriquecido en membrana de glóbulo graso (MFGMP) como emulgente y 10% de aceites, homogenizadas por diferentes tecnologías.

**Tabla 5.2.** Parámetros reológicos de índice de consistencia (K), índice de comportamiento al fluido ( $n$ ), e índice de correlación ( $R^2$ ) de las emulsiones elaboradas con el producto comercial MFGMP y 10% de fase oleosa, homogenizadas por diferentes tecnologías.

**Tabla 5.3.** Concentraciones de hidroperóxidos (mM/kg aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas con producto enriquecido en membrana de glóbulo graso y 10% de aceites, homogenizadas por diferentes tecnologías, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

**Tabla 5.4.** Concentraciones de malondialdehído (MDA) ( $\mu$ M/kg aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas con producto enriquecido en membrana del glóbulo graso y 10% de aceites, homogenizadas por diferentes tecnologías, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

## Capítulo 6

**Tabla 6.1.** Composición de las fórmulas lácteas infantiles obtenidas por inclusión de emulsiones tratadas por homogenización convencional (CH, 30 MPa) y a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa).

**Tabla 6.2** Comparación de medias y desviaciones estándar de los parámetros de tamaño de partícula  $D_{3,2}$  y  $D_{4,3}$  ( $\mu\text{m}$ ) para las emulsiones obtenidas por homogeneización convencional (CH, 30 MPa) y a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa) el día de elaboración.

**Tabla 6.3.** Medias y desviaciones estándar de los parámetros de tamaño de partícula  $D_{3,2}$  y  $D_{4,3}$  ( $\mu\text{m}$ ) para las leches infantiles adicionadas de emulsiones obtenidas por homogeneización convencional (CH, 30 MPa) y a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa).

**Tabla 6.4.** Medias y desviaciones estándar de los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , diferencia de color global ( $\Delta E^*$ ), índice de amarillento (YI), e índice de blancura (WI) para las leches infantiles adicionadas de emulsiones obtenidas por homogeneización convencional (CH, 30 MPa) y a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa).

**Tabla 6.5.** Medias y desviaciones estándar de los parámetros reológicos de índice de consistencia ( $K$ ), índice de comportamiento al flujo ( $n$ ) e índice de correlación ( $R^2$ ) de las fórmulas lácteas infantiles elaboradas con emulsiones tratadas por homogeneización convencional (CH) y a ultra alta presión (UHPH) y almacenadas durante un periodo de 60 días.

# Lista de Figuras

## Capítulo 1

**Figura 1.1.** Esquema del plan de trabajo expuesto en el **Capítulo 4**. Caracterización de emulsiones O/W formuladas a partir de mazada como emulgente, aceites vegetales ricos en ácidos grasos  $\omega$ -3 y 6, obtenidas por diferentes tecnologías de homogeneización.

**Figura 1.2.** Esquema del plan de trabajo expuesto en el **Capítulo 5**. Caracterización de emulsiones O/W formuladas a partir de un producto comercial enriquecido en membrana del glóbulo graso (MFGMP), aceites vegetales ricos en ácidos grasos  $\omega$ -3 y 6, obtenidas por diferentes tecnologías de homogeneización, y comparación con sus homólogas conteniendo mazada.

**Figura 1.3.** Esquema del plan de trabajo expuesto en el **Capítulo 6**. Aplicación de emulsiones en una fórmula láctea infantil líquida UHT.

## Capítulo 2

**Figura 2.1.** Representación esquemática de distintos tipos de emulsiones: emulsiones agua-en-aceite ("Water-in-Oil", W/O), emulsiones aceite-en-agua ("Oil-in-Water", O/W), emulsiones de aceite-en-agua-en-aceite (Oil-in-Water-in-Oil", O<sub>1</sub>/W/O<sub>2</sub>) y emulsiones de agua-en-aceite-en-agua ("Water-in-Oil-in-Water", W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub>).

**Figura 2.2.** Rutas metabólicas y fuentes alimentarias de los ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6.

**Figura 2.3.** Esquema de los diferentes pasos de procesamiento utilizados en la fabricación de mantequilla, con su impacto en la estructura de la matriz de la leche. (I) La nata pasteurizada se bate para inducir una inversión de fase; (II) la membrana del glóbulo de grasa de la leche (MFGM) se rompe liberando su contenido graso; (III) el líquido expulsado (mazada) resultante del batido se drena y los granos de mantequilla se siguen procesando.

**Figura 2.4.** Diagrama de flujo del proceso de obtención de: (I) nata, (II) mantequilla, (III) grasa láctea anhidra (AMF) y diversos tipos de mazada (dulce, ácida, de suero) a partir de leche cruda.

**Figura 2.5.** Representación esquemática de la estructura de la membrana del glóbulo de grasa de la leche.

**Figura 2.6.** Proceso de formación de una emulsión o/w.

**Figura 2.7.** Homogeneizador *UltraTurrax*®: mecanismo de mezcla rotor/estator.

**Figura 2.8.** Esquema de funcionamiento de un homogeneizador a alta presión con válvula de APV-Gaulin, Rannie. HP: alta presión, AP: presión atmosférica.

**Figura 2.9.** Esquema de funcionamiento de un homogeneizador a ultra alta presión con válvula UHPH-Ypsicon, UHP: ultra alta presión, AP: presión atmosférica.

**Figura 2.10.** Esquema de funcionamiento de un microfluidificador de un solo canal. Tipos de cámara de interacción.

**Figura 2.11.** Esquema de una sonda de ultrasonidos utilizada para reducir el tamaño de las gotas de una emulsión.

**Figura 2.12.** Mecanismos de desestabilización de una emulsión del tipo O/W.

**Figura 2.13.** Parámetros que influyen en la oxidación de lípidos en emulsiones.

### Capítulo 3

**Figura 3.1** Cromatograma del análisis de la clase lipídica de los emulgentes. **a.** Lípidos polares: Fosfatidiletanolamina (PE); Fosfatidilinositol (PI), Fosfatidilcolina (PC); Fosfatidilserina (PS) y Esfingomiélin (SM). **b.** Triacilglicérol (TAG); Diacilglicérol (DAG); Ácidos grasos libres + Colesterol (FFA + CHOL); Monoacilglicérol (MAG).

**Figura 3.2.** Diagrama de preparación de emulsiones finas mediante las diferentes técnicas de homogeneización a alta presión y ultrasonidos.

**Figura 3.3.** Representación esquemática de las válvulas de homogeneización utilizadas en el estudio. (a) Convencional, (b) Microfluidización, (c) Ultra Alta Presión (UHPH) (d) Representa el proceso de cavitación acústica del sistema de ultrasonido.

**Figura 3.4.** Diagrama de preparación de las fórmulas lácteas infantiles líquidas UHT en base a emulsiones O/W con mazada y aceites de chía/girasol obtenidas por homogeneización a ultra alta presión (UHPH) a 200 MPa u homogeneización convencional (CH) a 30 MPa.

### Capítulo 4

**Figura 4.1.** Distribuciones de tamaño de partícula de las emulsiones preparadas por homogeneización convencional a presiones de 30 MPa (línea discontinua) y 100 MPa (línea continua), y compuestas por: (a) 5% de mazada y 10% de fase oleosa; (b) 7% de mazada y 10% de fase oleosa; (c) 5% de mazada y 20% de fase oleosa; y (d) 7% de mazada y 20% de fase oleosa.

**Figura 4.2.** Índice de estabilidad del Turbiscan Global (TSI siglas en inglés) obtenida en las emulsiones preparadas mediante homogeneización convencional a 30 MPa: (--, 5% mazada y 10% fase oleosa); (-, 7% mazada y 10% fase oleosa); (-, 5% mazada y 20% fase oleosa); (-, 5% mazada y 20% fase oleosa) y a 100 MPa: (—, 5% mazada y 10% fase oleosa); (—, 7% mazada y 10% fase oleosa); (—, 5% mazada y 20% fase oleosa); (—, 5% mazada y 20% fase oleosa) en función del tiempo de almacenamiento.

**Figura 4.3.** Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones elaboradas con *Microfluidizer*® a 100 MPa. MZ5-10: 5% de mazada 10% fase oleosa y MZ7-10: 7% mazada-10% fase oleosa.

**Figura 4.4.** Distribuciones de tamaño de partícula de las emulsiones preparadas por homogeneización a (ultra) alta presión a presiones de 100, 200 y 300 MPa compuestas por: (a) 5% de mazada y 10% de fase oleosa; (b) 7% mazada y 10% de fase oleosa; (c) 5% mazada y 20% de fase oleosa; y (d) 7% mazada y 20% de fase oleosa.

**Figura 4.5.** Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones elaboradas con ultrasonidos. **a.** 5% de mazada y 10% aceites (línea continua) o 20% aceites (línea de puntos); **b.** 7% de mazada y 10% aceites (línea continua) o 20% aceites (línea de puntos).

**Figura 4.6.** Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones formuladas con 7% de mazada, y 10% aceites elaborados a diferentes técnicas de homogeneización. Convencional (CH), *Microfluidizer*® (MF), Homogeneización a ultra alta presión (UHPH) y Ultrasonidos (US).

**Figura 4.7.** Microscopía óptica láser confocal de emulsiones obtenidas por diferentes equipos de homogeneización: (a) Convencional (30 MPa), (b) *Microfluidizer*® (100 MPa), (c) UHPH (200 MPa) y (d) Ultrasonidos (40% amplitud por 10 min). (1) Micrografía de campo general  $\times 63$  con tinción *Nile Red* y *Fast Green*, (2) micrografía de zoom  $\times 4$  con tinción *Nile Red* y *Fast Green* y (3) micrografía de zoom  $\times 4$  con tinción *Rh-DOPE*. Colores tinción: Rojo, Fase aceite; Verde, Proteínas de la mazada; Azul, Fosfolípidos de la mazada. La barra equivale a 25 y 5  $\mu\text{m}$  en micrografías de campo y zoom, respectivamente.

**Figura 4.8.** Perfiles de retrodispersión de las emulsiones o/w preparadas con un 7% mazada y un 10% aceite, y homogeneizadas por las tecnologías: a) Convencional (30 MPa), b) *Microfluidizer*® (100 MPa), c) UHPH (200 MPa), d) Ultrasonidos (40% amplitud por 10 min) en función del tiempo de almacenamiento (15 días).

**Figura 4.9.** Cinética del índice de estabilidad global (TSI, siglas en inglés) en función del tiempo de almacenamiento de las emulsiones homogeneizadas por los siguientes métodos: **a.** Convencional; **b.** *Microfluidizer*®; **c.** UHPH (Homogeneización a ultra alta presión); y **d.** Ultrasonidos. Cada barra del gráfico se encuentra codificada por colores en correspondencia con la escala visual del TSI y se representa de la siguiente manera: **A+** (Excelente, verde oscuro), **A** (Bueno, verde claro), **B** (Variaciones detectadas, amarillo), **C** (Advertencia visual, naranja) y **D** (Inestabilidad visible, rojo).

## Capítulo 5

**Figura 5.1.** Perfiles de retrodispersión de las emulsiones conteniendo producto enriquecido en membrana de glóbulo graso como emulgente y estabilizadas por: **a.** Homogeneización convencional (CH, 30 MPa), **b.** *Microfluidizer*® (MF, 100 MPa), **c.** Homogeneización a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa), **d.** Ultrasonidos (US, 40% amplitud/10 min) en función del tiempo de almacenamiento (15 días) a temperatura ambiente.

**Figura 5.2.** Índice de estabilidad del Turbiscan global (TSI siglas en inglés): **a.** Cinética de estabilidad general de las emulsiones en función al tiempo de almacenamiento (15 días) y tecnología de homogeneización utilizada (Homogeneización convencional, CH, 30 MPa; Homogeneización a ultra alta presión, UHPH, 200 MPa; *Microfluidizer*®, MF, 100 MPa; y Ultrasonido, US, , 40% amplitud/10 min); **b.** Comparación del TSI general de las emulsiones a los 15 días de almacenamiento: letras distintas sobre la columna: indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ). Cada columna está coloreada de acuerdo con la escala visual TSI y está representada por: A+: visualmente excelente, color verde oscuro; A: Visualmente bueno, color verde claro; B: Variaciones detectadas por el Turbiscan, no visuales en la mayoría de los casos ( $>90\%$ ), color amarillo; C: Advertencia visual, color naranja y D: Variaciones extremas, fenómenos de inestabilidad visibles, color rojo.

**Figura 5.3.** Comparación del comportamiento fisicoquímico de emulsiones preparadas con diferentes materiales emulsionantes: producto enriquecido en membrana del glóbulo graso (MFGMP, color rosa) y mazada (color naranja) obtenidas por: Homogeneización Convencional (CH, 30 MPa); *Microfluidizer*® (MF, 100 MPa); Homogeneización a Ultra Alta Presión (UHPH, 200 MPa); y Ultrasonidos (US, 40% amplitud y 10 min). **a.** Diámetro medio de partícula (nm), **b.** Potencial zeta (mV), **c.** K: índice de consistencia ( $\text{Pa} \times \text{s}^n$ ), **d.** Índice estabilidad Turbiscan global a los 15 días de almacenamiento, **e.** Contenido de hidroperóxidos (mM/kg de aceite) y **f.** Contenido de malondialdehído ( $\mu\text{M}/\text{kg}$  aceite) a los 15 días de almacenamiento. <sup>a-b</sup> Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las emulsiones (MFGMP vs Mazada) en el mismo tratamiento.

**Figura 5.4.** Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones formuladas con diferentes materiales emulsionantes: Producto enriquecido en membrana del glóbulo graso (MFGMP, línea continua) y mazada (línea de trazos). **a.** Homogeneización convencional (CH, 30 MPa); **b.** *Microfluidizer*® (MF, 100 MPa); **c.** Homogeneización a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa) y **d.** Ultrasonidos (US, 40% amplitud y 10 min).

## Capítulo 6

**Figura 6.1.** Microscopía láser confocal de las emulsiones con 7% mazada y 10% aceite obtenidas por (a) homogeneización convencional (CH, 30 MPa) y por (b) homogeneización a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa). Emulsiones CH  $\times 63$  (a) y UHPH  $\times 63$  (b) con tinción *Nile Red* y *Fast Green* (1) y *Rh-DOPE* (2). Colores tinción: Rojo, Fase aceite; Verde, Proteínas de la mazada; Azul, Fosfolípidos de la mazada. La barra equivale a 25  $\mu\text{m}$ .

**Figura 6.2.** Perfil de distribución del tamaño de partícula para las emulsiones obtenidas por homogeneización convencional (CH, 30 MPa) (línea de trazos, rojo) y a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa) (línea de trazos, negro), así como para las fórmulas lácteas infantiles (FLI) adicionadas de sus respectivas emulsiones CH (línea, rojo) y UHPH (línea, negro), en el día de su elaboración.

**Figura 6.3.** Microscopía láser confocal de las fórmulas lácteas infantiles (FLI) UHT conteniendo emulsiones con 7% mazada y 10% aceite obtenidas por homogeneización (a) convencional (CH, 30 MPa) y (b) a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa). Micrografías de las FLIs a  $\times 63$  con tinción *Nile Red* y *Fast Green* (1) y zoom  $\times 4$  con tinciones *Nile Red* y *Fast Green* (2) y *Rh-DOPE* (3).

**Figura 6.4.** Perfil de distribución del tamaño de partículas de las fórmulas lácteas infantiles (FLI) conteniendo emulsiones obtenidas por homogeneización **(a)** convencional (CH, 30 MPa) y **(b)** a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa), diluidas en agua destilada (línea roja) y diluidas con SDS (línea negra).

**Figura 6.5.** Índice de estabilidad del Turbiscan Global (TSI siglas en inglés) en función del tiempo de las fórmulas lácteas infantiles (FLI) conteniendo emulsiones tratadas por homogeneización convencional (CH, color rojo) y a ultra alta presión (UHPH, color negro). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) a diferentes tiempos y en cada curva de tratamiento. El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos.

**Figura 6.6.** Perfiles de retrodispersión de las fórmulas lácteas infantiles elaboradas por adición de emulsiones estabilizadas por (a) homogeneización convencional (30 MPa) y (b) a ultra alta presión (200 MPa), en función del tiempo de almacenamiento (60 días).

**Figura 6.7.** Evolución en el contenido de hidroperóxidos en función del tiempo de las fórmulas lácteas infantiles (FLI) conteniendo emulsiones tratadas por homogeneización convencional (línea con símbolo cuadrado, color rojo) y a ultra alta presión (línea con símbolo redondo, color negro). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) a diferentes tiempos y en cada curva de tratamiento. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre tratamientos.

**Figura 6.8.** Evolución en el contenido de malondialdehído en función del tiempo de las fórmulas lácteas infantiles conteniendo emulsiones tratadas por homogeneización convencional (línea con símbolo cuadrado, color rojo) y a ultra alta presión (línea con símbolo redondo, color negro). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) a diferentes tiempos y en cada curva de tratamiento. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre tratamientos.







# Capítulo 1

## Hipótesis, Objetivos y Plan de trabajo

La problemática en este trabajo de investigación radica en la necesidad de desarrollar emulsiones de aceites vegetales ricas en ácidos grasos  $\omega$ -3 y 6 que sean estables tanto físicamente como frente a la oxidación lipídica. Los ácidos grasos  $\omega$ -3 y 6 son altamente beneficiosos para la salud humana, pero también son susceptibles a la oxidación, lo que puede disminuir su eficacia y calidad nutricional (Coelho et al., 2019; Ghelichi et al., 2023; Melo et al., 2019).

Para abordar este desafío, se pretende utilizar la mazada como un subproducto valioso debido a su funcionalidad como ingrediente emulgente en la elaboración de emulsiones. La mazada contiene componentes de la leche desnatada, como caseína, proteína de suero, lactosa y minerales, y fracciones de la membrana de los glóbulos grasos de la leche, compuestas por fosfolípidos y proteínas. Esto la convierte en un recurso altamente prometedor para mejorar la estabilidad y la calidad nutricional de las emulsiones (Gebreselassie et al., 2016). Se ha demostrado que los fosfolípidos presentes en la mazada tienen cierta bioactividad, contribuyendo al correcto funcionamiento de las membranas celulares y al metabolismo lipídico (Mudgil et al., 2016; Ortega-Anaya & Jiménez-Flores, 2019) (Mudgil et al., 2016; Ortega-Anaya & Jiménez-Flores, 2019) . Además, la mazada contiene proteínas de alta calidad que pueden ser beneficiosas para el crecimiento y desarrollo, especialmente en etapas tempranas de la vida (Ali, 2019).

La obtención de una emulsión físicamente estable es esencial para garantizar la calidad y durabilidad de productos emulsionados. Un sistema de homogeneización eficaz, respaldado por emulsionantes adecuados, es fundamental para lograr la uniformidad y estabilidad de la emulsión a lo largo del tiempo. En este contexto, entre los sistemas de homogeneización utilizados en la obtención de emulsiones, la homogeneización a ultra alta presión (UHPH) emerge como un sistema valioso para producir emulsiones físicamente estables. Al aplicar altas presiones en el proceso de homogeneización, se logra una reducción en el tamaño de partícula y una dispersión más uniforme, conduciendo a emulsiones con una estructura más

estable y una textura óptima, crucial para diversas aplicaciones industriales y, especialmente, en la formulación de productos de alta calidad (Fernandez-Avila et al., 2019; Trujillo et al., 2021).

La variabilidad en las condiciones de preparación, incluyendo la elección del emulsionante, su concentración, el tipo y las condiciones de homogeneización, y la concentración de aceite, plantea un desafío en la obtención de emulsiones estables y nutritivas, que ha sido ampliamente discutida por autores como Hebishy et al. (2013, 2015), McClements (2011) y Singh (2011). Además, la inserción exitosa de estas emulsiones en matrices alimentarias es fundamental para mostrar su aplicación práctica y su efectividad en la mejora de la calidad nutricional.

Considerando los desafíos de las emulsiones de aceites vegetales ricos en ácidos grasos  $\omega$ -3 y 6 en cuanto a estabilidad física y resistencia a la oxidación, se plantea que la incorporación de la mazada como emulsionante, por su prometedora funcionalidad, y su combinación adecuada con técnicas de homogeneización, incluyendo la UHPH, será fundamental para mejorar la durabilidad y calidad de estas. Asimismo, se espera que esta optimización permita su aplicación efectiva en matrices alimentarias, especialmente en fórmulas infantiles, fortaleciendo su habilidad para mejorar tanto la calidad física como química del producto final, lo que en última instancia contribuirá a su valor nutricional.

### **1.1 Objetivo General**

El objetivo principal de esta tesis doctoral es realizar una evaluación detallada y una comprensión profunda del impacto que generan diversas tecnologías de homogeneización en la calidad de emulsiones aceite en agua (O/W). Este estudio se enfoca específicamente en analizar los efectos de variaciones en las concentraciones de la fase oleosa y del emulsionante, así como el papel que juega el tipo de emulsionante (tanto en forma de mazada como en un producto enriquecido en membrana del glóbulo graso) en el desarrollo de emulsiones basadas en aceites vegetales ricos en ácidos grasos  $\omega$ -3 y 6. Además, se pretende investigar cómo la inclusión de estas emulsiones en matrices alimentarias, con un enfoque

particular en fórmulas infantiles, influye en las propiedades físico-químicas de dichas fórmulas, con el objetivo de optimizar su calidad y beneficios nutricionales.

## 1.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar y comparar el efecto de distintas tecnologías de homogeneización (convencional, microfluidización, ultra alta presión y ultrasonidos) en la preparación de emulsiones a base de aceites vegetales ricos en w-3 y 6, y de mazada como agente emulgente.
2. Investigar el impacto de diferentes concentraciones de fase oleosa (10 y 20%) y emulsionante (5 y 7%) en la formación y propiedades fisicoquímicas de las emulsiones obtenidas por las diferentes técnicas de homogeneización empleadas.
3. Analizar cómo la elección del tipo de emulsionante (mazada o producto enriquecido en membrana de glóbulo graso) afecta las características fisicoquímicas de las emulsiones según la tecnología de homogeneización empleada.
4. Estudiar cómo la adición de estas emulsiones a una matriz alimentaria, específicamente en una fórmula láctea infantil líquida UHT, influye en sus propiedades fisicoquímicas durante su almacenamiento.

## 1.3 Plan de Trabajo

La estructura de la tesis comprende diversos capítulos que abordan distintos aspectos de la investigación. En el **Capítulo 1** se contextualiza el tema de estudio, se genera la hipótesis de trabajo, se definen los objetivos de la investigación, y se muestra el plan de trabajo llevado a cabo. A continuación, en el **Capítulo 2**, se presenta el marco teórico, que proporciona los fundamentos conceptuales y teóricos que sustentan la investigación. El **Capítulo 3** detalla la metodología utilizada para llevar a cabo la investigación, describiendo los materiales y métodos, y enfoques empleados. Posteriormente, en los **Capítulos 4, 5 y 6**, se presentan de manera detallada los resultados experimentales obtenidos, y se profundiza en su discusión.

## Capítulo 1

A continuación, se describen con más detalle estos capítulos, y las **Figuras 1.1, 1.2 y 1.3** proporcionan una representación visual del plan de trabajo seguido.

En el **Capítulo 4** se llevó a cabo un análisis detallado del impacto sustancial generado al modificar las concentraciones de la fase oleosa (mezcla de aceites de chía y girasol, 10 y 20%) y del emulsionante (mazada, 5 y 7%) durante la preparación de emulsiones utilizando diversas tecnologías de homogeneización (**Figura 1.1**). Se evaluaron tecnologías como la homogeneización convencional, la microfluidización, la UHPH y los ultrasonidos. Las emulsiones resultantes se caracterizaron en términos de distribución y tamaño de partícula, microestructura, comportamiento reológico, y estabilidad física y oxidativa lipídica. El objetivo principal fue comprender cómo estas modificaciones afectan las características fisicoquímicas de las emulsiones, centrándose en la formación y tamaño de partículas, así como en la estabilidad general de estas.

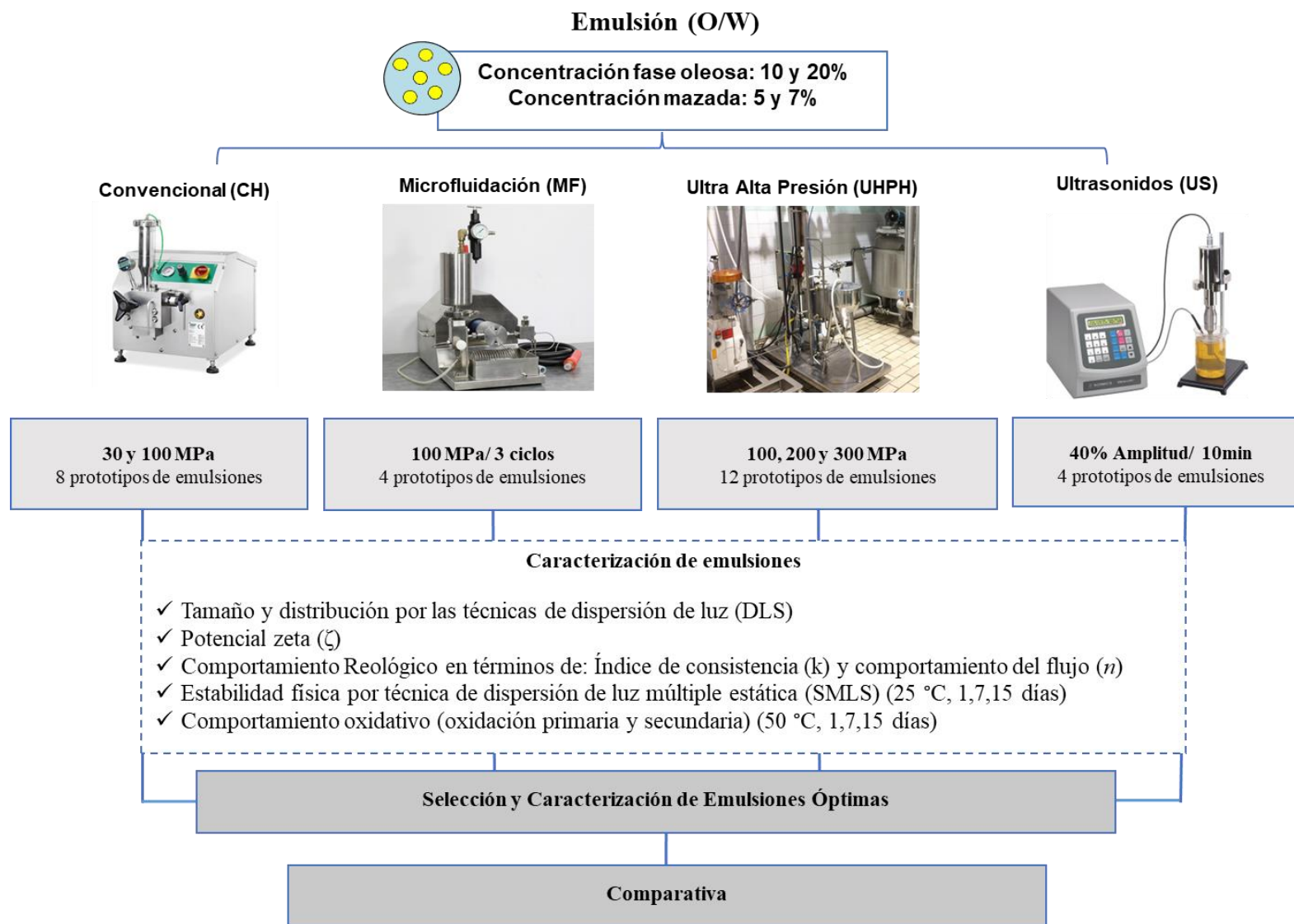
Posteriormente, una vez definida la formulación y las condiciones de trabajo óptimas para cada tecnología, se procedió a una comparación entre ellas. Este estudio nos brindó información esencial para comprender cuál de estas tecnologías ofrecía un desempeño superior en términos de calidad y estabilidad de la emulsión.

Paralelamente en el **Capítulo 5** se detalla un estudio (**Figura 1.2**) de las emulsiones utilizando un producto comercial procedente de la mazada enriquecida en membrana del glóbulo graso (MFGMP). Se replicó la formulación y las condiciones óptimas para cada tecnología de homogeneización del **Capítulo 4**, manteniendo constante el nivel de proteína utilizado anteriormente en las emulsiones elaboradas con mazada, con el objetivo de determinar la influencia de los fosfolípidos, como componentes mayoritarios junto a la proteína en el MFGMP, como emulsionantes en estas emulsiones. Posteriormente, se realizó un análisis comparativo con la mazada convencional empleada en el **Capítulo 4**. Este enfoque metodológico nos brindó una comprensión más precisa de cómo la elección del tipo de emulsionante influye en las propiedades fisicoquímicas y notablemente sobre la estabilidad física y oxidativa de las emulsiones, así como su comportamiento bajo las distintas técnicas de homogeneización testadas. Este abordaje resulta esencial para entender el comportamiento de las proteínas y los fosfolípidos en calidad de emulsionantes, independientemente de la técnica de homogeneización utilizada, y cómo esta puede incidir

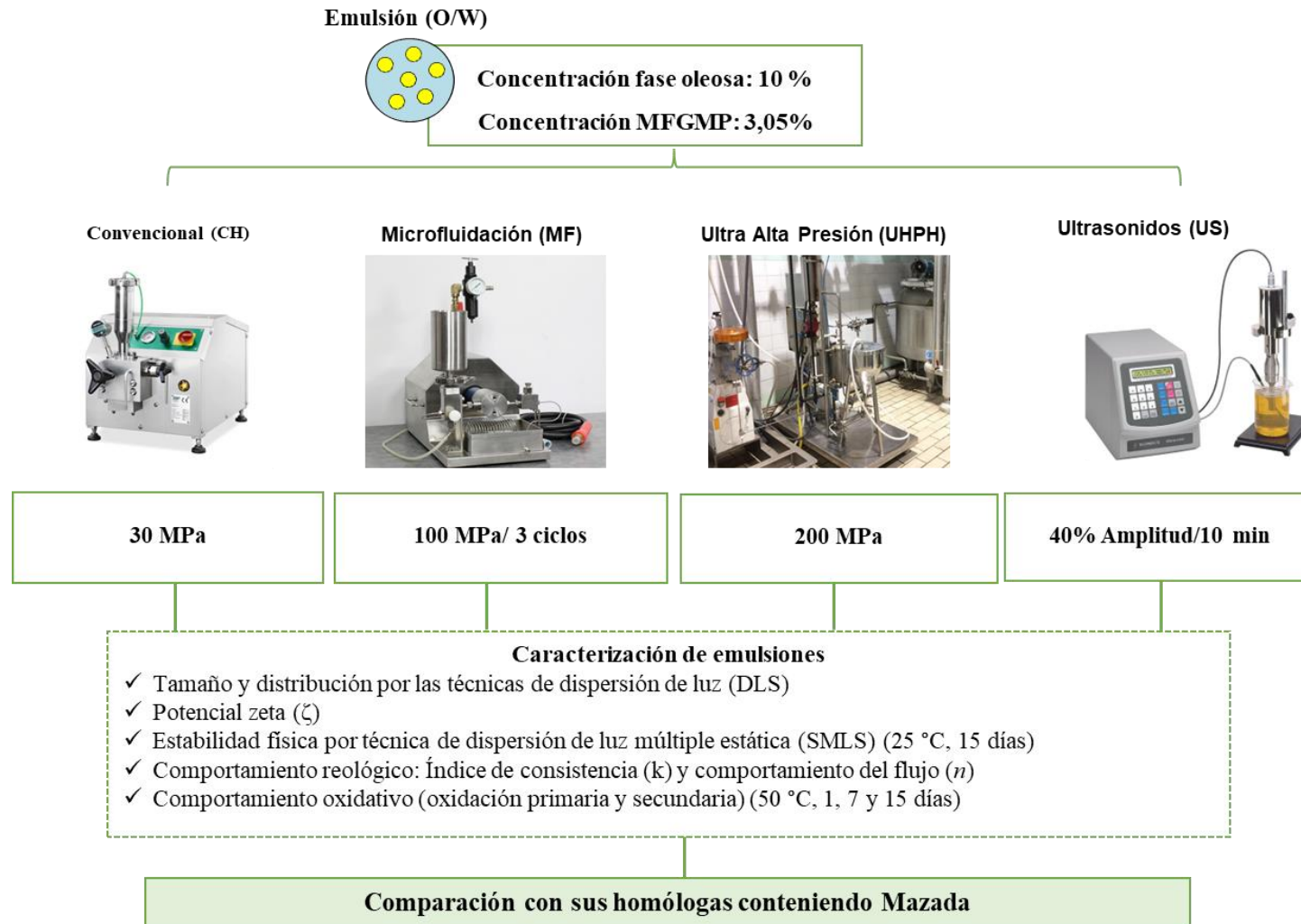
en la selección del emulsionante adecuado. La caracterización y comparación entre emulsiones fueron en términos distribución y tamaño de partícula, observación de la microestructura, comportamiento reológico, y estabilidades física y oxidativa lipídica (oxidación primaria y secundaria).

Por último, el **Capítulo 6** se centra en la incorporación de las emulsiones objeto de estudio en una matriz alimentaria específica, en este caso, una fórmula láctea infantil líquida UHT (**Figura 1.3**). En este estudio se investigó cómo las emulsiones, obtenidas bajo condiciones óptimas mediante las técnicas de UHPH y homogeneización convencional, interactúan con el resto de los componentes de la fórmula infantil, se comportan frente a un tratamiento térmico UHT y se mantienen durante un periodo de tiempo de almacenamiento. Para ello se caracterizaron las leches infantiles en cuanto a su composición fisicoquímica, distribución del tamaño de partícula, observación de la microestructura, color, comportamiento reológico, y estabilidades física y oxidativa lipídica (oxidación primaria y secundaria). Este estudio ofrece una comprensión sólida de cómo estas emulsiones, producidas con diferentes técnicas de homogeneización, se incorporan y preservan sus propiedades en la fórmula infantil, lo que incide en la calidad y estabilidad del producto final.

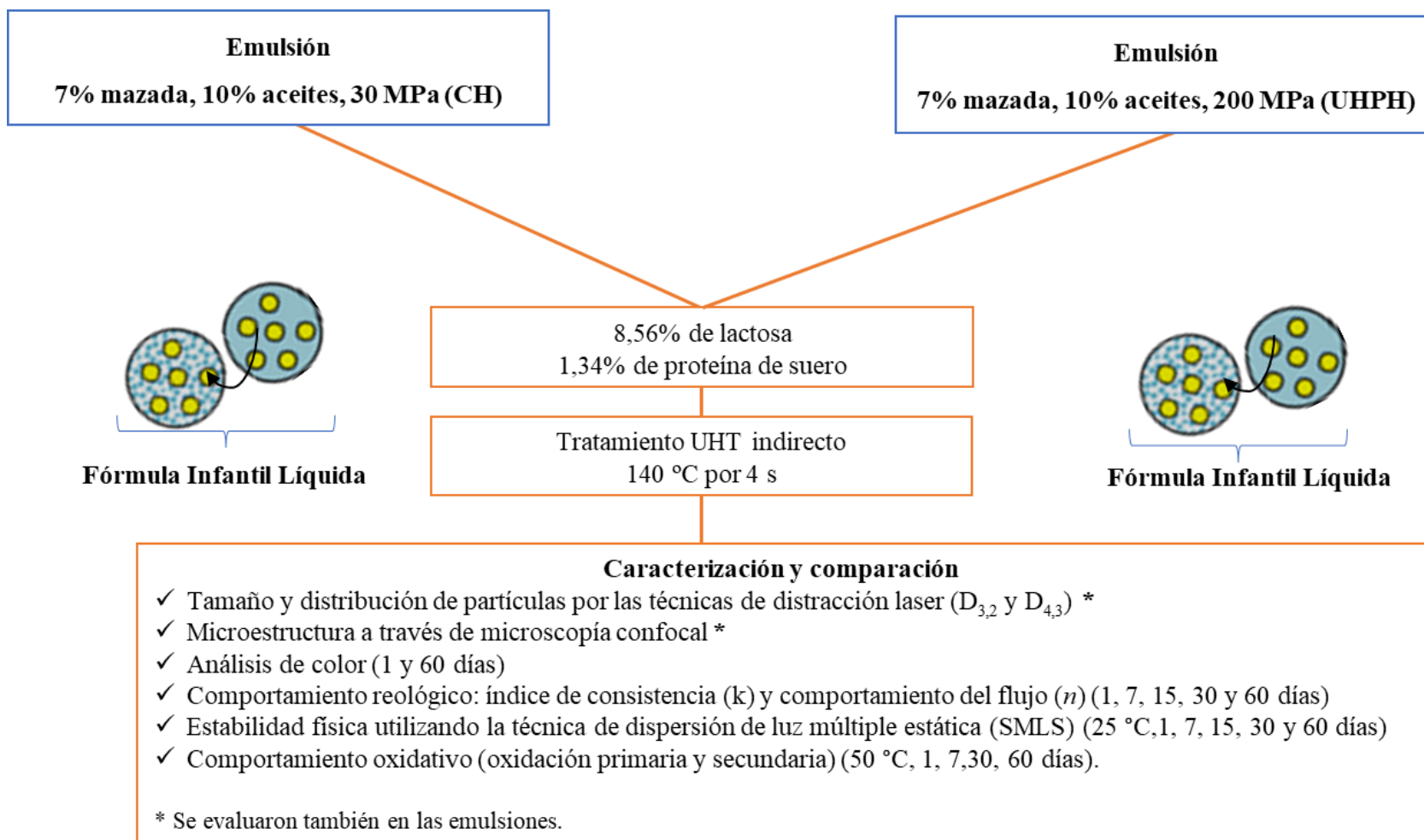
Finalmente, en el **Capítulo 7**, se presentan las conclusiones, donde se resumen los hallazgos y se proponen recomendaciones para futuras investigaciones.



**Figura 1.1.** Esquema del plan de trabajo expuesto en el **Capítulo 4**. Caracterización de emulsiones O/W formuladas a partir de mazada como emulgente, aceites vegetales ricos en ácidos grasos w-3 y 6, obtenidas por diferentes tecnologías de homogeneización.



**Figura 1.2.** Esquema del plan de trabajo expuesto en el **Capítulo 5**. Caracterización de emulsiones O/W formuladas a partir de un producto comercial enriquecido en membrana del glóbulo graso (MFGMP), aceites vegetales ricos en ácidos grasos w-3 y 6, obtenidas por diferentes tecnologías de homogeneización, y comparación con sus homólogos conteniendo mazada.



**Figura 1.3.** Esquema del plan de trabajo expuesto en el **Capítulo 6.** Aplicación de emulsiones en una fórmula láctea infantil líquida UHT.

## 1.4 Referencias bibliográficas

- Ali, A. H. (2019). Current knowledge of buttermilk: Composition, applications in the food industry, nutritional and beneficial health characteristics. *International Journal of Dairy Technology*, 72(2), 169–182. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12572>
- Coelho, M. S., Fernandes, S. S., & Salas-Mellado, M. de las M. (2019). Association between diet, health, and the presence of bioactive compounds in foods. In *Bioactive Compounds* (pp. 159–183). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814774-0.00009-8>
- Fernandez-Avila, C., Hebishy, E., Donsì, F., Arranz, E., & Trujillo, A. J. (2019). Production of food bioactive-loaded nanostructures by high-pressure homogenization. In *Nanoencapsulation of Food Ingredients by Specialized Equipment* (pp. 251–340). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815671-1.00006-8>
- Gebreselassie, N., Abrahamsen, R. K., Beyene, F., Abay, F., & Narvhus, J. A. (2016). Chemical composition of naturally fermented buttermilk. *International Journal of Dairy Technology*, 69(2), 200–208. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12236>
- Ghelichi, S., Hajfathalian, M., Yesiltas, B., Sørensen, A.-D. M., García-Moreno, P. J., & Jacobsen, C. (2023). Oxidation and oxidative stability in emulsions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(3), 1864–1901. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13134>
- Hebishy, E., Buffa, M., Guamis, B., Blasco-Moreno, A., & Trujillo, A.-J. (2015). Physical and oxidative stability of whey protein oil-in-water emulsions produced by conventional and ultra high-pressure homogenization: Effects of pressure and protein concentration on emulsion characteristics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 32, 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.013>
- Hebishy, E., Buffa, M., Guamis, B., & Trujillo, A.-J. (2013). Stability of sub-micron oil-in-water emulsions produced by ultra-high pressure homogenization and sodium caseinate as emulsifier. *Chemical Engineering Transactions*, 32, 1813-1818. <https://doi.org/10.3303/CET1332303>
- McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 7(6), 2297–2316. <https://doi.org/10.1039/c0sm00549e>
- Melo, D., Machado, T. B., & Oliveira, M. B. P. P. (2019). Chia seeds: an ancient grain trending in modern human diets. *Food & Function*, 10(6), 3068–3089. <https://doi.org/10.1039/c9fo00239a>
- Mudgil, D., Barak, S., & Darji, P. (2016). Development and characterization of functional cultured buttermilk utilizing Aloe vera juice. *Food Bioscience*, 15, 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.06.001>

## Capítulo 1

- Ortega-Anaya, J., & Jiménez-Flores, R. (2019). Symposium review: The relevance of bovine milk phospholipids in human nutrition—Evidence of the effect on infant gut and brain development. *Journal of Dairy Science*, *102*(3), 2738–2748. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15342>
- Singh, H. (2011). Aspects of milk-protein-stabilised emulsions. *Food Hydrocolloids*, *25*(8), 1938–1944. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.022>
- Trujillo, A. J., Roig-Sagués, A. X., Juan, B., Zamora, A., & Ferragut, V. (2021). Ultrahigh-pressure homogenization in dairy processing: Effects on quality and functionality. In *Innovative Food Processing Technologies* (pp. 315–336). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22998-3>

# Capítulo 2

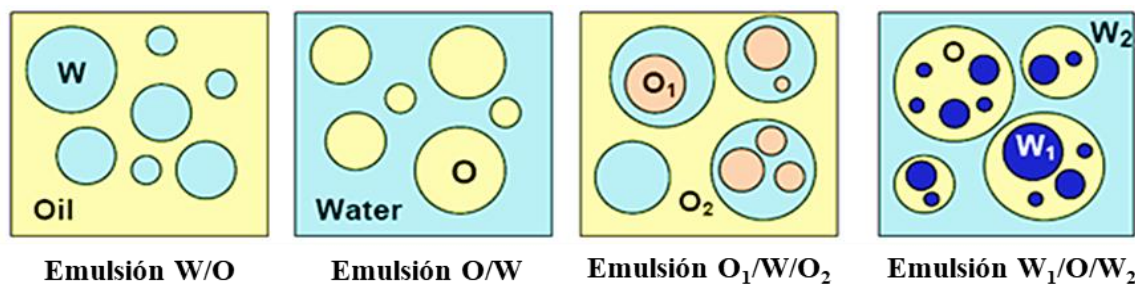
## Revisión bibliográfica

### 2.1 Emulsión

Una emulsión es un sistema heterogéneo formado por dos líquidos inmiscibles, normalmente estabilizado por un emulsionante. En las últimas décadas, las características estructurales y dinámicas de las emulsiones han motivado que exista un creciente interés en la aplicación de este tipo de sistemas en diversos sectores industriales. Por ejemplo, en el campo farmacéutico, cosmético y alimentario se utilizan estos sistemas como contenedores o vehículos de transporte, para mejorar la eficiencia en el suministro de activos, su biodisponibilidad y su protección frente a procesos de degradación (Berton-Carabin et al., 2018; Granato et al., 2020).

En la industria alimentaria, las emulsiones desempeñan un papel esencial en la formulación y calidad de muchos alimentos, brindando características únicas y mejorando la experiencia del consumidor (textura, estabilidad y palatabilidad). Por ejemplo, las emulsiones son ampliamente utilizadas para fabricar una amplia variedad de productos, incluyendo leche, cremas, refrescos, bebidas nutritivas, aderezos, mayonesa, salsas, postres, helados, margarina y mantequilla (McClements, 2010).

En una emulsión, un líquido (la fase dispersa o discontinua) es dispersado en otro líquido (la fase continua), en el cual no es soluble (Wilde, 2009). En función de la naturaleza y la distribución de sus fases (ver **Figura 2.1**), las emulsiones se clasifican en sistemas simples, como las emulsiones aceite-en-agua ("Oil-in-Water", O/W) o agua-en-aceite ("Water-in-Oil", W/O), y sistemas múltiples, como las emulsiones agua-en-aceite-en-agua ("Water-in-Oil-in-Water",  $W_1/O/W_2$ ) o aceite-en-agua-en-aceite ("Oil-in-Water-in-Oil",  $O_1/W/O_2$ ) (McClements, 2007).



**Figura 2.1.** Representación esquemática de distintos tipos de emulsiones: emulsiones agua-en-aceite ("Water-in-Oil", W/O), emulsiones aceite-en-agua ("Oil-in-Water", O/W), emulsiones de aceite-en-agua-en-aceite (Oil-in-Water-in-Oil", O<sub>1</sub>/W/O<sub>2</sub>) y emulsiones de agua-en-aceite-en-agua ("Water-in-Oil-in-Water", W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub>) (Vergara, 2018).

De acuerdo al tamaño de las gotas de la fase dispersa, las emulsiones también se pueden clasificar en: macro-, nano- y microemulsiones. En la **Tabla 2.1.** se describe la composición y propiedades fisicoquímicas observadas en macro-, nano- y microemulsiones de naturaleza alimentaria (Anton & Vandamme, 2011; Gupta et al., 2016; McClements, 2010).

**Tabla 2.1.** Propiedades de macro-, nano- y microemulsiones de naturaleza alimentaria.

Propiedad	Macroemulsiones	Nanoemulsiones	Microemulsiones
Tamaño	>400 nm	100-400 nm	<100 nm
Morfología	Esférica	Esférica	Esférica, laminar
Apariencia física	Turbio	Turbio/Transparente	Transparente
Estabilidad	Termodinámicamente inestable, débilmente cinéticamente estable	Termodinámicamente inestable, cinéticamente estable	Termodinámicamente estable
Método de preparación	Alta energía	Alta y baja energía	Baja energía
Concentración del emulsionante	Baja	Moderada	Alta
Polidispersidad	Normalmente alta (>40%)	Normalmente baja (<20%)	Normalmente baja (<10%)

Las macro-emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, es decir, con el tiempo siempre se da una separación de fases, aunque a veces pueden presentar una cierta estabilidad

cinética que retarda su separación, y se caracterizan porque su generación no suele ser espontánea requiriendo metodologías de preparación de alta energía. El diámetro medio de las gotitas dispersas puede ser desde nanométrico a micrométrico. Por otro lado, las nanoemulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, pero cinéticamente estables, y requieren metodologías de preparación de alta/baja energía. En este tipo de emulsiones, el diámetro medio de las gotitas dispersas está comprendido entre 100 y 400 nm. Por último, las microemulsiones son sistemas termodinámicamente estables que se pueden formar de manera espontánea y que requieren métodos de preparación de baja energía. El tamaño medio de las gotitas de la fase dispersa es nanométrico (<100 nm) y tienen un aspecto transparente o translucido azulado (Delmas et al., 2011). Las microemulsiones son mezclas homogéneas a nivel macroscópico, pero su estructura es heterogénea a nivel submicroscópico. La estabilidad de este tipo de emulsiones se ha observado que se puede alterar por cambios de temperatura y pH hasta alcanzar un punto en el que el sistema se escinde en dos fases (Anton & Vandamme, 2011).

La estabilidad física y oxidativa de una emulsión se define como la capacidad de resistir cambios en sus propiedades a lo largo del tiempo. En muchos contextos industriales, la estabilidad física se define esencialmente como la capacidad de evitar la coalescencia de las partículas de la emulsión y prevenir la sedimentación durante un período de tiempo determinado, mientras que la estabilidad oxidativa se refiere a la capacidad que tiene una emulsión de proteger sus ingredientes frente a fenómenos de oxidación, que puedan dar lugar a la formación de compuestos no deseados (McClements, 2015a). A esta estabilidad la influyen factores clave, como el tamaño de las partículas, la diferencia de densidad entre ambas, la viscosidad de la fase continua y de la emulsión final, las cargas de las partículas, la naturaleza, eficacia y cantidad del emulsionante, y las condiciones de almacenamiento (McClements, 2015a). Estas últimas incluyen temperaturas elevadas o bajas, agitación y vibración, dilución o evaporación durante el almacenamiento o el uso.

La estabilidad de una emulsión está estrechamente vinculada a la presencia de emulsionantes, sustancias que facilitan la dispersión de las gotas de la fase dispersa en la fase continua, generando una mezcla estable. Los emulsionantes típicamente poseen una porción hidrofílica (con afinidad por el agua) y una porción lipofílica (con afinidad por los lípidos o grasas), permitiéndoles unirse a ambas fases. Este proceso reduce la tensión

interfacial y previene la coalescencia de las gotas, contribuyendo así a la estabilidad de la emulsión. Los emulsionantes pueden ser de origen natural o sintético. La elección entre ellos se basa en las características deseadas de la emulsión y en los requisitos de estabilidad y compatibilidad de los ingredientes utilizados (McClements, 2015a). Algunos ejemplos comunes de emulsionantes incluyen proteínas, lípidos y surfactantes (Wilde, 2009). Actualmente, los emulsionantes comerciales más utilizados a base de proteínas son las caseínas y derivados, que se comercializan industrialmente en forma de caseinato de sodio (Wang et al., 2013). Estos emulsionantes están compuestos por todas las fracciones de caseína, incluyendo caseínas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ , que poseen fuertes propiedades anfifílicas.

## 2.2 Emulsiones aceite-en-agua (O/W)

Las emulsiones aceite-en-agua (O/W) son mezclas coloidales en las que las gotas de aceite (fase dispersa) están dispersas en una fase acuosa continua. Este tipo de emulsiones es comúnmente utilizado en una variedad de productos, desde alimentos y productos farmacéuticos hasta productos cosméticos e industriales.

### 2.2.1 Fase dispersa “O”

En una emulsión O/W, la fase dispersa u oleosa se compone de diminutas gotas de aceite. En este tipo de emulsiones, la fase oleosa suele consistir en líquidos no polares que abarcan ácidos grasos libres, mono, di y triacilglicéridos, aceites esenciales, aromatizantes, ceras, lípidos, compuestos lipofílicos y vitaminas solubles en aceite. Dentro de todos estos componentes, los triglicéridos de cadena larga son los más frecuentemente utilizados debido a su rentabilidad, propiedades funcionales y valor nutricional (Aswathanarayan & Vittal, 2019).

Actualmente, los consumidores están cada vez más interesados en su bienestar y buscan de manera proactiva alimentos que contribuyan a su salud. La composición de la fase oleosa en emulsiones desempeña un papel crucial en este contexto. La tendencia actual destaca los alimentos funcionales personalizados, que incorporan ingredientes bioactivos con funciones específicas en el organismo (Kaur & Das, 2011). Por ejemplo, la inclusión de ácidos grasos omega-3 ( $\omega$ -3) y omega-6 ( $\omega$ -6) de origen vegetal en estos alimentos ha ganado popularidad debido a sus beneficios para la salud. La cuidadosa selección y combinación de aceites

vegetales ha permitido la incorporación de mezclas óptimas de ácidos grasos esenciales, contribuyendo a una alimentación equilibrada y saludable, y a asegurar la estabilidad de dichos ácidos grasos (Shiela et al., 2004).

Los ácidos grasos esenciales, clasificados como poliinsaturados (PUFAs), son aquellos que el cuerpo humano no puede producir por sí mismo y, por lo tanto, deben obtenerse a través de la dieta. Hay dos tipos principales de ácidos grasos esenciales (Coelho et al., 2019):

#### 1. Ácidos Grasos Omega-3 ( $\omega$ -3)

- **Ácido  $\alpha$ -Linolénico (ALA):** Es el ácido graso esencial  $\omega$ -3 más común. Se encuentra en alimentos como las semillas de chía, semillas de lino, nueces y aceite de canola.
- **Ácido Eicosapentaenoico (EPA):** Se encuentra principalmente en pescados grasos como el salmón, la caballa y las sardinas.
- **Ácido Docosahexaenoico (DHA):** Al igual que el EPA, se encuentra en pescados grasos y también se puede obtener a través de suplementos de aceite de pescado.

#### 2. Ácidos Grasos Omega-6 ( $\omega$ -6)

- **Ácido Linoleico (LA):** Este es el ácido graso esencial  $\omega$ -6 más común y se encuentra en aceites vegetales como el aceite de girasol, maíz y soja, así como en frutos secos y semillas.
- **Ácido Araquidónico (AA):** Se encuentra en alimentos de origen animal como carne y huevos, y también se produce a partir del ácido linoleico en el cuerpo.

Ambos tipos de ácidos grasos esenciales desempeñan un papel fundamental en la salud humana, participando en funciones vitales como la formación de membranas celulares, la regulación del sistema inmunológico y la síntesis de hormonas. Mantener un equilibrio adecuado entre los ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 es esencial para promover la salud general y prevenir desequilibrios inflamatorios (Gillingham et al., 2013). Por ejemplo, se ha evidenciado que el consumo de ácidos grasos  $\omega$ -3 brinda protección contra enfermedades cardíacas e inflamatorias, asma, trastornos del estado de ánimo y enfermedades de la retina (Kulczyński et al., 2019; Melo et al., 2019; Muñoz et al., 2013; O'Dwyer et al., 2013).

Es conocido que algunos ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) pueden convertirse en otros PUFAs a través de procesos metabólicos en el cuerpo (**Figura 2.2**). Este proceso se conoce

como desaturación y elongación, y es esencial para la síntesis de diferentes tipos de PUFAs. Por ejemplo, la conversión del ALA en ácidos grasos de cadena larga como el EPA y DHA o el LA a AA a través de una serie de reacciones enzimáticas. Es importante destacar que estas conversiones no son siempre eficientes y pueden estar influenciadas por diversos factores, como la dieta y la presencia de otras grasas en la alimentación. Además, existe una competencia entre los grupos de ácidos grasos omega-3 y omega-6 por las mismas enzimas, lo que puede afectar la tasa de conversión (Hoppenbrouwers et al., 2019; Huerta-Yépez et al., 2016).

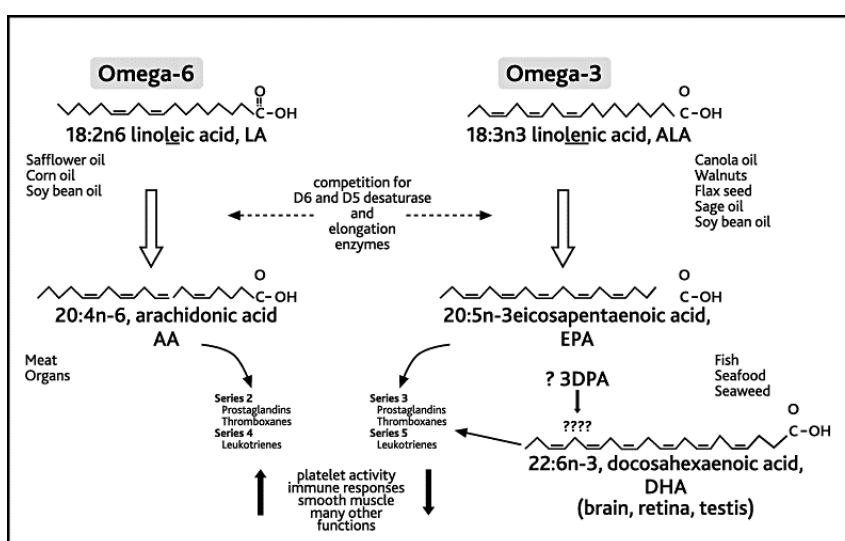


Figura 2.2. Rutas metabólicas y fuentes alimentarias de los ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 (Stark et al., 2008).

Investigaciones resaltan la importancia de mantener un equilibrio cercano a 1 entre los ácidos grasos  $\omega$ -6 y  $\omega$ -3 para aprovechar sus beneficios (Gómez Candela, 2011; Harris et al., 2006). En la actualidad, este equilibrio a menudo supera el valor de 20, lo que aumenta el riesgo de enfermedades relacionadas con el sobrepeso y la obesidad (Simopoulos A., 2016), y se ha vinculado con problemas de comportamiento en niños. De hecho, un estudio realizado por Johnson et al. (2017) mostró mejoras en el tratamiento de niños con déficit de atención mediante suplementos de ácidos grasos  $\omega$ -6/ $\omega$ -3.

Hasta el momento, los aceites de pescado son la mayor fuente industrial de ácidos grasos poliinsaturados. Sin embargo, en la actualidad se ha observado que los aceites de pescado no pueden satisfacer la creciente demanda global de ácidos grasos  $\omega$ -3 ni son aptos para

consumidores vegetarianos y veganos (Ramprasath et al., 2015). Por tanto, se ha generado una creciente demanda de búsqueda de otras fuentes de PUFAs que sean de origen vegetal. En este sentido, los aceites extraídos mediante el prensado de semillas de chía y girasol poseen un significativo potencial como fuentes de ácidos grasos, presentando un notorio valor nutracéutico y terapéutico, según investigaciones como las de Anjum et al. (2012). Las semillas de chía (*Salvia hispanica L.*) son la fuente vegetal con mayor concentración conocida de  $\omega$ -3, con hasta un 67,8% de ALA y un 20% de LA (Noello et al., 2016). Por otra parte, el aceite de girasol (*Helianthus annuus L.*) es un aceite que tiene un bajo contenido en ácidos grasos saturados y es rico en LA ( $\omega$ -6), ácido oleico ( $\omega$ -9) y fitoesteroles (Moreau et al., 2002, 2018; Sousa et al., 2021). Ambos aceites se distinguen por su alto contenido en vitamina E, que les proporciona un poderoso efecto antioxidante frente a radicales libres. El aceite de chía presenta una concentración de vitamina E que oscila entre 238-427 mg/kg, mientras que el de girasol la tiene de 634,4 mg/kg (Reyes-Caudillo et al., 2008).

Desde la perspectiva del desarrollo de un nuevo alimento funcional basado en emulsiones, la incorporación de una mezcla de aceites de chía (abundante en  $\omega$ -3) y girasol (rico en  $\omega$ -6) como fase dispersa se muestra sumamente prometedora. Esta combinación puede contribuir de manera efectiva a mantener una proporción equilibrada de  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 en el organismo, cumpliendo con las recomendaciones de la FAO/OMS, además de ser una fuente de vitamina E y fitoesteroles para el desarrollo de una alimentación saludable (Guiotto et al., 2014).

### **2.2.2 Fase continua “W”**

La fase continua en una emulsión se refiere a la matriz continua del sistema en la cual están dispersas finamente las pequeñas gotas de la fase dispersa. En las emulsiones, la fase continua proporciona la estructura básica y el sostén del producto. En una emulsión O/W, la fase continua está compuesta principalmente por agua, pudiendo contener también otros ingredientes como carbohidratos, proteínas, co-disolventes (alcoholes, polioles), minerales, bases y ácidos (Saxena et al., 2017). El tipo y la concentración de la fase continua determinan la polaridad, el pH, el comportamiento de fases, la tensión interfacial, la fuerza iónica y el comportamiento reológico de las emulsiones, lo cual, a su vez, influye en la fabricación y estabilización de las emulsiones (Manzoor et al., 2023).

### **2.2.3 Emulsionante o material emulgente**

Un emulsionante es una sustancia química que tiene la capacidad de facilitar y estabilizar la formación de emulsiones. En una emulsión, el emulsionante juega un papel crucial al permitir que las fases inmiscibles se mezclen de manera estable mediante la reducción de la tensión interfacial entre las gotas de la fase dispersa y la fase continua. Al adsorberse en la interfaz entre estas fases, el emulsionante forma una capa protectora alrededor de las gotas, impidiendo su coalescencia y evitando que se agrupen (Borreani et al., 2019).

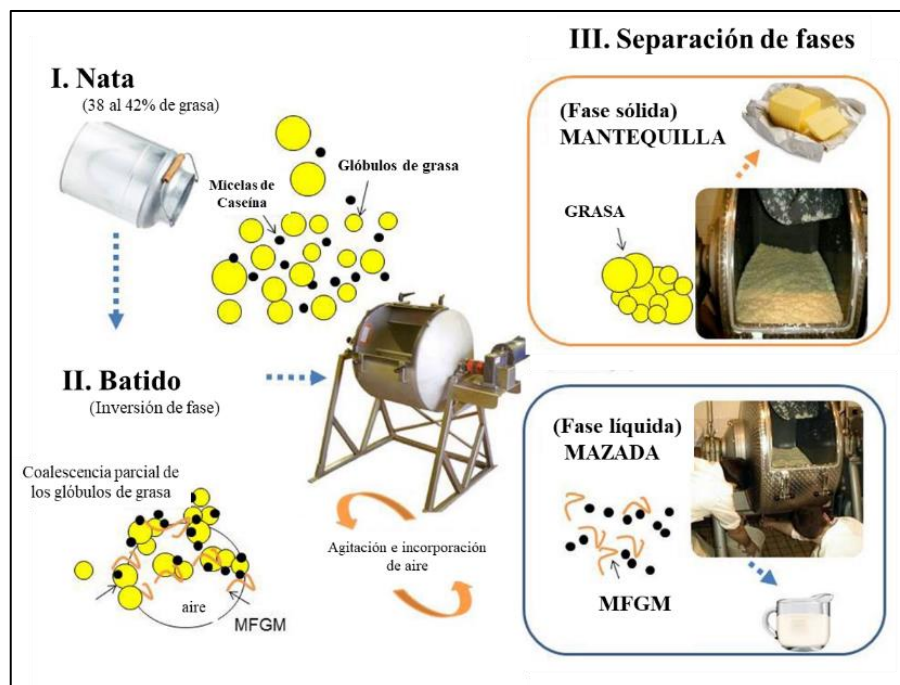
Los emulsionantes pueden tener diferentes estructuras químicas, pero comparten la propiedad de ser anfífilos, es decir, tienen regiones que son solubles en agua (hidrofilicas) y otras que son solubles en aceite (lipofílicas). Esta dualidad les permite interactuar tanto con la fase acuosa como con la fase oleosa de la emulsión. En la industria alimentaria, los emulsionantes son ampliamente utilizados para crear productos estables y homogéneos, tales como cremas, salsas, y aderezos. Algunos ejemplos comunes de emulsionantes son los tensioactivos, fosfolípidos, proteínas y polisacáridos (McClements et al., 2017; Stauffer et al., 2020).

Un emulsionante debe cumplir con varias características para ser eficaz en la formación y estabilización de emulsiones. Estas características son fundamentales para asegurar la calidad y la estabilidad de la emulsión (McClements, 2015b). Algunos criterios son: (1) Actividad superficial: El emulsionante debe adsorberse en las interfaces O/W. Esto implica tener una proporción adecuada de grupos polares y no polares en su estructura molecular para interactuar con ambas fases; (2) Cinética de adsorción: El emulsionante debe adsorberse rápidamente en las superficies de las gotas durante la homogeneización. Esta rápida adsorción es esencial para reducir rápidamente la tensión interfacial y evitar la agregación de las gotas; (3) Reducción de la tensión interfacial: Los emulsionantes adsorbidos en la interfaz deben reducir eficazmente la tensión interfacial entre las fases. Esto facilita la interrupción de las gotas dentro de los homogeneizadores y contribuye a la estabilidad de la emulsión; (4) Estabilización: El emulsionante debe formar una capa protectora alrededor de las gotas para prevenir la agregación durante los encuentros gota a gota. Esto se logra generando fuertes interacciones repulsivas, como la repulsión estérica o electrostática; (5) Cobertura superficial: La cantidad de emulsionante necesaria para estabilizar una emulsión depende de la carga superficial, que es la masa de emulsionante por unidad de superficie en

saturación. Cuanto mayor sea la carga superficial, más emulsionante se requiere para estabilizar una emulsión específica.

Estos criterios aseguran que el emulsionante facilite la formación de pequeñas gotas durante la homogeneización y prevenga la coalescencia de las gotas bajo diversas condiciones ambientales. En líneas generales, la elección del emulsionante adecuado dependerá del tipo de emulsión (O/W, W/O), facilidad de su manejo, su compatibilidad con el resto de los ingredientes de la emulsión, etiquetado y registro sanitario, las características del producto final y las condiciones de procesamiento y almacenamiento (Stauffer et al., 2020).

La mazada, también conocida como suero de mantequilla o *buttermilk* en inglés, es un subproducto líquido de color blanco y textura cremosa con un alto valor nutricional que se obtiene durante el proceso de elaboración de la mantequilla a partir de la nata (Augustin et al., 2015; Singh, 2006). En concreto, la nata que proviene del proceso de desnatado de la leche se bate para separar la parte acuosa de la parte grasa. Con la parte grasa se elabora la mantequilla y a la parte acuosa se le denomina mazada (**Figura 2.3**).



**Figura 2.3.** Esquema de los diferentes pasos de procesamiento utilizados en la fabricación de mantequilla, con su impacto en la estructura de la matriz de la leche. (I) La nata pasteurizada se bate para inducir una inversión de fase; (II) la membrana del glóbulo de grasa de la leche (MFGM) se rompe liberando su contenido graso; (III) el líquido expulsado (mazada) resultante del batido se drena y los granos de mantequilla se siguen procesando (Conway et al., 2014).

Según las últimas estadísticas, se produjeron aproximadamente 400.000 t y 973.000 t de mazada anualmente en Unión Europea (Eurostat, 2022) y Estados Unidos (USDA, 2022), respectivamente. En líneas generales, por cada 100 kg de leche, se pueden obtener 4,35 kg de mantequilla y 4,55 kg de mazada (Boylston, 2019). Desde una perspectiva comercial, una vez que se obtiene la mazada, generalmente esta se somete a procesos de concentración mediante evaporación y secado por pulverización, lo que resulta en una mazada en formato polvo. De este proceso, se pueden obtener mazadas de diferente composición (dulce, ácida, de suero) (**Figura 2.4**) y diferentes propiedades funcionales en base al origen de la nata empleada (**Tabla 2.2**).

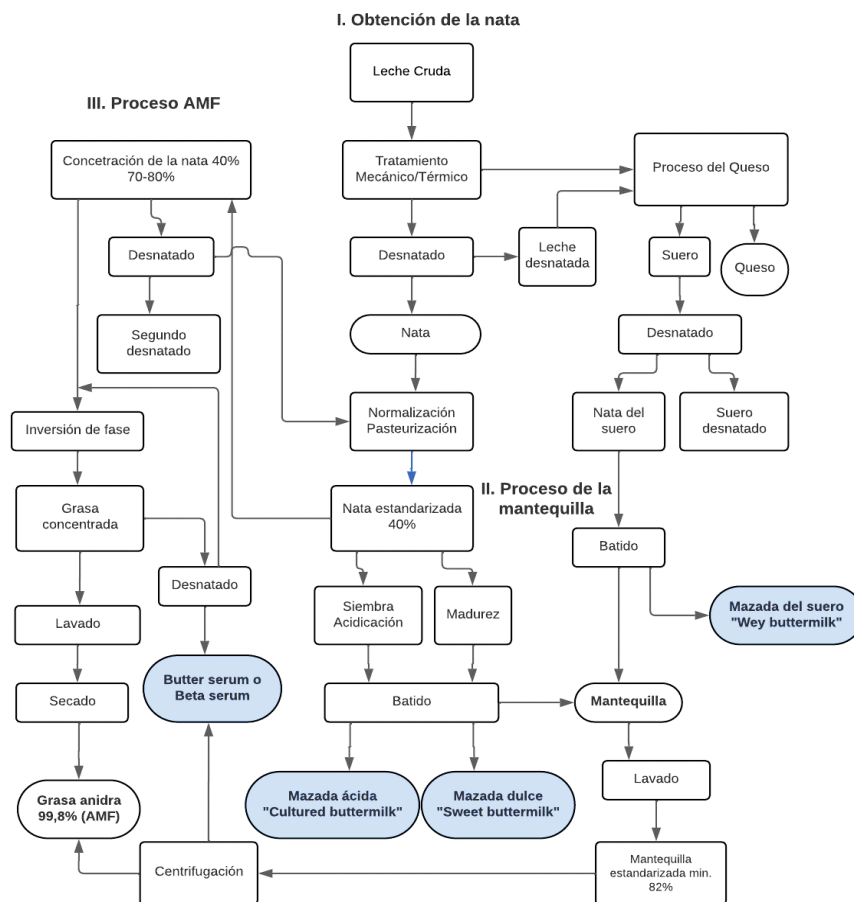
**Tabla 2.2.** Composición<sup>1</sup> de la leche desnatada en polvo, la mazada dulce, ácida o de suero (Sodini et al., 2006).

Producto	Nitrógeno Total	Lípidos	Fosfolípidos	Ceniza	Lactosa	pH
Leche desnatada en polvo	35,9	0,3	ND <sup>2</sup>	8,0	55,8	6,39
Mazada dulce	31,5	13,1	1,27	6,7	48,7	6,61
Mazada ácida	27,8	22,3	1,15	6,2	43,7	5,39
Mazada de suero	14,1	15,5	1,87	7,0	63,4	5,98

<sup>1</sup> Concentraciones expresadas en % de base seca. <sup>2</sup> ND = No determinado.

La mazada dulce, también conocida como suero de mantequilla dulce, es la variedad de mazada más ampliamente utilizada en el ámbito comercial. Esta mazada suele presentar niveles de acidez que oscilan entre el 0,10% y el 0,15%, y se caracteriza por tener un contenido de proteínas (caseína y séricas) comprendido entre 31,5% y 33,1%, de lactosa entre un 48,7% y 53,8%, y de grasa entre un 5,7% y 13,1% (Sodini et al., 2006). Por otro lado, la mazada ácida o fermentada (*cultured buttermilk*) se distingue por su alta concentración de fosfolípidos y por su acidez, que puede alcanzar niveles superiores al 1% (Banerjee & Qamar, 2022). Finalmente, la mazada de suero (*whey buttermilk*) proviene del suero de la quesería y se caracteriza por su elevado contenido de lactosa, que representa el 63,4%, y un matiz ligeramente ácido. En composición, la mazada se asemeja a la leche desnatada en cuanto al contenido de proteínas (caseína y proteínas séricas), minerales y lactosa. Esto la convierte en una opción muy atractiva como sustituto en una amplia variedad de aplicaciones alimentarias (De Bassi et al., 2012; Gebreselassie et al., 2016).

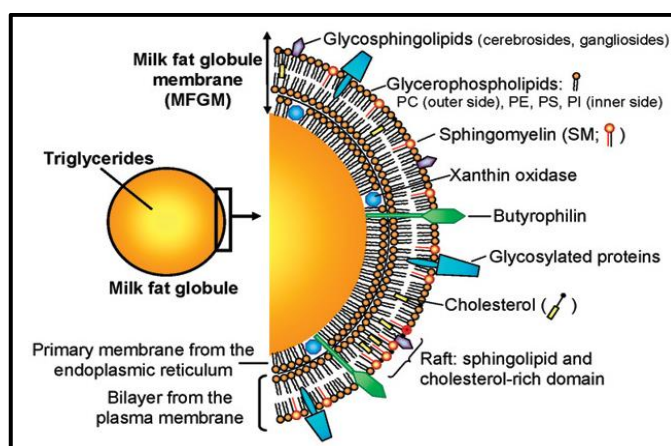
Recientemente, se ha observado un creciente interés en la utilización de la mazada en el desarrollo de alimentos funcionales, principalmente debido a su contenido excepcionalmente alto en membrana del glóbulo de grasa de la leche (MFGM) (Dewettinck et al., 2008). La MFGM es una membrana natural de la leche que actúa como emulsionante natural, ya que rodea y protege los glóbulos de grasa láctea ricos en triglicérido contra fenómenos de floculación y la coalescencia (**Figura 2.5**) (Bourlieu & Michalski, 2015; Dewettinck et al., 2008; Garczewska-Murzyn et al., 2022).



**Figura 2.4.** Diagrama de flujo del proceso de obtención de: (I) nata, (II) mantequilla, (III) grasa láctea anhidra (AMF) y diversos tipos de mazada (dulce, ácida, de suero) a partir de leche cruda (Vanderghem et al., 2010).

Los componentes de la MFGM tienen la capacidad de interactuar con el calcio presente en la leche, lo que a su vez ayuda a evitar la floculación de proteínas, en especial de la caseína, y previene así la separación de las fases de la leche (Jukkola et al., 2019; Spitsberg et al., 2019). Asimismo, la MFGM previene la oxidación e hidrólisis de la grasa de la leche, lo que mejora la idoneidad de la leche para su procesamiento en la industria láctea (El-Loly, 2011; Singh & Gallier, 2017; Smoczyński et al., 2012).

La MFGM tiene espesores comprendidos entre 10 y 50 nm, y se compone de proteínas bioactivas (25-70%), lípidos no polares y polares (30-75%), enzimas y otros componentes minoritarios (Conway et al., 2014; Dewettinck et al., 2008; Lambert et al., 2016; Vanderghem et al., 2010). Los lípidos polares están compuestos principalmente por fosfolípidos (aproximadamente el 30%), como la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE), la fosfatidilserina (PS) y el fosfatidilinositol (PI), así como por esfingolípidos, destacando la esfingomiélinea (SM), la cual es la más predominante en los lípidos polares de la mazada (Britten et al., 2008; Rombaut et al., 2006; Rombaut & Dewettinck, 2006).



**Figura 2.5.** Representación esquemática de la estructura de la membrana del glóbulo de grasa de la leche (Lopez et al., 2008).

Hasta la fecha, se ha descubierto que los lípidos polares de la leche de la MFGM y sus proteínas asociadas tienen una actividad fisiológica que va más allá de su función estructural en las membranas biológicas. En concreto, se ha observado que los lípidos y proteínas de la MFGM presentes en la mazada influyen en la fisiología intestinal, el metabolismo lipídico, el desarrollo cognitivo del cerebro estimulando el crecimiento de las células nerviosas (Ali, 2019), la resistencia física, el sistema inmunológico y la salud de la piel manteniendo su hidratación (Anto et al., 2020; Da Silva et al., 2021; Ortega-Anaya & Jiménez-Flores, 2019). Por ejemplo, se ha demostrado que el consumo continuado de mazada puede tener un efecto preventivo contra enfermedades cardiovasculares, ya que es capaz de reducir el nivel de colesterol en sangre, y el cáncer de colon como consecuencia de su carácter antioxidante (El-Loly, 2011; Mudgil et al., 2016). Por esta razón, estos componentes se suelen aislar de la mazada y se utilizan en la elaboración de alimentos funcionales (p.e. fórmulas infantiles) y

productos cosméticos (Arranz & Corredig, 2017; Fontecha et al., 2020; Govindasamy-Lucey et al., 2006).

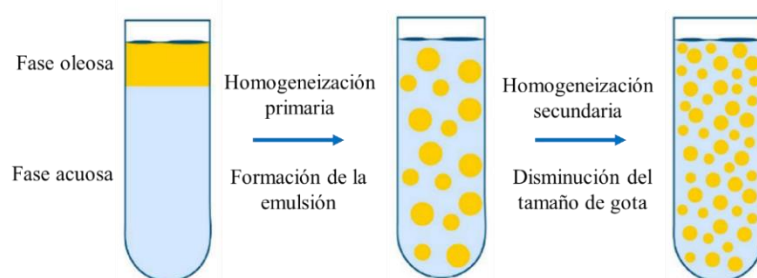
La mazada es un producto muy versátil que se utiliza tanto en alimentación humana como animal (Sodini et al., 2006; Vanderghem et al., 2010). Por ejemplo, en la industria láctea, la mazada se emplea en la producción de bebidas, helados, quesos y yogures. En este sector, la mazada se utiliza como aditivo para mejorar la estabilidad térmica de la leche condensada reconstituida, y para mejorar la estructura, las características sensoriales y el rendimiento de yogures y quesos bajos en grasa (Govindasamy-Lucey et al., 2006; Hickey et al., 2017; Romeih et al., 2012; Sakkas et al., 2020, 2021; Vanderghem et al., 2010). La mazada baja en grasa puede contener hasta un 28% de calcio, y consumir 500 mL de suero de mantequilla, según estudios realizados por Kumar et al. (2019), sería suficiente para cubrir el requerimiento diario de calcio del cuerpo humano, que es de 1 g.

Desde el punto de vista del uso de la mazada como emulsionante natural en alimentación, los fosfolípidos y proteínas presentes en la MFGM son los componentes que le confieren esa propiedad, observándose una mayor capacidad emulsionante de la mazada a mayor concentración de proteínas en la MFGM. Como ejemplo, se ha reportado que 1 g de MFGM puede llegar a emulsionar 25 g de aceite (Kanno et al., 1989, 1991). Así, la mazada se ha utilizado como emulsionante en productos tales como el chocolate, la mantequilla reconstituida, análogos de queso y salsas de queso, y como aditivo para mejorar la capacidad de retención de agua, la textura y la protección de lípidos contra oxidación en productos de panadería, bollerías y salsas (Ali, 2019; Vanderghem et al., 2010).

### **2.3 Formación de una emulsión aceite-en-agua**

La preparación de una emulsión implica la combinación de dos líquidos inmiscibles, fase dispersa y fase acuosa, con la ayuda de un emulsionante para formar una mezcla estable. En líneas generales para preparar una emulsión (**Figura 2.6**) se suelen llevar a cabo los pasos que se describen a continuación (Horn, 2012, McClements, 2015): (1) Selección de la fase acuosa, dispersa y emulsionante en función del tipo de emulsión deseada y del producto final que se está formulando; (2) Medir con precisión las cantidades requeridas de la fase acuosa, la fase dispersa y el emulsionante. En algunos casos se suele calentar las fases acuosa y

dispersa puede facilitar la formación de la emulsión al reducir la viscosidad y mejorar la solubilidad del emulsionante; (3) Incorporar el emulsionante a una de las fases (generalmente a la fase acuosa u oleosa) antes de la mezcla. Esto permite que el emulsionante se distribuya uniformemente y adsorba en la interfaz entre las fases; (4) Mezclar las fases acuosa y dispersa gradualmente de forma manual o con un agitador/homogeneizador de baja energía para obtener una primera emulsión de tamaño de gota grande denominada como “gruesa”. A continuación, dicha emulsión es sometida a una segunda etapa de homogeneización en un equipo de alta energía que permita la rotura de las gotas grandes de fase dispersa y crear emulsiones más finas y estables; (5) En algunos casos, enfriar la emulsión puede ayudar a mejorar su estabilidad, especialmente si se utiliza una fase oleosa que es líquida a altas temperaturas, pero sólida a bajas temperaturas; y (6) Almacenar la emulsión en envases adecuados, teniendo en cuenta las condiciones de almacenamiento recomendadas para mantener su estabilidad a lo largo del tiempo.



**Figura 2.6.** Proceso de formación de una emulsión o/w (McClements, 2011).

De acuerdo con lo descrito anteriormente, la estabilidad de las emulsiones juega un papel multifacético en la industria alimentaria, afectando aspectos que van desde la calidad sensorial hasta la vida útil de los productos. La comprensión y el control de las propiedades emulsionantes son esenciales para garantizar la consistencia y el éxito de una amplia variedad de productos alimentarios en el mercado. Durante la elaboración de una emulsión, los tres puntos críticos que determinarán su calidad y estabilidad serán: (1) La formación y ruptura de las gotas; (2) La adsorción del agente emulsificante en la interfase aceite/agua; y (3) La coalescencia de las gotas.

La coalescencia, también denominada "re-coalescencia", es un fenómeno que ocurre después de la homogeneización y se refiere a la unión de las gotas recién formadas con el objetivo de minimizar su energía libre interfacial. Por lo tanto, resulta fundamental que el agente

emulsificante se adsorba rápidamente en la interfase para reducir la tensión interfacial y prevenir la re-coalescencia, ya que una adsorción lenta podría dificultar la eficiencia del proceso de formación de la emulsión (Mahdi Jafari et al., 2007; McClements, 2015).

## **2.4 Métodos de preparación de emulsiones**

En el proceso de formación de emulsiones, la energía juega un papel crucial, ya que rompe la interfaz entre las fases líquidas inmiscibles y facilita la creación de pequeñas gotas dispersas. En la actualidad existen varios métodos para preparar emulsiones, los cuales están clasificados entre métodos de emulsificación de alta o baja energía. La elección de un método u otro a la hora de preparar emulsiones dependerá de las características específicas del sistema y del producto final que se busca obtener (Salem et al., 2018).

### **2.4.1 Métodos de emulsificación de baja energía**

Los métodos para la obtención de emulsiones de baja energía se enfocan en la formación espontánea de diminutas gotas de aceite en mezclas de aceite-agua-emulsionante. Estos procedimientos implican comúnmente la utilización de agentes emulsionantes, los cuales desempeñan un papel crucial al reducir la tensión interfacial entre las fases y facilitar la creación de gotas más pequeñas. Este enfoque, caracterizado por su baja intensidad, demanda una menor cantidad de energía en comparación con los métodos de alta energía, lo que resulta beneficioso tanto en términos de eficiencia como de sostenibilidad (Izquierdo et al., 2001; Tadros et al., 2004).

Entre los métodos más convencionales empleados para la obtención de emulsiones de baja energía se encuentran (Maestro et al., 2008; Salem et al., 2018): (1) Emulsificación espontánea: En este método, las fases acuosa y oleosa se mezclan con un agente emulsionante y, mediante agitación o mezclado, las gotas de aceite se forman espontáneamente. La energía necesaria es baja, y el proceso se basa en la afinidad del emulsionante por las fases inmiscibles. Este método se suele utilizar en la producción de nanoemulsiones; (2) Temperatura de inversión de fase: En este método, la temperatura de la mezcla se ajusta para inducir la inversión de fase, lo que resulta en la formación espontánea de emulsiones. Se aprovecha la variación de solubilidad del emulsionante con la

temperatura. Este método se suele utilizar para controlar la formación de emulsiones, especialmente en sistemas con cambios de temperatura; (3) Composición de inversión de fase: En este método, se ajusta la composición de la mezcla para inducir la inversión de fase y la formación de emulsiones. Dependiendo de la formulación, las fases se separan y luego se reorganizan espontáneamente en una emulsión. Este método es muy útil para controlar la estabilidad y la composición de las emulsiones; y (4) Método del punto de inversión de emulsión: Este método implica ajustar el contenido de agua en una mezcla de aceite y emulsionante para inducir la inversión de fase y la formación espontánea de emulsiones. Esta metodología se emplea para controlar la relación entre las fases y mejorar la estabilidad de las emulsiones.

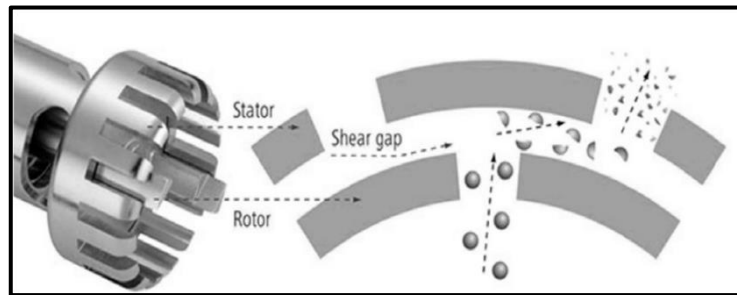
Los métodos de baja energía son valiosos en aplicaciones donde se busca evitar la aplicación de fuerzas intensas, como en la producción de emulsiones sensibles a la energía o en la fabricación de nanoemulsiones para aplicaciones específicas. No obstante, es importante señalar que estos métodos presentan diversas limitaciones. Por ejemplo, emplear cantidades considerables de emulsionantes puede afectar negativamente el sabor y la seguridad de las formulaciones de alimentos. Además, requieren un estricto control de la temperatura y, por lo tanto, no son adecuados para aplicaciones a gran escala en la producción industrial (Komaiko & McClements, 2016).

### **2.4.2 Métodos de emulsificación de alta energía**

Los métodos de alta energía para la preparación de emulsiones implican el uso de dispositivos mecánicos que generan fuerzas de ruptura intensas para mezclar y romper las fases de aceite y agua, facilitando así la formación de diminutas gotas de aceite (Gutiérrez et al., 2008; Leong et al., 2009). Los métodos de emulsificación de alta energía más utilizados incluyen aquellos basados en homogeneizadores de alta velocidad (rotor-estator), alta presión, microfluidización y sonicación, entre otros (Wooster et al., 2008). Estos métodos de alta energía son efectivos para obtener emulsiones con tamaños de gota pequeños y mejorar la estabilidad del sistema. Sin embargo, es importante considerar las propiedades específicas del producto y las limitaciones asociadas, como posibles efectos en la calidad sensorial y la necesidad de equipos especializados (Li et al., 2022).

### 2.4.2.1 Emulsificador por alta velocidad

Los emulsificadores por alta velocidad son equipos de estructura tipo rotor-estator, diseñados para generar fuerzas de corte y dispersión intensas (**Figura 2.7**). Se caracterizan por su capacidad para generar velocidades significativamente altas durante la operación, lo que contribuye a la formación eficiente de emulsiones al romper las fases líquidas inmiscibles en gotas más pequeñas. Estos equipos son altamente eficaces en la producción a gran escala de emulsiones estables. Asimismo, los mezcladores de rotor-estator permiten realizar operaciones intensivas de mezclado, molienda, dispersión y emulsificación en espacios reducidos. Con diversas geometrías, como dispositivos de ranuras y dientes o de descarga radial versus axial (Atiemo-Obeng & Calabrese, 2004), estos equipos son empleados tanto en procesos por lotes como continuos. Su aplicación abarca ampliamente la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, destacándose en la formación eficiente de emulsiones.



**Figura 2.7.** Homogeneizador *UltraTurrax*®: mecanismo de mezcla rotor/estator (Chee & Jawaid, 2019).

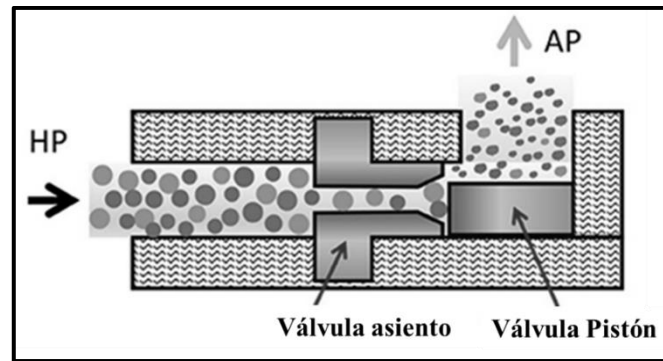
En los dispositivos rotor-estator, se realiza la mezcla de aceite y agua mediante la aplicación de velocidades de rotación elevadas, generalmente en el intervalo de 1000 a 25 000 rpm, en un espacio estrecho que oscila entre 50-1000  $\mu\text{m}$ , existente entre un disco estático (estator) y un disco giratorio (rotor). Este proceso conlleva a la creación de una región de interacción caracterizada por una disminución de la presión, lo que induce la circulación del líquido y promueve la formación de emulsiones con gotas de tamaño reducido, llegando a alcanzar dimensiones de hasta 1  $\mu\text{m}$ . La **Figura 2.7** ilustra cómo la ruptura de estas gotas ocurre debido al impacto mecánico contra las paredes, resultado de la alta aceleración del fluido y la presencia de esfuerzos cortantes en el flujo turbulento entre el rotor y el estator (Jafari et al., 2008). En este proceso altamente controlado, se gestionan variables críticas como el tiempo, la intensidad de la emulsificación y el diseño específico del rotor/estator. Estas

consideraciones permiten ajustar y optimizar el proceso para lograr la obtención de emulsiones con características deseadas, como tamaño de gota uniforme y estabilidad a largo plazo.

### 2.4.2.2 Homogeneización convencional y a alta presión

La homogeneización convencional (CH) y a alta presión (HPH), consisten en un proceso en el cual fluidos, generalmente líquidos, son sometidos a condiciones de presión significativamente elevadas con el propósito de mejorar su uniformidad y estabilidad. En esta tecnología, el líquido es forzado a pasar a través de una serie de estrechas aberturas o válvulas a una presión considerablemente mayor que la atmosférica. Este aumento de presión induce la ruptura de partículas y gotas presentes en el fluido, reduciendo su tamaño a nivel microscópico. La intensa acción de corte y la alta velocidad generadas durante este proceso resultan en una dispersión más fina y homogénea de los componentes del líquido. La eficacia de la homogeneización a alta presión está intrínsecamente ligada a la geometría de la válvula de homogeneización (Schubert et al., 2003). La geometría de válvula más utilizada es el tipo APV-Gaulin o Rannie que, debido a sus características geométricas, tiene un límite de presión de hasta 100 MPa. La CH se realiza a presiones moderadas, generalmente en el rango de 15 a 30 MPa (150 a 300 bar). En contraste, la HPH implica presiones significativamente más altas, que pueden variar entre 50 y 150 MPa (500 a 1500 bar), lo que resulta en una mayor reducción del tamaño de partícula y una emulsión más estable.

Estos homogeneizadores se componen esencialmente de una bomba de alta presión y una válvula de homogeneización (Stang et al., 2001). Su operación, como se ilustra en la **Figura 2.8**, implica someter una macroemulsión o emulsión gruesa a alta presión al pasar por un orificio pequeño, permitiendo la obtención de nanoemulsiones con gotas extremadamente pequeñas gracias a fuerzas como el cizallamiento hidráulico, la turbulencia intensa y la cavitación (Gupta et al., 2019; Martínez-Monteagudo et al., 2017). El proceso se repite hasta alcanzar el tamaño de gota y el índice de polidispersidad deseados. A medida que aumenta la velocidad, la presión disminuye, facilitando el impacto de la emulsión gruesa. En algunos casos, se emplean dos válvulas en el homogeneizador, dividiendo la producción en dos etapas. Sin embargo, la obtención de tamaños submicrónicos puede requerir altas temperaturas y energía, lo que podría afectar a componentes y compuestos termosensibles (Tadros et al., 2004).



**Figura 2.8.** Esquema de funcionamiento de un homogeneizador a alta presión con válvula de APV-Gaulin, Rannie (Morata & Guamis, 2020). HP: alta presión, AP: presión atmosférica.

Este método se aplica ampliamente en la industria alimentaria, farmacéutica y biotecnológica para el procesamiento de emulsiones, suspensiones y otros productos líquidos. Su eficacia se destaca al reducir el tamaño de partículas, lo que contribuye significativamente a mejorar la estabilidad, reología y microestructura del producto final (Betoret et al., 2015; Lanciotti et al., 2004). Por otro lado, estos tipos de homogeneización también han demostrado tener un impacto positivo en la biodisponibilidad de ciertos ingredientes, como nutrientes o fármacos, al facilitar su absorción en el cuerpo (Schubert y Engel, 2004). Este efecto beneficioso amplía aún más el alcance y la aplicación de esta técnica en diversos sectores, destacando su relevancia en la mejora de la eficacia de la entrega de componentes bioactivos esenciales para la nutrición y la salud (Schubert y Engel, 2004).

En el campo alimentario, la aplicación de la CH y HPH es notable, especialmente en la industria láctea, donde se utiliza para prevenir la separación de la crema en la leche líquida mediante la reducción del tamaño de los glóbulos de grasa (Escobar et al., 2011).

Estos homogeneizadores, pueden operar en un rango de presiones de 10 a 100 MPa, y desempeñan un papel crucial en diversas industrias, como la de bebidas, farmacéutica y cosmética. Su función principal radica en la disminución del tamaño de las partículas y el aumento de la estabilidad de las emulsiones, con el objetivo de prevenir la formación de crema y la coalescencia (Salehi, 2020). En función de la presión empleada, el fluido puede experimentar un aumento de temperatura al salir de la primera válvula de homogeneización. Este cambio se produce sin la necesidad de añadir calor adicional, siendo el resultado del trabajo realizado sobre el fluido durante el proceso de homogeneización (Martínez-

Monteagudo et al., 2016). Sin embargo, es importante destacar que la homogeneización estándar no conserva los alimentos, ya que no inactiva los patógenos ni los microorganismos responsables del deterioro (Martínez-Monteagudo et al., 2016).

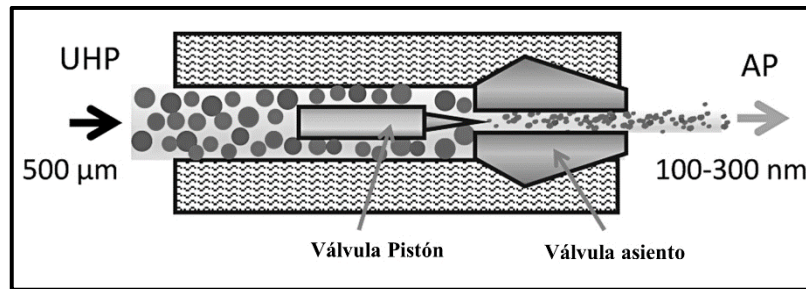
### 2.4.1.3 Homogeneización a ultra alta presión (UHPH)

La homogeneización a ultra alta presión, también conocida como *ultra-high pressure homogenization* (UHPH), es un proceso tecnológico continuo y altamente eficiente que se ha utilizado en el procesamiento de líquidos para mejorar la calidad y estabilidad de productos líquidos. En este método, se somete un líquido a presiones extremadamente elevadas, típicamente en el rango de 200 a 400 MPa, mediante el uso de equipos especializados.

Durante el proceso de UHPH, el líquido es forzado a través de una serie de válvulas de alta presión, boquillas de diámetro micrométrico o dispositivos de homogeneización, donde la presión y turbulencia se incrementa significativamente (**Figura 2.9**).

Este aumento repentino de presión provoca la formación de microcavidades y la generación de fuerzas de cizallamiento y cavitación, lo que conduce a la reducción del tamaño de partícula y a la emulsificación más efectiva de los componentes del líquido (Floury et al., 2004). Un requisito esencial para el procesamiento mediante UHPH es que las partículas en el fluido deben tener un tamaño inferior a 500  $\mu\text{m}$  (Loira et al., 2018).

El resultado final de la UHPH es una dispersión más fina (10 y 500 nm), estable y homogénea de las partículas, lo que ayuda a mejorar la estabilidad coloidal, la textura y la vida útil de productos como emulsiones, suspensiones y productos lácteos, entre otros, preservando sus características sensoriales y nutricionales (Briviba et al., 2016; Fernández-Avila & Trujillo, 2016; Hebshy et al., 2013; Loira et al., 2018; Pereda et al., 2007; Poliseli-Scopel et al., 2012; Rave et al., 2020; Thiebaud et al., 2003; Zamora et al., 2007). Por ejemplo, esta tecnología se ha utilizado con éxito para reducir el tamaño de los glóbulos de grasa de la leche (Hayes & Kelly, 2003; Thiebaud et al., 2003), o para aumentar la estabilidad física y oxidativa de los lípidos (Fernández-Avila, 2016; Floury et al., 2000; Hebshy et al., 2013; Varela et al., 2022).



**Figura 2.9.** Esquema de funcionamiento de un homogeneizador a ultra alta presión con válvula UHPH-Ypsicon (Morata y Guamis, 2020). UHP: ultra alta presión, AP: presión atmosférica.

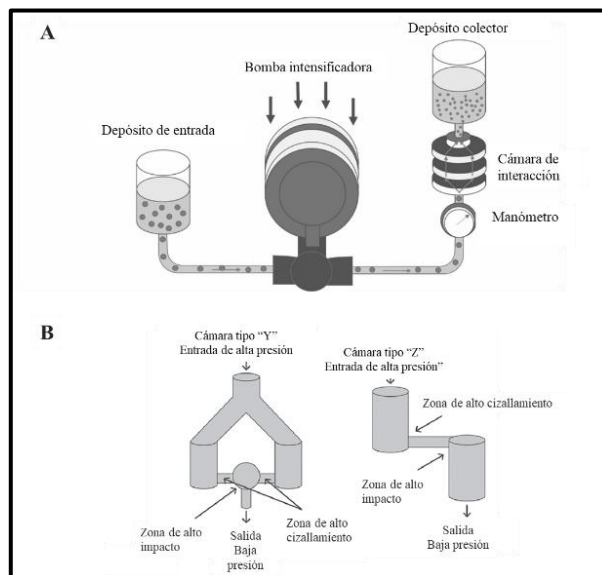
Cabe destacar que durante el proceso UHPH, se produce un aumento de temperatura de aproximadamente 2 a 2,5 °C por cada 10 MPa en la válvula, durante un tiempo inferior a 1 s (Amador Espejo et al., 2014; Hayes et al., 2005; Velázquez-Estrada et al., 2011). Esta elevación térmica, combinada con los fenómenos físicos mencionados, pueden ser utilizada para la inactivación microbiana y enzimática (fragmentación celular), así como a cambios en las propiedades tecnofuncionales en proteínas (Keerati-U-Rai y Corredig, 2009; Trujillo et al., 2021). Es crucial destacar que, al buscar la inactivación microbiana mediante UHPH, el nivel de destrucción de microorganismos depende no solo de la presión sino también de la temperatura alcanzada en la válvula de homogeneización. Por lo tanto, la regulación adecuada de la temperatura de entrada del líquido en el equipo UHPH es de suma importancia (Amador Espejo et al., 2014; Pereda et al., 2008).

#### 2.4.1.4 Homogeneización por microfluidización

La homogeneización por microfluidización o *Microfluidizer*® (MF) es una técnica avanzada para procesar fluidos, que implica reducir el tamaño de las partículas mediante fuerzas hidrodinámicas intensas en un sistema de flujo continuo. Utilizando dispositivos llamados microfluidizadores, que constan de cámaras y boquillas diseñadas para generar altas velocidades de flujo y cizallamiento, el fluido se presuriza y se fuerza a pasar a través de aberturas microscópicas. Este proceso provoca cizallamiento, turbulencia y fuerzas de impacto que fragmentan las partículas existentes, logrando una dispersión más uniforme y una reducción significativa del tamaño medio de partícula ( $<0,1 \mu\text{m}$ ) en comparación con métodos convencionales de homogeneización (Dhiman y Prabhakar 2021).

La **Figura 2.10** ilustra el esquema característico de un microfluidizador, resaltando la importancia de la bomba intensificadora y la cámara de interacción para optimizar la

eficiencia del procesamiento. En este esquema, la función de la bomba intensificadora es acelerar el líquido a alta velocidad y dirigirlo hacia la cámara de interacción (Mert, 2019).



**Figura 2.10.** (A) Esquema de funcionamiento de un microfluidificador de un solo canal (Li et al., 2022). (B) Tipos de cámara de interacción (Villalobos-Castillejos et al., 2018).

Existen dos tipos de cámaras de interacción en el microfluidizador: la cámara tipo Y y la cámara tipo Z. La cámara tipo Y divide el líquido en dos corrientes que colisionan entre sí y con la superficie del canal de flujo. Por otro lado, la cámara tipo Z hace que el líquido de alta velocidad atraviese un microcanal en zigzag, chocando con la superficie del canal de flujo. La cámara tipo Y se utiliza para dispersar líquidos en líquidos, mientras que la cámara tipo Z se aplica en la dispersión de materiales sólidos en suspensiones y en la destrucción de estructuras celulares. La eficiencia de un tratamiento por MF depende del diámetro y diseño del canal de flujo de la cámara de interacción, las condiciones de tratamiento como la presión y el número de ciclos, la temperatura durante el proceso y la naturaleza de los materiales tratados (Liu et al., 2019).

En la última década, esta técnica ha adquirido una relevancia significativa en el procesamiento de sistemas alimentarios tales como productos lácteos (Ciron et al., 2010), alimentos ricos en fibra (Wang et al., 2012, 2013) y bebidas vegetales (Wang et al., 2019), gracias a sus beneficios, que incluyen escalabilidad, trabajo en continuo o por lotes, tiempos de procesamiento rápidos, manejo de grandes volúmenes, bajas temperaturas de procesado, la mejora de la textura y la calidad sensorial, y mínima pérdida de nutrientes, además de ser

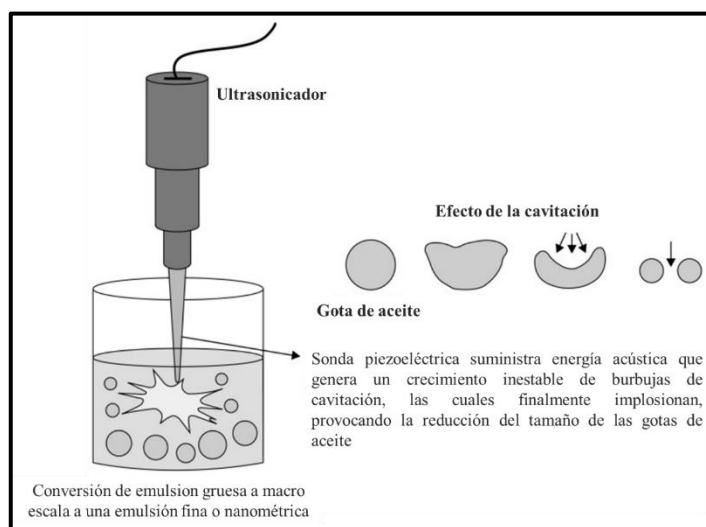
respetuoso con el medio ambiente (Jeličić et al., 2012; McClements y Rao, 2011). Asimismo, esta técnica ha mostrado ser muy prometedora en combinación con tratamientos térmicos para la inactivación de microorganismos y enzimas. A pesar de sus beneficios, a día de hoy, su implementación a nivel industrial enfrenta desafíos tales como un alto consumo energético, el desgaste de los microcanales, el tamaño pequeño de las cámaras de interacción que dificultan la producción continua de alimentos con sustancias que precipitan fácilmente, el sobreprocesamiento de las gotas del fluido (aumento del tamaño de las mismas) como consecuencia de las altas presiones de operación (Ozturk & Turasan 2021), y la acumulación de residuos en los canales de flujo no lineales que son difíciles de limpiar y plantean desafíos para la operación aséptica (Li et al., 2022).

#### **2.4.1.5 Homogeneización por ultrasonidos**

Las emulsiones por ultrasonidos (US) se refieren al proceso de formación de emulsiones mediante la aplicación de ondas ultrasónicas de alta frecuencia (20-100 kHz) a una mezcla de líquidos inmiscibles, como aceite y agua (Singh et al., 2017). Durante este proceso, las ondas ultrasónicas generan vibraciones y cavitación en la mezcla, creando microburbujas que colapsan, generando intensas fuerzas de corte y turbulencia. Estas fuerzas mecánicas contribuyen a la descomposición de las gotas de líquido en tamaños más pequeños, facilitando la formación de una emulsión estable con partículas finamente dispersas (Carpenter & Saharan, 2017; Taha et al., 2020).

Los sonicadores de sobremesa consisten en una sonda piezoeléctrica que genera una fuerza disruptiva intensa en su extremo (Mahdi Jafari et al., 2007). Al sumergirse en la muestra, como se ilustra en la **Figura 2.11**, las ondas ultrasónicas generan burbujas de cavitación que crecen hasta implosionar. Este proceso de implosión produce ondas de choque que, a su vez, generan una corriente en chorro de líquido circundante, ejerciendo presión sobre las gotas dispersas y reduciendo su tamaño (Gogate & Kabadi, 2009; Kentish et al., 2008). La disminución del tamaño de las gotas está determinada por el tiempo de sonicación y la potencia de entrada utilizada (Jena & Das, 2006; Leong et al., 2009; Li & Chiang, 2012). La emulsión debe permanecer el tiempo suficiente en la región donde se produce la interrupción de las gotas para asegurar una homogeneización eficiente y uniforme (Kentish et al., 2008; Leong et al., 2009). Las sondas de sonicación varían en dimensiones, afectando su funcionalidad, y generalmente, se prefieren sondas más estrechas para lotes de bajo volumen.

La ubicación relativa de la sonda en la muestra, especialmente su profundidad de inmersión influye en el patrón de reflexión de la onda y la distribución de la presión, por lo que es crucial evitar el contacto con superficies sólidas (Singh et al., 2017). Por otro lado, la ultrasonificación destaca por su menor consumo de energía en comparación con otros métodos de alta energía. Estudios comparativos con la dispersión rotor-estator han demostrado que la emulsificación ultrasónica es competitiva e incluso superior en términos de tamaño de gota y eficiencia energética (Izquierdo et al., 2001; Tadros et al., 2004).



**Figura 2.11.** Esquema de una sonda de ultrasonidos utilizada para reducir el tamaño de las gotas de una emulsión (Kumar et al., 2019).

La técnica de emulsificación por US es utilizada en diversas industrias, como la alimentaria, cosmética y farmacéutica, debido a su eficiencia para producir emulsiones con propiedades controladas y mejoradas. En el campo alimentario, se utilizan específicamente para preparar mayonesas, jugos de frutas, ketchup y leche homogeneizada (Ashokkumar et al., 2010; Kentish et al., 2008; Wu et al., 2000; Zisu et al., 2010).

La aplicación de US en bebidas ha demostrado beneficios saludables, incluyendo el aumento de los niveles de antioxidantes y compuestos bioactivos (Jiang et al., 2014). Además, se ha observado una mejora significativa en las propiedades sensoriales durante la producción de bebidas fermentadas funcionales (Jeličić et al., 2012). Estos hallazgos resaltan el potencial del ultrasonido para contribuir a la calidad y características saludables de las bebidas.

El US también se ha utilizado ampliamente en la producción y procesamiento de productos lácteos, abarcando áreas como la mejora de la ultrafiltración del suero, la extracción de componentes funcionales de los alimentos, la reducción de la viscosidad del producto, la reducción y homogeneización de glóbulos de grasa láctea, la cristalización de hielo y lactosa, e incluso el corte de bloques de queso (Ashokkumar et al., 2010).

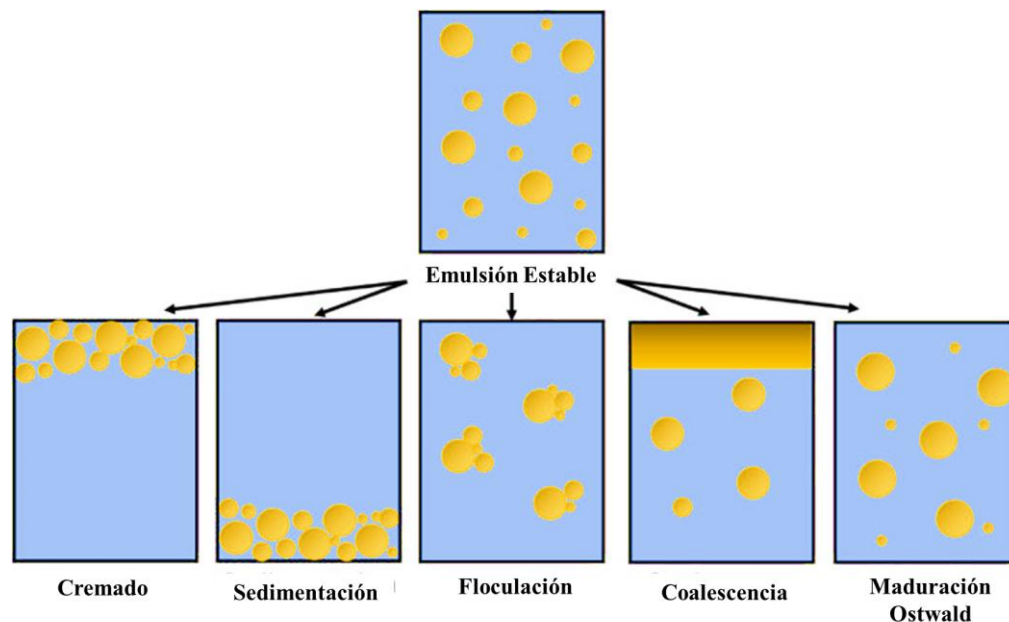
A pesar de sus beneficios, a día de hoy, su implementación a nivel industrial enfrenta desafíos tales como el “sobreprocesamiento” y aglomeración de las gotas de líquido de menor tamaño durante el proceso de ultrasonificación (Leong et al., 2009; Jafari et al., 2007), la desnaturalización de proteínas, la despolimerización de polisacáridos o la oxidación de lípidos durante el proceso de homogeneización (Salem et al., 2018), y la generación de radicales, como H y OH que tienden a acumularse en la superficie de las burbujas de cavitación. Este fenómeno favorece la formación de productos indeseables, desencadenando reacciones de oxidación de radicales libres. La oxidación resultante puede provocar rancidez en alimentos con alto contenido de grasas, disminuyendo la calidad de los productos alimenticios (Jadhav et al., 2023; Riesz & Kondo, 1992).

## 2.5 Estabilidad física de una emulsión

La estabilidad de una emulsión se define como la capacidad de sus fases para mantenerse mezcladas a lo largo del tiempo. Desde el punto de vista termodinámico, las emulsiones O/W son inherentemente inestables (Costa et al., 2022). Estas emulsiones suelen experimentar diversos mecanismos de desestabilización, como se ilustra en la **Figura 2.12**, que pueden conducir a la separación de fases y a la alteración de sus propiedades (McClements et al., 2016).

Los mecanismos de desestabilización más representativos de una emulsión son: (1) Cremado: Implica la concentración de las gotas en la parte superior de la emulsión, llevando a la separación de fases (McClements, 2011); (2) Sedimentación: Hundimiento de partículas hacia el fondo del recipiente, influenciado por el tamaño inicial de estas y las diferencias de densidad entre las fases; (3) Floculación: Acercamiento de las gotas debido a interacciones atractivas, moviéndose como una sola entidad (Rahn-Chique et al., 2012); (4) Coalescencia:

Fusión de las gotas para formar gotas más grandes, acelerando problemas de estabilidad, como el cremado (Rahn-Chique et al., 2012); (5) Maduración de Ostwald: Proceso crítico que conduce a la desestabilización, donde material migra desde gotas más pequeñas hacia las más grandes debido a diferencias de presión (Zeeb et al. 2012). La velocidad de este fenómeno disminuye significativamente cuando la distribución del tamaño de las gotas se estrecha o cuando la fase dispersa es altamente insoluble en la fase continua (Nielsen et al., 2013; McClements & Rao, 2011); y (6) Rotura de emulsión: Separación completa de las fases en dos capas distintas, influida por factores como composición, estructura microscópica y condiciones ambientales a lo largo del tiempo (Rayner & Dejmek, 2015).



**Figura 2.12.** Mecanismos de desestabilización de una emulsión del tipo O/W (Church et al., 2019).

Estos mecanismos pueden actuar de manera individual o combinada, dependiendo de factores como la composición de la emulsión, la temperatura, la agitación y la presencia de otros componentes. Comprender estos procesos es esencial para desarrollar y mantener emulsiones estables en diversas aplicaciones.

Por otro lado, la estabilidad de una emulsión viene determinada por sus propiedades fisicoquímicas, las cuales deben considerarse en conjunto al formular emulsiones para aplicaciones específicas. Las propiedades fisicoquímicas más importantes que afectan la estabilidad de una emulsión son (Zembyla et al., 2020; Maphosa et al., 2017): (1) Tamaño

de las gotas: El tamaño de estas gotas es crítico para la estabilidad y la apariencia del producto final. Gotas más pequeñas tienden a mejorar la estabilidad de la emulsión; (2) Distribución del tamaño de las gotas: Una distribución uniforme del tamaño de las gotas contribuye a la estabilidad de la emulsión. Una amplia variación en el tamaño de las gotas puede afectar negativamente la consistencia y la apariencia del producto; (3) Relación de fases: La proporción entre la fase acuosa y la fase oleosa en una emulsión es crucial para su estabilidad; (4) Concentración del emulsionante: La cantidad y tipo de emulsionante utilizado influyen en la formación y estabilidad de la emulsión. Un emulsionante adecuado ayuda a reducir la tensión superficial entre las fases inmiscibles; (5) Carga eléctrica: Algunos emulsionantes pueden proporcionar carga eléctrica a las gotas, lo que impide su coalescencia. Esta propiedad es especialmente importante en emulsiones estables a largo plazo; (6) Temperatura: La temperatura puede afectar la viscosidad y la estabilidad de la emulsión. Algunas emulsiones pueden separarse o coalescer a temperaturas extremas; (7) Viscosidad: La viscosidad de la emulsión es la resistencia al flujo y puede variar según la concentración de emulsionante y la temperatura. La viscosidad afecta la aplicación y la textura del producto; (8) pH: El pH puede influir en la carga eléctrica de las moléculas emulsionantes y, por lo tanto, afectar la estabilidad de la emulsión; (9) Estabilidad a la temperatura: La emulsión debe mantener su estabilidad a diversas temperaturas. Algunas emulsiones pueden desestabilizarse con el calentamiento o enfriamiento extremo; y (10) Estabilidad a largo plazo: La capacidad de mantenerse estable durante períodos prolongados es esencial. Las emulsiones pueden experimentar cambios con el tiempo debido a la coalescencia de las gotas o la separación de fases debido a la gravedad o la difusión molecular.

En base a lo descrito, prolongar la estabilidad de las emulsiones durante períodos más extensos, es posible lograrlo mediante el control de su composición de fases, así como de su microestructura, incluyendo la distribución del tamaño de partículas. También es viable mejorarlas mediante la inclusión de emulsionantes, modificadores de textura, agentes ponderantes o retardadores de maduración (McClements & Rao, 2011).

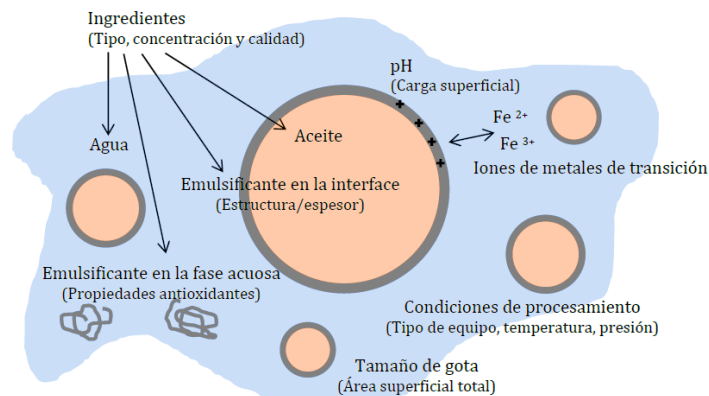
## 2.6 Estabilidad oxidativa de una emulsión

La estabilidad oxidativa de una emulsión se refiere a la capacidad de la emulsión para resistir o minimizar la degradación causada por reacciones de oxidación. La oxidación es un proceso químico en el cual las moléculas de lípidos presentes en la emulsión reaccionan con el oxígeno del aire, dando lugar a cambios en la composición y calidad del producto.

En un alimento se pueden desarrollar diferentes grados de oxidación de manera simultánea. La oxidación primaria se produce cuando los ácidos grasos insaturados presentes en los lípidos reaccionan con el oxígeno del aire, generando radicales libres e hidroperóxidos (Osborn & Akoh, 2004). Estos intermedios de transición inodoros e insípidos son inestables y se descomponen a su vez durante la oxidación de lípidos para formar productos de oxidación secundarios, como aldehídos, cetonas, hidrocarburos y alcoholes. Los productos de oxidación primarios y secundarios son subproductos que pueden afectar negativamente la calidad nutricional, el sabor, el aroma y la textura de un alimento. Los subproductos de oxidación secundaria suelen ser moléculas pequeñas y volátiles y están asociados con la rancidez oxidativa (Chaiyasit et al., 2007). La presencia de antioxidantes en la formulación de una emulsión puede ayudar a retardar la oxidación al neutralizar los radicales libres y prevenir la propagación de la reacción en cadena de oxidación. El control de factores como la exposición al oxígeno, la temperatura y la luz también es crucial para mantener la estabilidad oxidativa de la emulsión a lo largo del tiempo y garantizar su calidad.

La oxidación de lípidos en emulsiones O/W es un fenómeno complejo influenciado por diversos factores (Ghelichi et al., 2023). La calidad del aceite, el tipo y la concentración de emulsionante, así como el pH de la emulsión, son elementos cruciales que inciden en su estabilidad oxidativa (**Figura 2.13**). Como han indicado investigaciones anteriores (Frankel, 1993; Kamal-Eldin, 2006), los aceites altamente insaturados exhiben una mayor propensión a la oxidación, mientras que la presencia de tocoferoles en ciertos aceites, como el aceite de pescado, puede mitigar la oxidación lipídica. Adicionalmente, la concentración de aceite en la emulsión desempeña un papel crucial, ya que una mayor cantidad de aceite tiende a disminuir la oxidación de los lípidos, gracias a las disparidades en el tamaño de las gotas de aceite y la disponibilidad de proteínas (Kargar et al., 2011; Sun & Gunasekaran, 2009). El tipo de emulsionante también juega un papel significativo, ya que puede formar una

membrana protectora alrededor de las gotas de aceite y poseer grupos reactivos con propiedades antioxidantes (Horn, 2012). Investigaciones previas también han sugerido que las proteínas de la leche y los fosfolípidos pueden tener efectos antioxidantes (Horn, 2012; Judde et al., 2003).



**Figura 2.13.** Parámetros que influyen en la oxidación de lípidos en emulsiones (Horn, 2012).

El pH de la emulsión ha mostrado también ejercer una influencia significativa en la estabilidad oxidativa, especialmente en emulsiones estabilizadas con proteínas (Berton et al., 2011; Ghelichi et al., 2023; Hu et al., 2003). Un pH bajo tiende a mejorar la estabilidad oxidativa debido a la carga superficial positiva en las gotas de aceite, lo que puede repeler los iones metálicos de transición y reducir la oxidación de los lípidos. En contraste, a un pH neutro, metales como el hierro son menos solubles y pueden precipitar en la superficie de las gotas de aceite, promoviendo la oxidación de los lípidos (Mancuso et al., 1999; Nielsen et al., 2013).

El tamaño de las gotas de aceite en las emulsiones también puede tener un impacto en su estabilidad oxidativa. Se ha observado que las gotas más grandes son menos propensas a la oxidación de lípidos en comparación con las más pequeñas (Ghelichi et al., 2023; Jacobsen et al., 2000; Lethuaut et al., 2002). Sin embargo, la relación entre el tamaño de las gotas y la oxidación de lípidos no es concluyente, ya que varios factores pueden variar durante la formación de la emulsión.

Finalmente, las condiciones de homogeneización, como la presión y el tipo de equipo utilizado, también pueden influir en la oxidación de lípidos, aunque su impacto aún no se

comprende completamente (Ghelichi et al., 2023; Let et al., 2007). Por lo tanto, la estabilidad oxidativa de las emulsiones O/W es un tema complejo y multifactorial que implica la interacción de diversos componentes y condiciones, como se ha investigado en numerosos estudios previos.

## 2.7 Referencias bibliográficas

- Ali, A. H. (2019). Current knowledge of buttermilk: Composition, applications in the food industry, nutritional and beneficial health characteristics. *International Journal of Dairy Technology*, 72(2), 169–182. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12572>
- Amador Espejo, G. G., Hernández-Herrero, M. M., Juan, B., & Trujillo, A. J. (2014). Inactivation of *Bacillus* spores inoculated in milk by Ultra High Pressure Homogenization. *Food Microbiology*, 44, 204–210. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2014.06.010>
- Anjum, F. M., Nadeem, M., Khan, M. I., & Hussain, S. (2012). Nutritional and therapeutic potential of sunflower seeds: A review. *British Food Journal*, 114(4), 544–552. <https://doi.org/10.1108/00070701211219559>
- Anto, L., Warykas, S. W., Torres-Gonzalez, M., & Blesso, C. N. (2020). Milk Polar Lipids: Underappreciated Lipids with Emerging Health Benefits. *Nutrients* 2020, Vol. 12, Page 1001, 12(4), 1001. <https://doi.org/10.3390/NU12041001>
- Anton, N., & Vandamme, T. F. (2011). Nano-emulsions and micro-emulsions: Clarifications of the critical differences. *Pharmaceutical Research*, 28(5), 978–985. <https://doi.org/10.1007/S11095-010-0309-1/METRICS>
- Arranz, E., & Corredig, M. (2017). Invited review: Milk phospholipid vesicles, their colloidal properties, and potential as delivery vehicles for bioactive molecules. *Journal of Dairy Science*, 100(6), 4213–4222. <https://doi.org/10.3168/JDS.2016-12236>
- Ashokkumar, M., Bhaskaracharya, R., Kentish, S., Lee, J., Palmer, M., & Zisu, B. (2010). The ultrasonic processing of dairy products — An overview. *Dairy Science & Technology* 2009 90:2, 90(2), 147–168. <https://doi.org/10.1051/DST/2009044>
- Aswathanarayan, J. B., & Vittal, R. R. (2019). Nanoemulsions and Their Potential Applications in Food Industry. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, 438537. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2019.00095/BIBTEX>
- Atiemo-Obeng, V. A., & Calabrese, R. V. (2004). Rotor–Stator Mixing Devices. In *Handbook of Industrial Mixing* (pp. 479–505). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0471451452.CH8>

- Augustin, M. A., Bhail, S., Cheng, L. J., Shen, Z., Øiseth, S., & Sanguansri, L. (2015). Use of whole buttermilk for microencapsulation of omega-3 oils. *Journal of Functional Foods*, *19*, 859–867. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2014.02.014>
- Banerjee, P., & Qamar, I. (2022). Insights into the technological and nutritional aspects of lactic milk drinks: buttermilk. *Advances in Dairy Microbial Products*, 93–103. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85793-2.00002-3>
- Berton, C., Ropers, M. H., Viau, M., & Genot, C. (2011). Contribution of the interfacial layer to the protection of emulsified lipids against oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(9), 5052–5061. [https://doi.org/10.1021/JF200086N/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2011-00086N\\_0007.GIF](https://doi.org/10.1021/JF200086N/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2011-00086N_0007.GIF)
- Berton-Carabin, C. C., Sagis, L., & Schroën, K. (2018). Formation, Structure, and Functionality of Interfacial Layers in Food Emulsions. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Food-030117-012405>, *9*, 551–587. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-FOOD-030117-012405>
- Betoret, E., Betoret, N., Rocculi, P., & Dalla Rosa, M. (2015). Strategies to improve food functionality: Structure–property relationships on high pressures homogenization, vacuum impregnation and drying technologies. *Trends in Food Science & Technology*, *46*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2015.07.006>
- Borreani, J., Leonardi, C., Moraga, G., Quiles, A., & Hernando, I. (2019). How do Different Types of Emulsifiers/Stabilizers Affect the In Vitro Intestinal Digestion of O/W Emulsions? *Food Biophysics*, *14*(3), 313–325. <https://doi.org/10.1007/S11483-019-09582-2/METRICS>
- Bourlieu, C., & Michalski, M. C. (2015). Structure-function relationship of the milk fat globule. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *18*(2), 118–127. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000138>
- Boylston, T. D. (2019). Byproducts from Butter and Cheese Processing. *Byproducts from Agriculture and Fisheries: Adding Value for Food, Feed, Pharma and Fuels*, 107–121. <https://doi.org/10.1002/9781119383956.CH5>
- Britten, M., Lamothe, S., & Robitaille, G. (2008). Effect of cream treatment on phospholipids and protein recovery in butter-making process. *International Journal of Food Science & Technology*, *43*(4), 651–657. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2007.01501.X>
- Briviba, K., Gräf, V., Walz, E., Guamis, B., & Butz, P. (2016). Ultra high pressure homogenization of almond milk: Physico-chemical and physiological effects. *Food Chemistry*, *192*, 82–89. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.06.063>
- Carpenter, J., & Saharan, V. K. (2017). Ultrasonic assisted formation and stability of mustard oil in water nanoemulsion: Effect of process parameters and their

- optimization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 35, 422–430. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2016.10.021>
- Chaiyasit, W., Elias, R. J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2007). Role of Physical Structures in Bulk Oils on Lipid Oxidation., 47(3), 299–317. <https://doi.org/10.1080/10408390600754248>
- Chee, S. S., & Jawaid, M. (2019). The Effect of Bi-Functionalized MMT on Morphology, Thermal Stability, Dynamic Mechanical, and Tensile Properties of Epoxy/Organoclay Nanocomposites. *Polymers 2019, Vol. 11, Page 2012*, 11(12), 2012. <https://doi.org/10.3390/POLYM11122012>
- Church, J., Lundin, J. G., Diaz, D., Mercado, D., Willner, M. R., Lee, W. H., & Paynter, D. M. (2019). Identification and characterization of bilgewater emulsions. *Science of The Total Environment*, 691, 981–995. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.06.510>
- Ciron, C. I. E., Gee, V. L., Kelly, A. L., & Auty, M. A. E. (2010). Comparison of the effects of high-pressure microfluidization and conventional homogenization of milk on particle size, water retention and texture of non-fat and low-fat yoghurts. *International Dairy Journal*, 20(5), 314–320. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2009.11.018>
- Coelho, M. S., Fernandes, S. S., & Salas-Mellado, M. de las M. (2019). Association Between Diet, Health, and the Presence of Bioactive Compounds in Foods. In *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications*. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00009-8>
- Conway, V., Gauthier, S. F., & Pouliot, Y. (2014). Buttermilk: Much more than a source of milk phospholipids. *Animal Frontiers*, 4(2), 44–51. <https://doi.org/10.2527/AF.2014-0014>
- Costa, M., Losada-Barreiro, S., Bravo-Díaz, C., & Paiva-Martins, F. (2022). Effects of Emulsion Droplet Size on the Distribution and Efficiency of Antioxidants. *Lipid Oxidation in Food and Biological Systems: A Physical Chemistry Perspective*, 217–235. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-87222-9\\_10/FIGURES/5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-87222-9_10/FIGURES/5)
- Da Silva, R. C., Colleran, H. L., & Ibrahim, S. A. (2021). Milk fat globule membrane in infant nutrition: a dairy industry perspective. *Journal of Dairy Research*, 88(1), 105–116. <https://doi.org/10.1017/S0022029921000224>
- De Bassi, L. G., Ferreira, G. C. C., Da Silva, A. S., Sivieri, K., Aragon-Alegro, L. C., & Costa, M. D. R. (2012). Evaluation of physicochemical, microbiological and sensorial characteristics of fermented milk beverages with buttermilk addition. *International Journal of Dairy Technology*, 65(2), 282–286. <https://doi.org/10.1111/J.1471-0307.2011.00764.X>
- Delmas, T., Piraux, H., Couffin, A. C., Texier, I., Vinet, F., Poulin, P., Cates, M. E., & Bibette, J. (2011). How to prepare and stabilize very small nanoemulsions. *Langmuir*, 27(5), 1683–1692. <https://doi.org/10.1021/LA104221Q>

- Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T. T., Messens, K., & Van Camp, J. (2008). Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, *18*(5), 436–457. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2007.10.014>
- Dhiman, A., & Prabhakar, P. K. (2021). Micronization in food processing: A comprehensive review of mechanistic approach, physicochemical, functional properties and self-stability of micronized food materials. *Journal of Food Engineering*, *292*. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2020.110248>
- El-Loly, M. M. (2011). Composition, properties and nutritional aspects of milk fat globule membrane - a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, *61*(1). <https://doi.org/10.2478/v10222-011-0001-0>
- Escobar, D., Clark, S., Ganesan, V., Repiso, L., Waller, J., & Harte, F. (2011). High-pressure homogenization of raw and pasteurized milk modifies the yield, composition, and texture of queso fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, *94*(3), 1201–1210. <https://doi.org/10.3168/JDS.2010-3870>
- Fernandez-Avila, C., & Trujillo, A. J. (2016). Ultra-High Pressure Homogenization improves oxidative stability and interfacial properties of soy protein isolate-stabilized emulsions. *Food Chemistry*, *209*, 104–113. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.04.019>
- Floury, J., Desrumaux, A., & Lardières, J. (2000). Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *1*(2), 127–134. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(00\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00012-6)
- Floury, J., Legrand, J., & Desrumaux, A. (2004). Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. study of droplet break-up and re-coalescence phenomena. *Chemical Engineering Science*, *59*(6), 1285–1294. <https://doi.org/10.1016/J.CES.2003.11.025>
- Fontecha, J., Brink, L., Wu, S., Pouliot, Y., Visioli, F., & Jiménez-Flores, R. (2020). Sources, Production, and Clinical Treatments of Milk Fat Globule Membrane for Infant Nutrition and Well-Being. *Nutrients*, *12*(6). <https://doi.org/10.3390/NU12061607>
- Frankel, E. N. (1993). Formation of headspace volatiles by thermal decomposition of oxidized fish oils vs. oxidized vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *70*(8), 767–772. <https://doi.org/10.1007/BF02542598/METRICS>
- Gebreselassie, N., Abrahamsen, R. K., Beyene, F., Abay, F., & Narvhus, J. A. (2016). Chemical composition of naturally fermented buttermilk. *International Journal of Dairy Technology*, *69*(2), 200–208. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12236>
- Ghelichi, S., Hajfathalian, M., Yesiltas, B., Sørensen, A.-D. M., García-Moreno, P. J., & Jacobsen, C. (2023). Oxidation and oxidative stability in emulsions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13134>

- Gillingham, L. G., Harding, S. V., Rideout, T. C., Yurkova, N., Cunnane, S. C., Eck, P. K., & Jones, P. J. H. (2013). Dietary oils and FADS1-FADS2 genetic variants modulate [ $^{13}\text{C}$ ] $\alpha$ -linolenic acid metabolism and plasma fatty acid composition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(1), 195–207. <https://doi.org/10.3945/AJCN.112.043117>
- Gogate, P. R., & Kabadi, A. M. (2009). A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 60–72. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2008.10.006>
- Gómez Candela, C., Bermejo López, M.L., & Loria Kohen, V. (2011). Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health. Nutritional recommendations. *Nutrición Hospitalaria*, 26(2), 323–329.
- Govindasamy-Lucey, S., Lin, T., Jaeggi, J. J., Johnson, M. E., & Lucey, J. A. (2006). Influence of Condensed Sweet Cream Buttermilk on the Manufacture, Yield, and Functionality of Pizza Cheese. *Journal of Dairy Science*, 89(2), 454–467. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(06\)72109-9](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(06)72109-9)
- Granato, D., Barba, F. J., Bursac Kovačević, D., Lorenzo, J. M., Cruz, A. G., & Putnik, P. (2020). Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *11*, 93–118. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-FOOD-032519-051708>
- Guiotto, E. N., Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2014). Effect of Storage Conditions and Antioxidants on the Oxidative Stability of Sunflower–Chia Oil Blends. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(5), 767–776. <https://doi.org/10.1007/S11746-014-2410-9>
- Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A., & Doyle, P. S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, 12(11), 2826–2841. <https://doi.org/10.1039/C5SM02958A>
- Gupta, P. K., Bhandari, N., Shah, H. N., Khanchandani, V., Keerthana, R., Nagarajan, V., Hiremath, L., Gupta, P. K., Bhandari, N., Shah, H. N., Khanchandani, V., Keerthana, R., Nagarajan, V., & Hiremath, L. (2019). An Update on Nanoemulsions Using Nanosized Liquid in Liquid Colloidal Systems. *Nanoemulsions - Properties, Fabrications and Applications*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.84442>
- Gutiérrez, J. M., González, C., Maestro, A., Solè, I., Pey, C. M., & Nolla, J. (2008). Nanoemulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13(4), 245–251. <https://doi.org/10.1016/J.COCIS.2008.01.005>
- Harris, W. S., Assaad, B., & Poston, W. C. (2006). Tissue omega-6/omega-3 fatty acid ratio and risk for coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology*, 98(4A), 19–26. <https://doi.org/10.1016/J.AMJCARD.2005.12.023>

- Hayes, M. G., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2005). Potential applications of high-pressure homogenisation in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*, 72(1), 25–33. <https://doi.org/10.1017/S0022029904000524>
- Hayes, M. G., & Kelly, A. L. (2003). High pressure homogenisation of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. *Journal of Dairy Research*, 70(3), 307–313. <https://doi.org/10.1017/S0022029903006319>
- Hebishy, E., Buffa, M., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2013). Stability of Sub-Micron Oil-in-Water Emulsions Produced by Ultra-High Pressure Homogenization and Sodium Caseinate as Emulsifier. *Chemical Engineering Transactions*, 32, 1813–1818. <https://doi.org/10.3303/CET1332303>
- Hickey, C. D., Diehl, B. W. K., Nuzzo, M., Millqvist-Feurby, A., Wilkinson, M. G., & Sheehan, J. J. (2017). Influence of buttermilk powder or buttermilk addition on phospholipid content, chemical and bio-chemical composition and bacterial viability in Cheddar style-cheese. *Food Research International*, 102, 748–758. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.09.067>
- Hongyu, W., Hulbert, G. J., & Mount, J. R. (2000). Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(3), 211–218. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(00\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00020-5)
- Hoppenbrouwers, T., Cvejić Hogervorst, J. H., Garssen, J., Wichers, H. J., & Willemsen, L. E. M. (2019). Long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs) in the prevention of food allergy. *Frontiers in Immunology*, 10(MAY), 1118. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01118/BIBTEX>
- Horn, A. F. (2012). *Factors Influencing the Effect of Milkbased Emulsifiers on Lipid Oxidation in Omega-3 Emulsions*. PhD Thesis. Technical University of Denmark. <https://orbit.dtu.dk/en/publications/factors-influencing-the-effect-of-milkbased-emulsifiers-on-lipid->
- Hu, M., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2003). Impact of Whey Protein Emulsifiers on the Oxidative Stability of Salmon Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1435–1439. <https://doi.org/10.1021/JF0203794>
- Huerta-Yépez, S., Tirado-Rodríguez, A. B., & Hankinson, O. (2016). Role of diets rich in omega-3 and omega-6 in the development of cancer. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 73(6), 446–456. <https://doi.org/10.1016/J.BMHIMX.2016.11.001>
- Izquierdo, P., Esquena, J., Tadros, T. F., Dederen, C., Garcia, M. J., Azemar, N., & Solans, C. (2001). Formation and Stability of Nano-Emulsions Prepared Using the Phase Inversion Temperature Method. *Langmuir*, 18(1), 26–30. <https://doi.org/10.1021/LA010808C>
- Jacobsen, C., Hartvigsen, K., Lund, P., Thomsen, M. K., Skibsted, L. H., Adler-Nissen, J., Hølmer, G., & Meyer, A. S. (2000). Oxidation in fish oil-enriched mayonnaise3.

- Assessment of the influence of the emulsion structure on oxidation by discriminant partial least squares regression analysis. *European Food Research and Technology*, 211(2), 86–98. <https://doi.org/10.1007/s002179900132>
- Jadhav, H. B., Gogate, P., & Annapure, U. (2023). Analysing the repercussions of ultrasound on triacylglycerols in food. *Food Chemistry Advances*, 2, 100332. <https://doi.org/10.1016/J.FOCHA.2023.100332>
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids*, 22(7), 1191–1202. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2007.09.006>
- Jeličić, I., Božanić, R., Brnčić, M., & Tripalo, B. (2012). Influence and comparison of thermal, ultrasonic and thermo-sonic treatments on microbiological quality and sensory properties of rennet cheese whey. *Mljekarstvo: Časopis Za Unaprjeđenje Proizvodnje i Prerade Mlijeka*, 62(3), 165–178. [http://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id\\_clanak\\_jezik=129362](http://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=129362)
- Jena, S., & Das, H. (2006). Modeling of particle size distribution of sonicated coconut milk emulsion: Effect of emulsifiers and sonication time. *Food Research International*, 39(5), 606–611. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2005.12.005>
- Jiang, B., Mantri, N., Hu, Y., Lu, J., Jiang, W., & Lu, H. (2014). Evaluation of bioactive compounds of black mulberry juice after thermal, microwave, ultrasonic processing, and storage at different temperatures. *Food Science & Technology International*, 21(5), 392–399. <https://doi.org/10.1177/1082013214539153>
- Johnson, M., Fransson, G., Östlund, S., Areskoug, B., & Gillberg, C. (2017). Omega 3/6 fatty acids for reading in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in 9-year-old mainstream schoolchildren in Sweden. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 58(1), 83–93. <https://doi.org/10.1111/JCPP.12614>
- Judde, A., Villeneuve, P., Rossignol-Castera, A., & Le Guillou, A. (2003). Antioxidant Effect of Soy Lecithins on Vegetable Oil Stability and Their Synergism with Tocopherols. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(12), 1209–1215. <https://doi.org/10.1007/S11746-003-0844-4>
- Jukkola, A., Partanen, R., Xiang, W., Heino, A., & Rojas, O. J. (2019). Food emulsifiers based on milk fat globule membranes and their interactions with calcium and casein phosphoproteins. *Food Hydrocolloids*, 94, 30–37. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2019.03.005>
- Kamal-Eldin, A. (2006). Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(12), 1051–1061. <https://doi.org/10.1002/EJLT.200600090>
- Kanno, C. (1989). Emulsifying Properties of Bovine Milk Fat Globule Membrane in Milk Fat Emulsion: Conditions for the Reconstitution of Milk Fat Globules. *Journal of Food Science*, 54(6), 1534–1539. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1989.TB05153.X>

- Kargar, M., Spyropoulos, F., & Norton, I. T. (2011). The effect of interfacial microstructure on the lipid oxidation stability of oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 357(2), 527–533. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2011.02.019>
- Kaur, S., & Das, M. (2011). Functional foods: An overview. *Food Science and Biotechnology*, 20(4), 861–875. <https://doi.org/10.1007/S10068-011-0121-7>
- Keerati-U-Rai, M., & Corredig, M. (2009). Effect of Dynamic High Pressure Homogenization on the Aggregation State of Soy Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3556–3562. <https://doi.org/10.1021/JF803562Q>
- Kentish, S., Wooster, T. J., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R., & Simons, L. (2008). The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 170–175. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2007.07.005>
- Komaiko, J. S., & McClements, D. J. (2016). Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 331–352. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12189>
- Kulczyński, B., Kulczyński, K., Kobus-Cisowska, J., Taczanowski, M., Kmiecik, D., & Gramza-Michałowska, A. (2019). *The Chemical Composition and Nutritional Value of Chia Seeds-Current State of Knowledge*. <https://doi.org/10.3390/nu11061242>
- Kumar, M., Bishnoi, R. S., Shukla, A. K., & Jain, C. P. (2019). Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review. *Preventive Nutrition and Food Science*, 24(3), 225. <https://doi.org/10.3746/PNF.2019.24.3.225>
- Lambert, S., Leconte, N., Blot, M., Rousseau, F., Robert, B., Camier, B., Gassi, J.-Y., Cauty, C., Lopez, C., & Gésan-Guizieu, G. (2016). The lipid content and microstructure of industrial whole buttermilk and butter serum affect the efficiency of skimming. *Food Research International*, 83, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.002>
- Lanciotti, R., Vannini, L., Pittia, P., & Guerzoni, M. E. (2004). Suitability of high-dynamic-pressure-treated milk for the production of yoghurt. *Food Microbiology*, 21(6), 753–760. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2004.01.014>
- Leong, T. S. H., Wooster, T. J., Kentish, S. E., & Ashokkumar, M. (2009). Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(6), 721–727. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2009.02.008>
- Let, M. B., Jacobsen, C., Sørensen, A. D. M., & Meyer, A. S. (2007). Homogenization Conditions Affect the Oxidative Stability of Fish Oil Enriched Milk Emulsions: Lipid Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1773–1780. <https://doi.org/10.1021/JF062391S>
- Lethuaut, L., Métro, F., & Genot, C. (2002). Effect of droplet size on lipid oxidation rates of oil-in-water emulsions stabilized by protein. *JAACS, Journal of the American Oil*

*Chemists' Society*, 79(5), 425–430. <https://doi.org/10.1007/S11746-002-0500-Z/METRICS>

- Li, Y., Deng, L., Dai, T., Li, Y., Chen, J., Liu, W., & Liu, C. (2022). Microfluidization: A promising food processing technology and its challenges in industrial application. *Food Control*, 137, 108794. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2021.108794>
- Liu, Q., Huang, H., Chen, H., Lin, J., & Wang, Q. (2019). Food-Grade Nanoemulsions: Preparation, Stability and Application in Encapsulation of Bioactive Compounds. *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 4242, 24(23), 4242. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24234242>
- Loira, I., Morata, A., Bañuelos, M. A., Puig-Pujol, A., Guamis, B., González, C., & Suárez-Lepe, J. A. (2018). Use of Ultra-High Pressure Homogenization processing in winemaking: Control of microbial populations in grape musts and effects in sensory quality. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 50, 50–56. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2018.10.005>
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Menard, O., Rousseau, F., Pradel, P., & Besle, J. M. (2008). Phospholipid, sphingolipid, and fatty acid compositions of the milk fat globule membrane are modified by diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), 5226–5236. <https://doi.org/10.1021/jf7036104>
- Maestro, A., Solè, I., González, C., Solans, C., & Gutiérrez, J. M. (2008). Influence of the phase behavior on the properties of ionic nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 327(2), 433–439. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2008.07.059>
- Mahdi Jafari, S., He, Y., & Bhandari, B. (2007). Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization—A Comparison. *International Journal of Food Properties*, 9(3), 475–485. <https://doi.org/10.1080/10942910600596464>
- 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>
- Manzoor, M., Sharma, P., Murtaza, M., Jaiswal, A. K., & Jaglan, S. (2023). Fabrication, characterization, and interventions of protein, polysaccharide and lipid-based nanoemulsions in food and nutraceutical delivery applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 241, 124485. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.124485>
- Maphosa, Y., Jideani, V. A., & Adeyi, O. (2017). Effect of soluble dietary fibres from Bambara groundnut varieties on the stability of orange oil beverage emulsion. *African Journal of Science, Technology, Innovation and Development* 9(1), 69–76. <https://doi.org/10.1080/20421338.2016.1263436>

- Martínez-Monteagudo, S. I., Kamat, S., Patel, N., Konuklar, G., Rangavajla, N., & Balasubramaniam, V. M. (2017). Improvements in emulsion stability of dairy beverages treated by high pressure homogenization: A pilot-scale feasibility study. *Journal of Food Engineering*, *193*, 42–52. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2016.08.011>
- Martínez-Monteagudo, S. I., Yan, B., & Balasubramaniam, V. M. (2016). Engineering Process Characterization of High-Pressure Homogenization—from Laboratory to Industrial Scale. *Food Engineering Reviews* *2016* *9*:3, *9*(3), 143–169. <https://doi.org/10.1007/S12393-016-9151-5>
- McClements, D. J. (2007). Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *47*(7), 611–649. <https://doi.org/10.1080/10408390701289292>
- McClements, D. J. (2010). Emulsion Design to Improve the Delivery of Functional Lipophilic Components. *Annual Review of Food Science and Technology*, *1*(1), 241–269. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.FOOD.080708.100722>
- McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, *7*(6), 2297–2316. <https://doi.org/10.1039/C0SM00549E>
- McClements, D. J. (2015a). Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 219, pp. 27–53). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2015.02.002>
- McClements, D. J. (2015b). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques* (Third Edition). CRC. Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/b18868>
- McClements, D. J., Bai, L., & Chung, C. (2017). Recent Advances in the Utilization of Natural Emulsifiers to Form and Stabilize Emulsions. *Annual Review of Food Science and Technology*, *8*, 205–236. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-FOOD-030216-030154>
- McClements, D. J., & Gumus, C. E. (2016). Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloid and Interface Science*, *234*, 3–26. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2016.03.002>
- McClements, D. J., & Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *51*(4), 285–330. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.559558>
- Melo, D., MacHado, T. B., & Oliveira, M. B. P. P. (2019). Chia seeds: an ancient grain trending in modern human diets. *Food & Function*, *10*(6), 3068–3089. <https://doi.org/10.1039/C9FO00239A>

- Mert, I. D. (2019). The applications of microfluidization in cereals and cereal-based products: An overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(6), 1007–1024. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1555134>
- Morata, A., & Guamis, B. (2020). Use of UHPH to Obtain Juices with Better Nutritional Quality and Healthier Wines With Low Levels of SO<sub>2</sub>. *Frontiers in Nutrition*, 7, 598286. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2020.598286/BIBTEX>
- Moreau, R. A., Nyström, L., Whitaker, B. D., Winkler-Moser, J. K., Baer, D. J., Gebauer, S. K., & Hicks, K. B. (2018). Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 70, 35–61. <https://doi.org/10.1016/J.PLIPRES.2018.04.001>
- Moreau, R. A., Whitaker, B. D., & Hicks, K. B. (2002). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 41(6), 457–500. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(02\)00006-1](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(02)00006-1)
- Mudgil, D., Barak, S., & Darji, P. (2016). Development and characterization of functional cultured buttermilk utilizing Aloe vera juice. *Food Bioscience*, 15, 105–109. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2016.06.001>
- Muñoz, L. A., Cobos, A., Diaz, O., & Aguilera, J. M. (2013). Chia Seed (*Salvia hispanica*): An Ancient Grain and a New Functional Food. *Food Reviews International*, 29(4), 394–408. <https://doi.org/10.1080/87559129.2013.818014>
- Nielsen, N. S., Horn, A. F., & Jacobsen, C. (2013). Effect of emulsifier type, pH and iron on oxidative stability of 5% fish oil-in-water emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(8), 874–889. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200303>
- Noello, C., Carvalho, A. G. S., Silva, V. M., & Hubinger, M. D. (2016). Spray dried microparticles of chia oil using emulsion stabilized by whey protein concentrate and pectin by electrostatic deposition. *Food Research International*, 89, 549–557. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2016.09.003>
- O'Dwyer, S. P., O'Beirne, D., Eidhin, D. N., & O'Kennedy, B. T. (2013). Effects of sodium caseinate concentration and storage conditions on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1145–1152. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.09.138>
- Ortega-Anaya, J., & Jiménez-Flores, R. (2019). Symposium review: The relevance of bovine milk phospholipids in human nutrition—Evidence of the effect on infant gut and brain development. *Journal of Dairy Science*, 102(3), 2738–2748. <https://doi.org/10.3168/JDS.2018-15342>
- Osborn, H. T., & Akoh, C. C. (2004). Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid-based oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 84(3), 451–456. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00270-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00270-X)

- Ozturk, O. K., & Turasan, H. (2021). Applications of microfluidization in emulsion-based systems, nanoparticle formation, and beverages. *Trends in Food Science & Technology*, *116*, 609–625. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.07.033>
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2007). Effects of Ultra-High Pressure Homogenization on Microbial and Physicochemical Shelf Life of Milk. *Journal of Dairy Science*, *90*(3), 1081–1093. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(07\)71595-3](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(07)71595-3)
- Pereda, J., Jaramillo, D. P., Quevedo, J. M., Ferragut, V., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2008). Characterization of volatile compounds in ultra-high-pressure homogenized milk. *International Dairy Journal*, *18*(8), 826–834. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2007.12.002>
- Poliseli-Scopel, F. H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2012). Comparison of ultra high pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical and chemical quality of soymilk. *LWT - Food Science and Technology*, *46*(1), 42–48. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2011.11.004>
- Rahn-Chique, K., Puertas, A. M., Romero-Cano, M. S., Rojas, C., & Urbina-Villalba, G. (2012). Nanoemulsion stability: experimental evaluation of the flocculation rate from turbidity measurements. *Advances in Colloid and Interface Science*, *178*, 1–20. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2012.05.001>
- Ramprasath, V. R., Awad, B., Jones, P., & Mackay, D. (2015). Role of Phytosterols in Cancer Prevention and Treatment. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, *98*(3), 735–738. <https://doi.org/10.5740/JAOACINT.SGERAMPRASATH>
- Rave, M. C., Echeverri, J. D., & Salamanca, C. H. (2020). Improvement of the physical stability of oil-in-water nanoemulsions elaborated with Sacha inchi oil employing ultra-high-pressure homogenization. *Journal of Food Engineering*, *273*, 109801. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2019.109801>
- Rayner M., & Dejmek P. (2015). Emulsion Formation and Instability. In Rayner M. Dejmek P. (Ed.), *Engineering Aspects of Food Emulsification and Homogenization* (1st Edition). CRC Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/b18436>
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., & Valdivia-López, M. A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, *107*(2), 656–663. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2007.08.062>
- Riesz, P., & Kondo, T. (1992). Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. *Free Radical Biology and Medicine*, *13*(3), 247–270. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90021-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90021-8)
- Rombaut, R., Camp, J. Van, & Dewettinck, K. (2006). Phospho- and sphingolipid distribution during processing of milk, butter and whey. *International Journal of Food*

*Science & Technology*, 41(4), 435–443. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2005.01091.X>

Rombaut, R., & Dewettinck, K. (2006). Properties, analysis and purification of milk polar lipids. *International Dairy Journal*, 16(11), 1362–1373. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2006.06.011>

Romeih, E. A., Moe, K. M., & Skeie, S. (2012). The influence of fat globule membrane material on the microstructure of low-fat Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 26(1), 66–72. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2012.03.008>

Sakkas, L., Alatini, E., & Moatsou, G. (2021). Use of sweet sheep buttermilk in the manufacture of reduced-fat sheep milk cheese. *International Dairy Journal*, 120, 105079. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2021.105079>

Sakkas, L., Spiliopoulos, M., & Moatsou, G. (2020). Partial substitution of sheep and goat milks of various fat contents by the respective sweet buttermilks: Effect of cream heat treatment. *LWT*, 133, 109926. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109926>

Salehi, F. (2020). Physico-chemical and rheological properties of fruit and vegetable juices as affected by high pressure homogenization: A review. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 1136–1149. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1781167>

Salem, M. A., Ezzat, S. M., Salem, M. A., & Ezzat, S. M. (2018). Nanoemulsions in Food Industry. *Some New Aspects of Colloidal Systems in Foods*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.79447>

Saxena, A., Maity, T., Paliwal, A., & Wadhwa, S. (2017). Technological Aspects of Nanoemulsions and Their Applications in the Food Sector. *Nanotechnology Applications in Food: Flavor, Stability, Nutrition and Safety*, 129–152. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811942-6.00007-8>

Schubert, H., Ax, K., & Behrend, O. (2003). Product engineering of dispersed systems. *Trends in Food Science & Technology*, 14(1–2), 9–16. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00245-5](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00245-5)

Schubert, H., & Engel, R. (2004). Product and Formulation Engineering of Emulsions. *Chemical Engineering Research and Design*, 82(9), 1137–1143. <https://doi.org/10.1205/CERD.82.9.1137.44154>

Shiela, P. M., Sreerama, Y. N., & Krishna, A. G. G. (2004). Storage stability evaluation of some packed vegetable oil blends. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(12), 1125–1129. <https://doi.org/10.1007/S11746-004-1029-X/METRICS>

Simopoulos, A. P. (2016). An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*, 8(3), 128. <https://doi.org/10.3390/NU8030128>

- Singh, H. (2006). The milk fat globule membrane—A biophysical system for food applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *11*(2–3), 154–163. <https://doi.org/10.1016/J.COCIS.2005.11.002>
- Singh, H., & Gallier, S. (2017). Nature's complex emulsion: The fat globules of milk. *Food Hydrocolloids*, *68*, 81–89. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2016.10.011>
- Singh, Y., Meher, J. G., Raval, K., Khan, F. A., Chaurasia, M., Jain, N. K., & Chourasia, M. K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, *252*, 28–49. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2017.03.008>
- Smoczyński, M., Staniewski, B., & Kielczewska, K. (2012). Composition and Structure of the Bovine Milk Fat Globule Membrane—Some Nutritional and Technological Implications. *Food Reviews International*, *28*(2), 188–202. <https://doi.org/10.1080/87559129.2011.595024>
- Sodini, I., Morin, P., Olabi, A., & Jiménez-Flores, R. (2006). Compositional and functional properties of buttermilk: a comparison between sweet, sour, and whey buttermilk. *Journal of Dairy Science*, *89*(2), 525–536. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(06\)72115-4](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(06)72115-4)
- Sousa, G., Trifunovska, M., Antunes, M., Miranda, I., Moldão, M., Alves, V., Vidrih, R., Lopes, P. A., Aparicio, L., Neves, M., Tecelão, C., & Ferreira-Dias, S. (2021). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from *Pelvetia canaliculata* to Sunflower Oil. *Foods*, *10*(8), 1732. <https://doi.org/10.3390/FOODS10081732>
- Spitsberg, V. L., Ivanov, L., & Shritz, V. (2019). Recovery of milk fat globule membrane (MFGM) from buttermilk: effect of Ca-binding salts. *Journal of Dairy Research*, *86*(3), 374–376. <https://doi.org/10.1017/S002202991900061X>
- Stang, M., Schuchmann, H., & Schuber, H. (2001). Emulsification in High-Pressure Homogenizers. *Engineering in Life Sciences*, *1*(4), 151–157. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1618-2863\(200110\)1:4<151::AID-ELSC151>3.0.CO;2-D](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1618-2863(200110)1:4<151::AID-ELSC151>3.0.CO;2-D)
- Stark, A. H., Crawford, M. A., & Reifen, R. (2008). Update on alpha-linolenic acid. *Nutrition Reviews*, *66*(6), 326–332. <https://doi.org/10.1111/J.1753-4887.2008.00040.X>
- Stauffer, C. E., Ambigaipalan, P., & Shahidi, F. (2020). Emulsifiers for the Food Industry. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 1–36. <https://doi.org/10.1002/047167849X.BIO080.PUB2>
- Sun, C., & Gunasekaran, S. (2009). Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, *23*(1), 165–174. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2007.12.006>

- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., & Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108–109, 303–318. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2003.10.023>
- Taha, A., Ahmed, E., Ismaiel, A., Ashokkumar, M., Xu, X., Pan, S., & Hu, H. (2020). Ultrasonic emulsification: An overview on the preparation of different emulsifiers-stabilized emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 363–377. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.09.024>
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J. P., & Cheftel, J. C. (2003). High-pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, 13(6), 427–439. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00051-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00051-7)
- Trujillo, A. J., Roig-Sagues, A. X., Juan, B., Zamora, A., & Ferragut, V. (2021). Ultrahigh-Pressure Homogenization in Dairy Processing: Effects on Quality and Functionality. *Innovative Food Processing Technologies: A Comprehensive Review*, 315–336. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22998-3>
- Vanderghem, C., Bodson, P., Danthine, S., Paquot, M., Deroanne, C., & Blecker, C. (2010). Milk fat globule membrane and buttermilks: From composition to valorization. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 14(3), 485–500.
- Varela, C., Aghababaei, F., Cano-Sarabia, M., Turitich, L., Trujillo, A. J., & Ferragut, V. (2022). Characterization and oxidation stability of spray-dried emulsions with omega-3 oil and buttermilk processed by ultra-high-pressure homogenization (UHPH). *LWT*, 162, 113493. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2022.113493>
- Velázquez-Estrada, R. M., Hernández-Herrero, M. M., López-Pedemonte, T. J., Briñez-Zambrano, W. J., Guamis-López, B., & Roig-Sagués, A. X. (2011). Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar Senftenberg 775W inoculated into fruit juice by means of ultra high pressure homogenisation. *Food Control*, 22(2), 313–317. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2010.07.029>
- Vergara, E. (2018). *Importancia de pruebas de emulsión en pozos petroleros*. Dynadrill. <https://www.dynadrill.com.ec/pruebas-de-emulsion-pozos-petroleros/>
- Villalobos-Castillejos, F., Granillo-Guerrero, V. G., Leyva-Daniel, D. E., Alamilla-Beltrán, L., Gutiérrez-López, G. F., Monroy-Villagrana, A., & Jafari, S. M. (2018). Fabrication of Nanoemulsions by Microfluidization. *Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization*, 207–232. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00008-4>
- Wang, T., Raddatz, J., & Chen, G. (2013). Effects of microfluidization on antioxidant properties of wheat bran. *Journal of Cereal Science*, 58(3), 380–386. <https://doi.org/10.1016/J.JCS.2013.07.010>

- Wang, T., Sun, X., Zhou, Z., & Chen, G. (2012). Effects of microfluidization process on physicochemical properties of wheat bran. *Food Research International*, 48(2), 742–747. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.06.015>
- Wang, X., Wang, S., Wang, W., Ge, Z., Zhang, L., Li, C., Zhang, B., & Zong, W. (2019). Comparison of the effects of dynamic high-pressure microfluidization and conventional homogenization on the quality of peach juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(13), 5994–6000. <https://doi.org/10.1002/JSFA.9874>
- Wilde, P. J. (2009). Emulsions and nanoemulsions using dairy ingredients. *Dairy-Derived Ingredients: Food and Nutraceutical Uses*, 539–564. <https://doi.org/10.1533/9781845697198.3.539>
- Wooster, T. J., Golding, M., & Sanguansri, P. (2008). Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 24(22), 12758–12765. <https://doi.org/10.1021/LA801685V>
- Zamora, A., Ferragut, V., Jaramillo, P. D., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2007). Effects of Ultra-High Pressure Homogenization on the Cheese-Making Properties of Milk. *Journal of Dairy Science*, 90(1), 13–23. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(07\)72604-8](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(07)72604-8)
- Zeeb, B., Gibis, M., Fischer, L., & Weiss, J. (2012). Influence of interfacial properties on Ostwald ripening in crosslinked multilayered oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 387(1), 65–73. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2012.07.054>
- Zembyla, M., Murray, B. S., & Sarkar, A. (2020). Water-in-oil emulsions stabilized by surfactants, biopolymers and/or particles: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 104, 49–59. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.07.028>
- Zisu, B., Bhaskaracharya, R., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2010). Ultrasonic processing of dairy systems in large scale reactors. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(6), 1075–1081. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2009.10.014>



# Capítulo 3

## Materiales y métodos

### 3.1 Materiales

Los aceites vegetales de chía y girasol fueron suministrados por la empresa Gustav Heess (Santa Perpètua de Mogoda, España). Según las especificaciones técnicas del fabricante, el aceite de chía (*Salvia hispanica* L.) es un aceite puro obtenido de las semillas de chía por presión en frío. Este aceite presenta las siguientes características: densidad (20 °C) = 0,931 g/mL; índice de refracción (20 °C) = 1,475; índice de acidez  $\leq 4,0$  mg KOH/g; índice de peróxidos  $\leq 10,0$  mEq O<sub>2</sub>/kg; contenido en impurezas insolubles  $\leq 0,05\%$ , contenidos en ácidos oleico (C18:1)  $\geq 5,0\%$ , linoleico (C18:2) = 15,0-20,0% y  $\alpha$ -linolénico (C18:3)  $\geq 60,0\%$ . El aceite de girasol (*Helianthus annuus* L.) es un aceite puro obtenido de las semillas de girasol por presión o extracción, y posterior refinado. Este aceite presenta las siguientes características: densidad (20 °C) = 0,918-0,923 g/mL; índice de refracción (20 °C) = 1,461-1,468; índice de acidez  $\leq 0,5$  mg KOH/g; índice de peróxidos  $\leq 10,0$  mEq O<sub>2</sub>/kg; contenido en impurezas insolubles  $\leq 0,05\%$  y un contenido en ácidos palmítico (C16:0) 4,0-9,0%, esteárico (C18:0) 1,0-7,0%, oleico (C18:1) 15,0-85,0% y linoleico (C18:2) = 50,0-72,0%.

La mazada (MZ1) en polvo utilizada como emulgente para la producción y caracterización de emulsiones tipo agua-en-aceite ("oil-in-water", O/W) fue suministrada por RENY PICOT (ILAS, SA, Navia, Asturias, España). Las especificaciones de la mazada fueron las siguientes: contenido en sólidos totales:  $>95\%$ ; contenido en materia grasa: 6-12%; proteínas (N  $\times$  6,38) (g/100 g): 28-34%; humedad:  $< 5\%$ ; acidez (%): 0,16; contenido en cenizas (%): 7-8; y sin inhibidores. Por otro lado, la mazada (MZ2) utilizada para la producción de las emulsiones empleadas en la preparación de la fórmula láctea infantil fue suministrada por CAPSA FOOD (Corporación Alimentaria Peñasanta S.A, Sierra de Granada, España). Las especificaciones de esta mazada fueron las siguientes: contenido en sólidos totales:  $>96\%$ ; contenido en materia grasa: 4-14%; proteínas (N  $\times$  6,38) (g/100 g): 27-33%; humedad:  $< 4\%$ ; acidez (%): 0,16; contenido en cenizas (%): 7-8; y sin inhibidores.

En la producción de emulsiones O/W también se utilizó como emulgente un producto comercial enriquecido en membrana del glóbulo graso (MFGMP) obtenido a partir del lactosuero de quesería. Las especificaciones comerciales del MFGMP fueron las siguientes: contenido en materia grasa: 16-22%, proteínas (N × 6,38) (g/100 g): 71,2%, humedad: < 5%, acidez (%): 0,16, contenido en cenizas (%): 1,8; y sin inhibidores.

Como base para la fórmula láctea infantil se utilizó un concentrado de proteína del suero (LAKTEIN WPC80 LV Whey Protein Concentrate), suministrado por LACTALIS Ingredients (Bourgarré, Francia). Sus especificaciones fueron las siguientes: humedad: < 6,0%; materia grasa: < 0,4%; proteína en extracto seco: (N × 6,38) (g/100 g) >80,0%; lactosa: < 14%; y minerales: < 5,0%.

La lactosa (Edible Lactosa 100 Mesh) empleada para la fórmula láctea infantil fue suministrada por LACTALIS Ingredients. Este producto se obtuvo a partir de un suero dulce concentrado de quesería, tras su cristalización, separación y posterior secado. Las especificaciones de la lactosa fueron las siguientes: humedad: <5,2%; concentración en lactosa: >99,2%; contenido en proteína (N × 6,38) (g/100 g): < 0,5% y minerales: < 0,3%.

El resto de los productos químicos (NaOH, sulfato de hierro, tiocianato de amonio, ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico), disolventes (cloroformo, metanol, isopropanol, hexano, y butanol), etc. utilizados fueron suministrados por MERCK con un grado analítico o superior y sin ninguna purificación adicional.

### **3.2 Caracterización lipídica de los emulgentes**

La caracterización de las mazadas y MFGMP fue realizado en el laboratorio del Dr. Javier Fontecha director del Grupo de Biomarcadores lipídicos en alimentación y salud (BLAS) del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación de Madrid.

#### **3.2.1 Extracción de la grasa**

La grasa de las mazadas y del MFGMP se extrajo utilizando el método simplificado descrito por Löfgren et al. (2012), con algunas modificaciones basadas en la optimización de la relación disolvente/muestra. Brevemente, se disolvieron 60 mg en 300 µL de Milli-Q) y se añadieron 2490 µL de metanol y se agitó en vórtex. A continuación, la mezcla se agitó

levemente de forma mecánica durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 4980  $\mu\text{L}$  de diclorometano, se agitó en vórtex durante 20 min, y a continuación, se añadieron 1500  $\mu\text{L}$  de ácido acético 20 mM, y se volvió a agitar ligeramente durante 10 min. La mezcla se centrifugó a 3200 rpm durante 5 min a 4 °C. La fase orgánica inferior se separó cuidadosamente con una pipeta Pasteur, mientras que la fase superior de metanol se lavó de nuevo con 2490  $\mu\text{L}$  de diclorometano, se agitó, se centrifugó y se retiró la fase inferior combinándose con la recogida anterior, y se pasó a través de filtros de jeringa de membrana de PVDF, tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich) que contenían aproximadamente 100 mg de sulfato de sodio anhidro.

Los extractos de lípidos se recogieron en viales de color ámbar, se inyectaron en nitrógeno se secaron, se pesaron y se almacenaron a  $-35$  °C hasta su posterior análisis cromatográfico.

### 3.2.2 Análisis de la fracción lipídica por HPLC-ELSD

La separación de las clases de lípidos se realizó en un sistema HPLC (modelo 1260; Agilent Technologies Inc. Palo Alto, CA, USA) acoplado a un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD, modelo SEDEX 85; Sedere SAS, Alfortville Cedex, Francia) utilizando aire comprimido prefiltrado como gas de nebulización a una presión de 350 kPa a 60 °C, fijándose la ganancia en 3. Se usaron dos columnas en serie (250  $\times$  4,5 mm Zorbax Rx-SIL, diámetro de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies Inc.) y una precolumna con el mismo relleno.

Antes del análisis, las muestras se disolvieron en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (a 5 o 30 mg/mL) y se inyectaron 50  $\mu\text{L}$  después de equilibrar la columna a 40 °C. El gradiente de disolvente fue el detallado en Castro-Gómez et al. (2014). Las muestras y los estándares se analizaron en las mismas condiciones, utilizando disolventes recién preparados. Los ensayos se realizaron por triplicado.

La **Tabla 3.1** muestra el contenido de grasa y las clases de lípidos, incluyendo los neutros y los polares, así como los fosfolípidos y esfingolípidos individuales de las mazadas (MZ1 y MZ2) y del MFGMP. Como era de esperar, la mayoría de las clases de lípidos analizados eran cuantitativa y cualitativamente diferentes entre los diferentes productos comerciales, como se observa en la **Figura 3.1**. En cuanto al contenido de grasa, la MZ2 contiene un 42%

más de grasa que la MZ1, mientras que el MFGMP presentó 1,5 y 2,7 veces más de grasa que las muestras de MZ1 y MZ2, respectivamente.

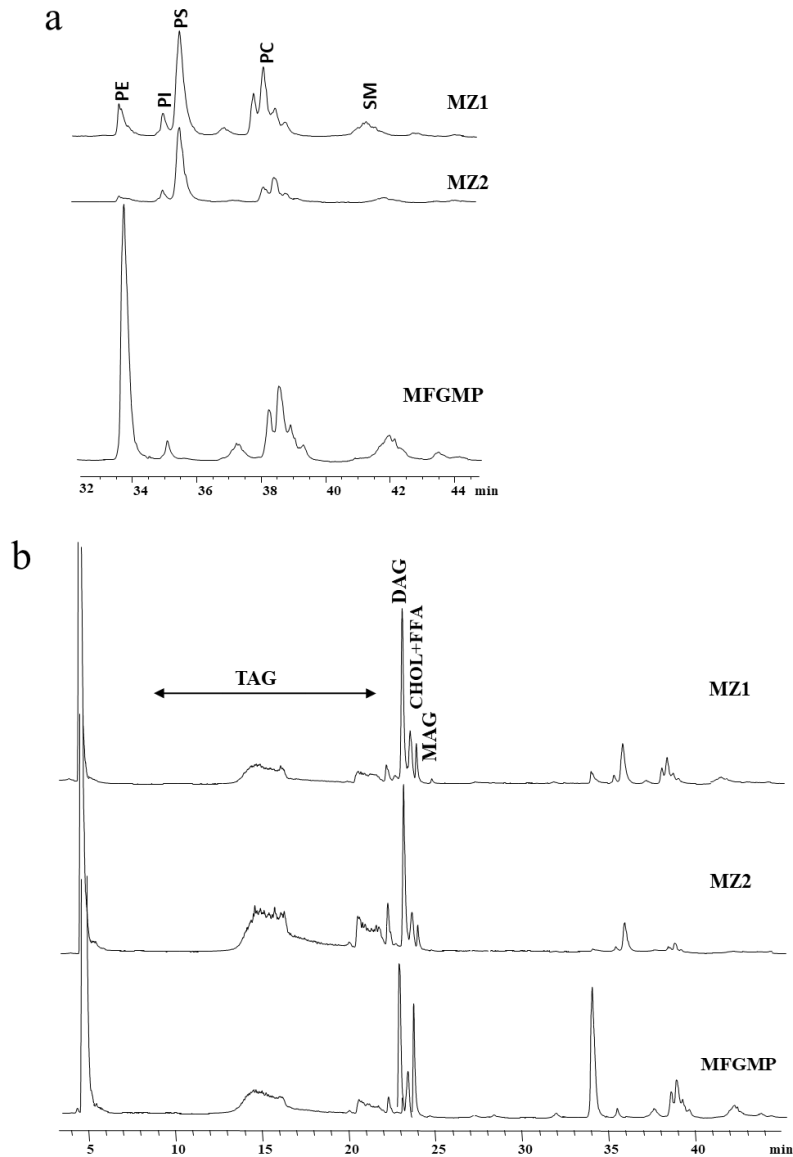
**Tabla 3.1.** Caracterización de la clase lipídica de los emulgentes.

Composición	Emulgente		
	MZ1	MZ2	MFGMP
(% grasa) - Teórico	6-12	4-14	16 – 22
(% grasa) - Extraída	6,2 ± 0,5	10,7 ± 0,0	16,6 ± 0,2
Clase de lípido (%)			
CE	0,3 ± 0,1	nd	0,2 ± 0,0
TAG	65,5 ± 3,1	85,8 ± 1,4	58,7 ± 2,7
DAG	16,3 ± 3,4	8,8 ± 1,0	12,1 ± 1,9
FFA+CHOL	2,0 ± 0,1	0,7 ± 0,2	4,6 ± 0,4
MAG	0,2 ± 0,0	nd	0,1 ± 0,0
GLUCCER	0,1 ± 0,1	nd	0,2 ± 0,0
LACCER	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,0
PL	15,4 ± 0,3	4,6 ± 0,1	23,3 ± 0,3
Componente lipídico (% PL)			
PA	0,5 ± 0,0	nd	0,1 ± 0,0
PE	9,3 ± 0,1	5,1 ± 0,0	45,2 ± 0,7
PI	5,6 ± 0,5	5,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1
PS	36,2 ± 0,4	48,8 ± 1,5	5,6 ± 0,5
PC	33,8 ± 1,6	29,6 ± 1,3	30,9 ± 0,7

Triacilglicerol (TAG); Diacilglicerol (DAG); Ácidos grasos libres + Colesterol (FFA + CHOL); Monoacilglicerol (MAG); Lípidos polares totales (PL); Ácido fosfatídico (PA); Fosfatidiletanolamina (PE); Fosfatidilcolina (PC); Fosfatidilserina (PS); Fosfatidilinositol (PI); Esfingomielina (SM); Glucosilceramida (GLUCCER); Lactosilceramida (LACCER); n.d.: no detectable.

En cuanto a los lípidos neutros, se observa que los porcentajes de triacilglicerol (TAG) y diacilglicerol (DAG) en el MFGMP fueron claramente inferior a los de las mazadas. Esto se debe a que durante el proceso de aislamiento y obtención del MFGMP se separa un mayor contenido de grasa láctea asociada a la MFGM que corresponde principalmente a grasa neutra. Por otro lado, el colesterol (CHOL) y otros componentes minoritarios, pero descritos como compuestos altamente activos biológicamente como las glucosilceramidas (GLUCCER) y lactosilceramidas (LACCER) aumentaron en el MFGMP en comparación al de las mazadas, debido muy probablemente a que están mayormente asociados a las MFGM como constituyentes de la membrana (Mather, 2011). Como se esperaba, el contenido en lípidos polares totales (PL) aumentó alrededor de 1,5-5 veces en el MFGMP en comparación

al de las muestras de mazada, debido a la importante presencia de glicerofosfo- y esfingolípidos en la MFGM.



**Figura 3.1** Cromatograma del análisis de la clase lipídica de los emulgentes. **a.** Lípidos polares: Fosfatidiletanolamina (PE); Fosfatidilinositol (PI), Fosfatidilcolina (PC); Fosfatidilserina (PS) y Esfingomielina (SM). **b.** Triacilgliceroles (TAG); Diacilgliceroles (DAG); Ácidos grasos libres + Colesterol (FFA + CHOL); Monoacilgliceroles (MAG).

En cuanto a los PL individuales analizados incluyendo ácido fosfatídico (PA), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y esfingomielina (SM) de las MZ1 y MZ2 se situaron en el mismo rango que los encontrados para el MFGMP, excepto para PE y PS cuyo porcentaje fue mayor y menor, respectivamente en el MFGMP.

Si se comparan los resultados del análisis de las mazadas y MFGMP de este estudio con los datos recogidos en la literatura, parece que la relación PL/grasa determinada en las mazadas (5-15%) y en el MFGMP (~23%) fue similar en las mazadas dependiendo del origen de estas (Calvo et al., 2020; Sodini et al., 2006), y ligeramente inferior a las calculadas por otros autores en el caso del MFGMP (Calvo et al., 2020; Dewettinck et al., 2008; Le et al., 2011; Mather, 2011) (entre 25-40%). En cuanto a los PL individuales, la proporción de estos en el MFGMP de este estudio se sitúa en el mismo rango que los reportados previamente en la literatura (Calvo et al., 2020; Gassi et al., 2016; Zheng et al., 2014), en los que PE y PC son los principales, seguidos por SM, PS y PI, que están presentes en una menor concentración.

### 3.3 Elaboración de las emulsiones y fórmulas lácteas infantiles

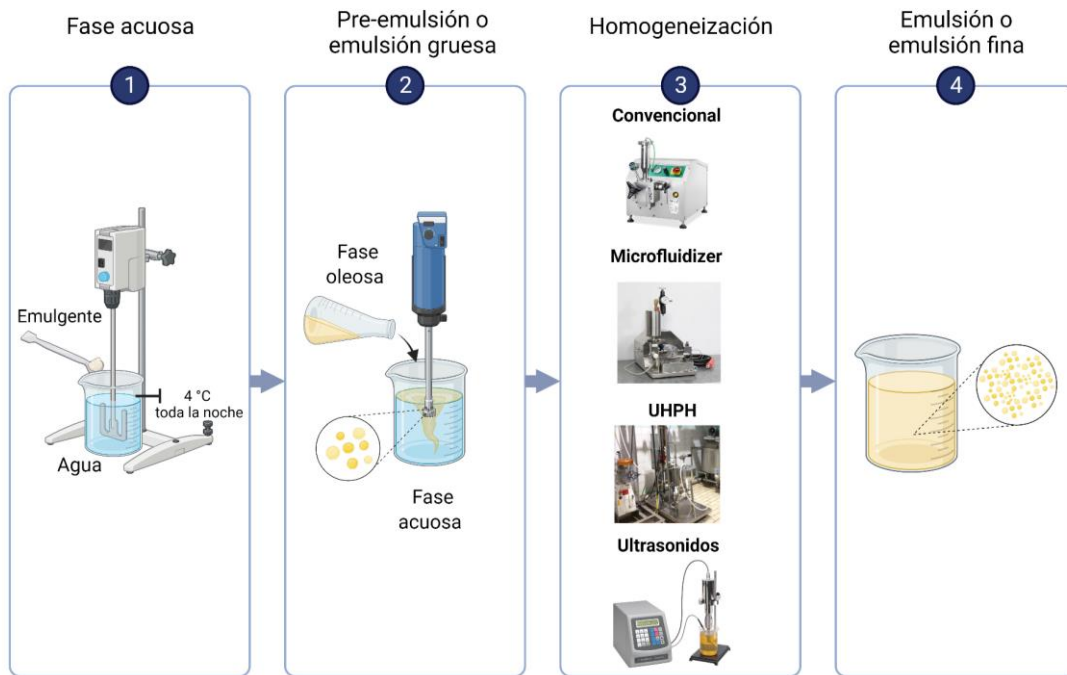
#### 3.3.1 Preparación de las emulsiones con mazada

Se prepararon emulsiones de tipo aceite-en-agua (O/W). La fase oleosa consistió en una mezcla de aceites de chía y girasol (1:1, p/p), y la fase acuosa en una disolución del emulgente utilizado (mazada) en agua destilada, en diferentes proporciones. En la **Tabla 3.2** se describe la composición y nomenclaturas de las diferentes emulsiones preparadas a base de mazada.

**Tabla 3.2.** Composición y nomenclatura de las emulsiones O/W preparadas con mazada.

Prototipo	Agua (%)	Aceite (%)	Mazada (%)
MZ5-10	85	10	5
MZ5-20	75	20	5
MZ7-10	85	10	7
MZ7-20	75	20	7

El protocolo de operaciones que se diseñó para llevar a cabo la preparación de las emulsiones, empleando la configuración experimental esquematizada en la **Figura 3.2**, es el que se describe a continuación.



**Figura 3.2.** Diagrama de preparación de emulsiones finas mediante las diferentes técnicas de homogeneización a alta presión y ultrasonidos. Figura creada con BioRender.com.

Una determinada cantidad de mazada, según el volumen final de emulsión a preparar, se disolvió en agua destilada (fase acuosa), adicionándose un 0,04% de azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) como agente antimicrobiano. La mezcla se dejó agitando en un agitador electromecánico STIRRER BS (VELP Scientifica, Usmate, Italia) durante 15 min a 800 rpm, hasta la disolución completa del emulgente. La mezcla fue almacenada a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche para una completa hidratación de los componentes del emulgente. Por otro lado, se preparó un determinado volumen de una mezcla de aceite de chía y girasol (1:1) en peso (fase oleosa). Sobre la fase acuosa se adicionó lentamente la fase oleosa para obtener una pre-emulsión o emulsión gruesa. La mezcla se realizó mediante una máquina de dispersión de alto rendimiento ULTRA-TURRAX (modelo IKAT25, Staufen, Alemania) con un sistema rotor-estator (eje S25N-18G) a 15.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Después se procedió a la homogeneización de las pre-emulsiones mediante diferentes técnicas de homogeneización para dar lugar a la formación de emulsiones finas.

Las técnicas de homogeneización y las condiciones de trabajo utilizadas (ver **Tabla 3.3**) fueron las siguientes:

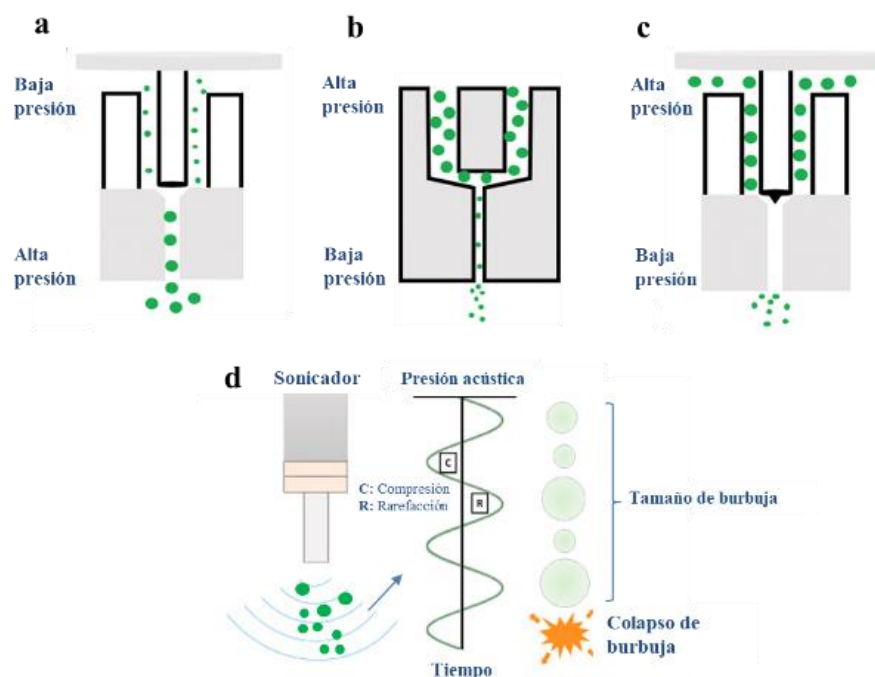
- i. **Convencional (CH):** la pre-emulsión es forzada con una alta velocidad de flujo a través de una válvula (**Figura 3.3a**), produciendo un esfuerzo cortante, y reduciendo así el tamaño de partícula de las gotas. Este equipo incorpora una válvula Gaulin con un diseño clásico que típicamente consta de un asiento y un émbolo, y el proceso de homogeneización ocurre cuando el fluido pasa a través de una pequeña apertura entre estos dos componentes. Este diseño es bastante robusto y ha sido utilizado ampliamente en la industria láctea. Esta tecnología permite alcanzar presiones de hasta 100 MPa, según tipo de equipo, y las utilizadas en la preparación de las emulsiones fueron de 30 y 100 MPa, presiones de homogeneización consideradas como baja y alta, respectivamente.
- ii. **Microfluidización (MF):** en este sistema de homogeneización una bomba de alta presión accionada neumáticamente fuerza el paso de la muestra líquida a través de una cámara cerámica de interacción de geometría fija a presiones que pueden oscilar entre los 10 y 150 MPa, según equipo. Dentro de la cámara de interacción, la muestra es empujada a través de unos microcanales (75-100  $\mu\text{m}$ ) (**Figura 3.3b**) generándose velocidades de flujo muy elevadas. La corriente de líquido se acelera y este choca tanto con las paredes de la cámara como consigo misma generando tres tipos de fuerzas de corte, impacto y disipación de energía. Estas fuerzas rompen las gotas dando lugar a la formación de emulsiones finas. La presión de homogeneización utilizada con este equipo en la obtención de las emulsiones fue de 100 MPa, considerada como presión de homogeneización alta.
- iii. **(Ultra) alta presión ((U)HPH):** La pre-emulsión se somete a un intenso flujo a alta velocidad mediante una válvula de carburo de tungsteno equipada con una aguja en su asiento (**Figura 3.3c**), produciendo un esfuerzo cortante, y reduciendo así el tamaño de partícula de las gotas. Este homogeneizador incorpora una válvula Stansted/Ypsicon que representa una evolución en el diseño de las válvulas de homogeneización. Estas válvulas suelen tener un diseño más sofisticado que puede incluir características como geometrías de asiento ajustables y componentes diseñados para manejar emulsiones más complejas o delicadas. Esto permite un control más preciso sobre el proceso de homogeneización y es útil en aplicaciones donde se requiere un grado más fino de emulsificación. Este equipo permite alcanzar presiones comprendidas entre 100 y 400 MPa. Las presiones de homogeneización utilizadas con este equipo en la obtención de las emulsiones fueron de 100 MPa (alta

presión) y 200 y 300 MPa, consideradas como presiones de homogeneización ultra altas.

- iv. Ultrasonidos (US):** el tamaño de gota de la pre-emulsión es reducida y homogeneizada mediante el uso de ondas ultrasónicas (**Figura 3.3d**) las cuales se generan mediante una sonda de ultrasonidos. Este proceso de sonicación se llevó a cabo utilizando un equipo Vibracell de Sonics & Materials Inc., con una potencia de salida máxima de 500 W y una frecuencia constante de 20 kHz. Se empleó una punta de aleación de titanio (Ti-6Al-4 V) de 13 mm de diámetro, aplicando una amplitud del 40% (equivalente a 200 W de potencia) durante 10 min en un baño de hielo para prevenir el sobrecalentamiento.

**Tabla 3.3.** Equipos de homogeneización y condiciones de trabajo utilizados en la producción de emulsiones O/W con mazada.

<b>Equipo</b>	<b>Marca y modelo</b>	<b>Condiciones/ Ciclos</b>
<b>Convencional (CH)</b>	Homolab, modelo 2.20 Fbf, Parma, Italia	30 MPa / 1 100 MPa / 1
<b>Microfluidización (MF)</b>	Microfluidizer® M-110L Microfluidics, Westwood, Massachusetts, Estados Unidos	100 MPa / 3
<b>Ultra Alta Presión (UHPH)</b>	Ypsicon, modelo A60 Ypsicon Advanced Technologies, S.L., Barcelona, España	100 MPa / 1 200 MPa / 1 300 MPa / 1
<b>Ultrasonidos (US)</b>	VCX 500 Vibra-Cell™ Sonics & Materials Inc., Estados Unidos	40% Amplitud -10 min/1



**Figura 3.3.** Representación esquemática de las válvulas de homogeneización utilizadas en el estudio. (a) Convencional, (b) Microfluidización, (c) Ultra Alta Presión (UHPH) (Levy et al., 2020). (d) Representa el proceso de cavitación acústica del sistema de ultrasonido (Taha et al., 2020).

### 3.3.2. Preparación de emulsiones con el producto enriquecido en membrana de glóbulo graso

Las emulsiones O/W preparadas utilizando el MFGMP se prepararon siguiendo el protocolo descrito en el **Apartado 3.3.1**. Para ello se utilizó una formulación al 3,05%, equivalente al contenido proteico que aporta una solución de mazada al 7% (2,11%), con un 10% de fase oleosa. Las técnicas de homogeneización utilizadas y las condiciones de trabajo fueron las indicadas en la **Tabla 3.4**.

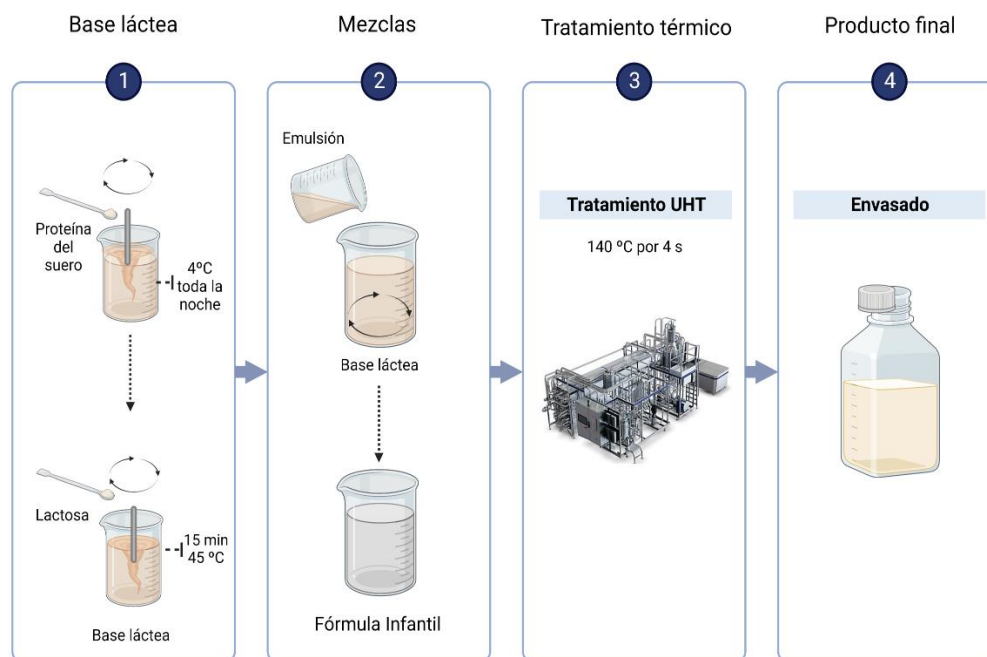
**Tabla 3.4.** Equipos y condiciones de trabajo utilizados en la elaboración de emulsiones O/W con producto enriquecido en membrana del glóbulo graso (MFGMP).

Equipo	Marca y modelo	Condiciones / Ciclos
Convencional (CH)	Homolab, modelo 2.20	30 MPa / 1
Microfluidización (MF)	Microfluidizer® M-110L	100 MPa / 3
Ultra Alta Presión (UHPH)	Ypsicon Advanced, modelo A60	200 MPa / 1
Ultrasonidos (US)	VCX 500 Vibra-Cell™	40% Amplitud -10 min / 1

### 3.3.3 Desarrollo de una fórmula láctea infantil en base a emulsiones

Se formuló una fórmula láctea infantil (FLI) líquida en base a la emulsión O/W compuesta por un 7% de mazada y un 10% de la mezcla de aceites vegetales chía/girasol, y preparada mediante las técnicas de homogeneización de UHPH y CH. Las condiciones empleadas para ambas tecnologías de homogeneización fueron las optimizadas obtenidas en el experimento descrito del **Apartado 3.3.1.**, es decir 200 y 30 MPa para los tratamientos UHPH y CH, respectivamente.

En la elaboración de las FLIs (ver **Figura 3.4**), se comenzó formulando una base láctea. Para ello, se preparó una disolución de proteína de suero al 1,34% (p/p), la cual se dejó hidratar durante toda una noche. Posteriormente, se procedió a la mezcla con la dilución de lactosa (8,56%, p/p) en agua descalcificada, atemperada a aproximadamente 45 °C, permitiendo su hidratación durante un periodo de 15 min. A continuación, sobre la base láctea, se adicionaron las emulsiones preparadas con un 7% de mazada y un 10% de la mezcla de aceites de chía/girasol, y preparadas según el protocolo del **Apartado 3.3.1.** y condiciones de presión antes especificadas. La relación base láctea/emulsión fue de 1:2,03 (p/p), para obtener una FLI con composición teórica de 1,4% proteína, 3,5% grasa, 7% lactosa y pH 6,8-6,9. Las FLIs resultantes fueron sometida a un tratamiento UHT indirecto de 4 s a 140 °C en un equipo Tetra Therm® Aseptic Pilot (Tetra Pak, Lund, Suecia) con un caudal de 300 L/h. Por último, las FLIs fueron recogidas en un envase aséptico (0,5 L) en una cabina de flujo laminar. Para su posterior caracterización, en algunos casos (p.e. estabilidad física) se añadió a las FLIs un 0,04% (p/v) de NaN<sub>3</sub> para evitar la proliferación del crecimiento microbiano a lo largo del estudio.



**Figura 3.4.** Diagrama de preparación de las fórmulas lácteas infantiles líquidas UHT en base a emulsiones O/W con mazada y aceites de chíá/girasol obtenidas por homogeneización a ultra alta presión (UHPH) a 200 MPa u homogeneización convencional (CH) a 30 MPa. Figura creada con Biorender.com.

### 3.4 Caracterización composicional de las emulsiones y fórmulas infantiles

El contenido en extracto seco (ES) de las emulsiones y FLIs líquidas UHT fue analizado mediante desecación en estufa a  $102 \pm 2$  °C hasta peso constante (IDF, 2010) y cálculo de su humedad retenida (100–ES). La medición de su pH se realizó mediante un electrodo de inmersión acoplado a un pH-metro (GLP 21 modelo 2001; Crison Instruments SA, Alella). El contenido proteico fue evaluado mediante la determinación de la concentración total de nitrógeno y se midió mediante el método Dumas (IDF, 2002) utilizando un equipo TruSpec® N (LECO, St. Joseph, MI, USA). El contenido en grasa se llevó a cabo por un método de extracción acelerada (ASE®) utilizando como disolventes de extracción éter de petróleo:isopropanol (3:2) en un equipo ASE 200 (Dionex, ThermoFisher Scientific, Titan Way, California, EEUU). La extracción se llevó a cabo a 120 °C, a presión de 1,0342 MPa, con un tiempo de calentamiento de 6 min, un tiempo estático de 1 min, un volumen de descarga del 100%, un tiempo de purga de 60 s, 3 ciclos y un tiempo total de extracción de 10 min. Por último, la concentración de lactosa fue determinada en las FLIs mediante un kit

enzimático Lactosa/D-Galactosa Cat. No. 10 176 303 035 de r-Biopharm AG (Darmstadt, Alemania).

### **3.5 Técnicas e instrumentación utilizadas para la caracterización fisicoquímica de las emulsiones y fórmulas infantiles**

#### **3.5.1 Medidas de tamaño de partícula y potencial zeta**

El tamaño medio y la distribución de tamaños de las gotas de aceite de las emulsiones se determinaron mediante un analizador de tamaño de partícula por difracción láser (LD) Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido), compuesto de un banco óptico y una unidad de dispersión por vía húmeda (Hidro MU) que permite realizar el análisis mediante la dilución de la muestra. Esta técnica se basa en la medición de la intensidad de luz dispersada por las partículas presentes. La luz incidente es transmitida a la muestra y el equipo detecta el patrón de difracción producido por las partículas. Este patrón depende del tamaño y forma de estas, así como de la longitud de onda de la luz incidente. A partir del patrón de difracción se determina la distribución de tamaños y los diámetros promedios. Se obtuvieron el diámetro medio en superficie ( $D_{3,2}$   $\mu\text{m}$ ) que representa el diámetro de una partícula esférica con la misma relación volumen/superficie del total de la emulsión, y el parámetro ( $D_{4,3}$   $\mu\text{m}$ ) que es el tamaño medio expresado en volumen. En cuanto a los parámetros ópticos, se emplearon índices de refracción de 1,46 y 1,33 para los aceites y el agua, respectivamente. Cada muestra diluida se analizó por triplicado de forma sucesiva. Las emulsiones también se diluyeron en una disolución de dodecilsulfato sódico (SDS) al 1% (p/v) para comprobar la presencia de agregados o fenómenos de coalescencia entre partículas.

El tamaño medio de partícula hidrodinámico y el potencial zeta de las gotas de las emulsiones fueron también determinadas mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) Zetasizer Nanoseries ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Las muestras se diluyeron con agua desionizada, obtenida con un sistema Milli-Q (18.2 M $\Omega$  cm) en proporción 1:1000 (v/v). Se realizaron mediciones por triplicado usando los parámetros ópticos anteriormente descritos.

### 3.5.2 Determinación de la estabilidad física

La estabilidad física de las emulsiones se caracterizó mediante la medida de la variación de su turbidez a lo largo del tiempo. Estas medidas se realizaron utilizando un analizador óptico Turbiscan™ LAB 2.1 (Formulacion, Toulouse, Francia), basado en tecnologías de múltiple dispersión de luz (transmisión y retrodispersión). Las emulsiones fueron analizadas sin dilución a lo largo del tiempo. Concretamente se analizó la variación en el tiempo del porcentaje de luz retrodispersada (muestras opacas) por la muestra a distintas alturas del vial que lo contiene. El análisis de los perfiles de dispersión de luz obtenidos a lo largo del tiempo permite detectar fenómenos de desestabilización de emulsiones tipo sedimentación, cremado, o crecimientos de tamaño de partícula por procesos de coalescencia y floculación (Mengual et al., 1999). En particular, es posible conocer el índice de estabilidad del Turbiscan (Turbiscan Stability Index, TSI), el cual proporciona información sobre la estabilidad global de la muestra y se obtiene a partir de la siguiente fórmula (1):

$$TSI = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{BS})^2}{n-1}} \quad (1)$$

Donde: n es el número de escaneos;  $x_i$  el valor de retrodispersión promedio para cada minuto de medición y  $x_{BS}$  es el valor promedio de  $x_i$ . Los valores de TSI varían en un rango de 0 a 100, y cuanto más pequeño sea su valor más estable es la emulsión estudiada.

Posteriormente se correlacionaron los valores de TSI con observaciones visuales de desestabilización, utilizando la siguiente clasificación:

- (A+) Visualmente Excelente:  $TSI < 0,5$ ; sin desestabilización significativa, máxima estabilidad.
- (A) Visualmente Bueno:  $0,5 < TSI < 1$ ; desestabilización temprana, no visualmente evidente.
- (B) Pase Visual:  $1 < TSI < 3$ ; inicio de desestabilización, generalmente no visible.
- (C) Advertencia Visual:  $3 < TSI < 10$ ; desestabilización importante, posiblemente visible.
- (D) Fallo Visual:  $TSI > 10$ ; variación extrema, desestabilización probablemente visible

La estabilidad de las emulsiones se evaluó durante 15 días a temperatura ambiente y 60 días para FLIs, analizando todas las muestras por triplicado.

### 3.5.3 Propiedades reológicas

La caracterización reológica de las emulsiones y de las FLIs se llevó a cabo mediante un reómetro rotatorio HAAKE™ RheoStress™ 1 (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Alemania) a 20 °C con un sensor de cilindros concéntricos (Z34 DIN 53019 / 222-1499) y una taza o cilindro exterior hueco (Z34 DIN 53019/ 222-1498) aptos para muestras líquidas. Se determinó la curva de flujo (esfuerzo cortante frente a la velocidad de cizallamiento) en función al incremento y, posterior disminución de la velocidad de cizallamiento 0,001 s<sup>-1</sup> y 100 s<sup>-1</sup> durante 1 min. Estas curvas de flujo fueron ajustadas al modelo reológico de Ostwald de Waele o ley de la potencia:  $\tau = K (\dot{\gamma})^n$ , donde  $\tau$  es el esfuerzo cortante (Pa), es K el índice de consistencia (Pa × s<sup>n</sup>),  $\dot{\gamma}$  la velocidad de cizallamiento (s<sup>-1</sup>), y  $n$  es el índice de comportamiento al flujo. Las mediciones se realizaron el mismo día de la preparación de la emulsión y mínimo por duplicado.

### 3.5.4 Determinación de la oxidación lipídica

La propensión a la oxidación lipídica de las emulsiones y FLIs fue examinada a lo largo del tiempo. En concreto, las emulsiones fueron sometidas a un envejecimiento en estufa a 50 °C durante 1, 7 y 15 días, y las FLIs durante 1 mes. Transcurrido el tiempo de ensayo, las muestras fueron congeladas a -80 °C para su posterior análisis en términos de cuantificación del contenido de hidroperóxidos (oxidación primaria) y malondialdehído (oxidación secundaria).

#### 3.5.4.1 Oxidación primaria

Para la cuantificación de los hidroperóxidos se utilizó el método propuesto por (Hu et al., 2003). Para ello, inicialmente se mezclaron 300 µL de la emulsión a analizar y 1,5 mL de una disolución de isooctano/2-propanol (3:1) en un tubo de ensayo de vidrio. La mezcla se agitó en vortex durante 30 s (10 s × 3). A continuación, la fase orgánica de la mezcla fue separada por centrifugación a 1000 rpm durante 2 min. Se tomaron 200 µL de la fase orgánica y se diluyó hasta 2,8 mL con una mezcla de metanol/1-butanol (2:1). A continuación, inmediatamente se añadieron 15 µL de una disolución tiocianato de amonio 3,97 M y 15 µL de una solución de BaCl<sub>2</sub> 0,132 M y FeSO<sub>4</sub> 0,144 M. Por último, la mezcla resultante se agitó en vórtex durante 10 s, se dejó reposar 20 min, y fue analizada en un espectrofotómetro UV 2310 (Dinko Instruments, Barcelona, España) a longitud de onda de 510 nm. La concentración de hidroperóxidos fue determinada a partir de una recta de calibrado realizada

con hidroperóxido de cumeno ( $C_9H_{12}O_2$ ) en un rango de concentraciones de 0,002-2 mM. Cada muestra se analizó por triplicado.

### 3.5.4.2 Oxidación secundaria

Para la cuantificación de malondialdehído se utilizó el método propuesto por (Papastergiadis et al., 2012) basado en cromatografía líquida (HPLC). Para ello, inicialmente se mezclaron 5 mL de la emulsión a analizar y 15 mL de una disolución conteniendo ácido tricloroacético (TCA) 7,5% (p/v), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,1% y propil galato (PG) 0,1% en tubos Falcón de centrifuga (50 mL). Los tubos fueron agitados horizontalmente durante 15 min y centrifugados a 3500 rpm durante 15 min. A continuación, 1 mL del sobrenadante fue mezclado con 3 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 40 mM en tubos de vidrio (con tapa y rosca). Seguidamente, los tubos se calentaron a 100 °C durante 40 min, se atemperaron a temperatura ambiente, se les añadió 1 mL de metanol (pureza HPLC) y se agitaron en vórtex durante 10 s. A continuación, las muestras fueron puestas en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min para evitar la presencia de precipitados. La separación y cuantificación de malondialdehído en los sobrenadantes se realizó en un equipo HPLC compuesto por un inyector automático (Waters 717 Plus, Milford, Massachusetts, EEUU), una bomba impulsora modelo 515 de Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, EEUU) y un detector de fluorescencia serie 200 (Perkin Elmer). Alícuotas de 20  $\mu$ L de la muestra se inyectaron en una columna Agilent Pursuit 3 C18 (5  $\mu$ m, 150  $\times$  4,6 mm) con una temperatura de análisis de 40 °C. La fase móvil consistió en una solución tampón de  $KH_2PO_4$  50 mM, metanol, y acetonitrilo (72:17:11, pH 5,3) bombeada isocráticamente con un flujo de 0,8 mL/min. Las longitudes de onda de excitación y emisión fluorométricas seleccionadas fueron 525 y 560 nm, respectivamente. Para cuantificar la cantidad del malondialdehído se realizó una curva patrón a partir de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) en un intervalo de concentración de 0,25 a 25  $\mu$ M. La cuantificación de picos se realizó con ayuda del software Turbochrom TC6 (Perkin Elmer).

### 3.5.5 Color

El color fue evaluado en las FLIs los días 1 y 60 con un colorímetro portátil Hunter Lab (MiniScan XETM, Hunter laboratory Inc., Reston, EEUU de acuerdo al método Pathare et al. (2013). Las muestras se colocaron en un recipiente de vidrio óptico transparente de 50 mL lleno hasta 10 mm seguido de un disco de tapón blanco para estandarizar las mediciones.

Se midió la superficie externa del fondo. Los resultados se expresaron en el espacio de color CIE  $L^*a^*b^*$ , donde  $L^*$  es la luminosidad,  $a^*$  es el verde-rojo y  $b^*$  es el azul-amarillo. El índice de blancura (WI), el índice de amarillez (YI) y la diferencia de color total ( $\Delta E$ ) se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones (2), (3), (4), respectivamente.

$$WI = 100 - [(100 - L^*) + a^{*2} + b^{*2}]^{0,5} \quad (2)$$

$$YI = 142,86 \times b^* \times L^{*-1} \quad (3)$$

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0,5} \quad (4)$$

### 3.5.7 Microscopía láser confocal

El análisis microestructural de las emulsiones y de las fórmulas infantiles se realizó con un microscopio láser confocal (Leica TCS SP2 AOBS, Heidelberg, Alemania) de argón a una longitud de onda de excitación de 488 nm (la emisión se detectó entre 500 y 530 nm), y un láser de He-Ne a una longitud de onda de excitación de 543 nm (la emisión se detectó entre 565 y 615 nm). Las observaciones se realizaron con un objetivo Leica de inmersión en aceite  $\times 63$  con una apertura numérica de 1,4.

Los lípidos neutros, como los triacilgliceroles, se tiñeron con la sonda fluorescente soluble en lípidos *Nile Red* (5H-benzo  $\alpha$ -fenoxazina-5-ona, 9-dietilamino; Sigma-Aldrich), preparada a una concentración de 42  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en acetona. Se añadieron unos 100  $\mu\text{L}$  de la solución de *Nile Red* a 1 mL de las emulsiones o FLIs. Para teñir los fosfolípidos de la MFGM se utilizó la sonda fluorescente N-(lisamina rodamina B sulfonil) dioleoilfosfatidiletanolamina (*Rh-DOPE*; Avanti polar lipids Inc, Birmingham, Reino Unido). Se añadieron unos 20  $\mu\text{L}$  de la solución comercial a 0,5 mL de las emulsiones o FLIs. Para el marcado de las proteínas se utilizó la sonda fluorescente *Fast Green* FCF (Sigma-Aldrich), que se preparó disolviendo el 1% del polvo en agua destilada, y se añadió a las emulsiones o FLIs a una concentración del 10%.

### 3.6 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un exhaustivo análisis estadístico utilizando diversas herramientas y enfoques en cada uno de los capítulos, con el objetivo de comprender y evaluar detalladamente los resultados obtenidos.

En el **Capítulo 4**, se utilizó el software R (versión 4.1.2, Viena, Austria) para realizar un análisis detallado de las variables de interés. Las decisiones estadísticas se tomaron con un nivel de significación establecido en 0,05, y se aplicó un ANOVA mediante un Modelo Lineal General con efectos aleatorios e interacciones entre factores. Además, se llevaron a cabo comparaciones 2 a 2 para identificar subconjuntos homogéneos, utilizando la corrección de Tukey para abordar la multiplicidad de contrastes.

En el **Capítulo 5**, se llevó a cabo un análisis estadístico empleando un Modelo Lineal General. Este enfoque permite evaluar de manera integral la influencia de múltiples factores sobre las variables de interés. Se utilizó el software Minitab Express™ 1.5.3 para realizar pruebas de análisis de varianza (ANOVA) bidireccional, determinando las diferencias significativas entre medias mediante la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95% ( $P < 0,05$ ). Además, se realizó un análisis específico para emulsiones con una única medida, comparando medias por Two Sample t-test.

En el **Capítulo 7** los resultados de las FLIs se sometieron a un análisis estadístico detallado en el que se utilizó estadística descriptiva, modelo lineal mixto con interacción y análisis de varianza (ANOVA) para cada variable. En presencia de diferencias significativas entre tratamientos, se procedió a la comparación de medias por el Test de Tukey ( $P < 0,05$ ) mediante el software R (versión 4.0.1). Además, se realizó un análisis específico para emulsiones con una única medida, comparando medias por Two Sample t-test.

### 3.7 Referencias bibliográficas

- Calvo, M. V., Martín-Hernández, M. C., García-Serrano, A., Castro-Gómez, M. P., Alonso-Miravalles, L., García-Martín, R., Megino-Tello, J., Alonso, L., & Fontecha, J. (2020). Comprehensive characterization of neutral and polar lipids of buttermilk from different sources and its milk fat globule membrane isolates. *Journal of Food Composition and Analysis*, *86*, 103386. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2019.103386>
- Castro-Gómez, M. P., Rodríguez-Alcalá, L. M., Calvo, M. V., Romero, J., Mendiola, J. A., Ibañez, E., & Fontecha, J. (2014). Total milk fat extraction and quantification of polar and neutral lipids of cow, goat, and ewe milk by using a pressurized liquid system and chromatographic techniques. *Journal of Dairy Science*, *97*(11), 6719–6728. <https://doi.org/10.3168/JDS.2014-8128>
- Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T. T., Messens, K., & Van Camp, J. (2008). Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, *18*(5), 436–457. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2007.10.014>
- IDF (2002). ISO 14891 / IDF 185: 2002 - Milk and milk products - Determination of nitrogen content - Routine method using combustion according to the Dumas principle. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- IDF (2010). ISO 6731 / IDF 021: 2010 - Milk, cream and evaporated milk - Determination of total solids content (Reference method). International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- Gassi, J. Y., Blot, M., Beaucher, E., Robert, B., Leconte, N., Camier, B., Rousseau, F., Bourlieu, C., Jardin, J., Briard-Bion, V., Lambert, S., Gésan-Guiziou, G., Lopez, C., & Gaucheron, F. (2016). Preparation and characterisation of a milk polar lipids enriched ingredient from fresh industrial liquid butter serum: Combination of physico-chemical modifications and technological treatments. *International Dairy Journal*, *52*, 26–34. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2015.08.012>
- Hu, M., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2003). Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate, and soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(6), 1696–1700. <https://doi.org/10.1021/JF020952J>
- Le, T. T., van Camp, J., Pascual, P. A. L., Meesen, G., Thienpont, N., Messens, K., & Dewettinck, K. (2011). Physical properties and microstructure of yoghurt enriched with milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, *21*(10), 798–805. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2011.04.015>
- Levy, R., Okun, Z., & Shpigelman, A. (2020). High-Pressure Homogenization: Principles and Applications Beyond Microbial Inactivation. *Food Engineering*, *13*(3), 90–508. <https://doi.org/10.1007/S12393-020-09239-8>

- Löfgren, L., Ståhlman, M., Forsberg, G. B., Saarinen, S., Nilsson, R., & Hansson, G. I. (2012). The BUME method: A novel automated chloroform-free 96-well total lipid extraction method for blood plasma. *Journal of Lipid Research*, 53(8), 1690–1700. <https://doi.org/10.1194/jlr.D023036>
- Mather, I. H. (2011). Milk Lipids | Milk Fat Globule Membrane. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition*, 680–690. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00337-X>
- Mengual, O., Meunier, G., Cayré, I., Puech, K., & Snabre, P. (1999). TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, 50(2), 445–456. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00129-0)
- Papastergiadis, A., Mubiru, E., Van Langenhove, H., & De Meulenaer, B. (2012). Malondialdehyde measurement in oxidized foods: Evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) Test in various foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(38), 9589–9594. <https://doi.org/10.1021/jf302451c>
- Pathare, P.B., Opara, U.L. & Al-Said, F.A.J. (2013). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food Bioprocess Technology*, 6, 36–60. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9>
- Sodini, I., Morin, P., & Jime, R. (2006). Compositional and Functional Properties of Buttermilk: A Comparison Between Sweet, Sour, and Whey Buttermilk. *Journal of Dairy Science*, 89(2), 525–536. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72115-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72115-4)
- Taha, A., Ahmed, E., Ismaiel, A., Ashokkumar, M., Xu, X., Pan, S., & Hu, H. (2020). Ultrasonic emulsification: An overview on the preparation of different emulsifiers-stabilized emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 363–377. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.09.024>
- Zheng, H., Jiménez-Flores, R., & Everett, D. W. (2014). Lateral lipid organization of the bovine milk fat globule membrane is revealed by washing processes. *Journal of Dairy Science*, 97(10), 5964–5974. <https://doi.org/10.3168/JDS.2014-7951>

# Capítulo 4

## **Encapsulación de aceites vegetales mediante emulsiones O/W usando mazada como emulgente y diferentes tecnologías de homogeneización**

### **4.1 Introducción**

Hoy en día, en la industria láctea existe un gran interés en la revalorización de los subproductos generados en sus procesos de fabricación, a través de su reutilización en la formulación de alimentos funcionales con actividad fisiológica (Kaur & Das, 2011).

En este contexto, la mazada es un subproducto obtenido durante la fabricación de la mantequilla. La mazada es un ingrediente alimenticio excepcional, con un valor nutricional superior a la leche y con efectos muy positivos en la salud por su alto valor biológico (Conway et al., 2013; Larsson et al., 2008). La mazada se compone de elementos provenientes de la leche desnatada (caseína, proteína de suero, lactosa y minerales) y la membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM; fosfolípidos y proteínas de la MFGM) (Barukčić et al., 2019; Conway et al., 2014; Corredig et al., 2003; Ihara et al., 2011; de Freitas Mascarello et al., 2019; Sodini et al., 2006). En la industria láctea, el uso de sus componentes fraccionados se encuentra ampliamente extendido por sus características funcionales, nutricionales y organolépticas (Barukčić et al., 2019; Zanabria Eyzaguirre & Corredig, 2011).

La mazada es baja en grasa y es una importante fuente de proteínas y de alto contenido en lípidos polares (Sodini et al., 2006). Estudios científicos han relevado su contribución a la prevención del cáncer de colon, la disminución de los niveles de colesterol, su efecto bactericida, la protección frente a la úlcera gástrica y la mejora de la función cerebral (Barukčić et al., 2019; Sodini, Morin, & Jime, 2006; Spitsberg, 2005). En el aspecto funcional, la mazada mejora las propiedades de emulsificación de los alimentos debido a su alto contenido de proteínas y fosfolípidos de la MFGM. Las proteínas ofrecen estabilidad a las emulsiones, mientras que los fosfolípidos, al ser anfífilicos, forman estructuras

vesiculares y también proporcionan estabilidad, permitiendo la administración controlada de agentes bioactivos encapsulados (Augustin et al., 2015; Kasinos et al., 2014; Thompson & Singh, 2006). Esta propiedad es esencial para una amplia gama de productos alimenticios, incluyendo salsas, aderezos para ensaladas y productos horneados (Ihara et al., 2011).

Por otro lado, otros ingredientes alimenticios excepcionales utilizados para el desarrollo de alimentos funcionales son los aceites vegetales ricos en ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 y 6, tales como los aceites procedentes de las semillas de girasol y de la chía. En numerosos estudios, se ha demostrado que el consumo de ácidos grasos  $\omega$ -3 y 6 favorece el desarrollo de las capacidades cognitivas, nerviosas y celulares de los niños, además de reducir la incidencia de enfermedades cardiovasculares y el curso de la arteriosclerosis coronaria en humanos (Kaur et al., 2014; Mazza et al., 2007; Nagy et al., 2017; Simopoulos, 2016). Sin embargo, la utilización de estos aceites vegetales en alimentos funcionales está comprometida debido a su elevada susceptibilidad a la oxidación que presentan sus ácidos grasos insaturados, y como consecuencia la aparición de compuestos oxidados con la aparición de olores desagradables en los aceites e incluso de componentes tóxicos (Ghelichi et al., 2023; Nogueira et al., 2019; Syed, 2016; Zhang & Chen, 1997).

Las emulsiones aceite en agua (O/W) se han convertido en una herramienta esencial para vehicular y proteger compuestos bioactivos, especialmente en la industria alimentaria y farmacéutica (Zhu et al., 2019). Estas emulsiones facilitan la incorporación de ingredientes solubles en aceite, como ácidos grasos insaturados, vitaminas y antioxidantes, en productos basados en agua (Chang & Nickerson, 2018). Al encapsular estos compuestos bioactivos, las emulsiones no solo mejoran su estabilidad y biodisponibilidad, sino que también permiten una liberación controlada y específica en el organismo (Fernandes et al., 2023). Esta técnica es particularmente valiosa para proteger compuestos sensibles a factores como la luz y el oxígeno, asegurando así su efectividad y calidad en el producto final (Chang & Nickerson, 2018).

En el campo de la preparación de emulsiones, los métodos de procesamiento físico desempeñan un papel fundamental, ya que aportan energía esencial al sistema, determinando así las características finales de las emulsiones obtenidas. Además de la homogeneización convencional (CH), tres técnicas avanzadas han ganado notoriedad por su eficacia en

producir emulsiones con tamaño de partícula más pequeño: la homogeneización a alta y ultra alta presión (HPH y UHPH), la microfluidización o *Microfluidizer*® (MF) y los ultrasonidos (US) (Hebishy et al., 2013; Jafari et al., 2007; Liu et al., 2019; McClements, 2011; Singh & Gallier, 2017).

La HPH es una técnica ampliamente reconocida que somete la emulsión a altas presiones, hasta 100 MPa, generando fuerzas mecánicas de cizallamiento que fragmentan y disminuyen el tamaño de las gotas de aceite (Comuzzo & Calligaris, 2019; Floury et al., 2000; Hidajat et al., 2020; Tobin et al., 2015). A pesar de su eficacia, la HPH puede producir distribuciones de tamaño de gota inconsistentes, afectando la estabilidad de la emulsión (Juttulapa et al., 2017; Santos et al., 2022; Seo et al., 2018).

En respuesta a estas limitaciones, las técnicas de UHPH y MF emergen como alternativas más avanzadas. Estos métodos permiten un control más exacto sobre la distribución del tamaño de las gotas, resultando en una notable uniformidad en el tamaño de partícula. La UHPH lleva el proceso de homogeneización a un nivel superior, aplicando presiones aún más elevadas (200-300 MPa), lo que se traduce en emulsiones con una estabilidad y una homogeneidad mejoradas (Cortés-Muñoz et al., 2009; Dumay et al., 2013; Fernández-Ávila et al., 2015; Hebishy et al., 2013; Zamora et al., 2007). Por su parte, la MF utiliza canales de flujo estrechos y de alta velocidad para obtener una reducción más eficiente y uniforme del tamaño de las gotas (Jafari et al., 2007; Li et al., 2022; Thompson & Singh, 2006; Villalobos-Castillejos et al., 2018; Wang et al., 2012).

Los ultrasonidos (US) representan otra técnica prometedora, utilizando ondas sonoras de alta frecuencia para crear vibraciones en el líquido. Esta acción genera microburbujas que colapsan violentamente, produciendo fuerzas de cizallamiento locales que facilitan la formación de emulsiones finas y estables (Abbas et al., 2013; Abismaïl et al., 1999; Anandan et al., 2017; Silva et al., 2015; Sousa et al., 2021).

Estas técnicas avanzadas no solo mejoran la calidad de las emulsiones, sino que también abren nuevas posibilidades en aplicaciones como la encapsulación de nutrientes y la creación de productos alimenticios y farmacéuticos con características específicas y deseables (Augustin et al., 2015; Bakry et al., 2015; Tan & McClements, 2021; Wang et al., 2011).

En este trabajo, se busca aprovechar las características funcionales, nutricionales y organolépticas de la mazada y los aceites vegetales ricos en ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 y 6 para desarrollar un ingrediente alimenticio funcional en forma de emulsión tipo O/W. Los componentes de la mazada han demostrado ser efectivos como emulsionantes en emulsiones O/W, lo que ofrece posibilidades interesantes para su uso en la encapsulación y protección de componentes bioactivos. Un estudio de Aghababaei et al. (2021) examinó el uso de la mazada comercial en la producción de emulsiones ricas en  $\omega$ -3 y 6 utilizando UHPH, resaltando una mejora en la estabilidad de las emulsiones y en la eficiencia de encapsulación en comparación con la CH. También, Yesiltas et al. (2020) en su estudio sobre emulsiones O/W con alto contenido de grasa estabilizadas con caseinato de sodio y fosfatidilcolina ilustra la capacidad de estos componentes, comunes en la mazada, para formar emulsiones estables, demostrando su potencial en aplicaciones donde se requiere la protección de componentes sensibles. Estos hallazgos subrayan la viabilidad de usar los componentes de la mazada como emulsionantes naturales en emulsiones aceite en agua para la encapsulación eficaz y protección de ingredientes bioactivos. La propiedad tensioactiva de los componentes de la mazada en la interfaz O/W evitará la coalescencia de los glóbulos de aceite. Además, se espera que la encapsulación de los aceites vegetales de girasol y chía en la emulsión, con la mazada y mediante el uso de diferentes tecnologías de homogeneización, ayude a reducir la degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 y 6, evitando así la pérdida de sus propiedades, como se ha demostrado en estudios anteriores (Augustin et al., 2011; Augustin & Hemar, 2009; Drusch & Mannino, 2009; McClements et al., 2007).

### **4.2 Preparación y caracterización de las emulsiones**

En el **Apartado 3.3.1** se describe la preparación de las emulsiones O/W utilizando una fase oleosa compuesta por una mezcla de aceites de chía y girasol en proporción 1:1, y una fase acuosa que contiene mazada como emulgente.

En este estudio se elaboraron emulsiones O/W mediante cuatro diferentes métodos de homogeneización, incluyendo CH, (U)HPH, MF y US. Se realizó una evaluación exhaustiva para examinar el impacto de varios factores, como la concentración de mazada y de la fase oleosa, la tecnología de homogeneización seleccionada y sus parámetros operativos, en las

características de las emulsiones obtenidas. Se analizaron estas propiedades en términos de tamaño de partícula, carga, morfología, comportamiento reológico, y estabilidades tanto física como oxidativa. La **Tabla 4.1** muestra la formulación, las técnicas de homogenización utilizadas en su preparación, y las condiciones de trabajo utilizadas para su elaboración.

**Tabla 4.1.** Diseño experimental de las emulsiones elaboradas en este estudio.

Técnica de homogenización	Condiciones de trabajo (MPa)	Formulación	
		Mazada (%)	Aceite (%)
Convencional (CH)	30	5	10
		7	10
		5	20
		7	20
	100	5	10
		7	10
		5	20
		7	20
Microfluidización (MF)	100	5	10
		7	10
		5	20
		7	20
(Ultra) alta presión (UHPH)	100	5	10
		7	10
		5	20
		7	20
	200	5	10
		7	10
		5	20
		7	20
300	5	10	
	7	10	
	5	20	
	7	20	
Ultrasonidos (US)	40% Amplitud-10 min	5	10
		7	10
		5	20
		7	20

#### 4.2.1 Caracterización de las emulsiones obtenidas mediante homogeneización convencional

Desde que se diseñó el primer homogeneizador convencional en 1899, el proceso de homogeneización convencional (CH) se ha utilizado en diferentes industrias para la mejora de la estabilidad, la uniformidad, la consistencia, la viscosidad, la vida útil, el sabor y el color

de los productos. Asimismo, la CH se usa ampliamente en la elaboración de distintos tipos emulsiones para evitar los fenómenos de desestabilización, fundamentalmente el cremado, agregación y coalescencia (Pereda et al., 2008; Mayta-Hanco et al., 2020).

La CH utiliza presiones entre 25 y 100 MPa para forzar el paso del fluido a homogenizar a través de una válvula con el fin de conseguir la división de las gotas de aceite polidispersas de una emulsión O/W hacia un gran número de gotas de aceite de tamaño menor y más homogéneo (Joubran et al., 1993). El líquido pasa a gran velocidad por la válvula y, a la salida, la presión cae bruscamente y se producen fuerzas de cizalla y fenómenos de turbulencia, cavitación e impacto que reducen el tamaño de las partículas de la fase oleosa (Sajjadi et al., 2002; Wilbey, 2011). Con este proceso de homogeneización se consigue reducir el tamaño inicial de las gotas e incrementar de 5 a 10 veces la superficie de las nuevas gotas de aceite. Por ejemplo, en la industria láctea las presiones utilizadas en los homogeneizadores convencionales oscilan entre ~20 y 60 MPa, y se emplean con el propósito de reducir el tamaño de los glóbulos de grasa que, en general, se encuentra entre 1 y 10  $\mu\text{m}$  (Dumay et al., 2013).

En este trabajo, siguiendo el diseño experimental de la **Tabla 4.1** y el protocolo de elaboración de emulsiones o/w del **Apartado 3.3.1.**, se ha llevado a cabo la preparación de 8 prototipos de emulsiones con el equipo de CH utilizando las presiones de trabajo de 30 y 100 MPa. Se ha trabajado con dos concentraciones (10 y 20%) de la fase oleosa formada por la mezcla de aceites de girasol /chía (1:1), y una fase acuosa con dos concentraciones (5 y 7%) de mazada.

Durante el tratamiento de homogeneización, la temperatura de entrada de las emulsiones, independientemente de la formulación, se mantuvieron en el intervalo de 22 a 24 °C. Las emulsiones a 30 MPa, experimentaron un ligero aumento de temperatura de salida, alcanzando valores de 24 a 26 °C. Sin embargo, al aumentar la presión a 100 MPa, las emulsiones registraron una temperatura de salida más elevada, situándose en el intervalo de 39 a 41 °C. Las temperaturas de salida de producto se redujeron rápidamente por enfriamiento de las emulsiones en hielo hasta temperatura ambiente.

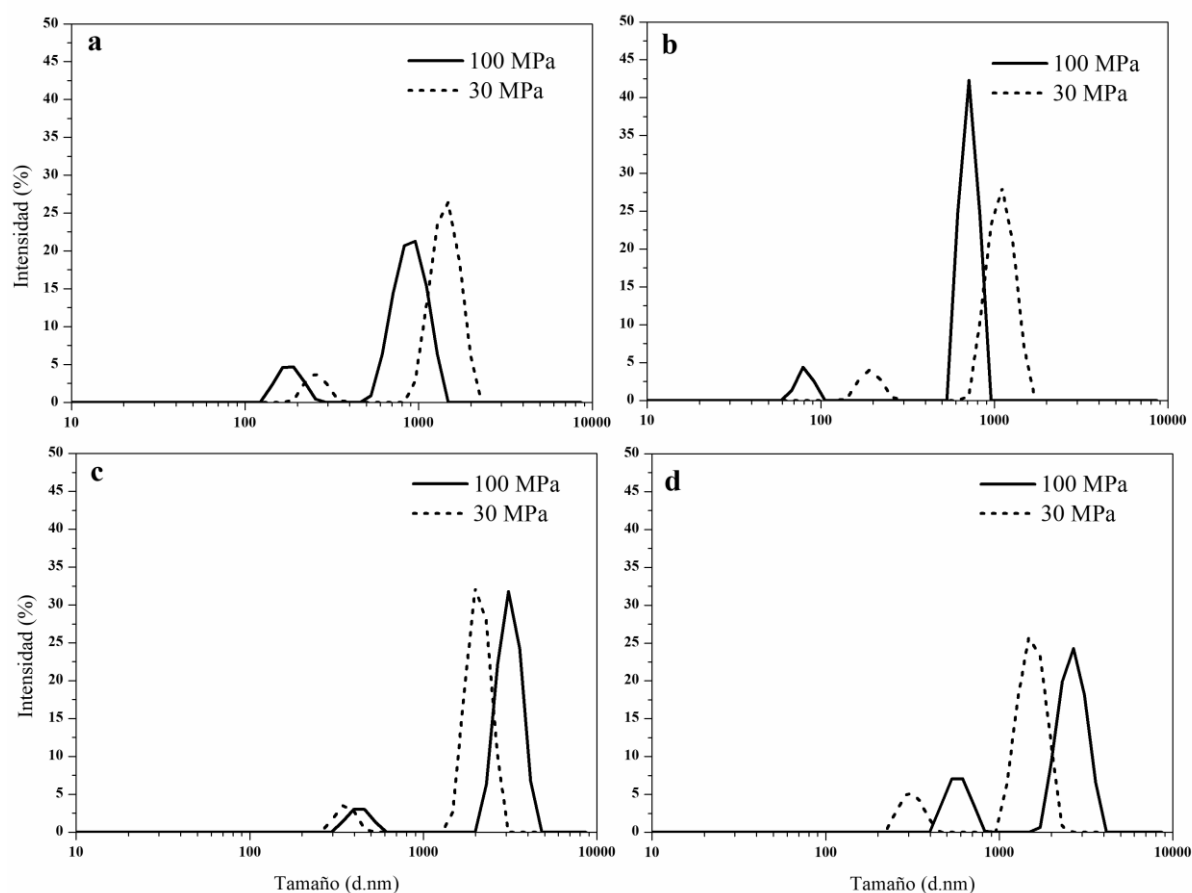
En base a los resultados de caracterización de partícula obtenidos mediante esta técnica de homogeneización (**Tabla 4.2**), se obtuvieron emulsiones con distribuciones de tamaño de partícula bimodales (**Figura 4.1**). A grandes rasgos se puede observar que, en todas las emulsiones, se identificó una población de partículas de tamaño menor a  $\sim 600$  nm y otra población más amplia de partículas con tamaños mayores, de  $\geq 1$  micra, con índices de polidispersión (PDI) por encima de 0,5, y tamaños medios comprendidos entre 900 nm y  $\sim 3$   $\mu\text{m}$ . El tamaño medio de partícula más pequeño correspondió a las emulsiones homogeneizadas a 100 MPa y compuestas por un 10% de fase oleosa, sin mostrar diferencias en cuanto a la concentración de mazada utilizada, mientras que sus homólogas con 20% de fase oleosa fueron las que presentaron mayor tamaño de partícula. En general, se observó un bajo grado de uniformidad en las emulsiones preparadas por CH, visible por el elevado índice de polidispersión obtenido, asociándose a fenómenos de floculación y agregación que ocurren entre las gotas de la emulsión tras la homogeneización (Shahavi et al., 2019).

**Tabla 4.2.** Tamaño medio de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta de las emulsiones preparadas mediante homogeneización convencional.

Presión (MPa)	Mazada (%)	Fase Oleosa (%)	Diámetro medio de partícula (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
30	5	10	1717,34 $\pm$ 167,33 <sup>bc</sup>	0,88 $\pm$ 0,14 <sup>ab</sup>	-34,96 $\pm$ 2,87 <sup>a</sup>
	7	10	1170,00 $\pm$ 73,67 <sup>cd</sup>	0,59 $\pm$ 0,14 <sup>c</sup>	-38,33 $\pm$ 6,22 <sup>a</sup>
	5	20	2059,89 $\pm$ 401,17 <sup>b</sup>	0,98 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	-35,53 $\pm$ 3,00 <sup>a</sup>
	7	20	1596,00 $\pm$ 242,00 <sup>bcd</sup>	0,96 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	-34,39 $\pm$ 3,60 <sup>a</sup>
100	5	10	925,90 $\pm$ 14,20 <sup>d</sup>	0,68 $\pm$ 0,03 <sup>bc</sup>	-35,57 $\pm$ 0,51 <sup>a</sup>
	7	10	908,20 $\pm$ 2,25 <sup>d</sup>	0,66 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	-35,53 $\pm$ 1,20 <sup>a</sup>
	5	20	3164,75 $\pm$ 278,25 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	-34,43 $\pm$ 1,50 <sup>a</sup>
	7	20	2759,00 $\pm$ 386,26 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	-32,82 $\pm$ 1,12 <sup>a</sup>

<sup>a-b-c-d</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

En lo que respecta al potencial zeta de las emulsiones, es relevante destacar que en todas las muestras se mantuvo un potencial zeta negativo constante, sin que se observaran diferencias significativas entre ellas. Este resultado es altamente beneficioso, ya que indica una estabilidad electrostática uniforme, independientemente de las variaciones en las condiciones y en la formulación de las emulsiones.



**Figura 4.1.** Distribuciones de tamaño de partícula de las emulsiones preparadas por homogenización convencional a presiones de 30 MPa (línea discontinua) y 100 MPa (línea continua), y compuestas por: (a) 5% de mazada y 10% de fase oleosa; (b) 7% de mazada y 10% de fase oleosa; (c) 5% de mazada y 20% de fase oleosa; y (d) 7% de mazada y 20% de fase oleosa.

Respecto al comportamiento reológico de las emulsiones (**Tabla 4.3**), las emulsiones preparadas con un 10% de fase oleosa y 5 o 7% de mazada presentaron un comportamiento de flujo Newtoniano ( $n \sim 1$ ), mientras que aquellas preparadas con un 20% lo presentaron de tipo pseudoplástico (fluido no Newtoniano), que se caracteriza por ser un fluido cuya viscosidad disminuye a medida que aumenta la velocidad de deformación. Las emulsiones preparadas por CH y con un 10% de fase oleosa presentaron índices de consistencia ( $K$ ) significativamente ( $P < 0,05$ ) más bajos que aquellas preparadas con un 20% de fase oleosa. La concentración de mazada no afectó la reología de las emulsiones, excepto aquellas elaboradas a 30 MPa con un 20% de fase oleosa, presentando una  $K$  menor al incorporar un 5% mazada. La presión de homogeneización tuvo un efecto significativo ( $P < 0,05$ ) sobre  $K$  solo en las emulsiones formuladas con 20% de fase oleosa, las cuales presentaron valores

duplicados en viscosidad aparente cuando la presión aplicada fue de 30 MPa, en comparación a las tratadas a 100 MPa.

**Tabla 4.3.** Parámetros reológicos de índice de consistencia (K), índice de comportamiento de flujo ( $n$ ), e índice de correlación ( $R^2$ ) de las emulsiones elaboradas por homogeneización convencional.

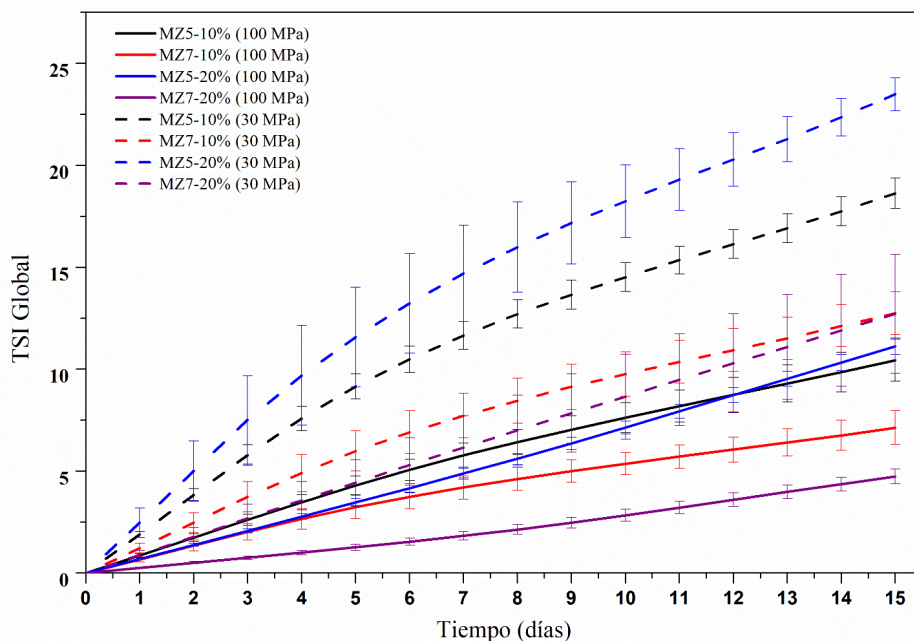
Presión (MPa)	Mazada (%)	Aceites (%)	K (Pa × s <sup>n</sup> )	$n$	R <sup>2</sup>
30	5	10	0,0022 ± 0,0001 <sup>d</sup>	1,0572 ± 0,0021 <sup>a</sup>	0,9996
	7	10	0,0028 ± 0,0001 <sup>d</sup>	1,0478 ± 0,0023 <sup>a</sup>	0,9998
	5	20	0,3005 ± 0,0387 <sup>b</sup>	0,5484 ± 0,0155 <sup>bc</sup>	0,9999
	7	20	0,4773 ± 0,0490 <sup>a</sup>	0,5204 ± 0,0304 <sup>c</sup>	0,9999
100	5	10	0,0023 ± 0,0002 <sup>d</sup>	1,0578 ± 0,0780 <sup>a</sup>	0,9998
	7	10	0,0026 ± 0,0002 <sup>d</sup>	1,0483 ± 0,0049 <sup>a</sup>	0,9998
	5	20	0,1673 ± 0,0166 <sup>c</sup>	0,5872 ± 0,0126 <sup>bc</sup>	0,9999
	7	20	0,2049 ± 0,0161 <sup>c</sup>	0,7067 ± 0,0560 <sup>b</sup>	0,9999

<sup>a-b-c-d</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

La estabilidad física de las emulsiones a temperatura ambiente a lo largo del tiempo (15 días) fue determinada mediante el analizador Turbiscan LAB (Formulation). Este equipo es capaz de identificar fenómenos de inestabilidad en las emulsiones en etapas tempranas, además de proporcionar el índice de estabilidad Turbiscan (Turbiscan Stability Index, TSI) que permite cuantificar y visualizar la estabilidad de diferentes formulaciones. En la **Figura 4.2** y **Tabla 4.4** se muestra las curvas de TSI de todas las emulsiones preparadas mediante CH, y los valores de TSI al cabo de 15 días de almacenamiento a temperatura ambiente. En este estudio se observó un aumento progresivo del TSI en todas las emulsiones con el tiempo, independientemente de la concentración de mazada, aceite o presión utilizadas, indicando una pérdida de estabilidad física de las emulsiones durante el tiempo de almacenamiento.

Las emulsiones con mayor concentración de emulgente y preparadas a 100 MPa presentaron, en general, una mayor ( $P < 0,05$ ) estabilidad física a partir del día 7 de almacenamiento. Sin embargo, la concentración de la fase oleosa en la emulsión no tuvo, en general, un efecto visible significativo ( $P > 0,05$ ) sobre su estabilidad física. Las emulsiones más estables a día 15 de almacenamiento fueron aquellas preparadas con un 7% de mazada, con 10 y 20% de fase oleosa y tratadas a 100 MPa, ya que presentaron los valores de TSI más pequeños tras 15 días de estabilidad. Las emulsiones más inestables fueron aquellas preparadas con un 5%

de mazada, 10 o 20% de fase oleosa y tratadas a 30 MPa, ya que presentaron los valores de TSI más elevados.



**Figura 4.2.** Índice de estabilidad del Turbiscan Global (TSI siglas en inglés) obtenida en las emulsiones preparadas mediante homogeneización convencional a 30 MPa: (---, 5% mazada y 10% fase oleosa); (---, 7% mazada y 10% fase oleosa); (---, 5% mazada y 20% fase oleosa); (---, 5% mazada y 20% fase oleosa) y a 100 MPa: (—, 5% mazada y 10% fase oleosa); (—, 7% mazada y 10% fase oleosa); (—, 5% mazada y 20% fase oleosa); (—, 5% mazada y 20% fase oleosa) en función del tiempo de almacenamiento.

**Tabla 4.4.** Índice de estabilidad Turbiscan Global (TSI) de las emulsiones elaboradas mediante la técnica de homogeneización convencional en función del tiempo de almacenamiento.

Presión (MPa)	Mazada (%)	Aceites (%)	TSI		
			Día 1	Día 7	Día 15
30	5	10	1,89 ± 0,12 <sup>ab, z</sup>	11,66 ± 0,74 <sup>a, y</sup>	18,62 ± 0,78 <sup>b, x</sup>
	7	10	1,22 ± 0,26 <sup>bc, z</sup>	7,71 ± 1,19 <sup>b, y</sup>	12,74 ± 1,15 <sup>c, x</sup>
	5	20	2,47 ± 0,81 <sup>a, z</sup>	13,24 ± 0,73 <sup>a, y</sup>	23,48 ± 0,84 <sup>a, x</sup>
	7	20	0,89 ± 0,25 <sup>cd, z</sup>	7,11 ± 0,36 <sup>bc, y</sup>	12,72 ± 3,23 <sup>c, x</sup>
100	5	10	0,86 ± 0,10 <sup>cd, z</sup>	5,78 ± 0,63 <sup>cd, y</sup>	10,44 ± 1,24 <sup>cd, x</sup>
	7	10	0,66 ± 0,02 <sup>cd, z</sup>	4,20 ± 0,21 <sup>d, y</sup>	7,13 ± 0,82 <sup>de, x</sup>
	5	20	0,70 ± 0,03 <sup>cd, z</sup>	4,83 ± 0,14 <sup>d, y</sup>	11,12 ± 0,41 <sup>cd, x</sup>
	7	20	0,25 ± 0,00 <sup>d, z</sup>	1,80 ± 0,03 <sup>e, y</sup>	4,74 ± 0,35 <sup>e, x</sup>

<sup>a-b-c-d</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

<sup>x-y-z</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

Las emulsiones pueden experimentar oxidación con el transcurso del tiempo, un proceso que puede ser acelerado o retardado dependiendo de las condiciones iniciales de su formulación y elaboración. La velocidad de esta oxidación está influenciada por diversos factores, como los cambios de temperatura, la exposición a la luz, la disponibilidad de oxígeno, la presencia de metales, la composición de la grasa utilizada y la incorporación de antioxidantes, entre otros (Flores et al., 2018). Por lo tanto, es esencial tener en cuenta estos parámetros al diseñar una emulsión con el fin de extender al máximo su vida útil (Ouerfelli & Almajano, 2021).

La incorporación en la dieta de aceites vegetales de diferente grado de insaturación es esencial, ya que por un lado es posible mejorar el aporte nutricional con la incorporación en los alimentos de ácidos grasos esenciales, tales como los  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 entre otros componentes minoritarios con actividad biológica y, sin embargo, por otro lado, el aumento de insaturaciones incrementa las posibilidades de reacciones de oxidación. La oxidación provoca alteraciones tanto químicas como nutricionales. Los hidroperóxidos son los principales productos de oxidación primaria, los cuales se producen al inicio de una peroxidación lipídica. Se caracterizan por ser inestables en el tiempo, y por desencadenar la producción de compuestos de oxidación secundaria, tales como cetonas y aldehídos de distinto peso molecular, ocasionando la aparición de olores y sabores desagradables, e incluso algunos de estos compuestos pueden tener efectos perjudiciales en el organismo (Flores et al., 2018).

Las **Tablas 4.5** y **4.6** muestran los niveles de hidroperóxidos (oxidación primaria) y malondialdehído (oxidación secundaria) medidos en las emulsiones incubadas a 50 °C a lo largo de un periodo de 15 días. Respecto a la oxidación primaria de las emulsiones, se observó que las emulsiones, independientemente de las concentraciones de mazada y aceites utilizadas y presión de trabajo aplicada, presentaron un comportamiento oxidativo donde los niveles de hidroperóxidos aumentaron durante el tiempo de almacenamiento de 15 días a 50 °C. La concentración de aceites tuvo un efecto positivo retardando la oxidación lipídica de las emulsiones durante su almacenamiento, siendo las emulsiones con 20% de aceite, en general, las más estables a nivel oxidativo. La concentración de mazada utilizada en la formulación de las emulsiones tuvo, a día 7 de almacenamiento, un efecto protector significativo frente a la oxidación lipídica, presentando en general, menores concentraciones de hidroperóxido aquellas con mayor concentración de mazada. Estas diferencias se

mantuvieron a los 15 días de incubación, sin embargo, las diferencias ya no fueron significativas. En cuanto al efecto de la presión de homogeneización, en general, las emulsiones obtenidas a 100 MPa presentaron concentraciones de hidroperóxidos mayores ( $P < 0,05$ ) que las tratadas a 30 MPa. Tras 15 días de almacenamiento a 50 °C, las emulsiones preparadas a 30 MPa con un 5 y 7% de mazada y un 20% de fase oleosa, así como aquella preparada a 100 MPa con 7% mazada y 20% de fase oleosa, fueron las que presentaron menores niveles de hidroperóxidos. Por otro lado, las emulsiones homogeneizadas a 100 MPa conteniendo 5 y 7% de mazada con 10% de fase oleosa fueron las que presentaron mayores niveles de hidroperóxidos. Por último, cabe destacar la alta variabilidad que pueden presentar las concentraciones de hidroperóxidos en las emulsiones, como consecuencia de su alta inestabilidad temporal, y su habilidad de ser desencadenadores de la producción de compuestos de oxidación secundaria.

**Tabla 4.5.** Concentración de hidroperóxidos obtenida en las emulsiones preparadas mediante homogeneización convencional a 30 y 100 MPa en función del tiempo de almacenamiento a 50 °C.

Presión (MPa)	Mazada (%)	Aceites (%)	Hidroperóxidos (mM/kg aceite)		
			Día 1	Día 7	Día 15
30	5	10	0,25 ± 0,04 <sup>d, z</sup>	15,92 ± 0,35 <sup>bc, y</sup>	23,79 ± 0,44 <sup>b, x</sup>
	7	10	0,19 ± 0,05 <sup>d, y</sup>	3,87 ± 0,37 <sup>e, y</sup>	17,76 ± 4,89 <sup>bc, x</sup>
	5	20	0,76 ± 0,03 <sup>c, y</sup>	6,90 ± 0,25 <sup>e, x</sup>	9,38 ± 2,43 <sup>e, x</sup>
	7	20	0,77 ± 0,15 <sup>bc, y</sup>	12,10 ± 0,23 <sup>cd, x</sup>	11,31 ± 0,70 <sup>de, x</sup>
100	5	10	1,72 ± 0,03 <sup>a, z</sup>	26,41 ± 2,87 <sup>a, y</sup>	38,68 ± 0,19 <sup>a, x</sup>
	7	10	0,98 ± 0,10 <sup>b, z</sup>	20,12 ± 3,56 <sup>b, y</sup>	36,01 ± 0,59 <sup>a, x</sup>
	5	20	0,27 ± 0,05 <sup>d, z</sup>	13,46 ± 0,62 <sup>c, y</sup>	22,12 ± 0,55 <sup>bc, x</sup>
	7	20	0,23 ± 0,08 <sup>d, z</sup>	8,47 ± 1,18 <sup>de, y</sup>	17,02 ± 2,52 <sup>cd, x</sup>

<sup>a-b-c-d-e</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

<sup>x-y-z</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

La **Tabla 4.6** muestra los valores obtenidos para malondialdehído en las emulsiones a lo largo del tiempo. Respecto a la oxidación secundaria, se ha observado que las emulsiones, independientemente de la concentración de mazada utilizada y presión de trabajo aplicada, han presentado un comportamiento oxidativo neto similar, aumentando de manera considerable los niveles de malondialdehído al cabo de 7 días de almacenamiento a 50 °C.

Sin embargo, a los 15 días de almacenamiento, se pudo observar que los niveles de malondialdehído presentaron un comportamiento variable dependiendo del tipo de emulsión, mostrando las emulsiones obtenidas a 30 MPa, en general, niveles de malondialdehído similares a los obtenidos a los 7 días, mientras que aquellas tratadas a 100 MPa, en general, tuvieron concentraciones mayores o menores en función de la cantidad de mazada utilizada en su formulación. Respecto a los efectos de la concentración de mazada y de la presión de homogeneización, se observó que los niveles de malondialdehído fueron inferiores a día 7 de almacenamiento en las emulsiones preparadas con un 7% de mazada, y en aquellas preparadas a 30 MPa, respecto de sus homólogas conteniendo 5% de mazada o bien preparadas a 100 MPa, respectivamente. Sin embargo, estas diferencias desaparecieron a los 15 días de almacenamiento. En cuanto al efecto de la concentración de la fase oleosa, a los 7 días de almacenamiento, en general, las emulsiones conteniendo 20% de aceite presentaron concentraciones de malondialdehído menores que aquellas formuladas con 10% de aceite, manteniéndose estas diferencias al día 15 de almacenamiento.

Las emulsiones con niveles de malondialdehído más pequeños, tras 7 y 15 días de almacenamiento a 50 °C, fueron aquellas preparadas a 30 MPa con un 5 y 7% de mazada, un 20% de fase oleosa, y aquella tratada a 100 MPa, conteniendo 7% de mazada y 20% de fase oleosa. Las emulsiones con mayores niveles de malondialdehído, tras 7 días de almacenamiento a 50 °C, fueron aquellas preparadas a 100 MPa con un 5% de mazada, un 10% de fase oleosa. Sin embargo, esta muestra redujo considerablemente su concentración de malondialdehído al día 15 de almacenamiento, posiblemente debido a una degradación o transformación de este compuesto de oxidación en componentes terciarios de oxidación. Estos resultados de oxidación secundaria se relacionan positivamente con los niveles de hidroperóxidos encontrados en las diferentes emulsiones, siguiendo una tendencia muy similar. Los niveles más altos o más bajos encontrados en estos componentes de oxidación primaria y secundaria en las emulsiones se podrían explicar en base a las características de composición (concentraciones de emulgente y fase oleosa) y de la presión de homogeneización, que en conjunto definen las características de estas emulsiones, en especial en referencia al tamaño de partícula y la viscosidad de las emulsiones. La oxidación lipídica se acelera por reacciones que tienen lugar en la superficie de las partículas que constituyen la emulsión O/W. Si nos basamos solo en este principio, es de esperar que la velocidad de la oxidación lipídica incremente al incrementar la presión de homogeneización,

ya que el tamaño de partícula disminuye, incrementando la superficie expuesta a la fase acuosa y así a las reacciones de deterioro, incluida la oxidación lipídica (Lethuaut et al., 2002; McClements & Li, 2010; Fernández-Avila & Trujillo, 2016). Este hecho podría explicar los niveles más elevados de oxidación lipídica de las emulsiones conteniendo 5 y 7% de mazada, 10% de fase oleosa obtenidas por homogeneización a 100 MPa, ya que estas emulsiones presentaron los tamaños de partícula más pequeños (**Tabla 4.2**). Una posible explicación para la mejor estabilidad oxidativa de las emulsiones conteniendo 7% mazada, 20% fase oleosa tratadas a 100 MPa podría ser su buena estabilidad física y mayor viscosidad (**Tablas 4.3 y 4.4**), como ya ha sido observado por otros autores en emulsiones obtenidas por CH con diferentes concentraciones de fase oleosa (Fernandez-Avila et al., 2015; Fernandez-Avila & Trujillo, 2016). Una baja estabilidad física de la emulsión lleva a fenómenos de cremado favoreciendo la oxidación lipídica por un mayor contacto de la fase oleosa con el medio ambiente que le rodea, y una mayor propagación de las reacciones de oxidación en la fase oleosa debido a la reducción de la distancia entre partículas lipídicas (Sun & Gunasekaran, 2009; Berton-Carabin et al., 2014).

**Tabla 4.6.** Concentración de malondialdehído (MDA) obtenida en las emulsiones preparadas mediante homogeneización convencional a 30 y 100 MPa en función del tiempo de almacenamiento a 50 °C.

Presión (MPa)	Mazada (%)	Aceites (%)	MDA (µM/kg aceite)		
			Día 1	Día 7	Día 15
30	5	10	3,33 ± 0,18 <sup>c, y</sup>	46,68 ± 2,11 <sup>b, x</sup>	51,39 ± 2,82 <sup>a, x</sup>
	7	10	3,10 ± 0,15 <sup>c, z</sup>	35,63 ± 2,40 <sup>c, y</sup>	49,70 ± 0,75 <sup>a, x</sup>
	5	20	3,17 ± 0,08 <sup>c, y</sup>	13,89 ± 1,60 <sup>f, x</sup>	14,44 ± 3,76 <sup>b, x</sup>
	7	20	3,39 ± 0,14 <sup>c, y</sup>	20,79 ± 0,11 <sup>de, x</sup>	20,34 ± 0,56 <sup>b, x</sup>
100	5	10	10,61 ± 2,01 <sup>a, z</sup>	73,64 ± 1,90 <sup>a, y</sup>	46,46 ± 3,28 <sup>a, x</sup>
	7	10	10,27 ± 1,50 <sup>a, z</sup>	47,53 ± 0,09 <sup>b, y</sup>	56,55 ± 7,79 <sup>a, x</sup>
	5	20	5,16 ± 0,45 <sup>bc, z</sup>	26,75 ± 2,92 <sup>d, y</sup>	19,11 ± 4,23 <sup>b, x</sup>
	7	20	6,04 ± 0,18 <sup>b, y</sup>	15,51 ± 3,99 <sup>ef, x</sup>	16,06 ± 0,33 <sup>b, x</sup>

<sup>a-b-c-d</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

<sup>x-y-z</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

En líneas generales, los niveles de hidroperóxidos y malondialdehído obtenidos en las emulsiones se consideran aceptables, lo cual pone de manifiesto la efectividad de los

componentes de la mazada (proteínas y fosfolípidos) para proteger el contenido lipídico de los aceites contra agentes oxidantes (Conway et al., 2012; Cui & Decker, 2015).

#### **4.2.2 Caracterización de las emulsiones obtenidas mediante microfluidización**

La técnica de MF, más conocida como *Microfluidizer*®, es una técnica de homogeneización de alta presión que se basa en la acción de fuerzas simultáneas de deformación, colisión y cavitación sobre las gotas de un líquido para provocar su ruptura en gotas de tamaño inferior y homogéneo (Schultz et al., 2004). En este trabajo, siguiendo el diseño experimental de la **Tabla 4.1** y el protocolo de elaboración del **Apartado 3.3.1.**, se ha llevado a cabo la preparación de cuatro prototipos de emulsiones con el equipo de MF a la presión de trabajo de 100 MPa. Se ha trabajado con dos concentraciones de mazada (5 y 7%) y dos concentraciones de la fase oleosa (10 y 20%).

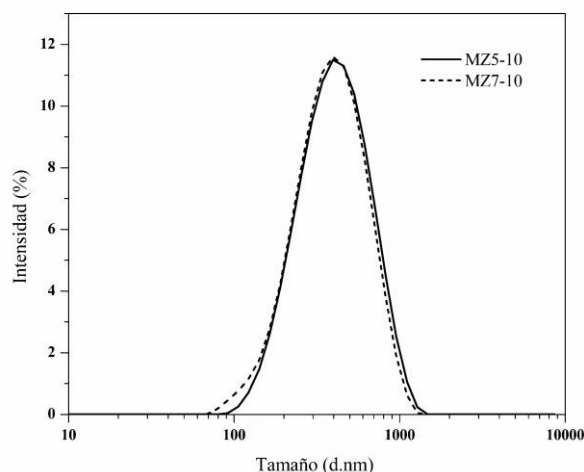
Durante el proceso de homogeneización, las emulsiones mantuvieron una temperatura de entrada constante, oscilando entre 22 y 24 °C, sin importar la formulación. Sin embargo, experimentaron un aumento de temperatura al salir del proceso, alcanzando valores en el intervalo de 37 a 39 °C. En base a los resultados obtenidos mediante esta técnica de homogeneización, únicamente se pudieron obtener emulsiones líquidas estables cuando se utilizaron un 10% de fase oleosa y un 5-7% de mazada. Las emulsiones formadas con un 20% de fase oleosa mostraron fenómenos de agregación, incluso con 7% de mazada, y sus viscosidades fueron tan elevadas que su posterior análisis no fue posible, por lo que los resultados que se exponen en este estudio se centran en las emulsiones conteniendo 10% de fase oleosa.

Según se indica en la **Tabla 4.7**, las emulsiones preparadas con un 10% de fase oleosa y un 5-7% de mazada mostraron tamaños medios de partícula de ~400 nm, presentando ambas concentraciones de mazada una distribución monomodal de las partículas (**Figura 4.3**), así como un PDI de ~0,3-0,4 y potenciales zeta negativos de ~ -26 mV. Así mismo, para los parámetros de diámetro medio, PDI y potencial zeta no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre los prototipos de emulsiones preparadas a las dos concentraciones de mazada. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Corredig

& Dalgleish (1998) en emulsiones producidas con 3-12% de sólidos de mazada, 10% aceite de soja y tratada con MF a 56 MPa (10 pases).

**Tabla 4.7.** Tamaño medio de partícula, índice de polidispersión (PdI) y potencial zeta de las emulsiones preparadas mediante la técnica de homogeneización por *Microfluidizer*®.

Presión (MPa)	Mazada (%)	Aceite (%)	Diámetro medio de partícula (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
100	5	10	446,98 ± 51,4	0,38 ± 0,08	-26,00 ± 1,0
100	7	10	435,93 ± 54,1	0,32 ± 0,04	-26,60 ± 1,8



**Figura 4.3.** Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones elaboradas con *Microfluidizer*® a 100 MPa. MZ5-10: 5% de mazada 10% fase oleosa y MZ7-10: 7% mazada-10% fase oleosa.

También se analizó la viscosidad de cada uno de los prototipos preparados, y tal y como se observa en los resultados de la **Tabla 4.8**, las emulsiones preparadas con un 10% de fase oleosa y un 5-7% de mazada presentaron un comportamiento reológico de tipo newtoniano ( $n \sim 1$ ) e índices de consistencia muy similares, no observándose diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre ellas.

**Tabla 4.8.** Parámetros reológicos de índice de consistencia (K), índice de comportamiento al fluido ( $n$ ), e índice de correlación ( $R^2$ ) de las emulsiones elaboradas por *Microfluidizer*®.

Presión (MPa)	Mazada (%)	Aceites (%)	K (Pa × s <sup>n</sup> )	n	R <sup>2</sup>
100	5	10	0,0026 ± 0,0000	1,034 ± 0,010	0,9997
100	7	10	0,0028 ± 0,0001	1,024 ± 0,005	0,9997

Respecto a la estabilidad física de las emulsiones (**Tabla 4.9**) se observó que el índice Turbiscan TSI aumentó hasta el día 7 para después estabilizarse. Conforme aumentó la concentración de mazada, las emulsiones exhibieron un índice de estabilidad del TSI menor, indicando un ligero aumento en la estabilidad de la emulsión, sin llegar a ser estas diferencias significativas, excepto en el día 1 de almacenamiento.

**Tabla 4.9.** Índice de estabilidad Turbiscan Global (TSI) de las emulsiones elaboradas mediante la técnica de homogeneización por *Microfluidizer*® a lo largo de 15 días de almacenamiento.

Presión (MPa)	Mazada (%)	Aceites (%)	TSI		
			Día 1	Día 7	Día 15
100	5	10	0,52 ± 0,03 <sup>a, y</sup>	2,39 ± 0,39 <sup>a, x</sup>	3,20 ± 0,45 <sup>a, x</sup>
100	7	10	0,21 ± 0,05 <sup>b, y</sup>	1,79 ± 0,61 <sup>a, x</sup>	2,61 ± 0,52 <sup>a, x</sup>

<sup>a-b</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

<sup>x-y</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

El grado de degradación de las emulsiones por fenómenos de oxidación fue analizado mediante el seguimiento de su concentración en hidroperóxidos (oxidación primaria) y malondialdehído (secundaria) a 50 °C durante 15 días. Tal y como se puede observar en los resultados de las **Tablas 4.10 y 4.11.**, en las emulsiones analizadas se observó un aumento progresivo ( $P < 0,05$ ) de la concentración de hidroperóxidos hasta el día 7 de almacenamiento para después estabilizar su contenido, mientras que la concentración de malondialdehído, aunque aumentó ligeramente con el tiempo, no fue significativa ( $P > 0,05$ ). El aumento en la concentración de mazada en las emulsiones tuvo un efecto significativo ( $P < 0,05$ ) reduciendo la concentración de hidroperóxidos a partir del día 7 de almacenamiento, lo cual es indicativo que un 7% de mazada permite obtener niveles más bajos de oxidación primaria en las emulsiones. Sin embargo, este comportamiento no se visualizó al analizar el contenido de malondialdehído, observándose niveles similares en las emulsiones con distintas concentraciones de mazada.

Estos resultados se explican debido a que, a pesar de que las emulsiones presentaron tamaños de partícula muy pequeños, exhibieron una efectiva cobertura de material proteico en la interfaz O/W. Esto resultó en la formación de una capa interfacial que previno la degradación

de las gotas de aceite, y, en consecuencia, la oxidación de los lípidos durante el almacenamiento. A este respecto y según Corredig & Dalgleish (1998), una concentración <8% en sólidos de mazada son suficientes para dar una cobertura total a la interfaz de una emulsión con 10% de fase oleosa preparada con *Microfluidizer*® a 56 MPa. Estos autores estudiaron la naturaleza de la cobertura de la interfase por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), mostrando que hasta el 50% de la proteína total adsorbida en la interfase fue caseína, y el resto proteínas del suero y proteínas de la MFGM. Por otra parte, mostraron que cuando la concentración de mazada fue baja, y no hubo suficientes proteínas para cubrir la interfase, la presencia de fosfolípidos de la mazada tiene un efecto sinérgico con la proteína para producir emulsiones estables.

**Tabla 4.10.** Concentraciones de hidroperóxidos (mM/kg aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas por *Microfluidizer*®, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

Presión (MPa)	Mazada (%)	Aceites (%)	Hidroperóxidos (mM/kg aceite)		
			Día 1	Día 7	Día 15
100	5	10	0,39 ± 0,08 <sup>a,y</sup>	2,19 ± 0,35 <sup>a,y</sup>	6,16 ± 0,44 <sup>a,x</sup>
100	7	10	0,39 ± 0,06 <sup>a,x</sup>	1,09 ± 0,50 <sup>b,x</sup>	1,91 ± 0,36 <sup>b,x</sup>

<sup>a-b</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

<sup>x-y</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

**Tabla 4.11.** Concentraciones de malondialdehído (MDA) (µM/kg aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas por *Microfluidizer*®, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

Presión (MPa)	Mazada (%)	Aceites (%)	MDA (µM/kg aceite)		
			Día 1	Día 7	Día 15
100	5	10	2,50 ± 0,07 <sup>a,x</sup>	3,01 ± 0,52 <sup>a,x</sup>	3,95 ± 0,55 <sup>a,x</sup>
100	7	10	3,13 ± 0,40 <sup>a,x</sup>	3,79 ± 0,51 <sup>a,x</sup>	4,32 ± 0,11 <sup>a,x</sup>

<sup>a-b</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

<sup>x-y</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

En base a los resultados de caracterización obtenidos, se puede concluir que mediante la técnica de MF a 100 MPa, se pueden obtener emulsiones compuestas por un 10% de fase oleosa y un 7% de mazada, de tamaño medio nanométrico, con un bajo grado de oxidación y una alta estabilidad física en el tiempo.

### 4.2.3 Emulsiones preparadas mediante la técnica de homogeneización a (ultra) alta presión (UHPH)

La UHPH es una tecnología de procesamiento no térmica que se basa en los mismos principios que la homogeneización convencional, pero gracias al diferente diseño de la geometría de la cámara de reacción y el tipo de material, puede alcanzar presiones de 10 a 20 veces superior a los homogeneizadores clásicos (Paquin, 1999).

En general, los beneficios de la UHPH incluyen, la prolongación de la vida útil a través de la inactivación de microorganismos (Amador-Espejo et al., 2014; Georget et al., 2014) y mejoras en la funcionalidad de varias matrices alimentarias (Patrignani & Lanciotti, 2016; Trujillo et al., 2021) debido al aumento de la capacidad y estabilidad de la emulsión, con mínimos efectos sobre el valor nutricional y las características sensoriales (Zamora y Guamis, 2015). Entre otras ventajas importantes de esta tecnología están la reducción del tamaño del glóbulo de grasa (Thiebaud et al., 2003), la desfloculación de agregados de glóbulos de grasa y la dispersión uniforme de aglomerados (Floury et al., 2000), cambios en la conformación de la proteína, aumento de la viscosidad y estabilidad de la emulsión (Desrumaux & Marcand, 2002; Trujillo et al., 2021) e inactivación de enzimas (Hayes et al., 2005; Hebishy et al., 2023). La tecnología UHPH también se ha utilizado ampliamente para crear sistemas de nanoemulsión estables (Fernandez-Avila & Trujillo, 2016; Hebishy et al., 2015, 2017), formular sistemas de administración de alimentos que contienen compuestos biológicos para mejorar su estabilidad fisicoquímica, y para producir nanoestructuras destinadas a proteger ingredientes bioactivos y lábiles propensos a las agresiones medioambientales, como los ácidos grasos poliinsaturados (Fernandez-Avila et al., 2019).

En este estudio, siguiendo el diseño experimental de la **Tabla 4.1** y el protocolo de elaboración del **Apartado 3.3.1.**, se llevó a cabo la preparación de emulsiones con el equipo UHPH a diferentes presiones de trabajo (100, 200 y 300 MPa). Se trabajó con dos concentraciones de mazada (5 y 7%) y dos concentraciones de la fase oleosa (10 y 20%) formada por la mezcla (50/50) de aceites de girasol/chía.

La **Tabla 4.12** presenta las temperaturas registradas durante el proceso UHPH al variar la presión de trabajo, resaltando la influencia de la presión aplicada en la temperatura alcanzada en la válvula. Este fenómeno se atribuye comúnmente a las tensiones viscosas generadas por

la alta velocidad del fluido, impactando en la válvula y convirtiendo parte de la energía mecánica en calor en el fluido (Floury et al., 2000; Zamora y Guamis, 2015). Estas temperaturas se alcanzan en un máximo de 1 s, ya que con el equipo UHPH, es posible controlar la temperatura de salida de los fluidos mediante un sistema de refrigeración interno. Estos datos resultan cruciales para optimizar la eficiencia y calidad en la producción de emulsiones mediante UHPH.

**Tabla 4.12.** Temperaturas registradas por el equipo en las emulsiones durante el proceso de homogeneización UHPH.

Presión de trabajo (MPa)	Temperatura inicial (°C)	Temperatura final (°C)	Temperatura de válvula (°C)
100	20,5 ± 1,3	20,7 ± 2,3	49,3 ± 2,3
200	21,1 ± 1,8	23,7 ± 2,3	70,7 ± 2,3
300	21,8 ± 0,7	22,8 ± 2,1	111,0 ± 1,0

Según se indica en la **Tabla 4.13**, las emulsiones preparadas a 100, 200 y 300 MPa con un 10% de fase oleosa y un 5-7% de mazada presentaron tamaños medios de partícula de ~350-700 nm, PDI de ~0,3-0,5 y potenciales zeta negativos de ~ -30 mV, no observándose, en general, diferencias entre los prototipos de emulsiones.

**Tabla 4.13.** Tamaño medio de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta de las emulsiones preparadas mediante la técnica de homogeneización a (ultra) alta presión.

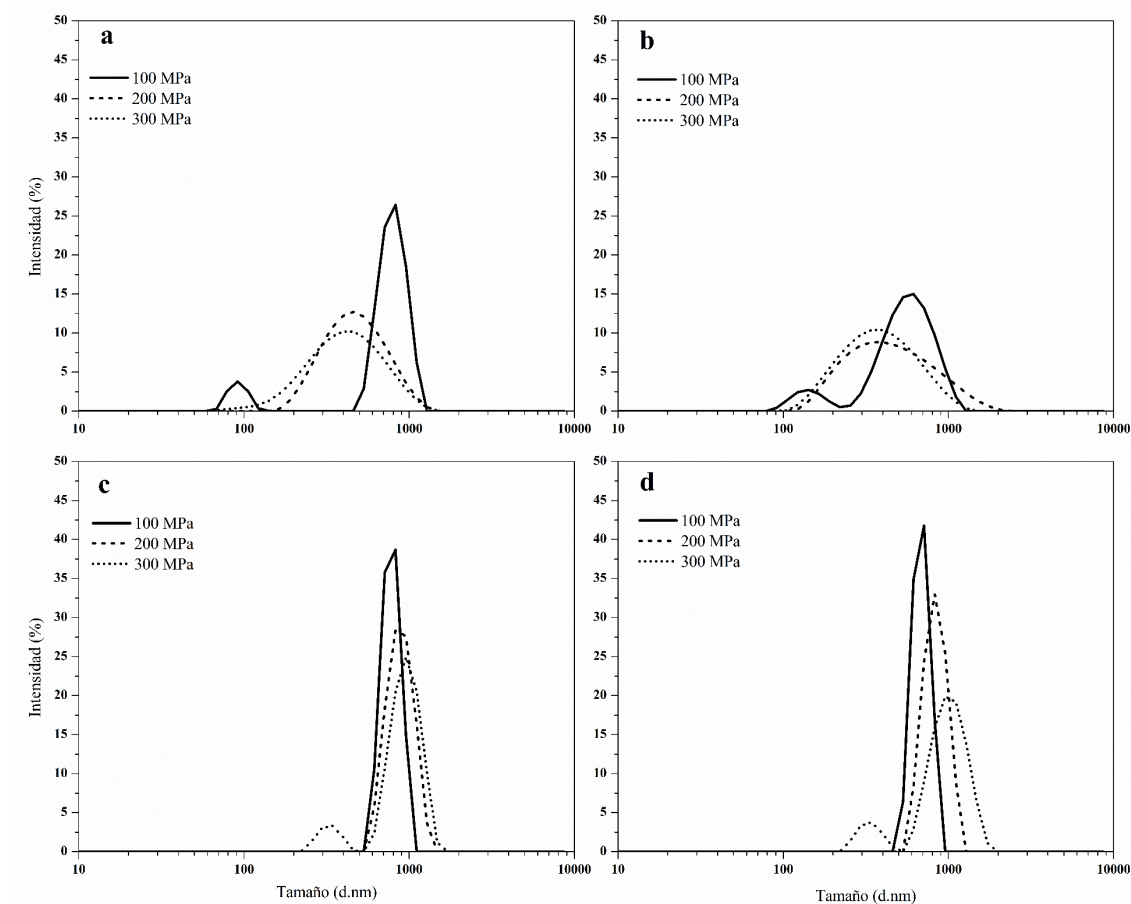
Presión (MPa)	Mazada (%)	Aceites (%)	Diámetro medio de partícula (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
100	5	10	712,30 ± 94,43 <sup>bc</sup>	0,58 ± 0,05 <sup>bcd</sup>	-30,73 ± 0,58 <sup>abc</sup>
	7	10	657,45 ± 21,65 <sup>bcd</sup>	0,52 ± 0,09 <sup>cd</sup>	-31,00 ± 1,74 <sup>abc</sup>
	5	20	841,12 ± 133,71 <sup>ab</sup>	0,40 ± 0,05 <sup>d</sup>	-25,77 ± 3,68 <sup>ab</sup>
	7	20	756,08 ± 156,65 <sup>b</sup>	0,91 ± 0,13 <sup>a</sup>	-28,07 ± 4,25 <sup>abc</sup>
200	5	10	472,58 ± 52,56 <sup>cde</sup>	0,30 ± 0,06 <sup>d</sup>	-29,75 ± 0,52 <sup>abc</sup>
	7	10	432,83 ± 19,73 <sup>de</sup>	0,30 ± 0,04 <sup>d</sup>	-30,03 ± 0,87 <sup>abc</sup>
	5	20	880,04 ± 101,73 <sup>ab</sup>	0,73 ± 0,20 <sup>b</sup>	-34,10 ± 0,15 <sup>c</sup>
	7	20	829,71 ± 64,79 <sup>ab</sup>	0,80 ± 0,19 <sup>abc</sup>	-31,27 ± 0,70 <sup>bc</sup>
300	5	10	484,04 ± 52,71 <sup>cde</sup>	0,41 ± 0,06 <sup>d</sup>	-24,96 ± 2,15 <sup>a</sup>
	7	10	351,83 ± 5,89 <sup>e</sup>	0,31 ± 0,12 <sup>d</sup>	-32,79 ± 2,30 <sup>c</sup>
	5	20	830,33 ± 49,67 <sup>ab</sup>	0,90 ± 0,07 <sup>a</sup>	-32,40 ± 1,76 <sup>c</sup>
	7	20	1038,44 ± 139,37 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,04 <sup>ab</sup>	-32,18 ± 1,82 <sup>c</sup>

<sup>a-b-c-d-e</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

Respecto a la concentración de la fase oleosa, se observó que las emulsiones preparadas con un 10% de aceites y homogeneizadas a 200-300 MPa presentaron los tamaños medios de partículas más pequeños ( $P < 0,05$ ) y las distribuciones de tamaño de partícula más homogéneas y netamente monomodal (**Figura 4.4**), en comparación a sus homólogas formuladas con 20% de aceites, no existiendo diferencias ( $P > 0,05$ ) entre estas presiones. Esto no ocurrió con las emulsiones tratadas a 100 MPa con 10-20% fase oleosa, que presentaron tamaños de partícula muy similares. Al incrementar la concentración de la fase oleosa al 20%, los tamaños medios de partícula de las emulsiones homogeneizadas a 200 y 300 MPa se duplicaron, observándose un mayor grado de heterogeneidad, tal y como muestran los valores altos del PDI. Este fenómeno está comúnmente asociado a la presencia de agregados de partículas o grandes gotas como consecuencia de fenómenos de coalescencia (Thiebaud et al., 2003).

Trujillo et al. (2016) observaron reducciones en el tamaño de partícula en muestras de leche tratadas con UHPH (100, 200 y 300 MPa) a medida que la presión aumentaba. Sin embargo, el incremento en la presión de homogeneización condujo a la formación de agregados de glóbulos de grasa ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ), al igual que Hayes et al. (2005) quienes sugirieron que, bajo presiones más elevadas, se produce una mayor exposición de la interfaz grasa. Esto puede limitar la cantidad de caseína disponible, dando lugar a la formación de glóbulos de grasa insuficientemente cubiertos que tienden a aglomerarse. Por otro lado, Flourey et al. (2000) propusieron que, a una presión de 300 MPa, las proteínas del suero experimentan desnaturalización, perdiendo su capacidad para estabilizar los glóbulos de grasa contra la coalescencia debido a que cuando se calientan por encima de una temperatura crítica, estas se despliegan y se agregan. Efectivamente, la temperatura alcanzada en la válvula, registrando temperaturas de  $111,0 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ , es suficiente para desencadenar la desnaturalización de las proteínas del suero y producir agregación entre ellas.

Por otro lado, se estudió el efecto que ejerció la concentración de mazada sobre el tamaño de partícula evidenciándose que las concentraciones utilizadas no presentaron diferencias significativas, en relación a la concentración de fase oleosa o a la presión de homogeneización utilizada.



**Figura 4.4.** Distribuciones de tamaño de partícula de las emulsiones preparadas por homogeneización a (ultra) alta presión a presiones de 100, 200 y 300 MPa compuestas por: (a) 5% de mazada y 10% de fase oleosa; (b) 7% mazada y 10% de fase oleosa; (c) 5% mazada y 20% de fase oleosa; y (d) 7% mazada y 20% de fase oleosa.

Respecto al comportamiento reológico de las emulsiones (**Tabla 4.14**), los resultados muestran que, en general, los prototipos preparados con un 10% de fase oleosa y un 5 o 7% de mazada presentaron un comportamiento de flujo newtoniano ( $n \sim 1$ ), mientras que aquellos preparados con una mayor concentración de fase oleosa (20%) lo mostraron de tipo pseudoplástico (fluido no Newtoniano,  $n < 1$ ), indicativa de fenómenos de floculación en la emulsión. Sin embargo, es importante indicar que aquellas emulsiones con 20% de fase oleosa tratadas a 300 MPa tuvieron un comportamiento más cercano al newtoniano que sus homólogas tratadas a 100-200 MPa. Este cambio de comportamiento reológico en las emulsiones fue probablemente debido a que el incremento de la concentración de la fase oleosa provocó cambios en el tamaño, forma, cantidad y deformabilidad de las gotas de aceite, así como en las interacciones entre dichas gotas, afectando de esta manera, su comportamiento reológico (Campanella et al., 1995; Fuhrmann et al., 2022; McClements, 2015b).

**Tabla 4.14.** Parámetros reológicos de índice de consistencia (K), índice de comportamiento al fluido ( $n$ ), e índice de correlación ( $R^2$ ) de las emulsiones elaboradas por homogeneización a (ultra) alta presión.

Presión (MPa)	Mazada (%)	Aceites (%)	K (Pa × s <sup>n</sup> )	$n$	R <sup>2</sup>
100	5	10	0,0024 ± 0,0002 <sup>f</sup>	1,049 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,9995
	7	10	0,0031 ± 0,0003 <sup>f</sup>	1,017 ± 0,013 <sup>ab</sup>	0,9998
	5	20	0,1796 ± 0,0001 <sup>d</sup>	0,690 ± 0,005 <sup>d</sup>	0,9999
	7	20	0,4574 ± 0,0172 <sup>b</sup>	0,657 ± 0,026 <sup>d</sup>	1,0000
200	5	10	0,0031 ± 0,0001 <sup>f</sup>	1,017 ± 0,002 <sup>ab</sup>	0,9999
	7	10	0,0056 ± 0,0004 <sup>ef</sup>	0,971 ± 0,006 <sup>bc</sup>	0,9999
	5	20	0,2745 ± 0,0298 <sup>c</sup>	0,570 ± 0,030 <sup>e</sup>	0,9996
	7	20	0,7396 ± 0,0286 <sup>a</sup>	0,559 ± 0,059 <sup>e</sup>	0,9980
300	5	10	0,0017 ± 0,0001 <sup>f</sup>	1,068 ± 0,011 <sup>a</sup>	0,9999
	7	10	0,0020 ± 0,0001 <sup>f</sup>	1,047 ± 0,010 <sup>a</sup>	0,9988
	5	20	0,0176 ± 0,0002 <sup>e</sup>	0,936 ± 0,004 <sup>c</sup>	1,0000
	7	20	0,0241 ± 0,0008 <sup>e</sup>	0,932 ± 0,037 <sup>c</sup>	1,0000

<sup>a-b-c-d-e-f</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

La concentración en fase oleosa tuvo un efecto significativo ( $P < 0,05$ ) sobre el K, independientemente de la presión de homogeneización utilizada, presentando valores más elevados de K las emulsiones conteniendo un 20% de fase oleosa en comparación a aquellas formuladas con un 10%. Se han descrito cambios similares en el comportamiento reológico de las emulsiones y aumento de K en otras emulsiones tratadas por (U)HPH conteniendo caseinato (Hebisy et al., 2019), proteínas del suero (Hebisy et al., 2017b; Flourey et al., 2000; Cortés-Muñoz et al., 2009), y proteína de soja (Fernandez-Avila et al., 2015) al aumentar la concentración de fase oleosa.

Respecto a la concentración de mazada, no se observó un efecto sobre el comportamiento reológico de las emulsiones formuladas con 10% de fase oleosa, pero sí en aquellas conteniendo 20% cuando las presiones utilizadas en la homogeneización fueron de 100 y 200 MPa, incrementándose el valor de K al aumentar la concentración de mazada. De igual manera, la presión de homogeneización solo afectó de manera significativa ( $P < 0,05$ ) al K de las emulsiones elaboradas con un 20% de fase oleosa, presentando las emulsiones valores de K según el tratamiento de (U)HPH en el orden de 200>100>300 MPa. Estos resultados coinciden con los descritos por Hebisy et al. (2017b) que usó como emulgente un

concentrado de proteínas del suero al 4% (p/p), una mezcla de aceites de oliva y girasol como fase oleosa (10, 30 y 50 %) y tratamientos de 100 y 200 MPa, observando un incremento de K al incrementar la concentración de fase oleosa, sobre todo cuando fue del 50% y una presión de 200 MPa. De manera similar, Flourey et al. (2000) formularon emulsiones a partir de un aislado de proteína de suero (1,5%) y aceite de girasol (10-50%) y las trataron a presiones de homogeneización de 20-300 MPa, observando un comportamiento newtoniano para aquellas emulsiones conteniendo <20% de fase oleosa independientemente de la presión de homogeneización utilizada, y un comportamiento pseudoplástico para aquellas con un contenido en fase oleosa de >20%, excepto en las tratadas a 300 MPa que presentaron un comportamiento newtoniano. También Fernandez-Avila et al. (2015) observaron en emulsiones elaboradas con un aislado de proteína de soja (4%), aceite de soja (10 y 20%) obtenidas a 100-300 MPa, que aquellas formuladas con 20% de fase oleosa presentaron un comportamiento pseudoplástico, siendo las emulsiones tratadas a 100 y 200 MPa las que mostraron mayores valores de K. Sin embargo, estos mismos autores describieron menores valores de K en las emulsiones tratadas a 300 MPa. Estos cambios en la reología de las emulsiones, con un elevado contenido de fase oleosa y tratadas a 300 MPa, han sido atribuidos por estos autores a la desnaturalización de las proteínas procedentes de los aislados proteicos (proteína de suero o de soja, respectivamente) utilizados como emulgentes, debido al aumento de temperatura alcanzado a nivel de válvula de homogeneización. Según Dalgleish (1997), la composición de la capa interfacial, establecida por la competencia entre los tensioactivos utilizados en su formulación, puede depender de los parámetros de procesamiento de homogeneización, como la temperatura. Por otra parte, y según Desrumaux & Marcand, (2002) puede haber cierto desdoblamiento o desnaturalización parcial de las proteínas globulares de los aislados proteicos del suero, especialmente la  $\beta$ -lactoglobulina, causada por tratamientos a alta presión y simultáneamente a alta temperatura. Estos tratamientos podrían afectar sutilmente a la naturaleza de las interacciones proteína-proteína, bien en la interfase aceite-agua de las gotitas, bien en la fase acuosa masiva entre las gotitas de la emulsión. Así, la reducción de K observada en las emulsiones conteniendo mazada y tratadas a 300 MPa del presente estudio podría explicarse por la desnaturalización de las proteínas del suero presentes en la mazada, debido a las fuerzas mecánicas e incremento de temperatura en la válvula ( $T^a = 111,0 \pm 1,0$  °C).

La **Tabla 4.15** muestra los valores del índice TSI de las emulsiones preparadas mediante la técnica (U)HPH al cabo de 1, 7 y 15 días de almacenamiento a temperatura ambiente. En este estudio, se observó un aumento progresivo del TSI en todas las emulsiones en función del tiempo, independientemente de la concentración de mazada, aceite o presión utilizada. Las emulsiones más estables fueron las preparadas con un 5-7 % de mazada, 10-20% de fase oleosa y tratadas a 200 MPa, ya que presentaron los valores de TSI más pequeños tras 15 días de almacenamiento, y las más inestables fueron las preparadas con un 5-7 % de mazada, 20% de fase oleosa y tratadas a 100 MPa, con valores de TSI más elevados.

**Tabla 4.15.** Índice de estabilidad Turbiscan (TSI) de las emulsiones elaboradas mediante la técnica de homogeneización a (ultra) alta presión a lo largo de 15 días de almacenamiento.

Presión (MPa)	Mazada (%)	Aceites (%)	TSI		
			Día 1	Día 7	Día 15
100	5	10	0,53 ± 0,11 <sup>c, z</sup>	3,65 ± 0,58 <sup>c, y</sup>	6,01 ± 0,50 <sup>c, x</sup>
	7	10	0,36 ± 0,04 <sup>de, z</sup>	2,71 ± 0,46 <sup>cd, y</sup>	5,31 ± 0,95 <sup>cd, x</sup>
	5	20	1,15 ± 0,05 <sup>a, z</sup>	7,95 ± 0,95 <sup>a, y</sup>	15,00 ± 1,50 <sup>a, x</sup>
	7	20	0,69 ± 0,03 <sup>b, z</sup>	4,83 ± 0,27 <sup>b, y</sup>	9,67 ± 0,37 <sup>b, x</sup>
200	5	10	0,31 ± 0,03 <sup>ef, y</sup>	1,94 ± 0,13 <sup>de, x</sup>	3,15 ± 0,18 <sup>ef, x</sup>
	7	10	0,16 ± 0,01 <sup>g, y</sup>	1,03 ± 0,11 <sup>e, xy</sup>	1,60 ± 0,13 <sup>f, x</sup>
	5	20	0,29 ± 0,03 <sup>efg, y</sup>	1,90 ± 0,09 <sup>de, x</sup>	2,88 ± 0,10 <sup>ef, x</sup>
	7	20	0,19 ± 0,02 <sup>fg, y</sup>	1,14 ± 0,13 <sup>e, xy</sup>	1,58 ± 0,14 <sup>f, x</sup>
300	5	10	0,46 ± 0,02 <sup>cd, z</sup>	3,03 ± 0,18 <sup>cd, y</sup>	5,12 ± 0,40 <sup>cd, x</sup>
	7	10	0,27 ± 0,05 <sup>efg, z</sup>	1,86 ± 0,31 <sup>de, y</sup>	3,24 ± 0,22 <sup>ef, x</sup>
	5	20	0,28 ± 0,06 <sup>efg, z</sup>	1,89 ± 0,38 <sup>de, y</sup>	3,67 ± 0,52 <sup>de, x</sup>
	7	20	0,48 ± 0,07 <sup>cd, z</sup>	3,54 ± 0,24 <sup>c, y</sup>	6,66 ± 0,49 <sup>c, x</sup>

<sup>a-b-c-d-e-f-g</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

<sup>x-y-z</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

En las **Tablas 4.16** y **4.17** se presentan los niveles de hidropéroxidos (oxidación primaria) y malondialdehído (oxidación secundaria) medidos en las emulsiones a lo largo de 1, 7 y 15 días de almacenamiento a 50 °C. Respecto a la oxidación primaria de las emulsiones, se observó que la emulsiones, independientemente de las concentraciones de mazada y fase oleosa utilizadas y presión de trabajo aplicada, presentaron el mismo comportamiento oxidativo, aumentando los niveles de hidropéroxidos durante el tiempo de almacenamiento de 15 días.

Las emulsiones con niveles de hidroperóxidos más reducidos, tras 7 y 15 días de almacenamiento a 50 °C, fueron aquellas preparadas con un 5-7% de mazada y 20% de fase oleosa obtenidas a 100 MPa, mientras que las emulsiones con niveles de hidroperóxidos más elevados, tras 15 días de almacenamiento, fueron aquellas preparadas con un 5-7% de mazada y 10% de fase oleosa para todas las presiones de trabajo.

**Tabla 4.16.** Concentraciones de hidroperóxidos (mM/kg aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas por homogeneización a (ultra) alta presión, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

Presión (MPa)	Mazada (%)	Aceites (%)	Hidroperóxidos (mM/kg aceite)		
			Día 1	Día 7	Día 15
100	5	10	3,38 ± 0,39 <sup>ab, z</sup>	33,41 ± 2,37 <sup>a, y</sup>	37,56 ± 0,37 <sup>a, x</sup>
	7	10	1,73 ± 0,11 <sup>d, z</sup>	17,32 ± 3,89 <sup>bc, y</sup>	37,29 ± 0,11 <sup>a, x</sup>
	5	20	0,16 ± 0,02 <sup>f, z</sup>	0,30 ± 0,03 <sup>e, y</sup>	2,19 ± 0,42 <sup>e, x</sup>
	7	20	0,16 ± 0,04 <sup>f, z</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>e, y</sup>	2,74 ± 0,81 <sup>e, x</sup>
200	5	10	3,44 ± 0,10 <sup>ab, z</sup>	19,10 ± 1,07 <sup>bc, y</sup>	22,84 ± 9,61 <sup>b, x</sup>
	7	10	2,93 ± 0,21 <sup>bc, y</sup>	5,08 ± 2,24 <sup>de, y</sup>	34,34 ± 8,56 <sup>a, x</sup>
	5	20	3,97 ± 0,88 <sup>a, z</sup>	8,09 ± 0,71 <sup>d, y</sup>	18,00 ± 0,17 <sup>b, x</sup>
	7	20	2,08 ± 0,08 <sup>cd, z</sup>	5,82 ± 0,92 <sup>d, y</sup>	11,56 ± 0,96 <sup>d, x</sup>
300	5	10	1,55 ± 0,12 <sup>de, z</sup>	14,90 ± 2,18 <sup>c, y</sup>	38,17 ± 0,77 <sup>a, x</sup>
	7	10	0,75 ± 0,32 <sup>ef, z</sup>	21,08 ± 2,88 <sup>b, y</sup>	37,40 ± 0,78 <sup>a, x</sup>
	5	20	2,13 ± 0,35 <sup>cd, z</sup>	9,31 ± 0,40 <sup>d, y</sup>	13,48 ± 1,07 <sup>d, x</sup>
	7	20	2,35 ± 0,12 <sup>cd, y</sup>	4,84 ± 0,87 <sup>de, y</sup>	18,06 ± 3,33 <sup>b, x</sup>

<sup>a-b-c-d-e-f</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

<sup>x-y-z</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

Respecto al efecto de la concentración de mazada sobre la oxidación primaria de las emulsiones, se observó un efecto inconsistente, variando en función de la presión de homogeneización aplicada y del contenido de fase oleosa. En cuanto al efecto de la presión en el tratamiento de homogeneización sobre el nivel de hidroperóxidos, este varió de manera significativa (P < 0,05) según la concentración de la fase oleosa y mazada utilizadas en la formulación de las emulsiones. Así, en las emulsiones conteniendo 20% de fase oleosa, el nivel de hidroperóxidos de aquellas con un 5% de mazada aumentaron en el orden de presiones 200>300>>100 MPa, mientras que las que contuvieron 7% de mazada fue en el orden de presiones 300>200>>100 MPa. En el caso de las emulsiones con un 10% de fase

oleosa, el nivel de hidroperóxidos en aquellas formuladas con 5% de mazada fue en el orden de presiones 100=300>200 MPa, mientras que aquellas formuladas con un 7% de mazada no se observaron diferencias en los niveles de hidroperóxidos.

La **Tabla 4.17** muestra los valores obtenidos de malondialdehído en las emulsiones a lo largo del tiempo de almacenamiento a 50 °C. Respecto a la oxidación secundaria, se observó un comportamiento similar de las emulsiones, independientemente de la concentración de mazada y fase oleosa utilizadas, y presión de trabajo aplicada, aumentando de manera significativa ( $P < 0,05$ ) los niveles de malondialdehído hasta el día 7 de almacenamiento. Tras 15 días de almacenamiento, los niveles de malondialdehído tendieron a estabilizarse para la mayoría de las emulsiones, aunque algunas presentaron mayores niveles como aquellas formuladas con 10% fase oleosa y 5-7% mazada y tratadas a 100 MPa, y otras disminuyeron el nivel de malondialdehído, indicando la conversión de productos de oxidación secundaria en otros compuestos de oxidación más avanzada. Las emulsiones con niveles de maloldialdehído más reducidos, tras 7 y 15 días de almacenamiento, fueron aquellas preparadas con un 5-7% de mazada y 20% de fase oleosa obtenidas a 300 MPa seguidas de las tratadas a 100 MPa, mientras que las emulsiones con niveles de maloldialdehído más elevados, desde inicio hasta final de almacenamiento, fueron aquellas preparadas con un 5-7% de mazada, 10% de fase oleosa tratadas a 100 MPa.

Respecto al efecto de la concentración de mazada, a día 7 de almacenamiento presentó un efecto significativo disminuyendo la concentración de malondialdehído al incrementar la concentración de mazada en emulsiones conteniendo 10% de fase oleosa, independientemente de la presión de homogeneización utilizada. Sin embargo, a los 15 días de almacenamiento este efecto solo fue evidente en las emulsiones conteniendo un 10% de fase oleosa y tratadas a 100 MPa.

En lo que se refiere al efecto de la concentración de fase oleosa, al igual que se observó para la concentración de hidroperóxidos, las emulsiones formuladas con un 20% y 5-7% de mazada independientemente de la presión de homogeneización utilizada, presentaron, en general, los niveles de malondialdehído más bajos ( $P < 0,05$ ) a lo largo del periodo de almacenamiento. Finalmente, en cuanto al efecto de la presión de homogeneización, las emulsiones conteniendo 10% fase oleosa y 5-7% de mazada presentaron niveles de

oxidación secundaria menores al incrementarse la presión, mientras que en aquellas formuladas con un 20% de fase oleosa y 5-7% de mazada, los niveles de malondialdehído fueron mayores en el orden de presión de 200>100>300 MPa.

En base a los resultados de caracterización obtenidos, se puede concluir que, mediante la técnica de homogeneización UHPH a 200 y 300 MPa, se pueden obtener emulsiones compuestas por un 10% de fase oleosa y un 7% de mazada, de tamaño medio ~ 1 µm, y con aceptables grados de oxidación y estabilidad física en el tiempo.

**Tabla 4.17.** Concentraciones de malondialdehído (MDA) (µM/kg aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas por homogeneización a (ultra) alta presión, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

Presión (MPa)	Mazada (%)	Aceites (%)	MDA (µM/kg aceite)		
			Día 1	Día 7	Día 15
100	5	10	43,89 ± 1,01 <sup>a, z</sup>	193,38 ± 0,73 <sup>a, y</sup>	228,56 ± 4,74 <sup>a, x</sup>
	7	10	25,50 ± 0,32 <sup>b, z</sup>	114,80 ± 1,72 <sup>b, y</sup>	203,40 ± 7,88 <sup>b, x</sup>
	5	20	2,34 ± 0,04 <sup>f, y</sup>	4,99 ± 0,71 <sup>g, x</sup>	5,84 ± 0,13 <sup>g, x</sup>
	7	20	2,49 ± 0,45 <sup>f, y</sup>	6,33 ± 0,87 <sup>g, xy</sup>	8,18 ± 0,76 <sup>g, x</sup>
200	5	10	20,27 ± 2,15 <sup>c, y</sup>	57,87 ± 6,34 <sup>d, x</sup>	50,21 ± 3,12 <sup>c, x</sup>
	7	10	11,39 ± 0,50 <sup>d, y</sup>	40,42 ± 2,45 <sup>e, x</sup>	43,42 ± 1,98 <sup>cd, x</sup>
	5	20	7,13 ± 1,10 <sup>e, y</sup>	15,47 ± 0,25 <sup>f, x</sup>	12,84 ± 0,47 <sup>fg, x</sup>
	7	20	7,94 ± 2,07 <sup>e, z</sup>	19,95 ± 1,33 <sup>f, x</sup>	14,26 ± 5,80 <sup>fg, y</sup>
300	5	10	2,15 ± 0,47 <sup>f, z</sup>	80,11 ± 0,11 <sup>c, x</sup>	36,55 ± 7,58 <sup>de, y</sup>
	7	10	1,33 ± 0,10 <sup>f, z</sup>	35,51 ± 2,86 <sup>e, x</sup>	25,83 ± 0,09 <sup>e, y</sup>
	5	20	0,93 ± 0,08 <sup>f, y</sup>	1,61 ± 0,06 <sup>h, x</sup>	2,08 ± 0,04 <sup>h, x</sup>
	7	20	0,17 ± 0,03 <sup>f, y</sup>	1,69 ± 0,31 <sup>h, x</sup>	1,72 ± 0,28 <sup>h, x</sup>

<sup>a-b-c-d-e-f-g-h</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

<sup>x-y-z</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

#### 4.2.4 Emulsiones preparadas mediante la técnica de ultrasonidos (US)

La homogeneización por cavitación ultrasónica o US es una técnica muy utilizada en la preparación de emulsiones tipo O/W. Los US de alta intensidad proporcionan la potencia necesaria para dispersar la fase oleosa en forma de pequeñas gotas en el seno de una fase acuosa. En la zona de dispersión, las burbujas de cavitación implosionan, provocando intensas ondas de choque en el líquido circundante (cizallamiento), lo que da lugar a la formación de chorros de líquido con altas velocidades (turbulencia) provocando la ruptura

de las partículas (Abbas et al., 2013; Canselier et al., 2010). Esta tecnología se caracteriza por permitir la preparación de emulsiones con un alto grado de uniformidad y estabilidad con bajos consumos energéticos comparación con otras alternativas mecánicas (Abismaïl et al., 1999; Carpenter & Saharan, 2017; Sarheed et al., 2020; Sivakumar et al., 2014). La aplicación de US a ingredientes y productos lácteos ha despertado un gran interés debido a su capacidad para mejorar sus propiedades funcionales (Ashokkumar et al., 2010, Shanmugam et al., 2012).

El presente trabajo, siguiendo el diseño experimental de la **Tabla 4.1** y el protocolo de elaboración del **Apartado 3.3.1**, se llevó a cabo la preparación de 4 prototipos de emulsiones mediante el equipo de homogeneización por US. Los parámetros de operación fueron: 40% de amplitud y 10 min de homogeneización. Se emplearon dos concentraciones de mazada (5 y 7%) y dos concentraciones de la fase oleosa (10 y 20%) formada por la mezcla de aceites de girasol/chía.

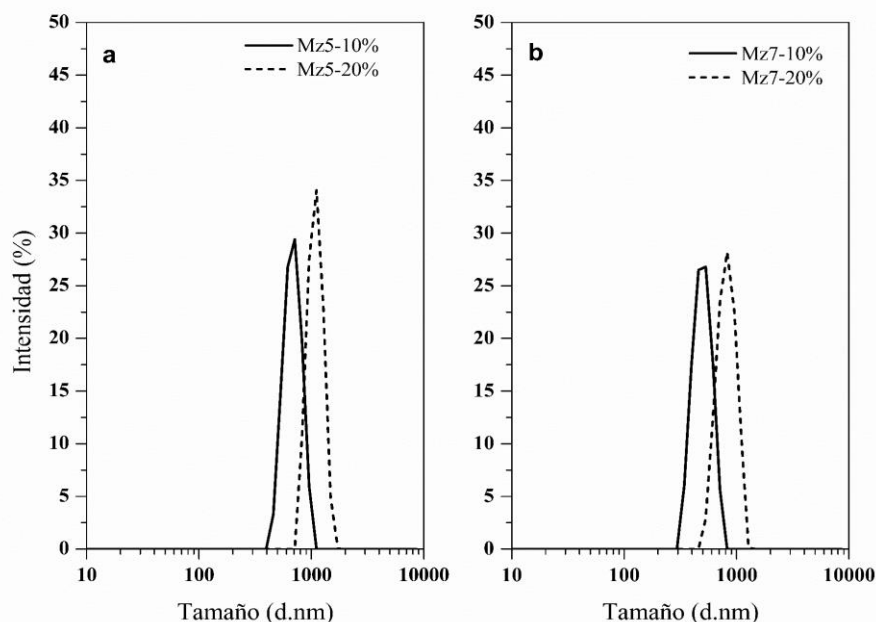
Durante el proceso de homogeneización, las emulsiones se mantuvieron a una temperatura de inicial constante, oscilando entre 20 y 22 °C. Sin embargo, después de la sonicación, experimentaron un aumento de temperatura, alcanzando valores en el rango de 28-30 °C. Para contrarrestar este incremento térmico, se llevó a cabo la técnica de US en un baño de hielo, asegurando que las emulsiones no se calentaran durante el proceso.

Según se aprecia en la **Tabla 4.18**, las emulsiones preparadas por US presentaron tamaños medios de partícula de  $\sim 0,5-1 \mu\text{m}$ , PdI de  $\sim 0,5-0,9$  y potenciales zeta negativos de  $\sim -30$  mV. Las distribuciones de tamaño partícula de las emulsiones fueron estrechas y unimodales (**Figura 4.5**). La emulsión con menor tamaño medio de partícula fue aquella compuesta por un 7% de mazada y un 10% de fase oleosa, mientras que la emulsión con mayor tamaño medio de partícula fue aquella compuesta por un 5% de mazada y un 20% de fase oleosa. Respecto a la concentración de mazada, se constató que las emulsiones preparadas con mayor concentración de mazada (7%) presentaron los tamaños medios de partículas más pequeños ( $P < 0,05$ ) y una buena homogeneidad. En cambio, al incrementar la concentración de la fase oleosa del 10% al 20% se observó un mayor grado de heterogeneidad en las emulsiones, tal y como mostraron el incremento de sus tamaños medios y PdI.

**Tabla 4.18.** Tamaño medio de partícula, índice de polidispersión (PDI) y Potencial zeta de las emulsiones preparadas mediante la técnica de homogeneización por ultrasonidos.

Condiciones	Mazada (%)	Aceites (%)	Diámetro medio de partícula (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
40% Amplitud 10 min	5	10	711,25 ± 48,87 <sup>c</sup>	0,59 ± 0,03 <sup>b</sup>	-33,48 ± 1,76 <sup>b</sup>
	7	10	561,40 ± 28,95 <sup>d</sup>	0,48 ± 0,03 <sup>b</sup>	-33,12 ± 1,29 <sup>b</sup>
	5	20	1118,53 ± 1,18 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,13 <sup>a</sup>	-27,18 ± 1,10 <sup>a</sup>
	7	20	834,38 ± 49,57 <sup>b</sup>	0,58 ± 0,11 <sup>b</sup>	-30,50 ± 2,72 <sup>ab</sup>

<sup>a-b-c-d</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).



**Figura 4.5.** Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones elaboradas con ultrasonidos. **a.** 5% de mazada y 10% aceites (línea continua) o 20% aceites (línea de puntos); **b.** 7% de mazada y 10% aceites (línea continua) o 20% aceites (línea de puntos).

Patil et al. (2018) exploraron la aplicación de US a 135 W durante 5 min para mejorar la emulsificación del aceite de cúrcuma en leche desnatada. Observaron que, al incrementar la cantidad de aceite en la mezcla, se requiere más energía para formar una emulsión con gotas de menor tamaño. En situaciones donde el contenido de aceite es alto y la energía aplicada se mantiene constante, las gotas no se fragmentan de manera eficiente, llevando a un incremento en su tamaño. Este fenómeno indica la necesidad de ajustar la energía de emulsificación en función del contenido de aceite para obtener gotas de tamaño deseado. También Shanmugam y Ashokkumar (2014) observaron cómo el aumento del porcentaje de

aceite de semilla de lino en leche desnatada homogeneizada pasteurizada, mediante el uso de US a 20 kHz, afecta la emulsión. Constataron que el incremento en el porcentaje de aceite (21%) provocó una ampliación en la distribución de tamaños y un aumento en el volumen de partículas más grandes.

En estudios previos, se observó que la fracción de volumen de la fase interna afecta el tamaño de las gotas en emulsiones. Por ejemplo, Leong et al. (2009) lograron tamaños de partícula más pequeños al reducir la cantidad de aceite en la muestra. Ramisetty et al. (2015) confirmaron estas observaciones demostrando que un aumento en la fracción de volumen de la fase interna resultó en un aumento proporcional en el tamaño de las gotas. Basándonos en estos hallazgos, en el presente estudio se podría seleccionar un contenido de fase oleosa del 10% como óptimo para equilibrar el tamaño de las gotas, optimizando así los efectos cavitacionales inducidos por los US.

Respecto al comportamiento reológico de las emulsiones (**Tabla 4.19**), se observó que las emulsiones presentaron un comportamiento netamente de flujo newtoniano ( $n \sim 1$ ), aunque al aumentar la fase oleosa en las emulsiones,  $n$  disminuyó. Respecto al índice de consistencia, se pudo observar que este aumentó ( $P < 0,05$ ) con el incremento de la concentración de la fase oleosa, y de la concentración de mazada. Abbas et al. (2014) desarrollaron nanoemulsiones estabilizadas con almidones modificados (anhídrido octenil succínico) utilizando ultrasonido (US) de 1200 W y 20 kHz. Encontraron que un aumento en la proporción de aceite en la emulsión llevaba a un incremento en el tamaño de las gotas y en la viscosidad de la emulsión. Este incremento en la proporción de aceite se traduce en una disminución de la proporción de agua, lo que resulta en un aumento de la fracción volumétrica de las partículas dispersas y en las interacciones entre ellas. A medida que las partículas se encuentran más cercanas entre sí, la viscosidad de la emulsión se incrementa debido a estas interacciones intensificadas. Estos resultados indican que cambios significativos en la composición de las emulsiones pueden afectar sus propiedades reológicas. Este fenómeno podría atribuirse a la formación de estructuras más complejas o a la saturación de ciertos componentes, alterando la respuesta de la emulsión a los efectos de cavitación inducidos por el US.

**Tabla 4.19.** Parámetros reológicos de índice de consistencia (K), índice de comportamiento al fluido ( $n$ ), e índice de correlación ( $R^2$ ) de las emulsiones elaboradas por ultrasonidos.

Condiciones	Mazada (%)	Aceites (%)	K (Pa × s <sup>n</sup> )	$n$	R <sup>2</sup>
40% Amplitud- 10 min	5	10	0,0017 ± 0,0001 <sup>c</sup>	1,068 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,9979
	7	10	0,0022 ± 0,0001 <sup>d</sup>	1,059 ± 0,009 <sup>a</sup>	0,9995
	5	20	0,0055 ± 0,0003 <sup>b</sup>	1,005 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,9999
	7	20	0,0108 ± 0,0007 <sup>a</sup>	0,966 ± 0,005 <sup>c</sup>	0,9990

<sup>a-b-c-d</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

En la **Tabla 4.20** se muestran los valores de TSI de todas las emulsiones preparadas mediante la técnica de US al cabo de 1, 7 y 15 días de estabilidad a temperatura ambiente, observándose un aumento (P < 0,05) progresivo del TSI en todas las emulsiones en función del tiempo, independientemente de la concentración de mazada y aceite utilizadas. Este hallazgo sugiere que, con el tiempo, todas las emulsiones experimentan cierto grado de inestabilidad.

**Tabla 4.20.** Índice de estabilidad Turbiscan (TSI) de las emulsiones elaboradas mediante la técnica de homogeneización por ultrasonidos a lo largo de 15 días de almacenamiento.

Condiciones	Mazada (%)	Aceites (%)	TSI		
			Día 1	Día 7	Día 15
40% Amplitud- 10 min	5	10	0,98 ± 0,03 <sup>a, z</sup>	6,32 ± 0,33 <sup>a, y</sup>	10,88 ± 0,81 <sup>a, x</sup>
	7	10	0,85 ± 0,09 <sup>a, z</sup>	5,39 ± 0,20 <sup>b, y</sup>	9,25 ± 0,63 <sup>b, x</sup>
	5	20	0,35 ± 0,05 <sup>b, z</sup>	2,33 ± 0,28 <sup>c, y</sup>	4,57 ± 0,48 <sup>c, x</sup>
	7	20	0,25 ± 0,04 <sup>b, z</sup>	1,68 ± 0,26 <sup>c, y</sup>	2,97 ± 0,52 <sup>d, x</sup>

<sup>a-b-c-d</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

<sup>x-y-z</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

La emulsión más estable, según los valores más bajos de TSI después de 15 días de estabilidad, fue aquella preparada con un 7% de mazada y un 20% de fase oleosa. En contraste, la emulsión menos estable fue la que contenía un 5% de mazada y un 10% de fase oleosa, ya que presentó el valor más elevado de TSI. Estos resultados refuerzan la influencia crítica de la concentración de los componentes en la estabilidad a largo plazo de las emulsiones.

Shanmugam & Ashokkumar (2014) emulsionando con US (176 W, 20 kHz) directamente aceite de semilla de lino (7%) sobre leche desnatada pasteurizada sin agregar tensioactivos, fueron capaces de producir emulsiones que fueron estables a la separación de fases durante al menos 9 días. También, Anandan et al. (2017) lograron emulsiones estables con un 7% de aceite de semilla negra (*Nigella sativa*) en leche desnatada homogeneizada pasteurizada utilizando US a 20 kHz y 100 W. Atribuyeron la estabilidad de estas emulsiones a los efectos de cavitación generados por esta tecnología. Además, señalaron que las proteínas de suero parcialmente desnaturadas desempeñan un papel crucial al proporcionar estabilidad a las gotas de emulsión y contribuir a la formación de gotas más pequeñas.

En este estudio se observó que el aumento en la concentración de mazada y en la fase oleosa mejora significativamente ( $P < 0,05$ ) la estabilidad de las emulsiones, siendo estas mejoras notables desde el séptimo día. Este efecto podría atribuirse a la mayor viscosidad de las emulsiones, que ralentiza el movimiento de las partículas, y al mayor contenido de mazada, que proporciona un recubrimiento más efectivo a las gotas de la emulsión. Ambos factores contribuyen a frenar los fenómenos de floculación entre partículas, y así, a mejorar la estabilidad general de las emulsiones (McClements, 2015a).

En conjunto, estos resultados subrayan la importancia de considerar la evolución temporal de las emulsiones y cómo las concentraciones específicas de mazada y fase oleosa pueden afectar su estabilidad, respaldando la relevancia de los parámetros de formulación en la optimización de emulsiones estables.

En las **Tablas 4.21** se muestran los niveles de hidroperóxidos (oxidación primaria) medidos en las emulsiones homogeneizadas por US a lo largo de 1, 7 y 15 días de almacenamiento a 50 °C. Respecto a la oxidación primaria, independientemente de las concentraciones de mazada y fase oleosa utilizadas, las emulsiones presentaron un aumento progresivo en los niveles de hidroperóxidos durante el tiempo de almacenamiento de 15 días a 50 °C. Las emulsiones con menores niveles hidroperóxidos, tras 15 días de almacenamiento, fue aquella preparada con un 5% de mazada y un 20% de fase oleosa, mientras la que presentó el nivel de hidroperóxidos más elevado fue aquella preparada con un 5% de mazada y un 10% de fase oleosa. Por otro lado, se observó que al incrementar la fase oleosa del 10 al 20%, y de mazada del 5 al 7% en emulsiones conteniendo un 10% de fase oleosa se redujo ( $P < 0,05$ ) la oxidación primaria de estas emulsiones.

Se ha demostrado que la cavitación acústica a través de US puede generar efectivamente radicales libres altamente reactivos debido a la disociación de moléculas en condiciones extremas de colapso de la cavidad lo que puede resultar en la oxidación de los ácidos grasos (Chemat et al., 2004).

**Tabla 4.21.** Concentraciones de hidroperóxidos (mM/kg aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas por ultrasonidos, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

Condiciones	Mazada (%)	Aceites (%)	Hidroperóxidos (mM/kg aceite)		
			Día 1	Día 7	Día 15
40% Amplitud- 10 min	5	10	0,90 ± 0,05 <sup>a, z</sup>	7,11 ± 1,25 <sup>a, y</sup>	11,69 ± 2,23 <sup>a, x</sup>
	7	10	0,77 ± 0,07 <sup>b, z</sup>	2,03 ± 0,07 <sup>b, y</sup>	5,54 ± 0,12 <sup>b, x</sup>
	5	20	0,48 ± 0,02 <sup>c, y</sup>	0,65 ± 0,02 <sup>d, y</sup>	1,36 ± 0,06 <sup>d, x</sup>
	7	20	0,35 ± 0,04 <sup>c, y</sup>	0,98 ± 0,07 <sup>c, xy</sup>	2,29 ± 0,55 <sup>c, x</sup>

<sup>a-b-c-d</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

<sup>x-y-z</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

La **Tabla 4.22** muestra los valores obtenidos de malondialdehído en las emulsiones a lo largo del tiempo de almacenamiento a 50 °C. Respecto a la oxidación secundaria, se constató que las emulsiones preparadas con un 10% de fase oleosa, independientemente de la concentración de mazada utilizada, presentaron similar comportamiento oxidativo, aumentando los niveles de malondialdehído considerablemente al cabo de 7 días de almacenamiento para después disminuir muy acusadamente. Este fenómeno se podría explicar por la degradación o transformación del malondialdehído en compuestos de oxidación terciaria.

A diferencia, las emulsiones preparadas con un 20% de fase oleosa, al cabo de 7 días de almacenamiento, se mantuvieron niveles estables, incluso inferiores de malondialdehído, respecto a los iniciales, pero muy inferiores a aquellos observados en las emulsiones preparadas con un 10% de fase oleosa, para después aumentar a los 15 días de almacenamiento. Estos niveles inferiores de malondialdehído en las emulsiones con un 20% de fase oleosa podrían probablemente relacionarse con su mayor viscosidad y buena estabilidad física, en comparación con sus homólogas formuladas con 10% de aceites. La estabilidad física reducida en las emulsiones puede provocar la aparición de cremado, lo que

incrementa la oxidación lipídica debido al mayor contacto de la fase oleosa con el ambiente circundante. Esta situación también facilita una propagación más extensa de las reacciones de oxidación dentro de la fase oleosa, como resultado de la disminución en la separación entre las partículas lipídicas (McClements, 2015a).

**Tabla 4.22.** Concentraciones de malondialdehído (MDA) ( $\mu\text{M}/\text{kg}$  aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas por ultrasonidos, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

Condiciones	Mazada (%)	Aceites (%)	MDA ( $\mu\text{M}/\text{kg}$ aceite)		
			Día 1	Día 7	Día 15
40% Amplitud-10 min	5	10	39,29 $\pm$ 5,47 <sup>a,y</sup>	78,50 $\pm$ 0,54 <sup>a,x</sup>	17,40 $\pm$ 0,78 <sup>c,z</sup>
	7	10	42,82 $\pm$ 1,51 <sup>a,y</sup>	60,60 $\pm$ 1,85 <sup>b,x</sup>	16,70 $\pm$ 0,08 <sup>c,z</sup>
	5	20	13,26 $\pm$ 0,22 <sup>c,y</sup>	9,68 $\pm$ 0,52 <sup>c,y</sup>	21,61 $\pm$ 0,12 <sup>a,x</sup>
	7	20	19,87 $\pm$ 1,65 <sup>b,x</sup>	11,35 $\pm$ 0,49 <sup>c,y</sup>	19,49 $\pm$ 0,02 <sup>b,x</sup>

<sup>a-b-c</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

<sup>x-y-z</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Este efecto también podría deberse a la reducción del tamaño de partícula en las emulsiones formuladas con un 10% de aceites. Varios estudios sobre emulsiones respaldan la teoría de que, al disminuir el tamaño de partícula, la emulsión se vuelve más susceptible a la oxidación. Esto se debe a que el aumento en el área total de interfase acelera la oxidación lipídica (Jacobsen et al., 2010).

En base a los resultados de caracterización obtenidos, se puede concluir que, las emulsiones formuladas con un 10% de fase oleosa y un 7% de mazada, homogeneizadas con US, exhibieron un tamaño medio de partícula de  $<0,6 \mu\text{m}$  y mostraron aceptable estabilidad oxidativa y física durante 15 días a 50 °C. La concentración de mazada resultó crucial para la estabilidad a largo plazo, evidenciando mejoras al aumentar tanto la mazada como la fase oleosa. Por otro lado, las emulsiones con un 20% de fase oleosa mantuvieron niveles estables de malondialdehído, incluso inferiores a las formuladas con 10%, destacando su mayor viscosidad y estabilidad física. Estos resultados subrayan la influencia significativa de la concentración de componentes en las propiedades de las emulsiones, respaldando la eficacia del US para obtener emulsiones con características controladas y estabilidad mejorada.

### **4.3 Comparación de emulsiones preparadas mediante diferentes técnicas de homogeneización**

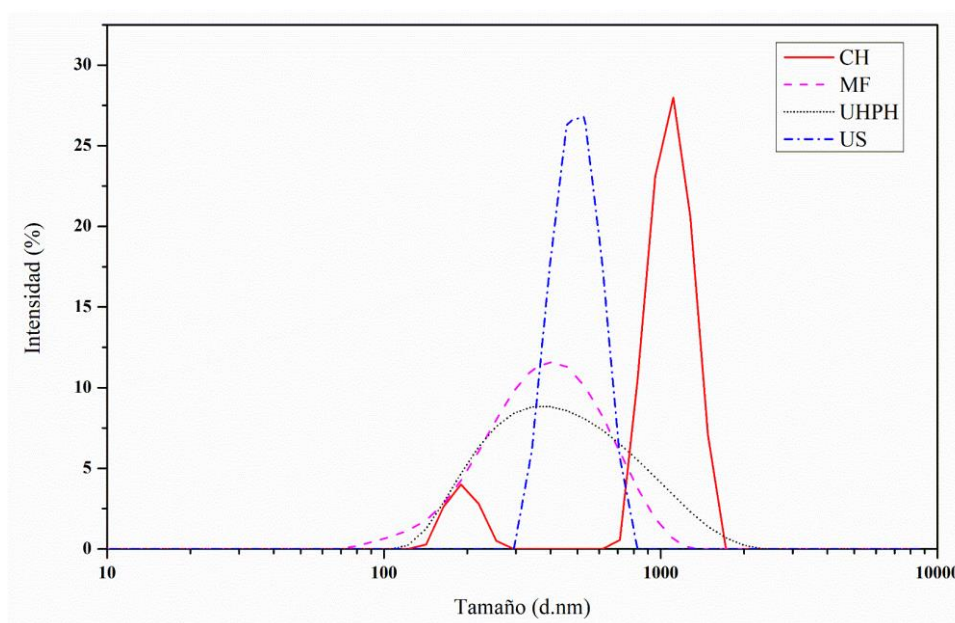
Hoy en día, existen en el mercado toda una serie de sistemas de homogeneización, entre ellos la utilización de molinos coloidales o sistemas rotor-estator, la homogeneización a alta y ultra presión (U)HPH, los US y los sistemas de membrana (Schultz et al., 2004), que permiten la preparación de productos basados en emulsiones tipo O/W con propiedades óptimas, en términos de tamaño de partícula, reología y estabilidad física en el tiempo. Sin embargo, existe un gran déficit de información acerca de estudios comparativos de emulsiones preparadas con diferentes tecnologías de homogeneización, lo cual es fundamental para poder entender el mecanismo de formación de una emulsión (emulsificación), el papel del emulgente e identificar los parámetros que afectan a las propiedades fisicoquímicas de una emulsión durante la emulsificación.

La obtención de emulsiones O/W mediante equipos del tipo rotor-estator es eficiente, pero proporcionan gotas lipídicas de gran tamaño, además de una elevada captación de oxígeno en la fase continua de la emulsión, lo que es perjudicial para la emulsión ya que sufre fenómenos de desestabilización física y oxidativa, y es por ello que esta técnica es utilizada principalmente como tecnología previa en la obtención de emulsiones de tamaño de partícula reducido mediante otros métodos de homogeneización (Gazolu-Rusanova et al., 2020; Han et al., 2012; Hebishy et al., 2015; Karthik & Anandharamakrishnan, 2016). Por otro lado, el uso de sistemas de homogeneización a alta presión y de US conduce a la formación de emulsiones con tamaños de gota más pequeños, y se han utilizado para estabilizar emulsiones como parte de los procesos de encapsulación de diferentes tipos de aceites (Aghababaei et al., 2021; Anandan et al., 2017; Fernandez-Avila et al., 2019; Fernandez-Avila & Trujillo, 2016; Mahdi Jafari et al., 2007; Taha et al., 2020). Sin embargo, hasta donde sabemos, existe una reducida información sobre la utilización de la mazada como agente emulgente en la producción de emulsiones O/W mediante tecnologías de homogeneización como MF, la UHPH o los US. Así, en esta tesis doctoral se ha realizado un estudio comparativo entre las emulsiones compuestas con un 7% de mazada como emulgente y un 10% de fase oleosa, y preparadas mediante las técnicas de CH (30 MPa), MF (100 MPa), UHPH (200 MPa) y US (40% amplitud-10 min). Para llevar a cabo esta comparación, se escogieron las emulsiones preparadas con un 10% de fase oleosa porque fueron aquellas en

las que se pudo obtener datos de cada técnica de homogeneización, y con 7% de mazada porque fue la concentración de emulgente que, en general, permitió obtener mejores emulsiones a nivel de estabilidad física y oxidativa. En este estudio, las diferentes emulsiones fueron comparadas en términos de tamaño medio de partícula, potencial zeta, comportamiento reológico, estabilidad y degradación (oxidación primaria y secundaria).

### 4.3.1 Tamaño, potencial zeta y microestructura

En la **Figura 4.6** y **Tabla 4.23** están representados las distribuciones de tamaño de partícula, los tamaños medios de partícula, y potencial zeta de las emulsiones preparadas mediante los cuatro tratamientos de homogeneización seleccionados (CH, MF, UHPH y US). Las emulsiones preparadas mediante MF, UHPH y US mostraron distribuciones de tamaño de partícula monomodales y tamaños medios de partícula  $\sim 500$  nm, no mostrando diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre tecnologías, lo que sugiere que se tratan de procesos de emulsificación controlados y precisos. Las emulsiones más homogéneas fueron aquellas preparadas mediante MF y UHPH, tal y como indicaron los valores de los PDI. Las emulsiones preparadas mediante CH a 30 MPa presentaron una distribución bimodal y tamaños de partícula de  $\sim 1 \mu\text{m}$  y un elevado grado de polidispersidad ( $\text{PDI} = 0,59$ ), indicando una menor uniformidad en la distribución del tamaño de partícula.



**Figura 4.6.** Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones formuladas con 7% de mazada, y 10% aceites elaborados a diferentes técnicas de homogeneización. Convencional (CH), *Microfluidizer*® (MF), Homogeneización a ultra alta presión (UHPH) y Ultrasonidos (US).

**Tabla 4.23.** Tamaño medio de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta de las emulsiones elaboradas con 7% de mazada y 10% de aceites, homogeneizadas por diferentes tecnologías.

Homogeneización	Diámetro medio de partícula (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
<b>Convencional</b>	1170,00 ± 73,67 <sup>a</sup>	0,590 ± 0,14 <sup>a</sup>	-38,3 ± 6,22 <sup>b</sup>
<b>Microfluidizer®</b>	435,93 ± 54,57 <sup>b</sup>	0,324 ± 0,04 <sup>b</sup>	-26,6 ± 1,81 <sup>a</sup>
<b>Ultra alta presión</b>	432,83 ± 19,73 <sup>b</sup>	0,302 ± 0,04 <sup>b</sup>	-30,0 ± 0,87 <sup>ab</sup>
<b>Ultrasonidos</b>	561,40 ± 28,95 <sup>b</sup>	0,483 ± 0,03 <sup>ab</sup>	-33,1 ± 1,3 <sup>ab</sup>

<sup>a-b</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

El elevado grado de uniformidad de las muestras, sobre todo aquellas obtenidas por MF y UHPH, se podría directamente relacionar con la proporción de proteínas de la mazada adsorbidas en la interfase O/W, el cual, a su vez, estaría enormemente influido por el mecanismo de rotura de las gotas de fase oleosa empleado en las diferentes técnicas de homogeneización. Por tanto, las muestras preparadas mediante MF, UHPH e incluso US debieron presentar índices de adsorción de material emulgente > 60%, tal y como ha sido informado en estudios similares, donde emulsiones O/W preparadas con proteína de suero como emulsionante y MF a 200 MPa, presentaron distribuciones de tamaño monomodales con una tasa elevada de adsorción de material emulgente en la interfase aceite-agua (Perrier-Cornet et al., 2005).

Jafari et al. (2006) evaluaron las eficacias de las técnicas de US (24 kHz, 100% amplitud, 100 s) y MF (20-124 MPa) en la creación de una nanoemulsión O/W de d-limoneno al 10% utilizando maltodextrina combinada con un biopolímero tensioactivo (Hi-Cap) en una proporción de 3:1. Los hallazgos de estos investigadores indicaron que ambas técnicas producían gotas de emulsión con tamaños que variaban entre 150 y 700 nm. No obstante, se confirmó que el método de US superaba al de MF en aspectos de operatividad y facilidad de limpieza.

Ertugay et al. (2004) investigaron la homogeneización de la leche utilizando US a 20 kHz (20, 40, 80 y 100% de amplitud) en dos diferentes tiempos de trabajo (5 y 10 min) y realizaron una comparativa con CH. Observaron que la distribución del tamaño de los glóbulos grasos tras el proceso de CH, realizado a 20 MPa y 55 °C, osciló entre 2 y 3 µm. En contraste, las muestras de leche homogeneizadas mediante US presentaron glóbulos

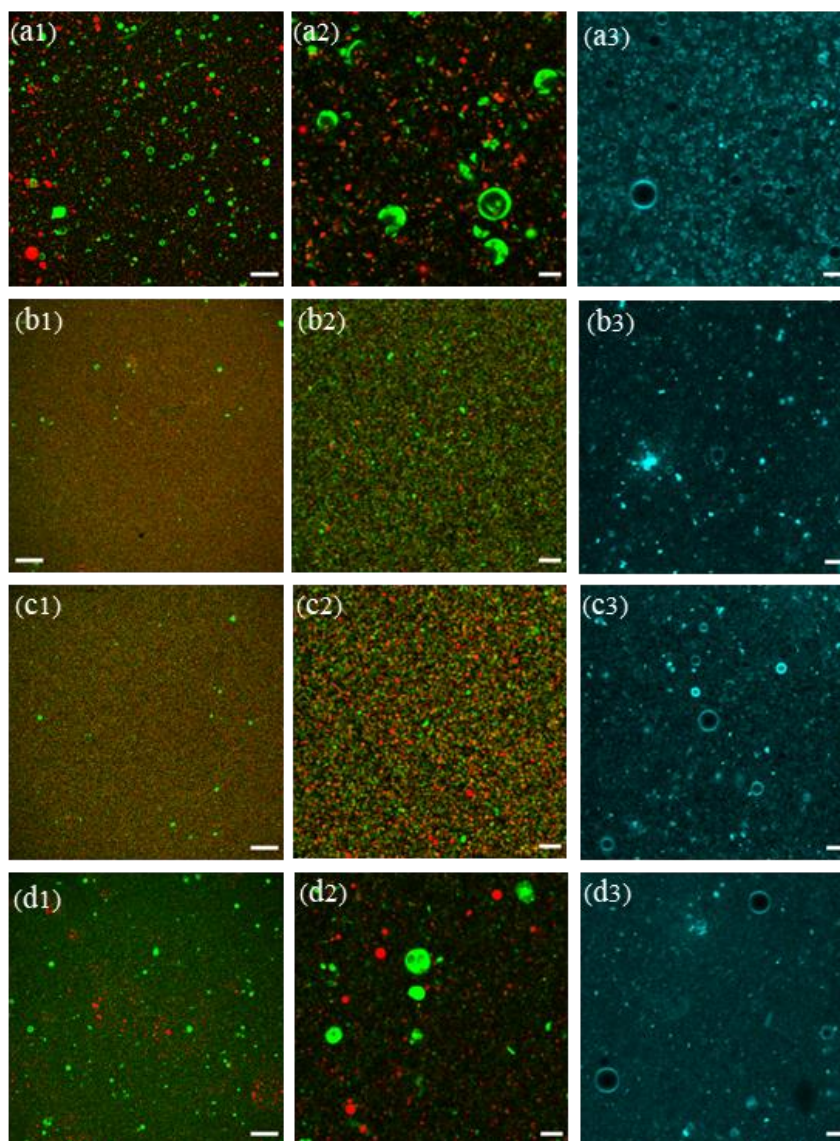
grasos de tamaño considerablemente menor (entre 0,5 y 0,9  $\mu\text{m}$ ) en condiciones de 100% amplitud por 10 min. Describieron que tanto el tamaño promedio como la distribución del tamaño de los glóbulos grasos dependían de la intensidad de la potencia ultrasónica y el tiempo de sonicación. El menor tamaño de los glóbulos grasos observado se atribuyó a los efectos físicos producidos durante la cavitación acústica.

Es relevante resaltar que, en comparación con el estudio anterior, donde la leche homogeneizada con US bajo condiciones del 40% de amplitud durante 10 min no mostró diferencias significativas en el tamaño medio respecto a la CH (20 MPa), en contraste nuestras emulsiones lograron tamaños sustancialmente más pequeños y significativos ( $P < 0,05$ ). Este resultado sugiere una mejora notable en la eficiencia del proceso, evidenciando la capacidad emulsionante de la mazada en comparación con la leche, subrayando la versatilidad y eficacia de este ingrediente en la formación y estabilización de emulsiones.

La microestructura de las emulsiones fue analizada por microscopia láser confocal. Para ello, se utilizaron los fluoróforos *Nile Red*, *Fast Green FCF* y *Rh-DOPE* para teñir los lípidos apolares, las proteínas de la mazada y lípidos polares, respectivamente. En la **Figura 4.7**, se muestran las micrografías de las emulsiones preparadas mediante los cuatro tratamientos de homogeneización. Las muestras preparadas por MF y UHPH presentaron los mayores grados homogeneidad en tamaño, morfología y estructura, ya que las proteínas de la mazada (color verde) se dispusieron uniformemente distribuidas sobre las gotitas de aceite (color rojo). Respecto a las emulsiones preparadas mediante CH y US, se pudo observar una elevada concentración de agregados tanto de proteína de la mazada (verde) como de gotas de la fase oleosa (aceite) de tamaño considerable, confirmando los mayores valores obtenidos por análisis de tamaño de partícula en estas emulsiones. La tinción de *Rh-DOPE* de las emulsiones dio a conocer que el material fosfolipídico de la mazada también participó del recubrimiento de las microgotas de aceite formando parte, juntamente con el material proteico de la mazada, de la interfaz O/W.

Respecto a los valores del potencial zeta de las emulsiones preparadas mediante los cuatro tratamientos de homogeneización, se observó que presentaron valores de potencial zeta negativos (entre  $-27$  y  $-38$  mV), mostrando solo diferencias significativas entre los tratamientos CH y MF. Estos elevados valores de potencial zeta en las diferentes emulsiones

pueden ser atribuidos a un efectivo mezclado y facilitados por una mínima agregación de partículas debido a los diferentes tratamientos de homogeneización.



**Figura 4.7.** Microscopía óptica láser confocal de emulsiones obtenidas por diferentes equipos de homogeneización: (a) Convencional (30 MPa), (b) *Microfluidizer*<sup>®</sup> (100 MPa), (c) UHPH (200 MPa) y (d) Ultrasonidos (40% amplitud por 10 min). (1) Micrografía de campo general  $\times 63$  con tinción *Nile Red* y *Fast Green*, (2) micrografía de zoom  $\times 4$  con tinción *Nile Red* y *Fast Green* y (3) micrografía de zoom  $\times 4$  con tinción *Rh-DOPE*. Colores tinción: Rojo, Fase aceite; Verde, Proteínas de la mazada; Azul, Fosfolípidos de la mazada. La barra equivale a 25 y 5  $\mu\text{m}$  en micrografías de campo y zoom, respectivamente.

### 4.3.2. Reología y estabilidad física

En cuanto a los resultados de los parámetros reológicos (**Tabla 4.24**) todas las emulsiones presentaron un comportamiento newtoniano ( $n \sim 1$ ). Respecto a los índices de consistencia, íntimamente ligados con la viscosidad de las emulsiones, los datos indican que las

emulsiones preparadas por MF y CH presentaron una similar baja viscosidad, seguida de las preparadas por US, mientras que la emulsión homogeneizada por UHPH mostró el doble de viscosidad que las anteriores. Aunque el tamaño promedio de las partículas y la polidispersidad en las emulsiones MF, UHPH y US, así como la estabilidad física de las emulsiones MF y UHPH fueron similares, la UHPH produjo una distribución de tamaño más uniforme con una ligera menor polidispersidad, y una mejor estabilidad física, sobre todo al compararla con las emulsiones US y CH (ver **Tabla 4.25** y **Figura 4.9**). Esto puede resultar en un empaquetamiento más eficiente de las gotas, con una menor tendencia de las gotas a fusionarse y formar estructuras más grandes y, por lo tanto, en una viscosidad más alta. Por otro lado, el proceso de UHPH puede inducir cambios en la estructura y conformación de las proteínas y fosfolípidos presentes en la mazada, mejorando su capacidad para estabilizar las interfaces O/W. Krebs et al. (2021) describieron que la UHPH puede promover la formación de agregados covalentes en el suero de mantequilla, lo que podría aumentar la viscosidad al crear una red más densa y entrelazada de proteínas.

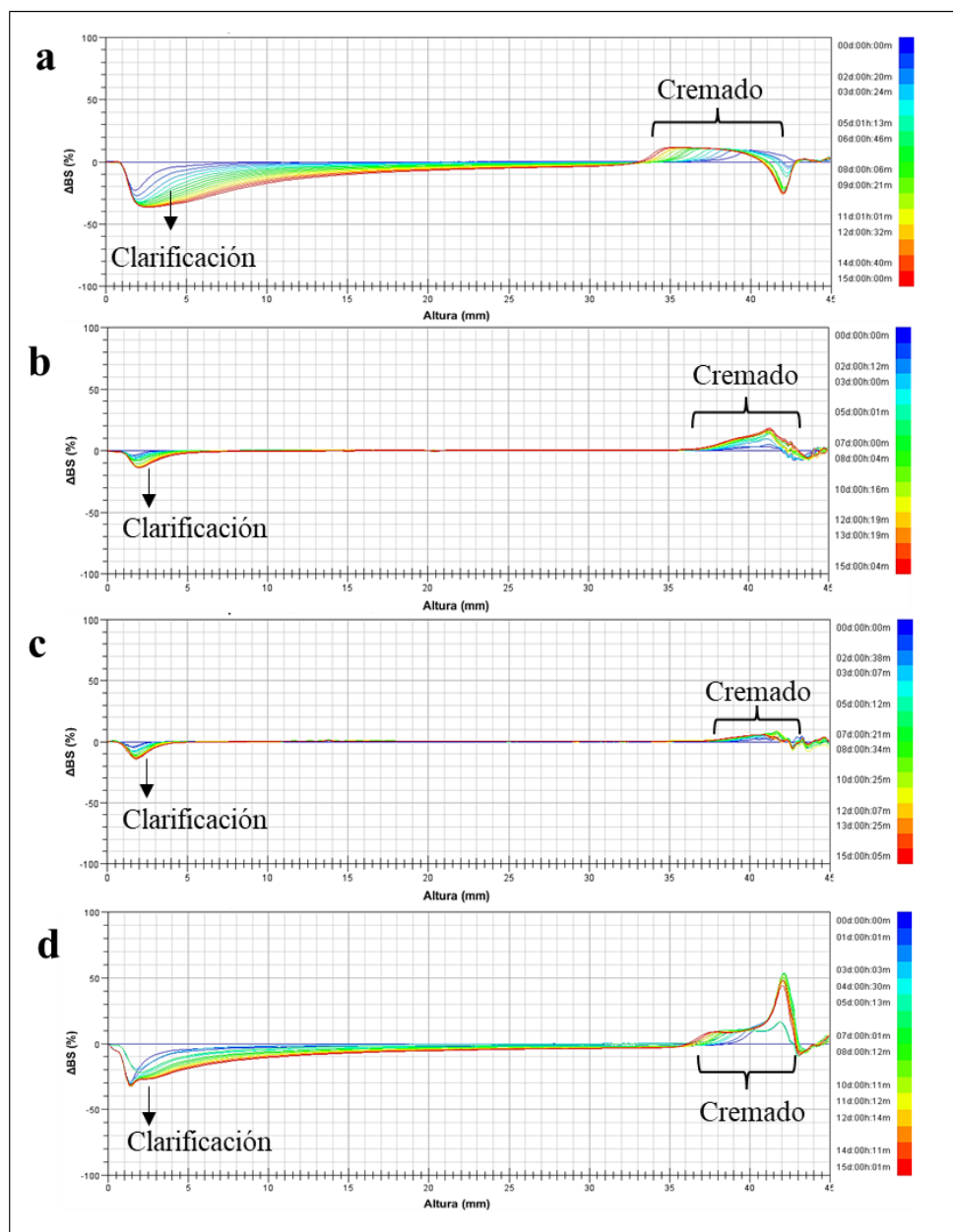
**Tabla 4.24.** Parámetros reológicos de índice de consistencia (K), índice de comportamiento al fluido ( $n$ ), e índice de correlación ( $R^2$ ) de las emulsiones elaboradas con 7% de mazada y 10% de aceites, homogeneizadas por diferentes tecnologías.

Homogeneizadores	K (Pa × s <sup>n</sup> )	$n$	R <sup>2</sup>
Convencional	0,0028 ± 0,0001 <sup>b</sup>	1,0478 ± 0,0023 <sup>a</sup>	0,9998
Microfluidizer®	0,0028 ± 0,0001 <sup>b</sup>	1,0238 ± 0,0045 <sup>b</sup>	0,0997
Ultra alta presión	0,0056 ± 0,0004 <sup>a</sup>	0,9708 ± 0,0056 <sup>c</sup>	0,9999
Ultrasonidos	0,0022 ± 0,0001 <sup>c</sup>	1,0509 ± 0,0089 <sup>a</sup>	0,9995

<sup>a-b-c</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Respecto a la estabilidad física de las emulsiones a temperatura ambiente tras 15 días de almacenamiento, tal y como se puede observar en los perfiles de luz retrodispersada de la **Figura 4.8**, se produjeron fenómenos de desestabilización de cremado y clarificación en todas las emulsiones preparadas mediante los cuatro tratamientos de homogeneización, siendo más visibles en las emulsiones homogeneizadas por CH y US. Este hecho está íntimamente relacionado con el mayor tamaño medio de partícula y grado de homogeneidad que presentaron las emulsiones CH y US, respecto a sus homólogas obtenidas por MF y UHPH. Estos fenómenos de desestabilización solo fueron detectados por inspección visual

directa en las emulsiones CH y US, no pudiéndose ser observados en las emulsiones MF y UHPH.



**Figura 4.8.** Perfiles de retrodispersión de las emulsiones o/w preparadas con un 7% mazada y un 10% aceite, y homogeneizadas por las tecnologías: a) Convencional (30 MPa), b) *Microfluidizer*® (100 MPa), c) UHPH (200 MPa), d) Ultrasonidos (40% amplitud por 10 min) en función del tiempo de almacenamiento (15 días).

Además, se utilizó el valor del TSI para evaluar estos cambios con el tiempo (**Tabla 4.25** y **Figura 4.9**), observándose un patrón común en todas las emulsiones: a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento, los valores de TSI presentaron un aumento progresivo, lo que indica una progresiva pérdida de estabilidad. Sin embargo, el mayor incremento ( $P < 0,05$ )

del TSI lo presentó las emulsiones CH y US. Por tanto, estas tecnologías de homogeneización pueden ser consideradas como las menos efectivas en términos de estabilidad física. Las emulsiones MF y UHPH mostraron los valores de TSI más bajos, no observándose entre ellas diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) tras 15 días de almacenamiento, aunque la emulsión UHPH siempre presentó valores más bajos de TSI en comparación a su homóloga tratada por MF. Estos resultados de estabilidad física de las emulsiones están directamente ligados al tamaño de partícula medio que presentaron estas emulsiones (**Tabla 4.23**), y en caso de las emulsiones UHPH también posiblemente a su mayor viscosidad.

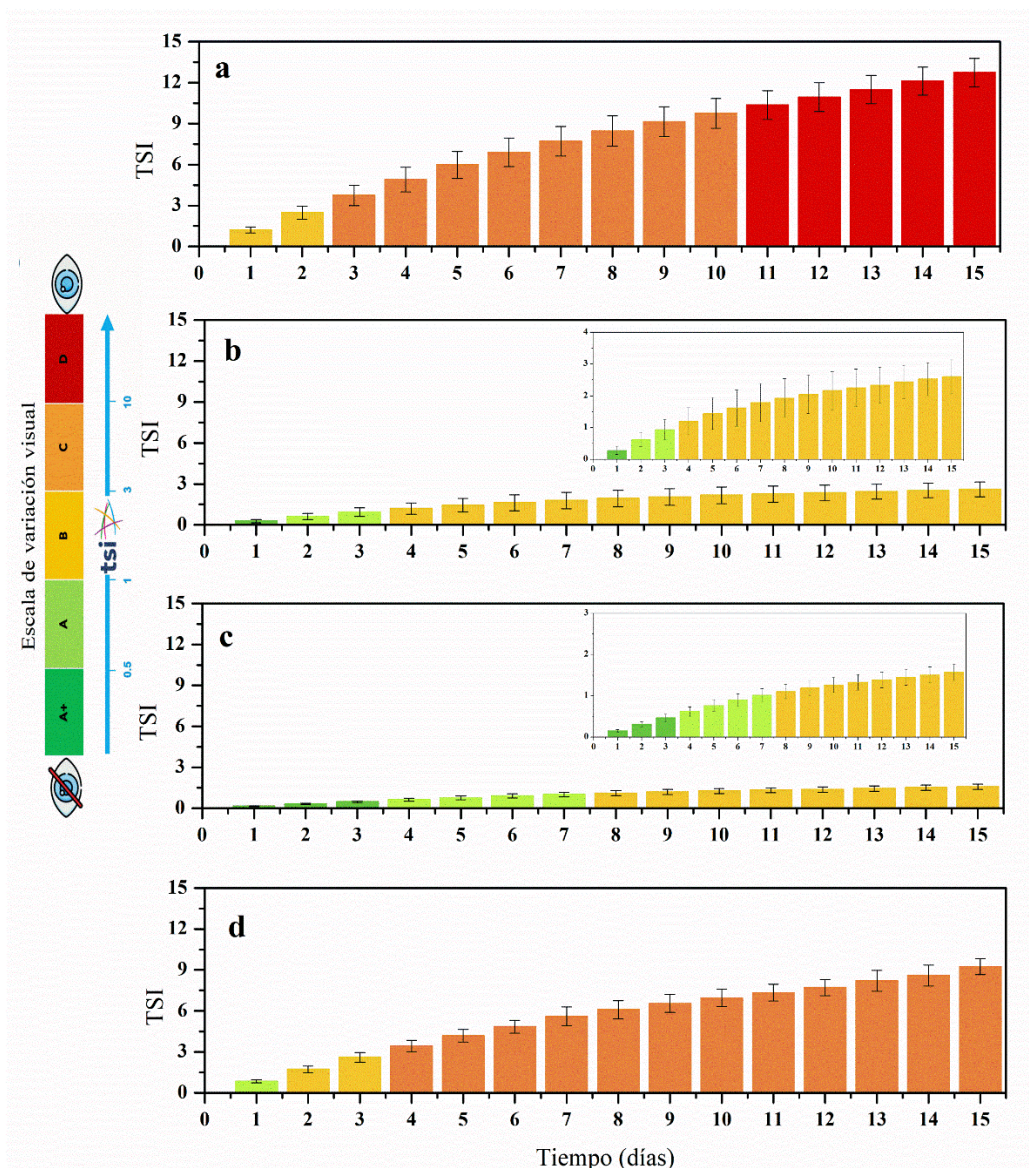
**Tabla 4.25.** Índice de estabilidad Turbiscan (TSI) de las emulsiones elaboradas con 7% de mazada y 10% de aceites, homogenizadas por diferentes tecnologías, a lo largo de 1,7 y 15 días de almacenamiento.

Homogeneización	TSI		
	Día 1	Día 7	Día 15
<b>Convencional</b>	1,22 ± 0,26 <sup>a, z</sup>	7,71 ± 1,19 <sup>a, y</sup>	12,74 ± 1,15 <sup>a, x</sup>
<b>Microfluidizer®</b>	0,21 ± 0,05 <sup>b, y</sup>	1,79 ± 0,61 <sup>c, x</sup>	2,61 ± 0,52 <sup>c, x</sup>
<b>Ultra alta presión</b>	0,16 ± 0,01 <sup>b, y</sup>	1,01 ± 0,17 <sup>c, xy</sup>	1,60 ± 0,13 <sup>c, x</sup>
<b>Ultrasonidos</b>	0,85 ± 0,09 <sup>a, z</sup>	5,39 ± 0,20 <sup>b, y</sup>	9,25 ± 0,63 <sup>b, x</sup>

<sup>a-b-c</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

<sup>x-y</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

La **Figura 4.9** detalla la cinética del TSI de las emulsiones estudiadas. En particular, en el caso de las emulsiones CH (**Figura 4.9a**), los cambios de estabilidad física se hicieron notorios en un corto período de tiempo. Tras tan solo 24 h de almacenamiento, las emulsiones CH ya se situaron en la escala (B) del TSI, sugiriendo la presencia de variaciones en la estructura de las emulsiones, la mayoría de las cuales no fueron visibles a simple vista, constituyendo más del 90% de las variaciones detectadas. Al llegar al tercer día, las emulsiones CH progresaron a la escala (C) del TSI, lo que representa una advertencia visual sobre los fenómenos de desestabilización. Finalmente, al día 11 del estudio, las emulsiones CH alcanzaron la escala (D) del TSI, indicando que los fenómenos de desestabilización fueron visibles a simple vista, marcando un deterioro significativo en su estabilidad.



**Figura 4.9.** Cinética del índice de estabilidad global (TSI, siglas en inglés) en función del tiempo de almacenamiento de las emulsiones homogeneizadas por los siguientes métodos: **a.** Convencional; **b.** *Microfluidizer*®; **c.** UHPH (Homogeneización a ultra alta presión); y **d.** Ultrasonidos. Cada barra del gráfico se encuentra codificada por colores en correspondencia con la escala visual del TSI y se representa de la siguiente manera: **A+** (Excelente, verde oscuro), **A** (Bueno, verde claro), **B** (Variaciones detectadas, amarillo), **C** (Advertencia visual, naranja) y **D** (Inestabilidad visible, rojo).

En el caso de las emulsiones US (**Figura 4.9d**), se observaron fenómenos de desestabilización visibles, aunque en menor medida que en las emulsiones CH. Durante las primeras 24 h de almacenamiento, las emulsiones US se encontraron en la escala visual "A", que se considera una escala de buena estabilidad. Sin embargo, en el segundo día, pasaron a la escala (B), y continuaron en esta escala hasta el día 4, para después pasar a escala (C) de advertencia visual, permaneciendo en esta escala hasta los 15 días de almacenamiento.

En cuanto a las emulsiones MF y UHPH (ver **Figura 7.9 b y c**, respectivamente), estas destacaron por su mayor estabilidad en comparación con las emulsiones CH y US. Estas emulsiones no cruzaron la barrera de la escala (B) incluso después de 15 días de almacenamiento. Es relevante mencionar que hubo una diferencia notable entre las emulsiones MF y UHPH. Las emulsiones UHPH mantuvieron su estabilidad durante más tiempo, permaneciendo en la escala "A+" durante 3 días y en la escala "A" hasta el día 7, mientras que las emulsiones MF se mantuvieron en la escala "A" durante los primeros 3 días.

### 4.3.3 Degradación por oxidación primaria y secundaria

En la **Tabla 4.26** se muestran los niveles de hidroperóxidos (oxidación primaria) medidos en las emulsiones homogeneizadas por las tecnologías CH, MS, UHPH y US a lo largo de 15 días de almacenamiento a 50 °C. Respecto a la oxidación primaria de las emulsiones, se produjo un aumento progresivo ( $P < 0,05$ ) en los niveles de hidroperóxidos durante el tiempo de almacenamiento de 15 días, excepto en el tratamiento de MF, donde estos niveles se mantuvieron estables. Las emulsiones con menores ( $P < 0,05$ ) concentraciones de hidroperóxidos, tras 7 y 15 días de almacenamiento, fueron aquellas homogeneizadas por MF seguidas de las US, y aquellas con mayor nivel de hidroperóxidos fueron las preparadas por UHPH y CH.

**Tabla 4.26.** Concentraciones de hidroperóxidos (mM/kg aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas con 7% de mazada y 10% de aceites, homogeneizadas por diferentes tecnologías, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

Homogeneización	Hidroperóxidos (mM/kg aceite)		
	Día 1	Día 7	Día 15
Convencional	0,20 ± 0,50 <sup>c,y</sup>	3,87 ± 0,37 <sup>b,y</sup>	17,76 ± 4,90 <sup>b,x</sup>
<i>Microfluidizer</i> ®	0,39 ± 0,05 <sup>c,x</sup>	1,09 ± 0,49 <sup>d,x</sup>	1,91 ± 0,35 <sup>d,x</sup>
Ultra alta presión	2,93 ± 0,21 <sup>a,y</sup>	5,08 ± 0,24 <sup>a,y</sup>	34,34 ± 8,56 <sup>a,x</sup>
Ultrasonidos	0,77 ± 0,07 <sup>b,y</sup>	2,03 ± 0,07 <sup>c,xy</sup>	5,53 ± 0,12 <sup>c,x</sup>

<sup>a-b-c-d</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

<sup>x-y</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

La **Tabla 4.27.** muestra los niveles de malondialdehído (oxidación secundaria) medidos en las emulsiones homogeneizadas por las tecnologías CH, MS, UHPH y US a lo largo de 15

días de almacenamiento a 50 °C. Respecto a la oxidación secundaria, se observó que las emulsiones preparadas por MF presentaron un nivel de malondialdehído constante ( $P > 0,05$ ) a lo largo de los 15 días de almacenamiento, lo cual indica una elevada protección y resistencia de la interfaz O/W de esta emulsión frente a fenómenos de degradación oxidativa. Los mayores niveles de malondialdehído ( $P < 0,05$ ) se alcanzaron en las emulsiones US y CH, tras 7 y 15 días de almacenamiento, respectivamente. En la emulsión US, tras 15 días de almacenamiento, se produjo una disminución ( $P < 0,05$ ) muy acusada de los niveles de malondialdehído, indicando una degradación o transformación del malondialdehído en compuestos de oxidación terciaria. En el caso de la emulsión obtenida por UHPH, los niveles de malondialdehído aumentaron durante el periodo de almacenamiento presentando índices de oxidación secundaria menores que las emulsiones CH y US, pero mayores que sus homólogas obtenidas por MF.

**Tabla 4.27.** Concentraciones de malondialdehído (MDA) ( $\mu\text{M}/\text{kg}$  aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas con 7% de mazada y 10% de aceites, homogenizadas por diferentes tecnologías, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

Homogeneización	MDA ( $\mu\text{M}/\text{kg}$ aceite)		
	Día 1	Día 7	Día 15
<b>Convencional</b>	3,10 $\pm$ 0,15 <sup>c,z</sup>	35,63 $\pm$ 2,40 <sup>b,y</sup>	49,70 $\pm$ 0,75 <sup>a,x</sup>
<b>Microfluidizer®</b>	3,13 $\pm$ 0,40 <sup>c,x</sup>	3,79 $\pm$ 0,51 <sup>c,x</sup>	4,32 $\pm$ 0,11 <sup>d,x</sup>
<b>Ultra alta presión</b>	11,39 $\pm$ 0,50 <sup>b,y</sup>	40,42 $\pm$ 2,44 <sup>b,x</sup>	43,42 $\pm$ 1,98 <sup>b,x</sup>
<b>Ultrasonidos</b>	42,83 $\pm$ 1,51 <sup>a,y</sup>	60,06 $\pm$ 1,85 <sup>a,x</sup>	16,70 $\pm$ 0,08 <sup>c,z</sup>

<sup>a-b-c-d</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

<sup>x-y-z</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Las diferencias en grado oxidación de las emulsiones UHPH en comparación con las obtenidas por MF podrían explicarse por la elevada susceptibilidad a procesos oxidativos de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la fase oleosa (aceites de chía y girasol) y las presiones de homogeneización aplicadas en cada una de estas tecnologías de homogeneización. Según Chen et al. (2019) el aumento de la presión de funcionamiento de los homogeneizadores de alta presión, más allá de un valor óptimo, provoca la degradación oxidativa del aceite durante la emulsificación. Estos autores observaron que, al aumentar la presión de 0,1 a 120 MPa, no se produjo ningún cambio importante en el índice de peróxido, pero al aumentar la presión a 200 MPa el índice de peróxido aumentó rápidamente. Por otro

lado, la geometría del orificio donde se produce la ruptura de las gotas en el homogeneizador puede alterar la intensidad de los fenómenos de cavitación y la subsiguiente tasa de generación de radicales hidroxilos. Esta teoría se mostró en el estudio de Amin et al. (2010) donde se puso de manifiesto que la geometría del orificio que proporciona más área de capa de corte dentro del área de flujo puede generar una gran cantidad de radicales hidroxilos.

#### 4.4 Conclusiones

En este estudio, se evaluaron los efectos de diversas tecnologías de homogeneización (CH, MF, UHPH y US) en la preparación de emulsiones con aceites vegetales ricos en ácidos grasos omega-3 y omega-6. Se utilizó mazada como agente emulgente, y se investigó el impacto de distintas concentraciones de fase oleosa (10% y 20%) y emulsionante (5% y 7%) en la formación y propiedades fisicoquímicas de las emulsiones para cada técnica de homogeneización empleada. Además, se seleccionó una formulación específica (10% de fase oleosa y 7% de emulsionante) para evaluar y comparar la estabilidad y las propiedades de las emulsiones bajo estas condiciones en cada una de las tecnologías de homogeneización utilizadas.

Este estudio ha demostrado que la mazada juega un rol clave como agente emulgente en la creación de emulsiones O/W con aceites vegetales ricos en  $\omega$ -3 y 6. Se encontró que una concentración de mazada del 7% era adecuada y consistente en todas las técnicas de homogeneización empleadas, proporcionando un balance ideal entre el tamaño de partícula y las estabilidades física y oxidativa de las emulsiones. Estos hallazgos destacan la importancia de la concentración adecuada de mazada en la formulación de estas emulsiones, ya que tiene un impacto significativo en la calidad y características finales de los productos resultantes.

Los resultados también subrayan la importancia crucial de la concentración de fase oleosa en la formulación de emulsiones O/W, ejerciendo una influencia significativa en sus propiedades físicas, oxidativas y reológicas. Se ha evidenciado que las emulsiones elaboradas con 20% de fase oleosa, a diferencia de sus homólogas con 10%, presentaron, con las diferentes técnicas de homogeneización utilizadas, niveles menores de oxidación y mayor viscosidad. En cuanto a la estabilidad física, las emulsiones con 20% de fase oleosa

presentaron una estabilidad física similar o mejorada (en el caso de las emulsiones US) a sus homólogas con 10%. Sin embargo, cada equipo de homogeneización responde de manera única a las variaciones en el contenido de fase oleosa, subrayando la necesidad de ajustar la formulación a las condiciones específicas del proceso. Además, destaca la importancia de encontrar un equilibrio preciso entre la concentración de mazada y la fase oleosa para lograr emulsiones estables con características óptimas. Estos hallazgos refuerzan la idea de que la manipulación cuidadosa de la concentración de fase oleosa es esencial para diseñar emulsiones con propiedades mejoradas y adaptadas a diferentes procesos y necesidades específicas.

Tras evaluar varias tecnologías de homogeneización en la elaboración de emulsiones con aceites vegetales ricos en omega-3 y 6, se concluye que los tratamientos de homogeneización por MF a 100 MPa y el de UHPH a 200 MPa son los más eficientes. Estos métodos proporcionan tamaños de partícula ideales y una estabilidad física superior. Aunque el tratamiento UHPH, en general, presenta buenos resultados en la obtención de emulsiones O/W, la aplicación de 200 MPa puede causar oxidación en la mezcla de aceites en condiciones aceleradas de ensayo (50 °C), a diferencia de la homogeneización por MF. Por otro lado, la técnica de CH es menos efectiva, presentando una distribución de tamaño más amplia, una estabilidad física deficiente y niveles de productos oxidativos mayores que la UHPH. La homogeneización por US, aunque logra tamaños de partícula y una estabilidad física intermedios entre CH y MF-UHPH, conduce a una oxidación lipídica muy elevada, no comparable con el resto de las tecnologías de homogeneización examinadas. En resumen, la homogeneización por MF a 100 MPa y la UHPH a 200 MPa emergen como las mejores opciones en la obtención de emulsiones O/W con un 10% de mezcla de aceites y 7% de mazada como agente emulgente, debido a sus capacidades para ofrecer tamaños de partícula óptimos, mayor estabilidad física y menor oxidación, en comparación a los tratamientos de CH y US.

## 4.5 Referencias bibliográficas

- Abbas, S., Bashari, M., Akhtar, W., Li, W. W., & Zhang, X. (2014). Process optimization of ultrasound-assisted curcumin nanoemulsions stabilized by OSA-modified starch. *Ultrasonics Sonochemistry*, *21*(4), 1265–1274. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.12.017>
- Abbas, S., Hayat, K., Karangwa, E., Bashari, M., & Zhang, X. (2013). An overview of ultrasound-assisted food-grade nanoemulsions. *Food Engineering Reviews*, *5*(3), 139–157. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9066-3>
- Abismail, B., Canselier, J. P., Wilhelm, A. M., Delmas, H., & Gourdon, C. (1999). Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, *6*(1–2), 75–83. [https://doi.org/10.1016/s1350-4177\(98\)00027-3](https://doi.org/10.1016/s1350-4177(98)00027-3)
- Aghababaei, F., Cano-Sarabia, M., Trujillo, A. J., Quevedo, J. M., & Ferragut, V. (2021). Buttermilk as encapsulating agent: Effect of ultra-high-pressure homogenization on Chia oil-in-water liquid emulsion formulations for spray drying. *Foods*, *10*(5), 1059. <https://doi.org/10.3390/foods10051059>
- Amador Espejo, G. G., Hernández-Herrero, M. M., Juan, B., & Trujillo, A. J. (2014). Inactivation of *Bacillus* spores inoculated in milk by Ultra High Pressure Homogenization. *Food Microbiology*, *44*, 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.010>
- Amin, L. P., Gogate, P. R., Burgess, A. E., & Bremner, D. H. (2010). Optimization of a hydrodynamic cavitation reactor using salicylic acid dosimetry. *Chemical Engineering Journal*, *156*(1), 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.09.043>
- Anandan, S., Keerthiga, M., Vijaya, S., Asiri, A. M., Bogush, V., & Krasulyaa, O. (2017). Physicochemical characterization of black seed oil-milk emulsions through ultrasonication. *Ultrasonics Sonochemistry*, *38*, 766–771. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.11.005>
- Ashokkumar, M., Bhaskaracharya, R., Kentish, S., Lee, J., Palmer, M., & Zisu, B. (2010). The ultrasonic processing of dairy products – An overview. *Dairy Science & Technology*, *90*(2–3), 147–168. <https://doi.org/10.1051/dst/2009044>
- Augustin, M. A., Abeywardena, M. Y., Patten, G., Head, R., Lockett, T., De Luca, A., & Sanguansri, L. (2011). Effects of microencapsulation on the gastrointestinal transit and tissue distribution of a bioactive mixture of fish oil, tributyrin and resveratrol. *Journal of Functional Foods*, *3*(1), 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.01.003>
- Augustin, M. A., Bhail, S., Cheng, L. J., Shen, Z., Øiseth, S., & Sanguansri, L. (2015). Use of whole buttermilk for microencapsulation of omega-3 oils. *Journal of Functional Foods*, *19*, 859–867. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.02.014>

- Augustin, M. A., & Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, 38(4), 902–912. <https://doi.org/10.1039/b801739p>
- 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>
- Barukčić, I., Jakopović, L. K., & Božanić, R. (2019). Valorisation of whey and buttermilk for production of functional beverages – an overview of current possibilities. *Food Technology and Biotechnology*, 57(4), 448–460. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.04.19.6460>
- Berton-Carabin, C. C., Ropers, M.-H., & Genot, C. (2014). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Involvement of the interfacial layer. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 945–977. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12097>
- Campanella, O. H., Dorward, N. M., & Singh, H. (1995). A study of the rheological properties of concentrated food emulsions. *Journal of Food Engineering*, 25(3), 427–440. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(94\)00000-y](https://doi.org/10.1016/0260-8774(94)00000-y)
- Canselier, J. P., Delmas, H., Wilhelm, A. M., & Abismaïl, B. (2002). Ultrasound emulsification—an overview. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23(1–3), 333–349. <https://doi.org/10.1080/01932690208984209>
- Carpenter, J., & Saharan, V. K. (2017). Ultrasonic assisted formation and stability of mustard oil in water nanoemulsion: Effect of process parameters and their optimization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 35, 422–430. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.10.021>
- Chang, C., & Nickerson, M. T. (2018). Encapsulation of omega 3-6-9 fatty acids-rich oils using protein-based emulsions with spray drying. *Journal of Food Science and Technology*, 55(8), 2850–2861. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3257-0>
- Chemat, F., Grondin, I., Costes, P., Moutoussamy, L., Sing, A. S. C., & Smadja, J. (2004). High power ultrasound effects on lipid oxidation of refined sunflower oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(5), 281–285. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2003.07.004>
- Chen, S., Wang, X., Xu, Y., Zhang, X., Wang, X., & Jiang, L. (2019). Effect of high pressure treatment on interfacial properties, structure and oxidative stability of soy protein isolate-stabilized emulsions. *Journal of Oleo Science*, 68(5), 409–418. <https://doi.org/10.5650/jos.ess18228>
- Comuzzo, P., & Calligaris, S. (2019). Potential applications of high pressure homogenization in winemaking: A review. *Beverages*, 5(3), 56. <https://doi.org/10.3390/beverages5030056>

- Conway, V., Gauthier, S. F., & Pouliot, Y. (2014). Buttermilk: Much more than a source of milk phospholipids. *Animal Frontiers*, 4(2), 44–51. <https://doi.org/10.2527/af.2014-0014>
- Conway, Valérie, Gauthier, S. F., & Pouliot, Y. (2013). Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins, and their enzymatic hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(2), 364–372. <https://doi.org/10.1021/jf304309g>
- Corredig, M., & Dalgleish, D. G. (1997). Isolates from industrial buttermilk: Emulsifying properties of materials derived from the milk fat globule membrane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4595–4600. <https://doi.org/10.1021/jf970531f>
- Corredig, M., Roesch, R. R., & Dalgleish, D. G. (2003). Production of a novel ingredient from buttermilk. *Journal of Dairy Science*, 86(9), 2744–2750. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(03\)73870-3](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(03)73870-3)
- Cortés-Muñoz, M., Chevalier-Lucia, D., & Dumay, E. (2009). Characteristics of submicron emulsions prepared by ultra-high pressure homogenisation: Effect of chilled or frozen storage. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 640–654. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.023>
- Cui, L., & Decker, E. A. (2016). Phospholipids in foods: prooxidants or antioxidants? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(1), 18–31. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7320>
- Dalgleish, D. G. (1997). Adsorption of protein and the stability of emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 8(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/s0924-2244\(97\)01001-7](https://doi.org/10.1016/s0924-2244(97)01001-7)
- De Freitas Mascarello, A., Pinto, G. I., De Araújo, I. S., Caragnato, L. K., Da Silva, A. L. L., & Santos, L. F. D. (2019). Technological and biological properties of buttermilk: A minireview. In I. Gigli (Ed.), *Whey - Biological Properties and Alternative Uses*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80921>
- Desrumaux, A., & Marcand, J. (2002). Formation of sunflower oil emulsions stabilized by whey proteins with high-pressure homogenization (up to 350 MPa): effect of pressure on emulsion characteristics. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(3), 263–269. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00565.x>
- Drusch, S., & Mannino, S. (2009). Patent-based review on industrial approaches for the microencapsulation of oils rich in polyunsaturated fatty acids. *Trends in Food Science & Technology*, 20(6–7), 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.03.007>
- Dumay, E., Chevalier-Lucia, D., Picart-Palmade, L., Benzaria, A., Gràcia-Julà, A., & Blayo, C. (2013). Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. *Trends in Food Science & Technology*, 31(1), 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.005>

- Ertugay, M. F., Şengül, M., & Şengül, M. (2004). Effect of ultrasound treatment on milk homogenisation and particle size distribution of fat. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28(2), 303–308. <https://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/vol28/iss2/9/>
- Fernandes, S. S., Egea, M. B., Salas-Mellado, M. de las M., & Segura-Campos, M. R. (2023). Chia oil and mucilage nanoemulsion: Potential strategy to protect a functional ingredient. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7384. <https://doi.org/10.3390/ijms24087384>
- Fernández-Ávila, C., Escriu, R., & Trujillo, A. J. (2015). Ultra-High Pressure Homogenization enhances physicochemical properties of soy protein isolate-stabilized emulsions. *Food Research International*, 75, 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.026>
- Fernandez-Avila, C., Hebishy, E., Donsi, F., Arranz, E., & Trujillo, A. J. (2019). Production of food bioactive-loaded nanostructures by high-pressure homogenization. In *Nanoencapsulation of Food Ingredients by Specialized Equipment* (pp. 251–340). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815671-1.00006-8>
- Fernandez-Avila, C., & Trujillo, A. J. (2016). Ultra-High Pressure Homogenization improves oxidative stability and interfacial properties of soy protein isolate-stabilized emulsions. *Food Chemistry*, 209, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.019>
- Flores, M., Meyer, L., Orellana, S., Saravia, C., Galdames, C., & Perez-Camino, M. C. (2018). Quality of lipid fractions in deep-fried foods from street vendors in Chile. *Journal of Food Quality*, 2018, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2018/7878439>
- Floury, J., Desrumaux, A., & Lardières, J. (2000). Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(2), 127–134. [https://doi.org/10.1016/s1466-8564\(00\)00012-6](https://doi.org/10.1016/s1466-8564(00)00012-6)
- Fuhrmann, P. L., Breunig, S., Sala, G., Sagis, L., Stieger, M., & Scholten, E. (2022). Rheological behaviour of attractive emulsions differing in droplet-droplet interaction strength. *Journal of Colloid and Interface Science*, 607, 389–400. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.08.124>
- Gallego, G., Hakkarainen, M., & Almajano, M. P. (2017). Stability of O/W emulsions packed with PLA film with incorporated rosemary and thyme. *European Food Research and Technology*, 243(7), 1249–1259. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2829-3>
- Gazolu-Rusanova, D., Lesov, I., Tcholakova, S., Denkov, N., & Ahtchi, B. (2020). Food grade nanoemulsions preparation by rotor-stator homogenization. *Food Hydrocolloids*, 102(105579), 105579. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105579>

- Georget, E., Miller, B., Callanan, M., Heinz, V., & Mathys, A. (2014). (ultra) high pressure homogenization for continuous high pressure sterilization of pumpable foods: A review. *Frontiers in Nutrition*, 1. <https://doi.org/10.3389/fnut.2014.00015>
- Ghelichi, S., Hajfathalian, M., Yesiltas, B., Sørensen, A.-D. M., García-Moreno, P. J., & Jacobsen, C. (2023). Oxidation and oxidative stability in emulsions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(3), 1864–1901. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13134>
- Han, N. S., Basri, M., Rahman, M. B., Rahman, R. N., Salleh, A. B., & Ismail, Z. (2012). Preparation of emulsions by rotor-stator homogenizer and ultrasonic cavitation for the cosmeceutical industry. *Journal of Cosmetic Science*, 63(5), 333–344. <https://europepmc.org/article/med/23089355>
- Hayes, M. G., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2005). Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. *The Journal of Dairy Research*, 72(1), 25–33. <https://doi.org/10.1017/s0022029904000524>
- Hebishy, E., Aguilar, J. G. dos S., Ribeiro, L. R., Amador-Espejo, G. G., & Trujillo, A.-J. (2023). Effects of high-pressure homogenization on enzyme activity in milk and dairy products. In *Effect of High-Pressure Technologies on Enzymes* (pp. 195–240). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-98386-0.00010-5>
- Hebishy, E., Buffa, M., Guamis, B., Blasco-Moreno, A., & Trujillo, A.-J. (2015). Physical and oxidative stability of whey protein oil-in-water emulsions produced by conventional and ultra high-pressure homogenization: Effects of pressure and protein concentration on emulsion characteristics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 32, 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.013>
- Hebishy, E., Buffa, M., Guamis, B., & Trujillo, A.-J. (2013). Stability of sub-micron oil-in-water emulsions produced by ultra high pressure homogenization and sodium caseinate as emulsifier. *Chemical Engineering Transactions*, 32, 1813-1818. <https://doi.org/10.3303/CET1332303>
- Hebishy, E., Ferragut, V., Blasco-Moreno, A., & Trujillo, A.-J. (2020). Impact of oil phase concentration on physical and oxidative stability of oil-in-water emulsions stabilized by sodium caseinate and ultra-high pressure homogenization. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 42(1), 46–57. <https://doi.org/10.1080/01932691.2019.1661256>
- Hebishy, E., Zamora, A., Buffa, M., Blasco-Moreno, A., & Trujillo, A.-J. (2017). Characterization of whey protein oil-in-water emulsions with different oil concentrations stabilized by ultra-high pressure homogenization. *Processes*, 5(4), 6. <https://doi.org/10.3390/pr5010006>
- Hidajat, M. J., Jo, W., Kim, H., & Noh, J. (2020). Effective droplet size reduction and excellent stability of limonene nanoemulsion formed by high-pressure homogenizer. *Colloids and Interfaces*, 4(1), 5. <https://doi.org/10.3390/colloids4010005>

- Ihara, K., Ochi, H., Saito, H., & Iwatsuki, K. (2011). Effects of buttermilk powders on emulsification properties and acid tolerance of cream. *Journal of Food Science*, 76(2). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.02017.x>
- Jacobsen, C. (2010). Enrichment of foods with omega-3 fatty acids: a multidisciplinary challenge. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1190(1), 141–150. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05263.x>
- Jafari, M. S., He, Y., & Bhandari, B. (2006). Nano-emulsion production by sonication and microfluidization—A comparison. *International Journal of Food Properties*, 9(3), 475–485. <https://doi.org/10.1080/10942910600596464>
- Jafari, S. M., He, Y., & Bhandari, B. (2007). Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. *Journal of Food Engineering*, 82(4), 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.03.007>
- Joubran, R. F., Cornell, D. G., & Parris, N. (1993). Microemulsions of triglyceride and non-ionic surfactant — effect of temperature and aqueous phase composition. *Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects*, 80(2–3), 153–160. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(93\)80194-j](https://doi.org/10.1016/0927-7757(93)80194-j)
- Juttulapa, M., Piriyaarasarth, S., Takeuchi, H., & Sriamornsak, P. (2017). Effect of high-pressure homogenization on stability of emulsions containing zein and pectin. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(1), 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.09.004>
- Karthik, P., & Anandharamakrishnan, C. (2016). Fabrication of a nutrient delivery system of docosahexaenoic acid nanoemulsions via high energy techniques. *RSC Advances*, 6(5), 3501–3513. <https://doi.org/10.1039/c5ra12876e>
- Kasinos, M., Tran Le, T., & Van der Meeren, P. (2014). Improved heat stability of recombined evaporated milk emulsions upon addition of phospholipid enriched dairy by-products. *Food Hydrocolloids*, 34, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.030>
- Kaur, S., & Das, M. (2011). Functional foods: An overview. *Food Science and Biotechnology*, 20(4), 861–875. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0121-7>
- Krebs, L., Bérubé, A., Iung, J., Marciniak, A., Turgeon, S. L., & Brisson, G. (2021). Impact of ultra-high-pressure homogenization of buttermilk for the production of yogurt. *Foods*, 10(8), 1757. <https://doi.org/10.3390/foods10081757>
- Larsson, S. C., Andersson, S.-O., Johansson, J.-E., & Wolk, A. (2008). Cultured milk, yogurt, and dairy intake in relation to bladder cancer risk in a prospective study of Swedish women and men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(4), 1083–1087. <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.4.1083>

- Leong, T. S. H., Wooster, T. J., Kentish, S. E., & Ashokkumar, M. (2009). Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*, *16*(6), 721–727. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.02.008>
- Lethuaut, L., Métro, F., & Genot, C. (2002). Effect of droplet size on lipid oxidation rates of oil-in-water emulsions stabilized by protein. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *79*(5). <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0500-z>
- Li, Y., Deng, L., Dai, T., Li, Y., Chen, J., Liu, W., & Liu, C. (2022). Microfluidization: A promising food processing technology and its challenges in industrial application. *Food Control*, *137*(108794), 108794. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108794>
- Liu, Huang, Chen, Lin, & Wang. (2019). Food-grade nanoemulsions: Preparation, stability and application in encapsulation of bioactive compounds. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(23), 4242. <https://doi.org/10.3390/molecules24234242>
- Mayta-Hanco, J., Trujillo, A.-J., Zamora, A., & Juan, B. (2019). Effect of ultra-high pressure homogenisation of cream on the physicochemical and sensorial characteristics of fat-reduced starter-free fresh cheeses. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, *110*, 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.096>
- Mazza, M., Pomponi, M., Janiri, L., Bria, P., & Mazza, S. (2007). Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: An overview. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *31*(1), 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2006.07.010>
- McClements, D. J. (2010). Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. *Annual Review of Food Science and Technology*, *1*(1), 241–269. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100722>
- McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, *7*(6), 2297–2316. <https://doi.org/10.1039/c0sm00549e>
- McClements, D. J. (2015a). Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, *219*, 27–53. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.02.002>
- McClements, D. J. (2015b). *Food emulsions: Principles, practices, and techniques, third edition*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b18868>
- McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, *72*(8). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x>
- Nagy, K., & Tiuca, I.-D. (2017). Importance of fatty acids in physiopathology of human body. In *Fatty Acids*. InTech. <https://doi.org/10.5772/67407>

- Nogueira, M. S., Scolaro, B., Milne, G. L., & Castro, I. A. (2019). Oxidation products from omega-3 and omega-6 fatty acids during a simulated shelf life of edible oils. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, *101*, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.044>
- Patil, L., & Gogate, P. R. (2018). Ultrasound assisted synthesis of stable oil in milk emulsion: Study of operating parameters and scale-up aspects. *Ultrasonics Sonochemistry*, *40*, 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.07.001>
- Patrignani, F., & Lanciotti, R. (2016). Applications of high and ultra high pressure homogenization for food safety. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1132. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01132>
- Pereda, J., Jaramillo, D. P., Quevedo, J. M., Ferragut, V., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2008). Characterization of volatile compounds in ultra-high-pressure homogenized milk. *International Dairy Journal*, *18*(8), 826–834. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.12.002>
- Perrier-Cornet, J. M., Marie, P., & Gervais, P. (2005). Comparison of emulsification efficiency of protein-stabilized oil-in-water emulsions using jet, high pressure and colloid mill homogenization. *Journal of Food Engineering*, *66*(2), 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.03.008>
- Ramisetty, K. A., Pandit, A. B., & Gogate, P. R. (2015). Ultrasound assisted preparation of emulsion of coconut oil in water: Understanding the effect of operating parameters and comparison of reactor designs. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *88*, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2014.12.006>
- Sajjadi, S., Zerfa, M., & W. Brooks, B. (2002). Dynamic behaviour of drops in oil/water/oil dispersions. *Chemical Engineering Science*, *57*(4), 663–675. [https://doi.org/10.1016/s0009-2509\(01\)00415-8](https://doi.org/10.1016/s0009-2509(01)00415-8)
- Santos, J., Trujillo-Cayado, L. A., Carrillo, F., López-Castejón, M. L., & Alfaro-Rodríguez, M. C. (2022). Relation between droplet size distributions and physical stability for Zein microfluidized emulsions. *Polymers*, *14*(11), 2195. <https://doi.org/10.3390/polym14112195>
- Sarheed, O., Shouqair, D., Ramesh, K. V. R. N. S., Khaleel, T., Amin, M., Boateng, J., & Drechsler, M. (2020). Formation of stable nanoemulsions by ultrasound-assisted two-step emulsification process for topical drug delivery: Effect of oil phase composition and surfactant concentration and loratadine as ripening inhibitor. *International Journal of Pharmaceutics*, *576*(118952), 118952. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118952>
- Schultz, S., Wagner, G., Urban, K., & Ulrich, J. (2004). High-pressure homogenization as a process for emulsion formation. *Chemical Engineering & Technology*, *27*(4), 361–368. <https://doi.org/10.1002/ceat.200406111>

- Seo, C.-W., Kang, S.-H., Shin, Y.-K., & Yoo, B. (2018). Effect of homogenization pressure and supplementation with sucrose fatty acid ester on the physical properties of dairy cream-based emulsions. *Food Science of Animal Resources*, 38(3), 476–486. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.38.3.476>
- Shahavi, M. H., Hosseini, M., Jahanshahi, M., Meyer, R. L., & Darzi, G. N. (2019). Evaluation of critical parameters for preparation of stable clove oil nanoemulsion. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 3225–3230. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.08.024>
- Shanmugam, A., & Ashokkumar, M. (2014). Ultrasonic preparation of stable flax seed oil emulsions in dairy systems – Physicochemical characterization. *Food Hydrocolloids*, 39, 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.006>
- Shanmugam, A., Chandrapala, J., & Ashokkumar, M. (2012). The effect of ultrasound on the physical and functional properties of skim milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies: IFSET: The Official Scientific Journal of the European Federation of Food Science and Technology*, 16, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.06.005>
- Silva, E. K., Zobot, G. L., & A. Meireles, M. A. (2015). Ultrasound-assisted encapsulation of annatto seed oil: Retention and release of a bioactive compound with functional activities. *Food Research International*, 78, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.10.022>
- Simopoulos, A. (2016). An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*, 8(3), 128. <https://doi.org/10.3390/nu8030128>
- Singh, H., & Gallier, S. (2017). Nature's complex emulsion: The fat globules of milk. *Food Hydrocolloids*, 68, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.011>
- Sivakumar, M., Tang, S. Y., & Tan, K. W. (2014). Cavitation technology – A greener processing technique for the generation of pharmaceutical nanoemulsions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2069–2083. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.03.025>
- Sodini, I., Morin, P., Olabi, A., & Jiménez-Flores, R. (2006). Compositional and functional properties of buttermilk: A comparison between sweet, sour, and whey buttermilk. *Journal of Dairy Science*, 89(2), 525–536. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(06\)72115-4](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(06)72115-4)
- Sousa, G., Trifunovska, M., Antunes, M., Miranda, I., Moldão, M., Alves, V., Vidrih, R., Lopes, P. A., Aparicio, L., Neves, M., Tecelão, C., & Ferreira-Dias, S. (2021). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *Pelvetia canaliculata* to sunflower oil. *Foods*, 10(8), 1732. <https://doi.org/10.3390/foods10081732>

- Spitsberg, V. L. (2005). Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2289–2294. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(05\)72906-4](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(05)72906-4)
- Sun, C., & Gunasekaran, S. (2009). Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.12.006>
- Syed, A. (2016). Oxidative stability and shelf life of vegetable oils. In *Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats* (pp. 187–207). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-056-6.00004-5>
- Taha, A., Ahmed, E., Ismaiel, A., Ashokkumar, M., Xu, X., Pan, S., & Hu, H. (2020). Ultrasonic emulsification: An overview on the preparation of different emulsifiers-stabilized emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 363–377. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.024>
- Tan, C., & McClements, D. J. (2021). Application of advanced emulsion technology in the food industry: A review and critical evaluation. *Foods*, 10(4), 812. <https://doi.org/10.3390/foods10040812>
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J. P., & Cheftel, J. C. (2003). High-pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, 13(6), 427–439. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(03\)00051-7](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(03)00051-7)
- Thompson, A. K., & Singh, H. (2006). Preparation of liposomes from milk fat globule membrane phospholipids using a microfluidizer. *Journal of Dairy Science*, 89(2), 410–419. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(06\)72105-1](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(06)72105-1)
- Tobin, J., Heffernan, S. P., Mulvihill, D. M., Huppertz, T., & Kelly, A. L. (2015). Applications of high-pressure homogenization and microfluidization for milk and dairy products. In *Emerging Dairy Processing Technologies* (pp. 93–114). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118560471.ch4>
- Trujillo, A. J., Roig-Sagués, A. X., Juan, B., Zamora, A., & Ferragut, V. (2021). Ultrahigh-pressure homogenization in dairy processing: Effects on quality and functionality. In *Innovative Food Processing Technologies* (pp. 315–336). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22998-3>
- Trujillo, A.-J., Roig-Sagués, A.-X., Zamora, A., & Ferragut, V. (2016). High-Pressure Homogenization for Structure Modification. In *Innovative Food Processing Technologies* (pp. 315–344). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100294-0.00012-2>
- Villalobos-Castillejos, F., Granillo-Guerrero, V. G., Leyva-Daniel, D. E., Alamilla-Beltrán, L., Gutiérrez-López, G. F., Monroy-Villagrana, A., & Jafari, S. M. (2018).

- Fabrication of Nanoemulsions by Microfluidization. In *Nanoemulsions* (pp. 207–232). Elsevier.
- Wang, R., Tian, Z., & Chen, L. (2011). A novel process for microencapsulation of fish oil with barley protein. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, *44*(9), 2735–2741. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.013>
- Wang, T., Sun, X., Zhou, Z., & Chen, G. (2012). Effects of microfluidization process on physicochemical properties of wheat bran. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, *48*(2), 742–747. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.015>
- Wilbey, R. A. (2011). Homogenization of milk | principles and mechanism of homogenization, effects and assessment of efficiency: Valve homogenizers. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 750–754). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374407-4.00223-5>
- Yesiltas, B., Torkkeli, M., Almásy, L., Dudás, Z., García-Moreno, P. J., Sørensen, A.-D. M., Jacobsen, C., & Knaapila, M. (2020). Small-angle neutron scattering study of high fat fish oil-in-water emulsion stabilized with sodium caseinate and phosphatidylcholine. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, *36*(9), 2300–2306. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b03269>
- Zamora, A., Ferragut, V., Jaramillo, P. D., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2007). Effects of ultra-high pressure homogenization on the cheese-making properties of milk. *Journal of Dairy Science*, *90*(1), 13–23. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(07\)72604-8](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(07)72604-8)
- Zamora, A., & Guamis, B. (2015). Opportunities for ultra-high-pressure homogenisation (UHPH) for the food industry. *Food Engineering Reviews*, *7*(2), 130–142. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9097-4>
- Zanabria Eyzaguirre, R., & Corredig, M. (2011). Milk lipids | buttermilk and milk fat globule membrane fractions. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 691–697). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374407-4.00338-1>
- Zhang, A., & Chen, Z. Y. (1997). Oxidative stability of conjugated linoleic acids relative to other polyunsaturated fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *74*(12), 1611–1613. <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0086-0>
- Zhu, Q., Pan, Y., Jia, X., Li, J., Zhang, M., & Yin, L. (2019). Review on the stability mechanism and application of water-in-oil emulsions encapsulating various additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *18*(6), 1660–1675. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12482>







# Capítulo 5

## **Encapsulación de aceites vegetales mediante emulsiones O/W usando un producto comercial enriquecido en membrana de glóbulo graso como emulgente y diferentes tecnologías de homogeneización**

### **5.1 Introducción**

La membrana del glóbulo graso (MFGM) representa un sistema biofísico único, cuya composición y estructura son fruto de procesos específicos de ensamblaje y secreción en los glóbulos de grasa láctea (Singh, 2006). Esta estructura se encuentra predominantemente alrededor de un núcleo de triglicéridos en los glóbulos de grasa, constituyendo hasta un 70% de su totalidad, dependiendo del tamaño del glóbulo graso, aunque en la leche desnatada predominan solo fragmentos de MFGM y componentes asociados, como los lípidos polares formando vesículas estructuradas (Keenan, 2006). Recientes y numerosas investigaciones han profundizado en la composición, estructura, y las propiedades tecnológicas, nutricionales y de salud de la MFGM, lo que ha resultado en una creciente publicación de estos hallazgos (Bourlieu & Michalski, 2015; Gallier et al., 2014; Jukkola & Rojas, 2017; Lopez, 2011; Singh & Gallier, 2017), resaltando así el creciente interés en este campo.

Históricamente, subproductos lácteos ricos en MFGM, como la mazada obtenida en la fabricación de mantequilla, eran frecuentemente descartados o transformados en alimento para animales mediante secado por pulverización (Lambert et al., 2016). No obstante, el avance en la comprensión de la estructura compleja, y los beneficios nutricionales y de salud de la MFGM ha motivado a investigadores y compañías a explorar métodos para extraer y elaborar productos lácteos enriquecidos con MFGM, añadiendo así un valor significativo a estos. Actualmente, empresas líderes en la industria láctea como Fonterra Co-operative Group Ltd (Auckland, Nueva Zelanda), Arla Foods Ingredients Group P/S (Viby, Dinamarca), Lecico GmbH (Hamburg, Alemania) y Megmilk Snow Brand Co Ltd (Sapporo,

Hokkaido, Japón) están comercializando ingredientes enriquecidos con MFGM o lípidos lácteos complejos, destacándose por ofrecer una variedad de ventajas tecnológicas, funcionales y nutricionales.

En el ámbito actual de la investigación alimentaria, emerge un interés creciente en la elaboración de emulsiones aceite-en-agua (O/W), focalizándose particularmente en el empleo de productos enriquecidos en MFGM como agentes emulsionantes. Esta perspectiva, respaldada por publicaciones científicas (Jiménez-Flores & Brisson, 2008; Lopez et al., 2015, 2019; Singh & Gallier, 2017), se orienta hacia la mejora de productos lácteos y fórmulas infantiles. La elección de la MFGM como agente emulsionante, fundamentada no solo en su origen natural sino también en su composición sustancial de proteínas y fosfolípidos anfífilicos, que le confiere propiedades emulsionantes excepcionales (Dewettinck et al., 2008; Kanno, 1989; Phan et al., 2013). Sin embargo, el método de separación, el tipo de materia prima y el pretratamiento de la nata o de la propia mazada afectan significativamente a la composición de los aislados de MFGM y, por tanto, a sus propiedades emulsionantes (Corredig & Dalgleish, 1997; Kanno, 1989; Phan et al., 2013, 2016). Así, de acuerdo con Corredig & Dalgleish (1997), los materiales enriquecidos con MFGM, extraídos de una mazada industrial, muestran una eficiencia emulsionante inferior en la creación de emulsiones O/W con aceite de soja, en comparación con los obtenidos de una nata fresca. Phan et al. (2013) encontraron que los fragmentos de MFGM, concentrados mediante microfiltración a partir de una mazada reconstituida, poseían propiedades emulsionantes y estabilizadoras superiores, en comparación con las de la mazada en polvo, la leche desnatada en polvo y el caseinato de sodio.

Esta variabilidad en las propiedades emulsionantes subraya una cuestión pendiente: aún no se ha determinado con precisión qué componentes específicos de la MFGM, ya sean los fosfolípidos, las proteínas o una combinación de ambos, son los responsables de su actividad emulsionante. En este contexto, Phan et al. (2016) concluyeron que bajo las condiciones preliminares experimentales que utilizaron en su estudio, el uso de un concentrado proteico procedente de la MFGM en la elaboración de emulsiones O/W presentó una mejor estabilidad emulsionante comparada con aquellas preparadas a partir de un concentrado de fosfolípidos procedente de la MFGM.

A parte de su eficacia como emulsionante, la MFGM surge como un componente de potencial valor nutracéutico, sustentado por investigaciones que destacan sus propiedades bioactivas y su capacidad para enriquecer productos con atributos beneficiosos para la salud, tales como la mejora del rendimiento físico en adultos sanos de mediana edad, la mejora en la elasticidad de la piel en adultos humanos, la reducción en la absorción de colesterol y la prevención de enfermedades coronarias, la mejora de la salud metabólica, la mejora de memoria en ratas envejecidas, el impacto positivo en la digestión de lípidos y el metabolismo lipídico postprandial en ratas (Gassi et al., 2016; Manoni et al., 2021; Rueda, 2014; Spitsberg, 2005; Vanderghem et al., 2010).

Este capítulo de la tesis doctoral se centra en la encapsulación de aceites mediante emulsiones O/W, utilizando un producto comercial específico enriquecido en membrana de glóbulo graso (MFGMP) y con un elevado contenido en fosfolípidos procedente de la elaboración de mantequilla a partir de la grasa del suero de quesería, y el uso de diferentes tecnologías de homogeneización (convencional, microfluidización, ultra alta presión y ultrasonidos). Este producto, seleccionado meticulosamente por sus propiedades distintivas, se caracteriza por su elevado contenido de fosfolípidos y una proporción reducida de triglicéridos en comparación con la mazada convencional (detalle composición disponible en el **Capítulo 3. Materiales y Métodos**). Esta elección estratégica tiene como finalidad explorar y comprender con mayor precisión la contribución individual de los componentes naturales de la MFGM, especialmente en el contexto de este producto enriquecido en fosfolípidos, en la elaboración de emulsiones, sin subestimar la importancia de las tecnologías de homogeneización, ya que juegan un papel crucial en la estabilidad y eficacia de la encapsulación. Estas tecnologías permiten una distribución uniforme de las partículas de grasa y otros componentes bioactivos, lo que se traduce en emulsiones de mayor calidad y estabilidad. Además, la homogeneización adecuada es fundamental para garantizar la liberación controlada de los ingredientes activos, lo que amplifica su potencial terapéutico y nutricional.

En concordancia con estos objetivos, este capítulo no solo se centra en la preparación y caracterización de emulsiones O/W utilizando MFGMP como emulgente, sino que también establece comparaciones significativas con emulsiones obtenidas mediante el uso de mazada, un subproducto lácteo común. Esta comparación exhaustiva posibilita una

evaluación detallada del impacto de estos emulsionantes en diversas propiedades fisicoquímicas de las emulsiones O/W.

Este análisis y comparación se perfilan como una contribución valiosa al entendimiento de las potenciales aplicaciones de estos productos en la mejora de formulaciones emulsionadas, tanto en el ámbito alimenticio como en el desarrollo de nutracéuticos. La relevancia de este estudio se manifestará en su capacidad para proporcionar información valiosa y perspectivas prácticas para la formulación de productos innovadores y funcionales.

### 5.2 Preparación de las emulsiones

Las emulsiones fueron preparadas siguiendo el procedimiento esquematizado en la **Figura 3.2** descrito en los **Apartados 3.3.1** y **3.3.2**. La preparación de emulsiones O/W se llevó a cabo utilizando un 3,05% de MFGMP y como fase oleosa de una mezcla de aceites de chía y girasol al 10% (proporción 1:1, en peso). La cantidad de MFGMP utilizada equivale al 2,11% de proteína total contenida en un 7% de mazada, de manera a dejar variable solo la concentración de los fosfolípidos. Para elaborar la emulsión, se preparó la fase acuosa conteniendo 3,05% de MFGMP, y a continuación, se adicionó la fase oleosa, mezclándose en un agitador rotor-estator (*Ultraturrax*®) obteniéndose así una emulsión gruesa. Finalmente, las emulsiones gruesas fueron homogeneizadas mediante los tratamientos de homogeneización a ultra alta presión (UHPH) a 200 MPa, *Microfluidizer*® (MF) a 100 MPa, ultrasonidos (US) con 40% de amplitud y 10 min, y convencional (CH) a 30 MPa.

Las emulsiones obtenidas se caracterizaron en términos de tamaño de partícula por las técnicas de dispersión de luz (DLS), potencial zeta, reología, y estabilidad física por técnica de dispersión de luz múltiple estática (SMLS) y oxidativa (primaria y secundaria), siguiendo los procedimientos descritos en el **Capítulo 3** de Materiales y métodos.

### 5.3 Caracterización de las emulsiones con MFGMP

La **Tabla 5.1**. muestra el comportamiento de las emulsiones preparadas con MFGMP y 10% de fase oleosa mediante las diferentes técnicas de homogeneización en términos de diámetro medio de partícula, índice de polidispersidad (PdI) y potencial zeta. En lo que respecta al

diámetro medio de las partículas, se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre todas las emulsiones producidas por las diferentes tecnologías. Asimismo, la emulsión con menor diámetro de partícula fue la elaborada por UHPH, seguida por la elaborada por MF, presentando también ambas emulsiones una mayor homogeneidad en su distribución de tamaño de partícula en comparación con el resto de las emulsiones ( $PdI \sim 0,2$ ). Por el contrario, las elaboradas por CH presentaron un diámetro medio de partícula por encima de la micra y un  $PdI$  cercano a 0,9, mientras que aquellas elaboradas por medio de la tecnología de US exhibieron parámetros de partícula intermedios entre MF y CH.

**Tabla 5.1.** Tamaño medio de partícula, índice de polidispersión ( $PdI$ ) y potencial zeta de las emulsiones elaboradas con el producto comercial enriquecido en membrana de glóbulo de grasa (MFGMP) como emulgente y 10% de aceites, homogenizadas por diferentes tecnologías.

Homogeneización	Diámetro medio de partícula (nm)	$PdI$	Potencial zeta (mV)
Convencional	$1307,50 \pm 75,52^a$	$0,89 \pm 0,08^a$	$-28,19 \pm 0,94^a$
<i>Microfluidizer</i> ®	$318,53 \pm 45,82^c$	$0,29 \pm 0,08^c$	$-35,72 \pm 0,80^c$
UHPH	$220,44 \pm 13,24^d$	$0,24 \pm 0,02^c$	$-27,99 \pm 0,67^a$
Ultrasonidos	$641,32 \pm 56,38^b$	$0,53 \pm 0,01^b$	$-33,26 \pm 0,68^b$

<sup>a-b-c-d</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Por otro lado, todas las emulsiones mostraron una carga superficial neta negativa. Las emulsiones elaboradas por CH y UHPH no fueron significativamente diferentes, presentando valores de potencial zeta en torno a  $-28$  mV. En comparación, las emulsiones elaboradas por MF y US exhibieron valores significativamente ( $P < 0,05$ ) más negativos. Valores cercanos a  $-30$  mV o superiores en el potencial zeta, indican una condición que podemos interpretar como una buena estabilidad de las emulsiones. Este umbral, respaldado por la literatura científica y las investigaciones de Barhoum et al. (2018) y Clogston & Patri (2011), señala la presencia de una barrera de alta energía entre las gotas de emulsión. Esta barrera genera una repulsión electrostática efectiva, lo que, en términos prácticos, sugiere una interacción altamente estable entre las partículas de las emulsiones. En consecuencia, estos resultados refuerzan la idea de que las emulsiones, obtenidas mediante estas técnicas de homogeneización, presentan una sólida estabilidad coloidal, esencial para garantizar su durabilidad y calidad a lo largo del tiempo.

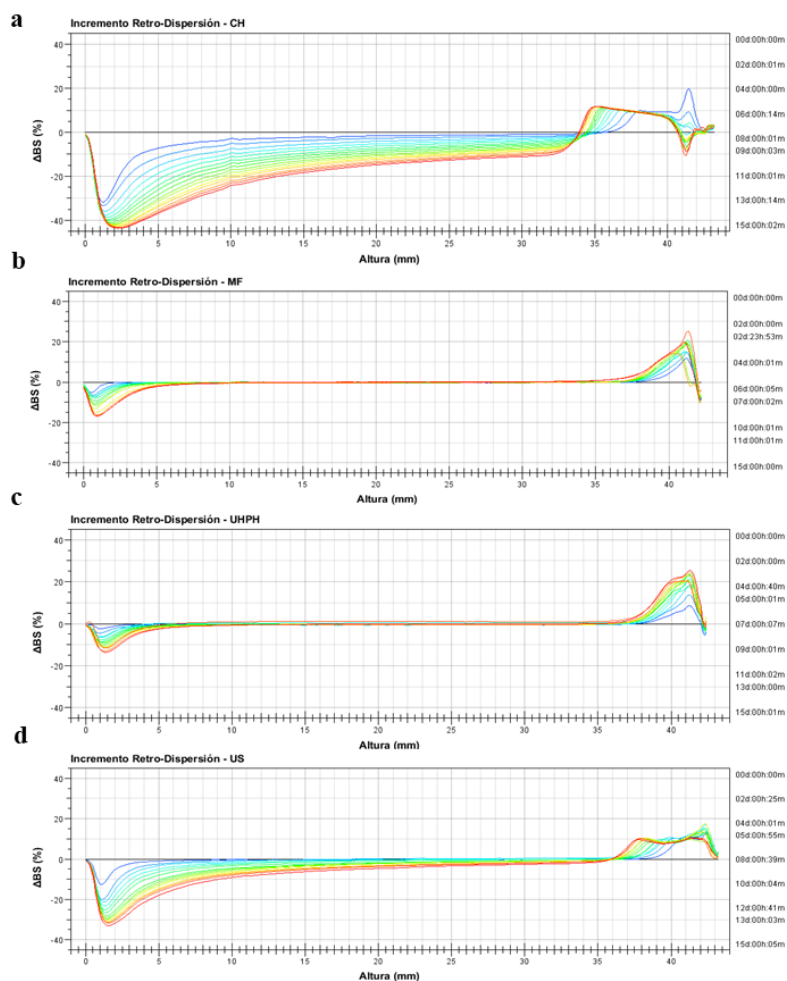
Respecto a los parámetros reológicos analizados, las emulsiones elaboradas por UHPH, CH y US presentaron un índice de consistencia similar (**Tabla 5.2**), mientras que las emulsiones obtenidas por MF mostraron valores de índice de consistencia significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) que el resto de las emulsiones. Con relación al índice de comportamiento al flujo, todas las emulsiones presentaron un comportamiento reológico newtoniano ( $n \sim 1$ ), aunque también fue significativamente diferente, siendo en este caso  $n$  menor en la emulsión obtenida por MF.

**Tabla 5.2.** Parámetros reológicos de índice de consistencia ( $K$ ), índice de comportamiento al fluido ( $n$ ), e índice de correlación ( $R^2$ ) de las emulsiones elaboradas con el producto comercial MFGMP y 10% de fase oleosa, homogenizadas por diferentes tecnologías.

Homogeneización	$K$ ( $\text{Pa} \times \text{s}^n$ )	$n$	$R^2$
<b>Convencional</b>	$0,0018 \pm 0,0001^b$	$1,0709 \pm 0,0042^a$	0,999
<b>Microfluidizer®</b>	$0,0021 \pm 0,0001^a$	$1,0407 \pm 0,0279^b$	0,999
<b>UHPH</b>	$0,0018 \pm 0,0001^b$	$1,0704 \pm 0,0083^a$	0,999
<b>Ultrasonidos</b>	$0,0019 \pm 0,0001^b$	$1,0704 \pm 0,0061^a$	0,999

<sup>a-b</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

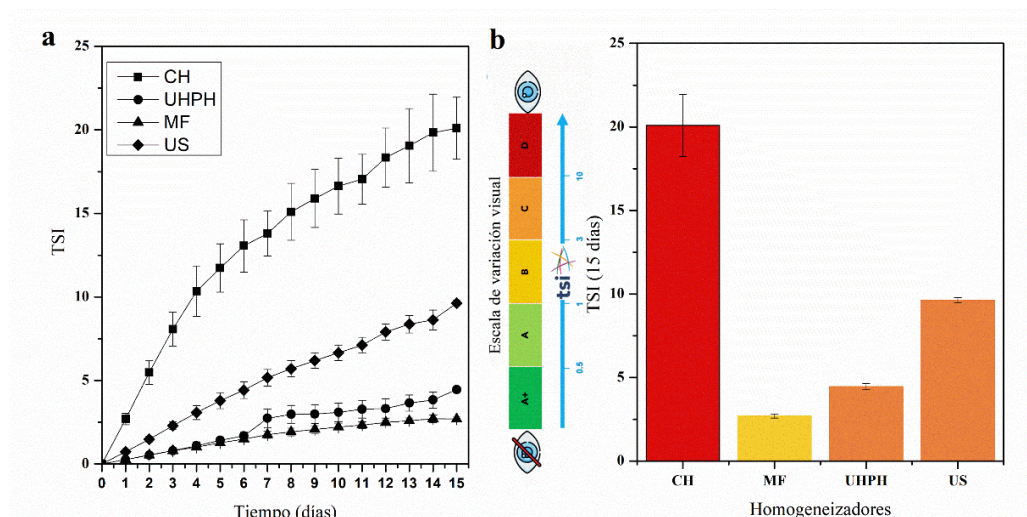
La estabilidad física de las emulsiones producidas por diferentes tecnologías de homogeneización se valoró a lo largo de 15 días de almacenamiento a temperatura ambiente mediante los perfiles de retrodispersión registrados en el equipo Turbiscan (**Figura 5.1**). Todas las emulsiones presentaron un porcentaje de retrodispersión (%ABS) tanto en la parte superior como inferior del tubo, que se traducen en fenómenos de cremado en la parte superior y de clarificación en la parte basal del tubo. La emulsión elaborada por CH fue la que presentó mayor variación de retrodispersión en ambas partes del tubo con el tiempo de almacenamiento, presentando también variaciones de retrodispersión en la parte central del tubo, que sugieren fenómenos de floculación y/o coalescencia durante su almacenamiento. Un comportamiento similar pero menos acusado lo presentó la emulsión elaborada por US. En cambio, las emulsiones elaboradas por UHPH y MF fueron más estables y registraron menos cambios con el tiempo de almacenamiento.



**Figura 5.1.** Perfiles de retrodispersión de las emulsiones conteniendo producto enriquecido en membrana de glóbulo graso como emulgente y estabilizadas por: **a.** Homogenización convencional (CH, 30 MPa), **b.** *Microfluidizer*® (MF, 100 MPa), **c.** Homogeneización a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa), **d.** Ultrasonidos (US, 40% amplitud/10 min) en función del tiempo de almacenamiento (15 días) a temperatura ambiente.

La retrodispersión de la muestra puede variar debido a su inestabilidad, y el total de las variaciones se pueden cuantificar mediante el índice de estabilidad de Turbiscan (TSI). Cuanto mayor sea el valor de TSI, mayor es la inestabilidad de la muestra. En la **Figura 5.2a** se muestra la cinética del TSI a lo largo del tiempo de almacenamiento para las diferentes emulsiones analizadas, apreciándose que todas las emulsiones incrementaron su TSI, siendo las elaboradas por CH las que mostraron un mayor aumento en comparación con las elaboradas por MF y UHPH, las cuales presentaron un menor incremento del TSI, seguidas de las elaboradas por US que presentaron un comportamiento intermedio entre estas últimas y las tratadas por CH.

En el día 15 de almacenamiento (**Figura 5.2b**) se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en los valores de TSI entre las diferentes emulsiones. La emulsión elaborada por CH presentó el valor más alto de TSI ( $20 \pm 1,9$ ), seguida por la emulsión elaborada por US que alcanzó un valor de  $9,6 \pm 0,2$ . La emulsión elaborada por MF tuvo el valor más bajo de TSI ( $2,7 \pm 0,1$ ), seguida por la emulsión elaborada por UHPH con un valor de  $4,05 \pm 0,2$ . Es importante destacar que no hubo diferencias significativas en los valores de TSI entre estas dos últimas emulsiones hasta el día 6 de almacenamiento, sin embargo, a partir del día 7 la emulsión MF presentó valores de TSI ligeramente inferiores en comparación a la emulsión UHPH. Estos resultados podrían explicarse en términos del tamaño de partícula de las emulsiones, y en el caso de las emulsiones MF y UHPH por la mayor viscosidad de las emulsiones MF en comparación a las UHPH.



**Figura 5.2.** Índice de estabilidad del Turbiscan global (TSI siglas en inglés): **a.** Cinética de estabilidad general de las emulsiones en función al tiempo de almacenamiento (15 días) y tecnología de homogeneización utilizada (Homogeneización convencional, CH, 30 MPa; Homogeneización a ultra alta presión, UHPH, 200 MPa; *Microfluidizer*®, MF, 100 MPa; y Ultrasonido, US, , 40% amplitud/10 min); **b.** Comparación del TSI general de las emulsiones a los 15 días de almacenamiento: letras distintas sobre la columna: indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ). Cada columna está coloreada de acuerdo con la escala visual TSI y está representada por: A+: visualmente excelente, color verde oscuro; A: Visualmente bueno, color verde claro; B: Variaciones detectadas por el Turbiscan, no visuales en la mayoría de los casos (>90%), color amarillo; C: Advertencia visual, color naranja y D: Variaciones extremas, fenómenos de inestabilidad visibles, color rojo.

Según la escala de visualización del TSI, la emulsión CH se clasificaría en el grupo D ( $TSI < 10$ ), lo que indica una variación extrema e importante en la retrodispersión y una inestabilidad visible y significativa. Por otro lado, las emulsiones US y UHPH se clasificarían en el grupo C, lo que sugiere que los fenómenos de inestabilidad pueden ser visibles o no. Finalmente, las emulsiones MF se encuentran en un grupo inferior (B). A pesar

de ello, las diferencias entre las emulsiones MF y UHPH, aunque significativas, fueron mínimas. Por lo tanto, estos resultados indican que las tecnologías MF y UHPH son capaces de producir sistemas más estables desde un punto de vista físico.

En referencia a la estabilidad oxidativa forzada a 50 °C durante un periodo de almacenamiento de 15 días, se valoraron los niveles de hidroperóxidos de las emulsiones en estudio (**Tabla 5.3**). Se pudo observar que todas las emulsiones incrementaron sus niveles de hidroperóxidos a lo largo del periodo de almacenamiento (15 días) de manera significativa ( $P < 0,05$ ), salvo en el caso de las emulsiones producidas por CH, las cuales mantuvieron sus niveles de hidroperóxido entre los días 7 y 15, quizás por transformación de estos en productos de oxidación secundaria. Los valores de hidroperóxidos obtenidos en las emulsiones en día 1 fue en el orden de MF>US>CH>UHPH. Sin embargo, al día 15 de almacenamiento las emulsiones elaboradas por US fueron las que presentaron mayores valores de hidroperóxidos, seguidas de las elaboradas por MF, después CH y con menor concentración de hidroperóxidos fueron las estabilizadas por UHPH.

**Tabla 5.3.** Concentraciones de hidroperóxidos (mM/kg aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas con producto enriquecido en membrana de glóbulo graso y 10% de aceites, homogeneizadas por diferentes tecnologías, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

Homogeneización	Hidroperóxidos (mM/kg aceite)		
	Día 1	Día 7	Día 15
<b>Convencional</b>	10,78 ± 0,23 <sup>c, y</sup>	60,85 ± 6,35 <sup>b, x</sup>	62,05 ± 2,43 <sup>c, x</sup>
<b>Microfluidizer®</b>	21,32 ± 0,73 <sup>a, z</sup>	78,87 ± 1,80 <sup>a, y</sup>	91,84 ± 0,14 <sup>b, x</sup>
<b>UHPH</b>	8,37 ± 0,32 <sup>d, z</sup>	31,37 ± 2,01 <sup>c, y</sup>	53,34 ± 2,46 <sup>d, x</sup>
<b>Ultrasonidos</b>	17,12 ± 0,64 <sup>b, z</sup>	79,55 ± 2,20 <sup>a, y</sup>	117,22 ± 11,99 <sup>a, x</sup>

<sup>a-b-c-d</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ) entre las emulsiones elaboradas con las diversas técnicas de homogeneización.

<sup>x-y-z</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ) de las emulsiones entre los diferentes días.

La **Tabla 5.4** muestra el incremento en los valores de MDA con el tiempo de almacenamiento en todas las emulsiones analizadas. Las emulsiones producidas por CH fueron las que presentaron los valores más altos de MDA en el día 1, mientras que las emulsiones elaboradas por US presentaron los valores más bajos en comparación al resto de las emulsiones. En el día 7, continuó siendo la emulsión producida por CH la que presentó

valores más elevados de MDA en comparación con el resto de las emulsiones, las cuales no presentaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre ellas. Finalmente, en el día 15 de almacenamiento, las emulsiones elaboradas por UHPH, seguidas de las preparadas por MF, fueron las que presentaron valores más bajos de MDA, siendo en este orden las emulsiones que fueron más estables a nivel oxidativo, seguido de las obtenidas por CH y US. La notable mejora en la estabilidad oxidativa observada en las emulsiones sometidas a tratamientos UHPH y MF, en comparación con las obtenidas mediante CH y US, podría explicarse por el hecho de que las condiciones de procesamiento mediante UHPH y MF afectan de manera distinta a los componentes de la MFGM y a su organización durante la formación de la emulsión. Esta alteración parece ser beneficiosa, proporcionando una protección reforzada a las gotas de aceite gracias a la MFGM, lo cual contribuye significativamente a la reducción de su oxidación. Este fenómeno resalta la importancia de seleccionar métodos de homogeneización adecuados para mejorar la estabilidad y calidad de las emulsiones.

**Tabla 5.4.** Concentraciones de malondialdehído (MDA) ( $\mu\text{M}/\text{kg}$  aceite) obtenidas en las emulsiones elaboradas con producto enriquecido en membrana del glóbulo graso y 10% de aceites, homogeneizadas por diferentes tecnologías, durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

Homogeneización	MDA ( $\mu\text{M}/\text{kg}$ aceite)		
	Día 1	Día 7	Día 15
<b>Convencional</b>	44,87 $\pm$ 0,43 <sup>a, z</sup>	100,88 $\pm$ 0,42 <sup>a, y</sup>	136,69 $\pm$ 10,52 <sup>a, x</sup>
<b>Microfluidizer®</b>	20,79 $\pm$ 0,28 <sup>c, z</sup>	52,17 $\pm$ 1,18 <sup>b, y</sup>	104,19 $\pm$ 5,07 <sup>b, x</sup>
<b>UHPH</b>	24,56 $\pm$ 1,72 <sup>b, z</sup>	49,66 $\pm$ 3,34 <sup>b, y</sup>	80,90 $\pm$ 0,15 <sup>c, x</sup>
<b>Ultrasonidos</b>	18,07 $\pm$ 0,43 <sup>d, z</sup>	56,54 $\pm$ 3,33 <sup>b, y</sup>	136,95 $\pm$ 18,43 <sup>a, x</sup>

<sup>a-b-c-d</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ) entre las emulsiones.

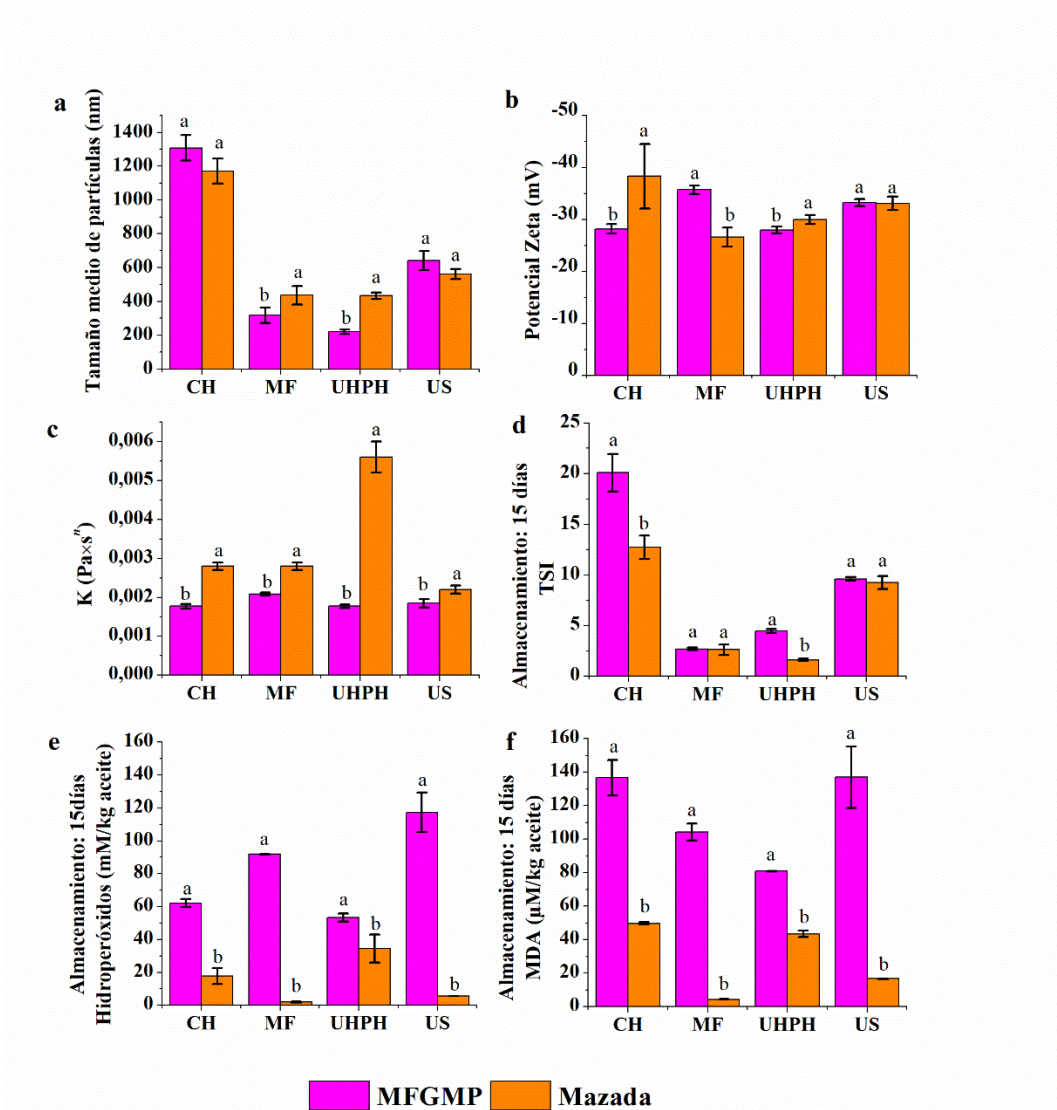
<sup>x-y-z</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ) de las emulsiones entre los diferentes días.

## 5.4 Estudio comparativo fisicoquímico entre emulgentes

Con el fin de distinguir el efecto de distintos emulgentes en la elaboración de emulsiones mediante diversas técnicas de homogeneización, se realizó una comparación del comportamiento fisicoquímico de las emulsiones preparadas con dos materiales emulsionantes diferentes: MFGMP (un producto comercial altamente purificado rico en

MFGM y con una concentración elevada de lípidos polares y proteínas) y mazada (suero íntegro de mantequilla secado por atomización).

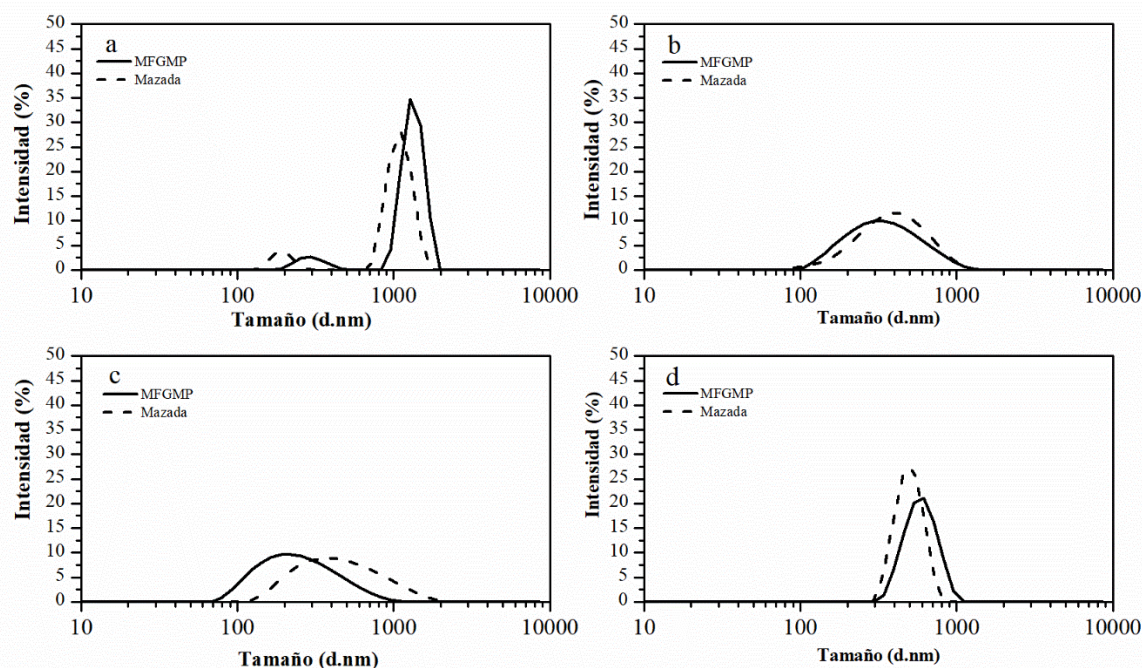
La **Figura 5.3a** permite visualizar la variación en el tamaño medio de partícula en función del tipo de emulgente utilizado y del método de procesado.



**Figura 5.3.** Comparación del comportamiento fisicoquímico de emulsiones preparadas con diferentes materiales emulsionantes: producto enriquecido en membrana del glóbulo graso (MFGMP, color rosa) y mazada (color naranja) obtenidas por: Homogeneización Convencional (CH, 30 MPa); *Microfluidizer*® (MF, 100 MPa); Homogeneización a Ultra Alta Presión (UHPH, 200 MPa); y Ultrasonidos (US, 40% amplitud y 10 min). a. Diámetro medio de partícula (nm), b. Potencial zeta (mV), c. K: índice de consistencia ( $\text{Pa} \times \text{s}^n$ ), d. Índice estabilidad Turbiscan global a los 15 días de almacenamiento, e. Contenido de hidropéroxidos (mM/kg de aceite) y f. Contenido de malondialdehído ( $\mu\text{M}/\text{kg}$  aceite) a los 15 días de almacenamiento.

<sup>a-b</sup> Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las emulsiones (MFGMP vs Mazada) en el mismo tratamiento.

Al comparar los efectos de los distintos emulgentes, se ha podido constatar que las emulsiones elaboradas con el MFGMP presentaron tamaños de partícula inferiores ( $P < 0,05$ ) en ambas tecnologías en comparación con las emulsiones elaboradas con mazada. Sin embargo, al utilizar las tecnologías de CH y US, se observó una ligera disminución del tamaño de partícula en las emulsiones elaboradas con mazada, aunque esta diferencia no resultó ser significativa ( $P > 0,05$ ). La distribución del tamaño de partícula (**Figura 5.4**) permitió validar estos resultados, evidenciando un comportamiento de distribución de tamaño de partícula similar en cada uno de los equipos de homogeneización para los emulgentes estudiados.



**Figura 5.4.** Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones formuladas con diferentes materiales emulsionantes: Producto enriquecido en membrana del glóbulo graso (MFGMP, línea continua) y mazada (línea de trazos). a. Homogeneización convencional (CH, 30 MPa); b. *Microfluidizer*® (MF, 100 MPa); c. Homogeneización a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa) y d. Ultrasonidos (US, 40% amplitud y 10 min).

El MFGMP contiene una mayor cantidad de lípidos polares, como los fosfolípidos, en comparación con la mazada (ver **apartado 3.2.2**). Estos lípidos tienen una afinidad natural por las interfaces de las emulsiones, lo que significa que pueden ayudar a estabilizar las gotas de la emulsión y reducir su tamaño. Además, el MFGMP es un producto más purificado que la mazada lo que significa que puede tener menos impurezas presentes que podrían interferir con la formación de emulsiones estables. En términos de procesado, los resultados han demostrado que el MFGMP puede producir emulsiones con tamaños de partícula más

pequeños cuando se procesa con tecnologías de MF y de UHPH. Esto puede deberse a la mayor capacidad emulsionante de los lípidos polares presentes en el MFGMP, que permiten una mejor interacción con la superficie de las gotas de la emulsión y, por lo tanto, reducir su tamaño. En contraste, cuando se utilizan técnicas de procesamiento menos intensivas, como la CH y el US, no se observaron grandes diferencias en los tamaños de partículas entre el MFGMP y la mazada (Li & Xiang, 2019). Una posible explicación para la incapacidad de las técnicas de CH y US de reducir eficazmente el tamaño de partícula con ambos emulgentes, en comparación con las técnicas de UHPH y MF, podría residir en las características iniciales de la emulsión, como un tamaño de partícula inicial demasiado grande y una alta viscosidad. En tales circunstancias, la energía aplicada por los métodos CH y US podría no ser suficiente para fragmentar eficazmente las gotas de aceite. Además, durante estos procesos podría producirse un fenómeno concurrente de ruptura y agregación de gotas, limitando la reducción del tamaño de partícula. En el caso específico del US, otro factor a considerar es la inestabilidad o el colapso prematuro de las burbujas de cavitación, lo cual podría obstaculizar el logro de una disminución significativa en el tamaño de las partículas. Estos factores conjuntos sugieren que la elección de la técnica de homogeneización debe ser cuidadosamente considerada en función de las propiedades físicas de la emulsión para optimizar los resultados deseados (Li & Xiang, 2019).

En cuanto a los valores de potencial zeta (**Figura 5.3b**), se observaron diferencias entre los materiales emulgentes en las emulsiones preparadas por CH, MF y UHPH, con valores más negativos en las emulsiones CH y UHPH, y menos negativos en MF al utilizar mazada respecto del MFGMP. El potencial zeta es una medida de la carga eléctrica en la superficie de las partículas en suspensión. Esta carga eléctrica se produce por la adsorción de iones en la superficie de las partículas y puede verse afectada por la naturaleza del emulsionante utilizado y las condiciones de procesamiento (Bhattacharjee, 2016). La diferencia en el potencial zeta de las emulsiones elaboradas con mazada y MFGMP podría deberse a la composición (más o menos ricos en lípidos anfifílicos y proteínas) y pureza de los emulsionantes, y a las diferentes interacciones de estos con las gotas de aceite. En cuanto al uso de diferentes técnicas de homogeneización, la diferencia en el potencial zeta podría estar relacionada con la intensidad (presión, amplitud de sonicación) y la forma en que se aplican las fuerzas de corte a la emulsión, que afectan a la exposición de los grupos funcionales cargados más negativamente del emulgente (Bhattacharjee, 2016; Li & Xiang, 2019).

Al comparar los índices de consistencia de las emulsiones (**Figura 5.3c**), se observó un aumento significativo ( $P < 0,05$ ) en aquellas que contenían mazada como emulgente, independientemente de la técnica de homogeneización utilizada. Esto podría ser debido a la proporción de cada uno de los emulgentes utilizados en la formulación de las emulsiones, y también a las diferencias en la composición de estos emulgentes dependiente de su origen (Calvo et al., 2020). En las emulsiones conteniendo MFGMP se utilizó una concentración de este emulgente del 3,05%, mientras que fue del 7% de mazada en las emulsiones con mazada, con el objetivo de obtener una equivalencia en contenido proteico del 2,11% en ambas emulsiones. Así, la cantidad de sólidos procedentes de la mazada y utilizados en la formulación de estas emulsiones mínimo duplicó los procedentes del MFGMP utilizado en las emulsiones homólogas correspondientes, pudiendo afectar la viscosidad de estas emulsiones. Además, la mazada tiene una composición proteica cercana a la leche conteniendo caseína y proteína de suero, a parte del material proteico de la MFGM. Sin embargo, el MFGMP es un producto rico en MFGM altamente concentrado en lípidos, pero también en proteína del suero ya que este aislado procede del suero de quesería, siendo la cantidad de caseína muy limitada en este producto. Según Singh & Li (2022) las dispersiones de proteínas del suero no agregadas presentan una viscosidad mucho más baja comparado con los caseinatos, y una adsorción preferencial de estos últimos sobre las proteínas del suero en la interfase de emulsiones O/W formuladas con mezclas de ambas proteínas lácteas. La presencia de caseína en la mazada podría resultar en una mayor viscosidad aparente y un índice de consistencia más alto en las emulsiones formuladas con mazada, en comparación a las obtenidas con el MFGMP.

Finalmente, es importante tener en cuenta que la técnica de homogeneización de la emulsión puede influir en el tamaño y el potencial zeta de las partículas de la fase dispersa. A su vez, este cambio en el tamaño de las partículas puede afectar la viscosidad y el índice de consistencia de la emulsión (Li & Xiang, 2019; Zhou et al., 2022). Si existe una mayor variación o polidispersión en el tamaño de las partículas, esto puede contribuir a una viscosidad aparente más elevada y un índice de consistencia más alto debido a la posible formación de agregados en la muestra.

En resumen, las diferencias en la cantidad y composición de los emulsionantes, y en el sistema de homogeneización podrían afectar la afinidad de los emulsionantes por la fase continua y la fase oleosa, y la estabilidad de la emulsión, afectando la viscosidad y el índice de consistencia de la emulsión. Corredig y Dalgleish (1997) apuntaron que la estabilidad de las emulsiones formuladas con productos enriquecidos en MFGM depende en gran medida del tipo de aislado que se utilice. Además, como se ha observado previamente, la estabilidad de las emulsiones también se ve influenciada por el tipo de procesamiento utilizado. En general, cuanto más pequeños y homogéneos sean los glóbulos de grasa, mayor estabilidad se encontrará en la matriz de la emulsión.

La **Figura 5.3d** muestra una comparativa del índice de estabilidad física TSI entre las emulsiones formuladas con los emulgentes en estudio, después de 15 días de almacenamiento. Los datos recogidos mostraron únicamente diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en la estabilidad de las emulsiones cuando se utilizaron los equipos UHPH y CH, pero no entre las emulsiones preparadas por MF y US. Estas diferencias consistieron en una menor estabilidad física (mayor TSI) de las emulsiones formuladas con el MFGMP en ambos métodos de homogeneización, indicando una mayor inestabilidad de estas emulsiones en comparación con las elaboradas con mazada. Las variaciones en la estabilidad física notadas entre las emulsiones tratadas con UHPH y CH, empleando MFGMP y mazada como emulgentes, se vinculan con sus distintas concentraciones lipídicas y proteicas, así como con la propensión de los lípidos y las proteínas a ubicarse en la interfaz O/W durante el proceso de tratamiento. En este contexto, los procedimientos UHPH y CH podrían propiciar la disposición de más proteínas que lípidos en la interfaz, promoviendo así una estabilidad física superior.

En cuanto a la estabilidad oxidativa, las **Figuras 5.3e y 5.3f** muestran los niveles de oxidación primaria y secundaria, observándose que las emulsiones con MFGMP presentaron una mayor concentración de hidroperóxidos y de MDA independientemente de la técnica de homogeneización utilizada, en comparación con las emulsiones con mazada. Sin embargo, se observa que la técnica de homogeneización utilizada influye en la estabilidad oxidativa de las emulsiones, dependiendo del material de MFGM utilizado. Así, las emulsiones producidas por MF a partir de mazada, que presentaron los niveles de oxidación lipídica más bajos, cuando estas se elaboraron utilizando el MFGMP, exhibieron los niveles más elevados

de oxidación primaria y secundaria, con concentraciones de hidroperóxidos y de MDA 48,08 y 24,12 veces más elevados, respectivamente, en comparación a sus homólogas formuladas con mazada. Similarmente, este cambio de comportamiento también se evidenció cuando la tecnología de homogeneización utilizada fue los US, obteniéndose emulsiones elaboradas con MFGMP con concentraciones de hidroperóxidos y de MDA 21,20 y 8,20 veces superior, en comparación con aquellas formuladas con mazada. Sin embargo, hay que recordar que las emulsiones conteniendo mazada y elaboradas con US a los 7 días de almacenamiento a 50 °C presentaron niveles de MDA de 60,06  $\mu\text{M}/\text{kg}$  aceite, para a los 15 días disminuir a cantidades de 16,70  $\mu\text{M}/\text{kg}$  aceite, sugiriendo fenómenos de transformación de productos secundarios a terciarios de oxidación lipídica (**Tabla 4.27**), e indicando que posiblemente las diferencias del nivel de oxidación secundaria entre emulsiones conteniendo mazada y el MFGMP sean menores que las indicadas anteriormente. En cambio, las emulsiones elaboradas con mazada y obtenidas por UHPH y CH, que presentaron los niveles de oxidación lipídica más elevados, en comparación a las tecnologías de MF y US, también incrementaron sus niveles de oxidación lipídica al utilizar el MFGMP, pero en una proporción mucho menor que sus homólogas obtenidas por MF y US. En concreto las concentraciones de hidroperóxidos y de MDA fueron 3,49 y 2,75 veces superior en el caso de las emulsiones conteniendo MFGMP tratadas por CH, y 1,55 y 1,87 veces en caso de las obtenidas por UHPH, en comparación a sus homólogas formuladas con mazada (Ghelichi et al., 2023). Estos cambios de estabilidad oxidativa observados entre emulsiones tratadas por MF y US en comparación con aquellas preparadas por UHPH y CH, podrían estar asociados con la concentración y tipo de proteínas y lípidos presentes en el MFGMP y mazada, y su reordenación en el interfaz O/W generado durante el tratamiento. La distribución de proteínas en el interfaz O/W desempeña un papel crucial en la limitación de la oxidación en las emulsiones, atribuido principalmente a su capacidad de formar capas O/W, que actúan como una barrera física con fuerzas estéricas que dificultan la difusión de prooxidantes hacia la fase lipídica (Ghelichi et al., 2023).

Asimismo, una mayor exposición de lípidos en el interfaz O/W puede llevar a un incremento considerable de la oxidación de la emulsión ya que los lípidos son muy susceptibles a oxidarse. La estabilidad oxidativa de las emulsiones MF y US preparadas con mazada muestran que la utilización de esas técnicas resulta en una mayor presencia y composición de proteínas en la interfaz, lo que conduce a una mejor protección del aceite dentro de la

gota de aceite. La estabilidad oxidativa disminuye con el aumento de la presión en las emulsiones UHPH y CH preparadas con mazada (rica en fosfolípidos), lo que confirma que una partición favorable de proteínas y lípidos entre la fase acuosa y la interfaz es más importante que la distribución del tamaño de las gotas. En el caso de las emulsiones preparadas con MFGMP, se observa que la estabilidad oxidativa mejora al utilizar los tratamientos de UHPH y CH, como consecuencia de una mayor disposición de proteínas en el interfaz.

En general, estos resultados sugieren que la elección de la técnica de homogeneización y el tipo y cantidad de componentes del emulgente (proteínas y fosfolípidos) pueden influir significativamente en la estabilidad oxidativa de las emulsiones. Es importante considerar estos factores al formular productos alimenticios y diseñar procesos de producción para garantizar una vida útil adecuada y una calidad óptima del producto.

Después de analizar los resultados obtenidos, podemos concluir que el emulgente MFGMP presenta una mayor afinidad por la fase oleosa. Esto sugiere que la porción hidrófoba del emulgente es probablemente más grande o más polar, lo que le permite ser más atraído hacia la fase oleosa que hacia la fase acuosa, lo que se traduce en una distribución del tamaño de partícula más uniforme en estas emulsiones. Sin embargo, es importante tener en cuenta que tanto la estabilidad física como la oxidativa de la emulsión pueden verse afectadas. La mayor afinidad del emulgente por la fase oleosa puede mejorar la estabilización de la fase oleosa y una distribución más uniforme de los componentes de la emulsión, pero también puede hacer que la emulsión sea más susceptible a la oxidación y a otros procesos de deterioro que afectan la fase oleosa. Por lo tanto, es necesario considerar cuidadosamente la elección del emulgente y las condiciones de almacenamiento para mantener la calidad de la emulsión a largo plazo.

## 5.5 Conclusiones

Este capítulo presenta un análisis de las propiedades de emulsiones O/W, enfocándose en aquellas que contienen un 10% de fase oleosa y emplean un emulgente específicamente enriquecido en MFGM, obtenidas mediante una gama de tecnologías de homogeneización

(CH, MF, UHPH y US). Además, se realizó una comparativa detallada de los resultados obtenidos con estas emulsiones frente a los generados al utilizar mazada como emulsionante. Este enfoque permitió una evaluación más profunda de las diferencias y similitudes en las características de las emulsiones, proporcionando una comprensión más completa de la influencia de los emulsionantes y las tecnologías de homogeneización en la calidad del producto final.

Las emulsiones con MFGMP y producidas por UHPH y MF destacaron por presentar distribuciones de tamaño de partícula más homogéneas y tamaños óptimos. En contraste, las emulsiones obtenidas por CH y US exhibieron partículas de mayor tamaño, con una carga negativa equiparable. Se observó que las emulsiones MF demostraron un índice de consistencia significativamente superior en términos reológicos. La evaluación de la estabilidad física y oxidativa a lo largo de 15 días resaltó la superioridad de las emulsiones elaboradas por MF y UHPH, evidenciando una elevada estabilidad física y menores niveles de compuestos de oxidación secundaria durante su almacenamiento, en comparación con las otras tecnologías de homogeneización.

La comparación entre los emulsionantes MFGMP y mazada indicó que la composición del emulgente, la técnica de homogeneización y condiciones de operación, inciden de manera crucial en la distribución de los componentes del emulgente en el interfaz O/W, y, por tanto, en la formación y estabilidad de las emulsiones. Los hallazgos mostraron variaciones significativas en las características de las emulsiones, tales como el tamaño de las partículas, el índice de polidispersión, el potencial zeta, las propiedades reológicas, y la estabilidad tanto física como oxidativa. El uso del MFGMP llevó a la formación de emulsiones con gotas menores, logradas con técnicas de MF y de UHPH, y con un índice de consistencia significativamente menor en todas las emulsiones, una mejora de estabilidad física para los tratamientos CH y UHPH, pero un mayor nivel de oxidación lipídica en todos los tratamientos de homogeneización, mientras que la mazada contribuyó a la obtención de emulsiones con una elevada consistencia y estabilidad oxidativa.

En conclusión, la elección de la tecnología de homogeneización y el emulsionante es determinante para obtener emulsiones con características deseadas. Las condiciones específicas de MF a 100 MPa y UHPH a 200 MPa emergen como las más prometedoras

cuando se utilizan emulgentes ricos en MFGM, generando emulsiones con tamaño de partícula óptimo, estabilidad física y oxidativa superiores, en comparación a los sistemas de CH y US. Este estudio proporciona una base técnica valiosa para la formulación y preparación de emulsiones, destacando la relevancia de considerar tanto la tecnología de homogeneización como el emulsionante para alcanzar propiedades óptimas en emulsiones O/W.

## 5.6 Referencias bibliográficas

- Barhoum, A., García-Betancourt, M. L., Rahier, H., & Van Assche, G. (2018). Physicochemical characterization of nanomaterials: polymorph, composition, wettability, and thermal stability. In *Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructures* (pp. 255–278). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-51254-1.00009-9>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bourlieu, C., & Michalski, M.-C. (2015). Structure–function relationship of the milk fat globule. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 18(2), 118–127. <https://doi.org/10.1097/mco.000000000000138>
- Calvo, M. V., Martín-Hernández, M. C., García-Serrano, A., Castro-Gómez, M. P., Alonso-Miravalles, L., García-Martín, R., Megino-Tello, J., Alonso, L., & Fontecha, J. (2020). Comprehensive characterization of neutral and polar lipids of buttermilk from different sources and its milk fat globule membrane isolates. *Journal of Food Composition and Analysis: An Official Publication of the United Nations University, International Network of Food Data Systems*, 86(103386), 103386. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103386>
- Chen, J., Chen, X., Zhou, G., & Xu, X. (2022). Ultrasound: A reliable method for regulating food component interactions in protein-based food matrices. *Trends in Food Science & Technology*, 128, 316–330. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.08.014>
- Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2011). Zeta Potential Measurement. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 63–70). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6)
- Corredig, M., & Dalgleish, D. G. (1997). Isolates from industrial buttermilk: Emulsifying properties of materials derived from the milk fat globule membrane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4595–4600. <https://doi.org/10.1021/jf970531f>

- Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T. T., Messens, K., & Van Camp, J. (2008). Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, *18*(5), 436–457. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.10.014>
- Gallier, S., Laubscher, A., & Jiménez-Flores, R. (2014). The Milk Fat Globule Membrane. In *Food Structures, Digestion and Health* (pp. 107–142). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-404610-8.00004-9>
- Gassi, J. Y., Blot, M., Beaucher, E., Robert, B., Leconte, N., Camier, B., Rousseau, F., Bourlieu, C., Jardin, J., Briard-Bion, V., Lambert, S., Gésan-Guiziou, G., Lopez, C., & Gaucheron, F. (2016). Preparation and characterisation of a milk polar lipids enriched ingredient from fresh industrial liquid butter serum: Combination of physico-chemical modifications and technological treatments. *International Dairy Journal*, *52*, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.08.012>
- Ghelichi, S., Hajfathalian, M., Yesiltas, B., Sørensen, A.-D. M., García-Moreno, P. J., & Jacobsen, C. (2023). Oxidation and oxidative stability in emulsions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *22*(3), 1864–1901. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13134>
- Jiménez-Flores, R., & Brisson, G. (2008). The milk fat globule membrane as an ingredient: why, how, when? *Dairy Science & Technology*, *88*(1), 5–18. <https://doi.org/10.1051/dst:2007005>
- Jukkola, A., & Rojas, O. J. (2017). Milk fat globules and associated membranes: Colloidal properties and processing effects. *Advances in Colloid and Interface Science*, *245*, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.010>
- Kanno, C. (1989). Emulsifying properties of bovine milk fat globule membrane in milk fat emulsion: Conditions for the reconstitution of milk fat globules. *Journal of Food Science*, *54*(6), 1534–1539. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb05153.x>
- Keenan, T. W., & Mather, I. H. (2007). Intracellular origin of milk fat globules and the nature of the milk fat globule membrane. In *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids* (pp. 137–171). Springer US.
- Lambert, S., Leconte, N., Blot, M., Rousseau, F., Robert, B., Camier, B., Gassi, J.-Y., Cauty, C., Lopez, C., & Gésan-Guiziou, G. (2016). The lipid content and microstructure of industrial whole buttermilk and butter serum affect the efficiency of skimming. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, *83*, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.002>
- Li, Y., & Xiang, D. (2019). Stability of oil-in-water emulsions performed by ultrasound power or high-pressure homogenization. *PloS One*, *14*(3), e0213189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213189>
- Lopez, C. (2011). Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure. *Current Opinion in*

*Colloid & Interface Science*, 16(5), 391–404.  
<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2011.05.007>

- Lopez, C., Cauty, C., & Guyomarc'h, F. (2015). Organization of lipids in milks, infant milk formulas and various dairy products: role of technological processes and potential impacts. *Dairy Science & Technology*, 95(6), 863–893. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0263-0>
- Lopez, C., Cauty, C., & Guyomarc'h, F. (2019). Unraveling the complexity of milk fat globules to tailor bioinspired emulsions providing health benefits: The key role played by the biological membrane. *European Journal of Lipid Science and Technology: EJLST*, 121(1). <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800201>
- Manoni, M., Cattaneo, D., Mazzoleni, S., Giromini, C., Baldi, A., & Pinotti, L. (2021). Milk fat globule membrane proteome and micronutrients in the milk lipid fraction: Insights into milk bioactive compounds. *Dairy*, 2(2), 202–217. <https://doi.org/10.3390/dairy2020018>
- Phan, T. T. Q., Asaduzzaman, M., Le, T. T., Fredrick, E., Van der Meeren, P., & Dewettinck, K. (2013). Composition and emulsifying properties of a milk fat globule membrane enriched material. *International Dairy Journal*, 29(2), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.10.014>
- Phan, T. T. Q., Le, T. T., Van de Walle, D., Van der Meeren, P., & Dewettinck, K. (2016). Combined effects of milk fat globule membrane polar lipids and protein concentrate on the stability of oil-in-water emulsions. *International Dairy Journal*, 52, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.08.003>
- Rueda, R. (2014). The role of complex lipids in attaining metabolic health. *Current Cardiovascular Risk Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1007/s12170-013-0371-4>
- Singh, H. (2006). The milk fat globule membrane—A biophysical system for food applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11(2–3), 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.002>







# Capítulo 6

## **Emulsiones O/W con mazada y aceites ricos en omega-3 y 6 para fórmulas lácteas infantiles UHT: Homogeneización Convencional vs. Ultra Alta Presión**

### **6.1 Introducción**

La lactancia materna, además de ser fundamental en la nutrición infantil, ofrece una serie de beneficios para los recién nacidos. Estos incluyen la protección contra enfermedades, tanto infecciosas como no infecciosas, la prevención de alergias e intolerancias, así como la reducción del riesgo de diarreas e infecciones respiratorias (James et al., 2009, Kelishadi & Farajian, 2014).

La leche materna se compone de aproximadamente un 1% de proteínas, un 3,8% de grasa y un 7% de lactosa. Estas proteínas incluyen principalmente proteínas del suero y caseínas, junto con una pequeña cantidad de proteínas asociadas a la membrana del glóbulo graso (MFGM) (Guo, 2021).

La grasa en la leche materna aporta más de la mitad de las necesidades energéticas de los recién nacidos, y está presente en forma de glóbulos de grasa recubiertos por una membrana compleja denominada membrana del glóbulo graso (MFGM) (Chen & Sun, 2021). La composición típica de ácidos grasos en la leche humana incluye un 39% de ácidos grasos monoinsaturados, un 35% de ácidos grasos saturados y un 18% de ácidos grasos polinsaturados de cadena larga, siendo el ácido palmítico (16:0), el oleico (18:1 n-9) y el linoleico (18:2 n-6) los ácidos grasos predominantes (He et al., 2020).

El contenido de lactosa en la leche humana es elevado en comparación con otras especies de mamíferos y proporciona una fuente importante de energía para el recién nacido. Además, la leche materna contiene oligosacáridos que tienen actividad prebiótica y antimicrobiana, contribuyendo a su protección (Guo, 2021).

Ciertos componentes de la leche materna albergan propiedades bioactivas notables, como la lactoferrina, la lisozima y la  $\kappa$ -caseína que destacan por sus capacidades antibacterianas. De igual manera, la  $\alpha$ -lactoalbúmina, durante su procesamiento en el sistema gastrointestinal, suministra al lactante péptidos prebióticos e inmunoestimulantes (Lönnerdal, 2016). Adicionalmente, la MFGM contiene proteínas que, en experimentos de laboratorio, han demostrado poseer efectos antivirales y antibacterianos (Hernell et al., 2016; Lönnerdal, 2016; López et al., 2019). Asimismo, los lípidos polares (esfingolípidos y fosfolípidos) presentes en la MFGM tienen el potencial de fomentar el desarrollo neuronal de los neonatos y modulación de la microbiota intestinal (Bhinder et al., 2017; Chen & Sun, 2021, O'Mahony, et al., 2020). La leche materna indiscutiblemente proporciona una abundante fuente de nutrientes y energía, siendo considerada el estándar ideal para respaldar el óptimo crecimiento y desarrollo de los recién nacidos (Gallier et al., 2015). No obstante, en situaciones en las que la leche materna no está disponible, ya sea por razones médicas o elección de los padres, se recurre a la fórmula láctea infantil (FLI) para cubrir las necesidades nutricionales de los recién nacidos. Esta fórmula se compone de manera que se asemeja en términos nutricionales a la leche materna (Phosanam et al., 2021).

En la actualidad, existen tres variantes principales de FLI en el mercado: en polvo, concentrada líquida y lista para el consumo (Martin et al., 2016). La composición de estas fórmulas varía según la etapa de desarrollo del lactante, que generalmente abarca desde el nacimiento hasta los 6 meses, de 6 a 12 meses, y de 12 meses en adelante. Los componentes proteicos predominantes tanto en la FLI como en la leche materna son la proteína de suero y la caseína (Phosanam et al., 2021). Las FLIs con una proporción mayor de proteína de suero en comparación con la caseína (60:40) se digieren de manera más eficiente, ya que su composición proteica se asemeja a la que se encuentra en la leche materna (Owens et al., 2013). La proporción deseada de proteína de suero y caseína se puede lograr mediante la adición de concentrados o aislados de proteína de suero a la leche desnatada (Masum et al., 2020).

Diferentes organizaciones como la Asociación Europea de Bancos de Leche (EMBA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), aparte de promocionar la leche materna como la alimentación normal, óptima y más conveniente para los bebés humanos, han señalado que dar leche de origen animal sin procesar directamente a los bebés lactantes no es

recomendable. En la grasa de origen bovino, el ácido palmítico se encuentra en la parte externa de los triglicéridos y puede generar jabones de calcio durante la digestión de los lípidos, lo que puede retrasar la absorción de calcio en los recién nacidos. Como resultado, en la producción de FLIs, se ha optado por sustituir la grasa láctea sin procesar con emulsiones de aceites, fabricadas mediante la emulsión de una mezcla de aceites vegetales con emulsionantes de origen biológico o sintético (Chen & Sun, 2021).

En la leche materna, se encuentran, en cantidades variables, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido araquidónico (AA). El ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) es el precursor del DHA, un tipo de ácido graso comúnmente conocido como ácido graso omega-3 ( $\omega$ -3). Por otro lado, el ácido linoleico (LA) es el precursor del ácido araquidónico (AA), que también es conocido como ácido graso omega-6 ( $\omega$ -6). Agregar LA y ALA a las FLIs es una práctica estándar debido a su importancia en el desarrollo neurológico, cognitivo y visual de los recién nacidos que crecen rápidamente (Owens et al., 2013).

Diversos aceites vegetales se utilizan como fuente de lípidos en la elaboración de FLIs, entre ellos el aceite de girasol, de soja, de canola, de linaza y, más recientemente, el aceite de chía. El aceite de chía (*Salvia hispánica* L.) se destaca por tener el porcentaje más elevado de ALA, que puede alcanzar hasta un 68%, en comparación con cualquier otra fuente vegetal conocida (Ayerza & Coates, 2011), y contiene aproximadamente un 20% de LA en su composición de aceite (Abedi & Sahari, 2014). El aceite de girasol, por su parte, contiene un alto porcentaje de ácidos grasos mono y poliinsaturados (91%), dividido por igual entre los ácidos oleico ( $\omega$ -9) y LA (Chowdhury et al., 2007).

Las FLIs y la leche materna difieren en su composición en varios niveles. A nivel molecular, los triglicéridos, las micelas de caseína y las proteínas del suero presentan diferencias en su naturaleza y estructura. En un nivel supramolecular, las partículas de grasa láctea dispersas varían en tamaño y en la naturaleza de su interfaz de manera significativa (Bourlieu et al., 2015). Para ilustrar este contraste, un ejemplo sería el tamaño de los glóbulos de grasa en la leche materna, que tienen un diámetro promedio de 3 a 5  $\mu$ m, mientras que, en las FLIs, estos glóbulos son mucho más pequeños, con un tamaño de 0,4  $\mu$ m. Además, la capa que recubre estos glóbulos de grasa difiere; en la leche materna, es la MFGM la que cumple esta función,

mientras que, en las FLIs, diferentes proteínas, dependiendo de la formulación, desempeñan este papel (Lopez, 2011; Gallier et al., 2015).

En cuanto al proceso de fabricación, las FLIs se elaboran mediante emulsiones de tipo aceite en agua (O/W). Durante este proceso, las proteínas desempeñan un papel crucial al influir en las características físicas de las formulaciones, especialmente en la estabilización de la fase oleosa en la emulsión de aceite en agua (McDermott, 1987). Estas proteínas, compuestos poliméricos que incorporan segmentos hidrófobos e hidrófilos, tienen la capacidad de adherirse a la superficie de las gotas de aceite durante la mezcla, reduciendo la tensión en la interfaz entre el aceite y el agua. En la producción de alimentos para lactantes, los ingredientes basados en proteínas de suero son ampliamente preferidos debido a sus propiedades nutricionales y funcionales, destacando su capacidad emulsionante excepcional (Figueiredo Furtado et al., 2021).

Para minimizar las diferencias entre la composición y estructura de la leche materna y las FLIs, se hace necesario incorporar ingredientes que se asemejen lo más posible a los componentes de la leche materna y emplear procesos tecnológicos que contribuyan a mantener la estabilidad del sistema. En este sentido, la MFGM, que actúa como un agente emulsionante en alimentos, se convierte en una opción adecuada. La MFGM es rica en lípidos polares y proteínas, que bajo ciertas condiciones actúan como agentes tensioactivos, lo que elimina la necesidad de agregar otros emulsionantes (Jukkola et al., 2019). La cantidad total de lípidos polares es comparable entre la grasa de la leche humana ( $20,4 \pm 2,8$  mg/100 mL) y la grasa de la leche bovina ( $19,2 \pm 0,8$  mg/100 mL) (Hageman et al., 2019).

La MFGM se obtiene de subproductos de la industria lechera, como la nata, la mantequilla y la grasa láctea anhidra, que concentran la parte lipídica de la leche y separan la fase acuosa, resultando en productos como la mazada o suero de mantequilla, la mazada procedente del suero de quesería y el denominado *beta serum* procedente de la fabricación de la grasa anhidra (Vanderghem et al., 2010). Estos productos ricos en MFGM pueden ser empleados como ingredientes en formulaciones de alimentos, reemplazando en parte los sólidos lácteos (Aghababaei et al., 2021). La mazada contiene lactosa, minerales y proteínas de la leche desnatada (caseínas y proteínas del suero) en proporciones similares a las de la leche desnatada. Sin embargo, la concentración de lípidos polares y proteínas procedentes de la

MFGM en la mazada en base seca es considerablemente mayor que en la leche desnatada, la leche entera y la nata, lípidos que son interesantes por sus propiedades emulgentes y funcionales de salud (Vanderghem et al., 2010). Diversos grupos de investigación y fabricantes de fórmulas infantiles han explorado la incorporación de productos e ingredientes enriquecidos con MFGM o lípidos complejos en sus productos, con la iniciativa de imitar la estructura del glóbulo graso de la leche humana para potenciar el crecimiento y desarrollo de los lactantes (Gallier et al., 2015). Empresas como Mead Johnson Nutrition Inc. (Chicago, EEUU) con su línea Enspire™, Fonterra Co-operative Group Ltd (Auckland, Nueva Zelanda) con Annum™, y Semper AB (Sundbyberg, Suecia) con Baby Semp, están comercializando en distintos mercados fórmulas infantiles que contienen MFGM o lípidos lácteos complejos. Estos productos, a menudo combinados con otros nutrientes bioactivos, están diseñados para apoyar el desarrollo cerebral y cognitivo de los recién nacidos.

La producción de las FLIs implica la estabilización de las emulsiones utilizando procesos tecnológicos como la homogeneización convencional, ya que las emulsiones con gotas de gran tamaño (emulsiones convencionales  $>1 \mu\text{m}$ ) tienen poca estabilidad física y oxidativa en comparación con las microemulsiones. En cuanto a los procesos tecnológicos de homogeneización, existe un gran interés en utilizar emulsiones submicrónicas/nano para el suministro de compuestos bioactivos y la mejora de la estabilidad física, sobre todo en aquellos productos esterilizados con vida útil elevada. La homogeneización a ultra alta presión (UHPH) es una tecnología de procesamiento no térmica que puede mejorar la estabilidad física de las emulsiones reduciendo el tamaño de partícula en emulsiones submicrónicas/nano, estabilizando el producto frente al cremado y la pérdida de componentes bioactivos (Dumay et al., 2013; Hebishy et al., 2013).

El objetivo de este estudio es comparar FLIs líquidas UHT elaboradas a partir de emulsiones que fueron sometidas a dos diferentes tratamientos de homogeneización, convencional (CH) a 30 MPa y por UHPH a 200 MPa. Ambas emulsiones O/W partieron de una misma base formulada con una mezcla (50:50) de aceites de chía (*Salvia hispánica* L.) y girasol (*Helianthus annuus* L.) (10%), y mazada (7%) como agente emulgente. Las FLIs fueron caracterizadas en cuanto a su composición fisicoquímica, distribución del tamaño de partícula, observación de la microestructura, color, comportamiento reológico, y estabilidades física y oxidativa lipídica (oxidación primaria y secundaria).

## 6.2 Caracterización de las fórmulas lácteas infantiles

### 6.2.1 Composición de las fórmulas lácteas infantiles

En la **Tabla 6.1**, se detalla la composición de las FLIs, que se obtuvieron mediante la inclusión de emulsiones tratadas por homogenización a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa) y el método convencional (CH, 30 MPa). Los niveles de grasa, lactosa y proteína coinciden con los valores teóricos calculados para este estudio, indicando una formulación precisa y altamente equiparable a los macronutrientes presentes en la leche materna. Estos valores también se asemejan a los utilizados en la elaboración de FLIs, según lo documentado en diversas investigaciones (Lönnerdal & Hernell, 1998; Bourlieu et al., 2015; Tari et al., 2018).

**Tabla 6.1.** Composición de las fórmulas lácteas infantiles obtenidas por inclusión de emulsiones tratadas por homogenización convencional (CH, 30 MPa) y a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa).

Parámetros	Tratamientos	
	CH	UHPH
Grasa (%)	3,35 ± 0,00	3,36 ± 0,28
Lactosa (%)	7,04 ± 0,09	6,99 ± 0,08
Proteína (%)	1,5 ± 0,07	1,42 ± 0,03
Extracto seco (%)	11,95 ± 0,18	11,51 ± 0,09
pH	6,75 ± 0,05	6,76 ± 0,06

En el contexto de este estudio, el producto evaluado antes de someterse al proceso de tratamiento térmico UHT presentó un pH de  $6,99 \pm 0,05$  para la FLI con emulsión UHPH y  $6,98 \pm 0,06$  en el caso de la convencional. Después del tratamiento térmico, se observó una disminución del pH a  $6,76 \pm 0,06$  y  $6,75 \pm 0,05$ , respectivamente. Este fenómeno puede atribuirse a la degradación de la lactosa, la desfosforilación de las caseínas y a los cambios en la concentración de componentes al calentar productos lácteos por encima de los 100 °C, como han señalado Lund et al. (2021). De manera interesante, a diferencia de lo observado por estos investigadores, el pH se mantuvo constante hasta el día 60 de almacenamiento, manteniéndose en  $6,87 \pm 0,02$  para la FLI con emulsión UHPH y  $6,86 \pm 0,03$  para la FLI con emulsión CH.

### 6.2.2 Determinación del tamaño y distribución del tamaño de partícula

La cantidad y tamaño de las gotas en una emulsión son aspectos cruciales que influyen en características fundamentales como apariencia, textura y sabor, y estos elementos desempeñan un papel crucial en la estabilidad del producto a lo largo de su vida útil (McClements, 2010). La información detallada en la **Tabla 6.2** revela que la emulsión generada a través de la tecnología UHPH presenta tamaños medios de partícula expresados en términos de superficie (D<sub>3,2</sub>) y volumen (D<sub>4,3</sub>) que son significativamente más reducidos ( $P < 0,05$ ) en comparación con la emulsión producida por CH. Específicamente, estos tamaños son aproximadamente seis veces menores, subrayando la eficacia de la aplicación de la tecnología UHPH para la disminución del tamaño de partículas, como han corroborado estudios anteriores realizados por otros investigadores (Hebishy et al., 2015; Fernandez-Avila & Trujillo, 2017).

**Tabla 6.2** Comparación de medias y desviaciones estándar de los parámetros de tamaño de partícula D<sub>3,2</sub> y D<sub>4,3</sub> (µm) para las emulsiones obtenidas por homogeneización convencional (CH, 30 MPa) y a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa) el día de elaboración.

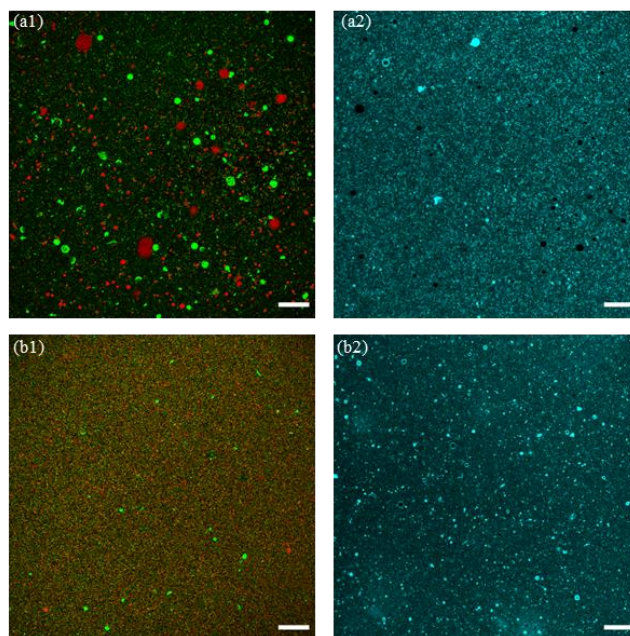
Tratamientos	Tamaño de partícula	
	D <sub>3,2</sub>	D <sub>4,3</sub>
CH	2,30 ± 0,24 <sup>a</sup>	3,89 ± 0,22 <sup>a</sup>
UHPH	0,38 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,69 ± 0,06 <sup>b</sup>

<sup>a-b</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos para cada parámetro ( $P < 0,05$ ).

Complementando los datos de la **Tabla 6.2**, la **Figura 6.1** presenta imágenes capturadas con microscopía láser confocal de las emulsiones producidas mediante las tecnologías de UHPH y CH. Estas imágenes revelan una clara variabilidad en el tamaño de las partículas, siendo más pronunciada en las emulsiones tratadas con el método convencional (CH) en comparación con las obtenidas mediante UHPH. Se observa de manera evidente que las partículas en las emulsiones UHPH son más pequeñas y uniformes que las de las emulsiones CH, especialmente en lo que respecta a los glóbulos de grasa (mostrados en color rojo) y los agregados proteicos (mostrados en color verde), confirmando así los resultados del analizador de tamaño de partícula (**Figura 6.1, a1 y b1**). Estos resultados concuerdan con investigaciones previas, como el estudio de Hebishy et al. (2017), donde emulsiones compuestas por un 1-5% de caseinato como emulsionante y un 20% de aceite, tratadas con UHPH (200 MPa), exhibieron partículas más pequeñas y una estructura más uniforme en

comparación con las emulsiones tratadas con la homogeneización convencional (15 MPa). En otro estudio de Hebishy et al. (2015), que también examinó emulsiones con un 20% de aceite, pero con diferentes porcentajes de aislado de proteína de suero (1-4%), se observó que las emulsiones tratadas con UHPH (200 MPa) presentaron partículas más pequeñas en comparación con las tratadas por CH (15 MPa), independientemente del porcentaje de emulsionante utilizado.

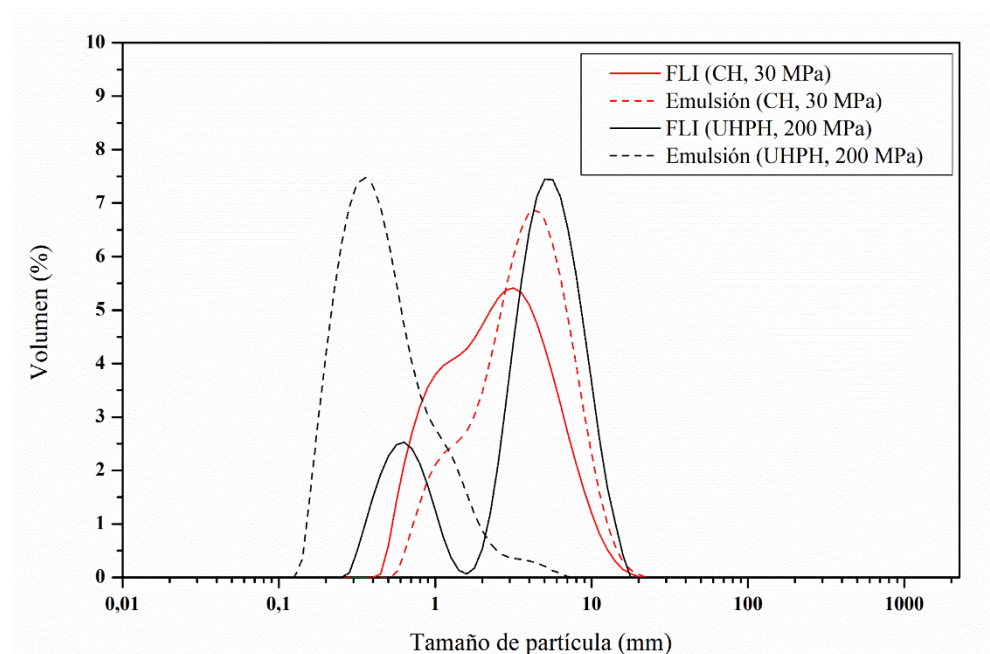
Aunque hay diferencias notables en los tipos y contenidos de aceites y proteínas utilizados en los estudios mencionados, estos resultados ofrecen una visión general sobre cómo se comportan las emulsiones bajo dos condiciones distintas de presión de homogeneización, utilizando las dos principales proteínas de la leche como agentes emulsionantes. Es importante señalar que en los estudios citados anteriormente no se empleó específicamente la mazada, que contiene caseína, proteínas del suero y está enriquecida en MFGM (fosfolípidos y glicoproteínas), con alta funcionalidad como agente emulsionante. En relación con los componentes de la mazada, la tinción *Rh-DOPE* evidenció que los fosfolípidos de la mazada también formaron parte del recubrimiento de las partículas en ambas emulsiones (**Figura. 7.1, a2 y b2**).



**Figura 6.1.** Microscopía láser confocal de las emulsiones con 7% mazada y 10% aceite obtenidas por (a) homogeneización convencional (CH, 30 MPa) y por (b) homogeneización a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa). Emulsiones CH  $\times 63$  (a) y UHPH  $\times 63$  (b) con tinción *Nile Red* y *Fast Green* (1) y *Rh-DOPE* (2). Colores tinción: Rojo, Fase aceite; Verde, Proteínas de la mazada; Azul, Fosfolípidos de la mazada. La barra equivale a 25  $\mu\text{m}$ .

En la **Figura 6.2**, se presenta el perfil de distribución del tamaño de partícula para las emulsiones producidas mediante CH y UHPH, así como de sus FLIs respectivas. En la **Tabla 6.3**, se detallan los tamaños medios de partícula expresados en superficie ( $D_{3,2}$ ) y volumen ( $D_{4,3}$ ) de las FLIs UHT elaboradas mediante la incorporación de emulsiones producidas por CH o UHPH, durante un período de almacenamiento de 60 días.

Aunque se identificaron diferencias significativas en el análisis del tamaño de partícula de las emulsiones obtenidas mediante UHPH y CH, las FLIs resultantes de la adición de estas emulsiones no mostraron diferencias significativas en el parámetro  $D_{3,2}$ . La combinación de la incorporación de emulsiones en la preparación de las FLIs, junto con el proceso térmico UHT aplicado, desencadenó fenómenos de agregación en las proteínas del suero (que constituyen el 60% de la proteína total en esta formulación) y en los glóbulos de grasa. Esto condujo a la formación de agregados lipoproteicos que aumentaron el tamaño de partícula global. Este efecto fue más pronunciado en el caso de las FLIs elaboradas con la emulsión UHPH, que incluso exhibieron valores de  $D_{4,3}$  superiores a los de las FLIs elaboradas a partir de la emulsión CH.



**Figura 6.2.** Perfil de distribución del tamaño de partícula para las emulsiones obtenidas por homogeneización convencional (CH, 30 MPa) (línea de trazos, rojo) y a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa) (línea de trazos, negro), así como para las fórmulas lácteas infantiles (FLI) adicionadas de sus respectivas emulsiones CH (línea, rojo) y UHPH (línea, negro), en el día de su elaboración.

Un estudio previo llevado a cabo por Lund et al. (2021) señaló que el tratamiento UHT provoca la formación de agregados en las lactoglobulinas, componentes presentes en los concentrados de proteína del suero, en las leches líquidas infantiles. En una investigación de Cattaneo et al. (2009), se examinó la formación de diversas moléculas como indicadores de daño térmico en fórmulas infantiles líquidas, y se encontró que los mayores daños se observaban en las fórmulas diseñadas para recién nacidos debido a su contenido más elevado de proteína de suero, la cual, según se sugiere, experimenta cambios y daños térmicos durante el proceso de elaboración hasta su secado por atomización. Este descubrimiento también recibió respaldo en un estudio de Contreras-Calderón et al. (2008), el cual incluyó la evaluación de seis proveedores diferentes de concentrados de proteína de suero utilizados como materia prima en la formulación de FLIs.

**Tabla 6.3.** Medias y desviaciones estándar de los parámetros de tamaño de partícula D<sub>3,2</sub> y D<sub>4,3</sub> (µm) para las leches infantiles adicionadas de emulsiones obtenidas por homogeneización convencional (CH, 30 MPa) y a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa).

Días de almacenamiento	Tratamientos			
	CH		UHPH	
	D <sub>3,2</sub>	D <sub>4,3</sub>	D <sub>3,2</sub>	D <sub>4,3</sub>
1	2,09 ± 0,24 <sup>a,x</sup>	3,76 ± 0,60 <sup>a,y</sup>	2,46 ± 0,56 <sup>ab,x</sup>	4,56 ± 0,12 <sup>a,x</sup>
7	2,03 ± 0,18 <sup>a,x</sup>	3,65 ± 0,42 <sup>a,y</sup>	2,87 ± 1,10 <sup>ab,x</sup>	4,63 ± 0,12 <sup>a,x</sup>
15	2,31 ± 0,42 <sup>a,x</sup>	3,80 ± 0,20 <sup>a,x</sup>	2,52 ± 0,65 <sup>ab,x</sup>	3,80 ± 0,75 <sup>a,x</sup>
30	2,08 ± 0,22 <sup>a,x</sup>	3,84 ± 0,68 <sup>a,x</sup>	3,00 ± 1,13 <sup>a,x</sup>	5,20 ± 1,96 <sup>ab,x</sup>
60	2,15 ± 0,27 <sup>a,x</sup>	3,97 ± 0,73 <sup>a,y</sup>	1,81 ± 0,04 <sup>b,x</sup>	6,71 ± 0,55 <sup>b,x</sup>

D<sub>3,2</sub>: diámetro medio en relación con la superficie-peso de las partículas.

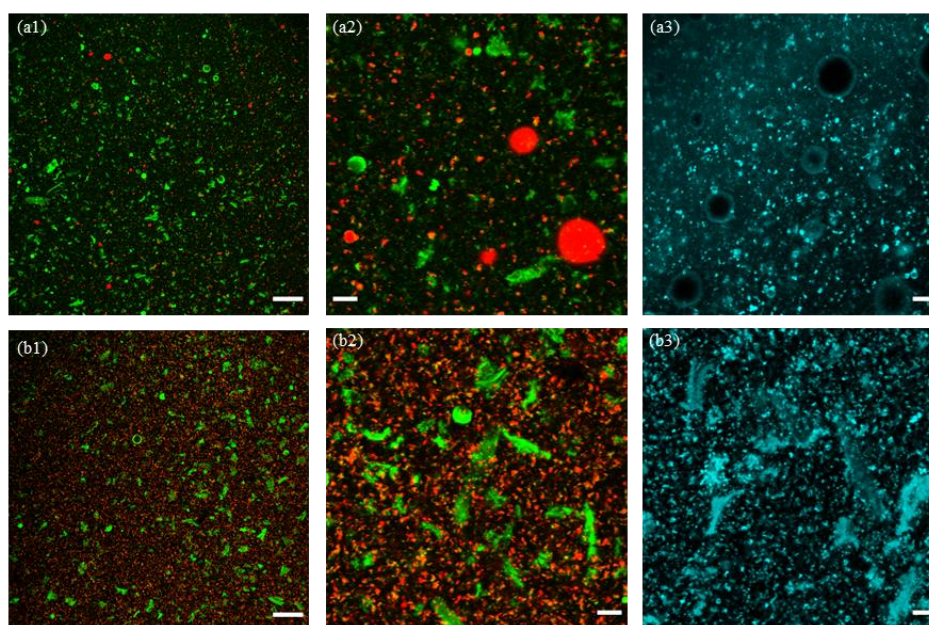
D<sub>4,3</sub>: diámetro medio en relación con el volumen-peso de las partículas.

<sup>a-b</sup> Letras diferentes en la misma columna indican que existen diferencias significativas (P < 0,05) para cada parámetro de tamaño y tratamiento a lo largo de los días.

<sup>x-y</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (P < 0,05) para cada parámetro de tamaño de partícula entre tratamientos.

La **Figura 6.3** presenta las micrografías obtenidas mediante microscopía confocal de las FLIs, observándose que la FLI elaborada con la emulsión UHPH (**Figura 6.3 b1 y b2**) exhibe glóbulos de grasa más pequeños en comparación con su homóloga tratada por CH (**Figura 6.3 a1 y a2**). Sin embargo, en ambas leches se evidencia la presencia de agregados proteicos y lipoproteicos, siendo particularmente intensos e irregulares en la FLI que contiene la emulsión UHPH. Estos agregados se tiñen con las tinciones *Nile Red + Fast Green* y *Rh-DOPE*, mostrando su naturaleza lipoproteica. Estos datos corroboran los resultados obtenidos en la evaluación del tamaño de partículas en las FLIs.

La presencia de agregados más grandes y, por ende, de tamaños de partícula mayores en las FLIs elaboradas con emulsiones UHPH, podría explicarse a partir de las observaciones realizadas por Liang et al. (2013). En su estudio, trabajaron con emulsiones de aceite al 10%, que contenían un 8,5% de proteína total a base de un concentrado de proteína del suero (WPC80) y estaban estabilizadas con caseinatos, sometidas a tratamientos térmicos de 120 °C durante 10 min. A través de la observación microscópica, indicaron que las emulsiones que incluían caseinato como agente emulgente y proteínas del suero mostraban mayor estabilidad y menos agregados proteicos en comparación con las emulsiones en las que no se utilizaba emulgente o se empleaban surfactantes no iónicos.



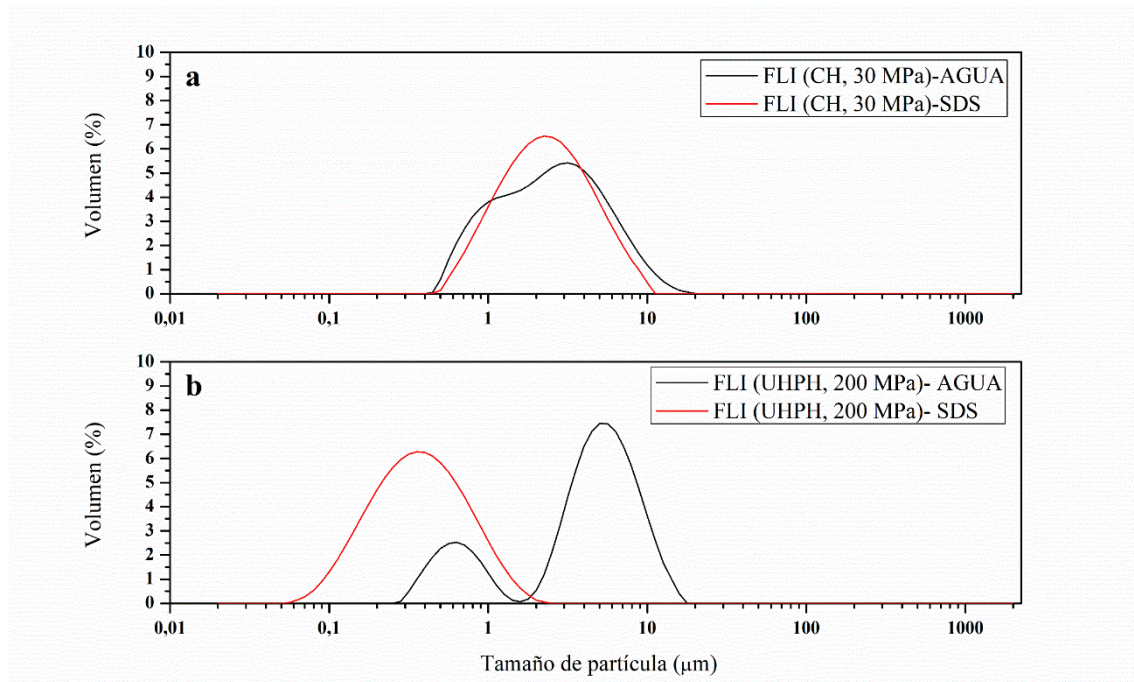
**Figura 6.3.** Microscopía láser confocal de las fórmulas lácteas infantiles (FLI) UHT conteniendo emulsiones con 7% mazada y 10% aceite obtenidas por homogeneización (a) convencional (CH, 30 MPa) y (b) a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa). Micrografías de las FLIs a  $\times 63$  con tinción *Nile Red* y *Fast Green* (1) y zoom  $\times 4$  con tinciones *Nile Red* y *Fast Green* (2) y *Rh-DOPE* (3).

En este estudio, se empleó la mazada como agente emulgente, siendo esta una mezcla que incluye MFGM rica en fosfolípidos y glicoproteínas, así como diversos componentes de la leche, entre ellos, proteínas del suero y caseína. La explicación propuesta para los mayores agregados observados en la emulsión UHPH se basa en la distribución de los componentes de la mazada (MFGM, proteínas del suero y caseínas) en la interfase aceite-agua al utilizarse como agente emulgente en la producción de emulsiones. Estos componentes rodean las pequeñas gotas de lípidos en proporciones variables según el método de homogeneización

utilizado, dejando el excedente de material emulgente en la fase acuosa. Basándonos en el estudio de Liang et al. (2013), se sugiere que la presencia de caseína libre tiene la capacidad de reducir los agregados térmicos de proteínas del suero. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que el tratamiento UHPH hace que gran parte de la caseína de la mazada se distribuya en la interfase aceite-agua, quedando una cantidad insuficiente en la fase continua para estabilizar los agregados de proteínas del suero. En contraste, en la emulsión CH, al tener un tamaño de partícula considerablemente mayor que su equivalente obtenido por UHPH, la interfase aceite-agua consumiría menos material emulgente de la mazada, permitiendo una mayor cantidad de caseína en la fase continua. Esto podría actuar como estabilizante de la proteína del suero, resultando en una menor formación de agregados de proteínas del suero.

Con el propósito de verificar la formación de agregados de naturaleza lipoproteica, se realizaron mediciones de tamaño de partícula utilizando SDS al 1% como agente dispersante. **La Figura 6.4** presenta las curvas de distribución del tamaño de partícula, mostrando que ambos tratamientos generan curvas de distribución bimodales, las cuales se convierten en unimodales al emplear SDS. Al comparar ambas curvas, se observa que la distribución del tamaño de partícula de la FLI que contiene la emulsión CH (**Figura 6.4a**) experimenta cambios mínimos en su forma y tamaño. En contraste, la curva de distribución de la FLI elaborada con la emulsión UHPH (**Figura 6.4b**) muestra una transición del tamaño promedio de partículas de 1-10  $\mu\text{m}$  a 0,1-1  $\mu\text{m}$ , que serían los tamaños de partícula correspondientes a este tratamiento si no hubiera agregados presentes. Estas observaciones respaldan la existencia de fenómenos de agregación entre partículas proteicas y lipídicas, formando agregados lipoproteicos, que son más prominentes en la FLI que contiene la emulsión UHPH.

En relación con la evolución de los tamaños medios durante el almacenamiento a temperatura ambiente, la FLI adicionada con emulsión CH no mostró diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en las diversas mediciones realizadas entre los días 1 y 60, manteniendo una media de  $D_{3,2} \sim 2,13 \mu\text{m}$  y  $D_{4,3} \sim 3,80 \mu\text{m}$ . Por otro lado, en el caso de la FLI adicionada con emulsión UHPH, se evidenciaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) a lo largo del período de evaluación, con una media de  $D_{3,2} \sim 2,53 \mu\text{m}$  y diferencias entre los días 30 y 60, así como una media de  $D_{4,3} \sim 4,98 \mu\text{m}$  con diferencias entre los días 1 al 15 y el día 60.



**Figura 6.4.** Perfil de distribución del tamaño de partículas de las fórmulas lácteas infantiles (FLI) conteniendo emulsiones obtenidas por homogeneización (a) convencional (CH, 30 MPa) y (b) a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa), diluidas en agua destilada (línea roja) y diluidas con SDS (línea negra).

En cuanto a la influencia de los sistemas de homogeneización empleados en la preparación de emulsiones, no se observaron diferencias significativas para  $D_{3,2}$ , pero sí para  $D_{4,3}$ . Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en los días 1, 7 y 60, siendo la FLI elaborada con la emulsión UHPH la que presentó tamaños de partícula mayores en comparación con su contraparte elaborada con la emulsión tratada por CH.

### 6.2.3 Análisis de color

Es ampliamente reconocido que los tratamientos de ultra alta temperatura (UHT) ocasionan alteraciones en las proteínas y generan subproductos de la reacción de Maillard (Valero et al., 2001). Estos subproductos surgen a través de reacciones entre grupos nucleofílicos de las proteínas y azúcares reductores. Dado que las fórmulas de las leches infantiles analizadas en este estudio contienen una cantidad considerable de proteínas y lactosa, un azúcar reductor, se anticipa la aparición de un fenómeno evidente de pardeamiento no enzimático durante el almacenamiento debido a estas reacciones químicas.

En la **Tabla 6.4** se detallan las características de color de las FLIs al día 1 y después de 60 días de almacenamiento. A lo largo del periodo, el parámetro de color  $L^*$  no experimentó

cambios significativos ( $P > 0,05$ ) en ambas FLIs. No obstante, se identificaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en el parámetro  $L^*$  entre la FLI adicionada con emulsión UHPH y su homóloga con emulsión CH al final de periodo de almacenamiento, siendo la FLI adicionada de emulsión UHPH más luminosa, lo que se relaciona con el mayor WI de las FLIs adicionadas de emulsión UHPH. Los índices de blancura y de amarillez (WI y YI, respectivamente, por sus siglas en inglés) se utilizan ampliamente para generar valores que se correlacionan estrechamente con las preferencias de los consumidores en cuanto a colores blancos y amarillentos, respectivamente.

Estos índices combinan matemáticamente los valores  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  en un solo término. Un WI más alto indica un material más blanco y un YI más alto indica un tono más amarillo (Pathare et al., 2013). El valor más alto del WI en la FLI adicionada de emulsión UHPH podría estar relacionado con la cantidad de agregados de gotas en comparación con el proceso de homogeneización CH, ya que el número y el tamaño de las partículas contribuyen a la reflexión de la luz (McClements, 2002). Las partículas grandes dispersan la luz con mayor intensidad que las más pequeñas, lo que provoca un aumento en el WI de las emulsiones (McClements, 2011).

**Tabla 6.4.** Medias y desviaciones estándar de los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , diferencia de color global ( $\Delta E^*$ ), índice de amarillento (YI), e índice de blancura (WI) para las leches infantiles adicionadas de emulsiones obtenidas por homogeneización convencional (CH, 30 MPa) y a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa).

Parámetros de color	Tratamientos			
	CH		UHPH	
	Día 1	Día 60	Día 1	Día 60
$L^*$	$88,19 \pm 1,52^{ab}$	$86,98 \pm 2,19^b$	$90,46 \pm 1,09^a$	$89,83 \pm 0,8^a$
$a^*$	$-0,02 \pm 0,6^b$	$1,20 \pm 0,7^a$	$-0,10 \pm 1,50^b$	$0,46 \pm 0,07^{ab}$
$b^*$	$13,57 \pm 1,08^a$	$14,19 \pm 1,43^a$	$11,91 \pm 0,57^b$	$12,74 \pm 1,52^{ab}$
$\Delta E^*$	$3,32 \pm 0,83$	$3,36 \pm 1,33$	–	–
YI	$22,00 \pm 2,12^a$	$23,36 \pm 2,95^a$	$17,68 \pm 1,08^b$	$20,27 \pm 2,61^{ab}$
WI	$86,56 \pm 1,71^{ab}$	$85,21 \pm 2,49^b$	$89,20 \pm 1,17^a$	$88,35 \pm 1,05^{ab}$

<sup>a-b</sup> Letras diferentes en la misma fila señalan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos para cada parámetro.

$\Delta E^*$ : diferencia de color global entre tratamientos (CH y UHPH) y día de almacenamiento.

En relación con el parámetro  $b^*$  (indica colores de azul a amarillo), se identificó una diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) entre las FLIs siendo más amarillas las que incorporaron la emulsión CH, en comparación a las formuladas con emulsión UHPH a día 1 de almacenamiento. Sin embargo, al transcurrir el periodo de almacenamiento de las FLIs, estas diferencias se fueron diluyendo para no ser significativas a día 60. Estos resultados concuerdan con los valores más elevados del YI de la FLI conteniendo la emulsión CH, en comparación su homóloga con emulsión UHPH. Asimismo,  $b^*$  mostró variaciones significativas ( $P < 0,05$ ) entre el día 1 y el día 60 de las FLIs, mostrando una tendencia hacia colores más amarillentos, lo que también concuerda con las variaciones mostradas por el YI durante el tiempo de almacenamiento de las FLIs, siguiendo la misma tendencia que el parámetro  $b^*$ . Este índice está relacionado con la degradación general del producto debido a la luz, la exposición química y el procesamiento (Pathare et al., 2013).

Por otro lado, el parámetro  $a^*$  no presentó diferencias significativas entre las FLIs adicionadas con emulsiones tratadas por UHPH o CH, pero sí entre los días de almacenamiento en la FLI con emulsión CH, mostrando un incremento hacia tonalidades más rojizas. Este parámetro fue el único que transitó de  $(-a^*)$  a  $(+a^*)$ , es decir, se desplazó del umbral del verde hacia el rojo en ambos tratamientos. Estos tres cambios en los parámetros de color (disminución de luminosidad, aumento del color amarillo y aumento del color rojo) se vinculan con el fenómeno de pardeamiento no enzimático atribuible a la formación de pigmentos marrones en la mezcla de azúcar y proteína resultante de la reacción de Maillard (Grigioni et al 2007; Morales & Van Boekel 1998).

El ojo humano puede distinguir dos colores dependiendo de su diferencia de color total que pueden ser analíticamente clasificadas como: diferencias de color que pueden ser claramente perceptibles por el ojo humano ( $\Delta E > 3$ ), diferencias de color menores que podrían ser perceptibles para el ojo humano ( $1,5 < \Delta E < 3$ ) diferencias de color que no podrían ser perceptibles para el ojo humano ( $\Delta E < 1,5$ ) (Pathare et al., 2013). La variación total de color  $\Delta E^*$  al comparar el día 1 con el día 60 para las FLIs adicionadas con emulsión CH fue de  $2,05 \pm 1,45$ , mientras que para las FLIs adicionadas con emulsión UHPH fue de  $1,99 \pm 1,00$ , siendo estas  $\Delta E^*$  posiblemente no perceptibles al ojo humano. Sin embargo, al comparar las FLIs adicionadas con emulsión UHPH frente a las FLIs con emulsión CH, el valor  $\Delta E^*$  en el día 1 fue de  $3,32 \pm 0,83$ , y de  $3,36 \pm 1,33$  en el día 60. Estos resultados indican que, desde

el inicio, la comparación del color de las FLIs elaboradas bajo ambos tratamientos fue notablemente diferente ( $\Delta E > 3$ ) y posiblemente visible al ojo humano, permaneciendo esta diferencia constante con el paso de los días hasta el final del periodo de almacenamiento.

### 6.2.4 Propiedades reológicas

En la **Tabla 6.5** se exponen los parámetros reológicos del índice de consistencia e índice de comportamiento al flujo de las FLIs analizadas, revelándose diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para ambos índices en las FLIs. Es importante destacar que el índice de comportamiento al flujo ( $n$ ) fue ligeramente inferior en las FLIs elaboradas con emulsiones UHPH en comparación con aquellas que contenían emulsiones CH; no obstante, en ambos casos, los valores fueron cercanos a 1, indicando un comportamiento Newtoniano. Cuando se aplica un esfuerzo cortante a un fluido Newtoniano, este continúa fluyendo mientras se mantiene el esfuerzo. Una vez que se elimina la tensión aplicada, el líquido sigue fluyendo hasta que la energía cinética almacenada en su interior se disipa en forma de calor debido a la fricción (McClements, 2016). Esto indica que la viscosidad del fluido puede considerarse constante en el tiempo. El valor de  $n$  varió muy poco durante todo el período de evaluación para ambos tratamientos, no mostrando diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en el comportamiento al flujo de las FLIs en los días evaluados. Lo mismo ocurrió para el índice de consistencia ( $K$ ), que no experimentó variaciones durante el tiempo de almacenamiento en las diferentes FLIs. Sin embargo, la FLI que contenía la emulsión UHPH presentó una ligera mayor viscosidad ( $P < 0,05$ ) que aquella elaborada con la emulsión CH, lo cual podría asociarse con la presencia de un mayor número de agregados, como se mencionó en las secciones de tamaño de partícula y microscopía.

El estudio de Fernández-Ávila et al. (2017) comparó la aplicación de emulsiones UHPH y CH (que contenían 4% de aislado de proteína de soja como emulsionante y 20% de aceite de soja) en un producto de base láctea UHT. Al mezclar estas emulsiones con leche desnatada en una proporción de 1:10, no se observaron diferencias significativas en la viscosidad entre los tratamientos. La leche con emulsión UHPH mostró en general valores más bajos de viscosidad que su homóloga convencional. Es relevante señalar que, en este caso, la formulación del producto lácteo base no incorporó concentrado de proteína láctea, sino leche desnatada. Esto implica que la proporción de proteína del suero y caseína podría diferir

considerablemente entre ambos estudios, lo que podría influir en las propiedades reológicas y características finales de los productos lácteos.

**Tabla 6.5.** Medias y desviaciones estándar de los parámetros reológicos de índice de consistencia ( $K$ ), índice de comportamiento al flujo ( $n$ ) e índice de correlación ( $R^2$ ) de las fórmulas lácteas infantiles elaboradas con emulsiones tratadas por homogeneización convencional (CH) y a ultra alta presión (UHPH) y almacenadas durante un periodo de 60 días.

Días	Tratamientos					
	CH (30 MPa)			UHPH (200 MPa)		
	K (Pa × s)	$n$	$R^2$	K (Pa × s <sup>n</sup> )	$n$	$R^2$
1	0,0011 ± 0,00002 <sup>y</sup>	1,091 ± 0,002 <sup>x</sup>	0,99	0,0014 ± 0,0001 <sup>x</sup>	1,080 ± 0,004 <sup>y</sup>	0,999
7	0,0012 ± 0,00000 <sup>y</sup>	1,089 ± 0,002 <sup>x</sup>	0,99	0,0015 ± 0,0002 <sup>x</sup>	1,077 ± 0,004 <sup>y</sup>	0,999
15	0,0012 ± 0,00005 <sup>y</sup>	1,093 ± 0,006 <sup>x</sup>	0,99	0,0015 ± 0,0001 <sup>x</sup>	1,078 ± 0,001 <sup>y</sup>	0,999
30	0,0012 ± 0,00004 <sup>y</sup>	1,091 ± 0,003 <sup>x</sup>	0,99	0,0016 ± 0,0002 <sup>x</sup>	1,078 ± 0,004 <sup>y</sup>	0,999
60	0,0013 ± 0,00007 <sup>y</sup>	1,091 ± 0,006 <sup>x</sup>	0,99	0,0015 ± 0,0002 <sup>x</sup>	1,080 ± 0,005 <sup>y</sup>	0,999

<sup>x-y</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos para cada uno de los parámetros.

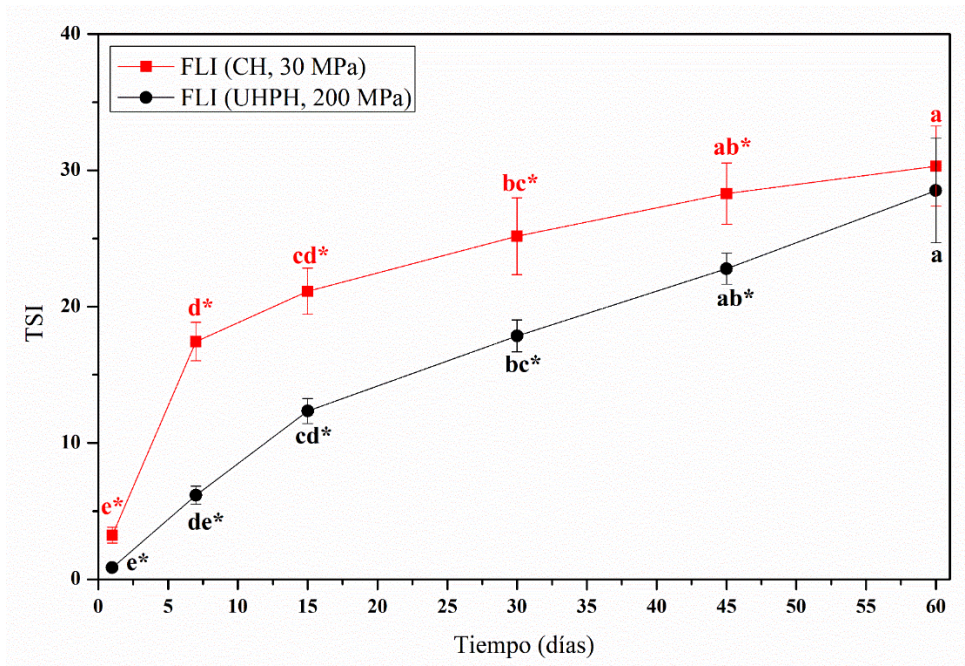
### 6.2.5 Determinación de la estabilidad física

En el proceso de elaboración de las FLIs, la estabilidad de las emulsiones juega un papel crucial. Garantizar la estabilidad de estas emulsiones es fundamental para mantener la homogeneidad y la calidad del producto final. Los coloides, debido a su naturaleza, tienden a ser inherentemente inestables, pero se clasifican como cinéticamente estables cuando el ritmo de su desestabilización es menor en comparación con la duración de su vida útil, como se ha destacado en investigaciones anteriores (Mengual et al., 1999).

Las proteínas desempeñan un papel decisivo en la estabilización de la fase oleosa de las emulsiones O/W presentes en las FLIs. Con alrededor del 60% de proteínas de suero en el total proteico de las FLIs, estas proteínas pueden tener un impacto significativo en la estabilidad térmica de las formulaciones (Murphy et al., 2015). La elección adecuada de emulsionantes y la comprensión de su interacción con otros componentes de la fórmula son esenciales para asegurar la estabilidad de las emulsiones y, en consecuencia, la calidad de las FLIs.

En la **Figura 6.5**, se presentan los resultados de TSI medidos durante el almacenamiento de las FLIs (días 1, 7, 15, 30, 45 y 60). Los resultados muestran que la FLI que contenía la emulsión tratada por UHPH presentó valores de TSI menores desde el día 1 al 45 de almacenamiento, lo que indica una mayor estabilidad física en comparación con su homóloga con emulsión convencional. La FLI con emulsión CH presentó un gran aumento del TSI del día 1 al 7, indicando una cinética de desestabilización física muy acusada en los primeros días de almacenamiento. McClements (2016) destaca que la tasa y los mecanismos de desestabilización de una emulsión dependen de su composición y microestructura. A pesar de que el tamaño de partícula de la FLI con emulsión CH fue menor que el de la UHPH, la estabilidad física resultó ser mejor en la UHPH, sugiriendo que factores adicionales, aparte del tamaño de partícula, influyen en la estabilidad final del producto. Además, los resultados de viscosidad (**Tabla 6.4**) mostraron que la FLI con emulsión UHPH tuvo siempre valores superiores en comparación con su homóloga con emulsión CH. La sedimentación y el cremado de partículas en una emulsión son fenómenos que ocurren debido a las diferencias de densidad entre las fases. Estos procesos de separación de fases en dispersantes dentro de fluidos newtonianos tienden a ser más lentos en emulsiones con alta viscosidad. Además, una mayor viscosidad contribuye a prevenir la coalescencia de gotas, ya que este fenómeno implica la disminución y ruptura de la película líquida que separa las gotas en proceso de unión (Selway & Stokes, 2014).

Es fundamental destacar que las diferencias entre los valores de TSI de ambos tratamientos se redujeron a lo largo del período de almacenamiento, y para el día 60, estas diferencias dejaron de ser significativas. Investigaciones similares sobre emulsiones tratadas por UHPH han mostrado resultados comparables. Aghababaei et al. (2021) formularon emulsiones O/W encapsuladas con maltodextrina para su posterior secado por atomización e incorporación en alimentos. Las emulsiones formuladas con 10% de aceites de girasol y chía (50:50) y 4-7% de mazada como agente emulgente rico en MFGM fueron sometidas a tratamientos de homogenización de 30, 100 y 200 MPa, observándose valores de TSI más altos con CH (30 MPa) en comparación con UHPH (200 MPa).

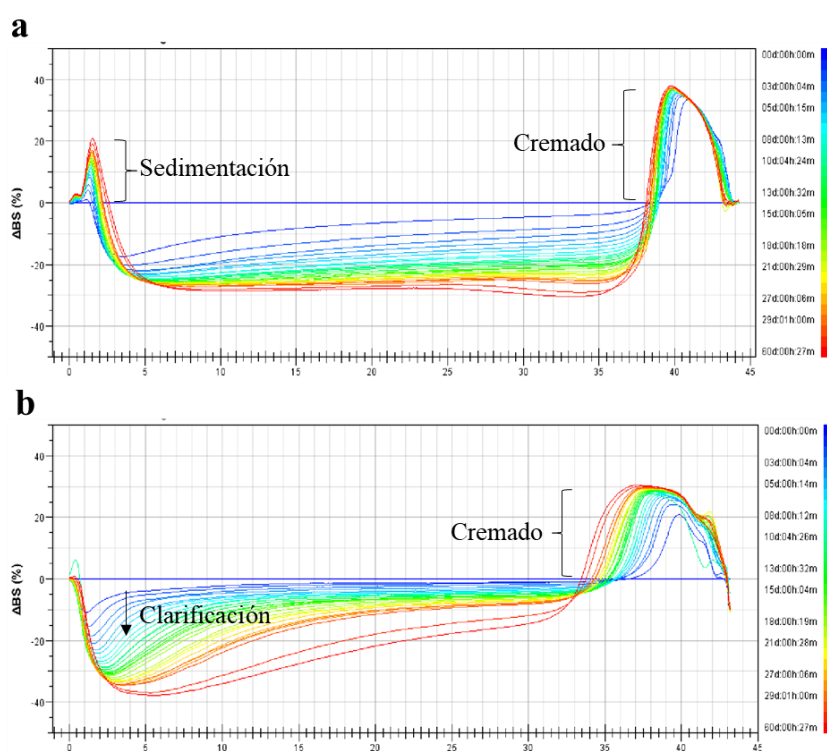


**Figura 6.5.** Índice de estabilidad del Turbiscan Global (TSI siglas en inglés) en función del tiempo de las fórmulas lácteas infantiles (FLI) conteniendo emulsiones tratadas por homogeneización convencional (CH, color rojo) y a ultra alta presión (UHPH, color negro). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) a diferentes tiempos y en cada curva de tratamiento. El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos.

En la **Figura 6.6** se presentan los perfiles de retrodispersión ( $\% \Delta BS$ ) de luz de las FLIs a lo largo de un período de 60 días. En la parte superior del tubo de almacenamiento de las muestras, se observó un aumento en los valores de retrodispersión debido al fenómeno de cremado de las fórmulas a lo largo del tiempo (parte superior derecha del eje del gráfico). Además, los valores de la disminución de retrodispersión en la parte inferior del tubo (bajo el eje del gráfico), indican un proceso de clarificación. Ambos procesos son indicativos de inestabilidad física de la emulsión, y ocurrieron en ambos tratamientos, pero la velocidad y magnitud en los que se produjeron en la FLI con emulsión CH fueron mucho más evidentes que en la tratada por UHPH. Valores de BS por encima del eje en la parte izquierda del gráfico indican sedimentación, lo que solo ocurrió en la FLI que contenía la emulsión tratada por CH.

En el mismo gráfico de retrodispersión, se aprecia la distancia entre las curvas para cada día de evaluación; líneas más separadas del eje central indican fenómenos de coalescencia con mayor inestabilidad, y viceversa. Este fenómeno, de naturaleza irreversible, también se manifestó de manera más pronunciada en la FLI con emulsión CH. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Fernandez-Avila et al. (2017) que investigaron la

importancia de las emulsiones O/W tratadas mediante UHPH (200 MPa) como matrices conservantes frente al tratamiento térmico (UHT) para compuestos bioactivos altamente hidrofóbicos y propensos a la oxidación, como el ácido linoleico conjugado (CLA) libre. En esa investigación, el objetivo fue evaluar la estabilidad física y oxidativa de las emulsiones UHPH formuladas con de soja y CLA, añadido a leche desnatada para elaborar un producto de base láctea, en comparación con otras emulsiones tratadas por CH (25 MPa). Los resultados mostraron que el producto de base láctea UHT que contenía la emulsión de CLA obtenida por UHPH presentó un tamaño de partícula más pequeño y una mejor estabilidad física en comparación con el producto homólogo con la emulsión de CLA obtenido por CH. En particular, la velocidad de cremado del producto con emulsión UHPH fue mucho más lenta que la del producto con emulsión CH.



**Figura 6.6.** Perfiles de retrodispersión de las fórmulas lácteas infantiles elaboradas por adición de emulsiones estabilizadas por (a) homogenización convencional (30 MPa) y (b) a ultra alta presión (200 MPa), en función del tiempo de almacenamiento (60 días).

### 6.2.6. Oxidación lipídica

La oxidación de lípidos constituye una reacción química que conlleva al deterioro de la calidad de los alimentos, generando cambios oxidativos que resultan en la producción de

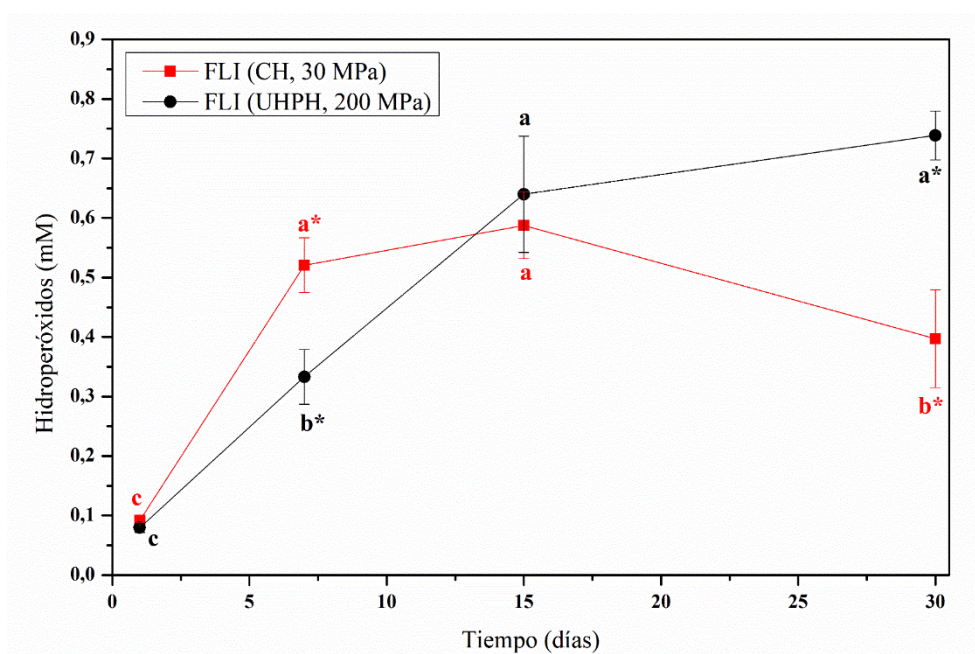
sabores indeseables, pérdida de nutrientes y compuestos no deseados (Frankel, 1991; Romeu-Nadal et al., 2007). La fórmula infantil, rica en ácidos grasos insaturados, es particularmente propensa a la oxidación lipídica. Durante este proceso, los ácidos grasos insaturados se oxidan, formando hidroperóxidos, productos de oxidación primaria que carecen de olor y sabor. Estos compuestos son altamente inestables y pueden degradarse aún más, dando lugar a la formación de productos de oxidación secundarios, como alcanos, alquenos, aldehídos y cetonas (Frankel et al., 2002; Hardas et al., 2002; Shahidi & Ying, 2010; O'Connor & O'Brien, 2009).

Los tratamientos térmicos, como el proceso UHT, durante la fabricación de las FLIs o las condiciones desfavorables de almacenamiento, promueven el inicio de la reacción de Maillard y la peroxidación lipídica (Nunes et al., 2019; Sabater et al., 2018). La complejidad del proceso de oxidación se ve significativamente amplificada en sistemas dispersos como las emulsiones. Esto se debe principalmente a la discontinuidad inherente en la fase lipídica y a la influencia de diversas variables adicionales, tales como las condiciones de homogeneización, el pH y el tamaño de los glóbulos grasos, entre otras (Hebishy et al., 2013; Let et al., 2007).

El proceso de oxidación de lípidos, por lo general, exhibe una reacción lenta en condiciones normales de almacenamiento. Con el propósito de evaluar la vida útil de alimentos y productos farmacéuticos, se llevan a cabo pruebas de almacenamiento acelerado, evitando así la necesidad de estudios prolongados de almacenamiento (Cole & Leadbeater, 2011). En nuestra investigación, la prueba de almacenamiento acelerado se realizó exponiendo las FLIs a una temperatura de 50 °C, acelerando las velocidades de reacción y reduciendo el tiempo de evaluación. De acuerdo con las conclusiones de Romeu-Nadal et al. (2007), la temperatura y el tiempo de almacenamiento se identifican como factores cruciales para determinar la estabilidad oxidativa.

En la **Figura 6.7** se representan los niveles de hidroperóxidos en las FLIs a las que se incorporaron emulsiones tratadas por CH y UHPH durante un periodo de almacenamiento de 30 días a 50 °C. Al analizar la tendencia del gráfico, se observa que el nivel de hidroperóxidos aumentó hasta el día 15 para ambos tratamientos. Sin embargo, en el caso de la FLI con emulsión UHPH, este aumento continuó hasta el día 30, mientras que su homóloga

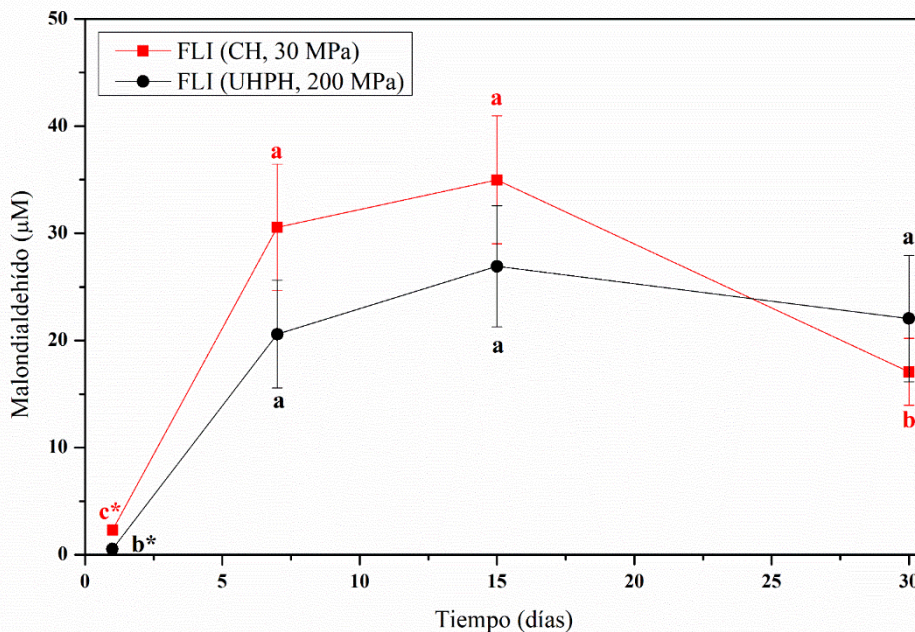
con emulsión CH disminuyó a partir del día 15. Este patrón sugiere que la FLI con emulsión UHPH siguió en una fase de oxidación primaria, mientras que la FLI con emulsión CH experimentó una transición hacia una fase secundaria debido a una cinética de oxidación más acelerada. El análisis estadístico de este modelo reveló que el aumento en la concentración de hidroperóxidos en la FLI con emulsión UHPH durante los diferentes días de muestreo fue significativamente diferente ( $P < 0,05$ ), excepto en el día 30, donde, aunque mayor que a día 15, no fue significativamente diferente. En cuanto a la FLI con emulsión CH, la concentración de hidroperóxidos aumentó significativamente hasta el día 7 de almacenamiento, para luego mantenerse estable hasta el día 15 y disminuir de manera significativa en el día 30. El análisis estadístico demostró que las cinéticas de oxidación primaria de las FLIs, obtenidas mediante la adición de emulsiones tratadas por CH o UHPH, no presentaron diferencias significativas en las concentraciones de hidroperóxidos alcanzadas en los días 1 y 15 de almacenamiento.



**Figura 6.7.** Evolución en el contenido de hidroperóxidos en función del tiempo de las fórmulas lácteas infantiles (FLI) conteniendo emulsiones tratadas por homogeneización convencional (línea con símbolo cuadrado, color rojo) y a ultra alta presión (línea con símbolo redondo, color negro). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) a diferentes tiempos y en cada curva de tratamiento. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre tratamientos.

En el análisis de la oxidación secundaria (**Figura 6.8**), se observa que los niveles de MDA fueron inferiores en la FLI con emulsión UHPH en comparación a su homóloga con

emulsión CH, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) en los días 1 y 30 de almacenamiento. El valor promedio de MDA en el día 1 fue de  $2,31 \pm 0,18 \mu\text{M}$  para la FLI con emulsión CH y de  $0,53 \pm 0,04 \mu\text{M}$  para la variante con emulsión UHPH, evidenciando una mayor estabilidad desde el inicio en la FLI con emulsión UHPH frente a la oxidación. Además, se observó una disminución significativa en el valor de MDA entre los días 15 y 30 para la FLI con emulsión CH, mientras que para la FLI con emulsión UHPH no se constataron diferencias significativas en la concentración de MDA desde el día 7 hasta el final del periodo de almacenamiento. Estos resultados indican que la FLI convencional habría experimentado una transición hacia un estadio de oxidación terciaria, mientras que la FLI con emulsión UHPH mantuvo niveles estables de MDA entre los días 7 y 30 de almacenamiento, señalando una menor susceptibilidad a la oxidación lipídica y, por consiguiente, una mejor conservación de los ácidos grasos insaturados presentes en los aceites de chía y girasol.



**Figura 6.8.** Evolución en el contenido de malondialdehído en función del tiempo de las fórmulas lácteas infantiles conteniendo emulsiones tratadas por homogeneización convencional (línea con símbolo cuadrado, color rojo) y a ultra alta presión (línea con símbolo redondo, color negro). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) a diferentes tiempos y en cada curva de tratamiento. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre tratamientos.

A pesar de que las FLIs con emulsión CH mostraron tamaños de partícula global más reducidos en comparación con las variantes con emulsión UHPH, debido a la presencia de agregados proteicos considerables en estas últimas, las micrografías obtenidas por

microscopía confocal (**Figura 6.3, a2 y b2**) revelaron un tamaño de partícula lipídica superior en las FLIs con emulsión CH en contraste con sus homólogas con emulsión UHPH. Aunque es conocido que la oxidación de lípidos tiende a acelerarse en las gotas de emulsión O/W debido a reacciones en el interfaz, la tasa de oxidación de lípidos podría esperarse que aumentara en las FLIs con emulsiones UHPH en lugar de en las FLIs con emulsiones CH, ya que el área de superficie expuesta a la interfaz O/W es mayor. Sin embargo, esta tendencia puede variar debido a las propiedades específicas de la emulsión y la capacidad protectora del interfaz contra la oxidación.

Hebishy et al. (2015) observaron niveles más bajos de oxidación en emulsiones formuladas con 10% de aceite y diversos contenidos de proteínas de suero, obtenidas por UHPH (200 MPa) en comparación con aquellas obtenidas por CH (15 MPa). Atribuyeron esta diferencia a varios factores, como la cantidad limitada de proteína en la interfaz en emulsiones CH, el mayor tamaño de partícula que las hace más susceptibles al cremado y, por lo tanto, más expuestas al oxígeno en el espacio de cabeza, y el efecto antioxidante del material emulgente utilizado, siendo menor en las emulsiones CH debido a su menor área de superficie.

Nakaya et al. (2005) estudiaron el proceso de oxidación de triglicéridos poliinsaturados en emulsiones O/W y también encontraron que las emulsiones con partículas lipídicas más finas eran más estables a la oxidación. Sugirieron que la ubicación de las moléculas emulsionantes en la interfaz O/W puede influir en la movilidad de las moléculas de lípidos y, en consecuencia, puede mejorar la estabilidad oxidativa. Estimaron que la concentración real de emulsionante en las gotas más pequeñas era 10 veces mayor que en las gotas más grandes y, en consecuencia, la concentración de aceite insaturado en una gota más pequeña se vuelve más baja y, por lo tanto, los lípidos en la emulsión se vuelven más estables frente a la oxidación. Atarés et al. (2012) también informaron que las proteínas del suero poseen capacidad antioxidante que puede proteger la emulsión de la oxidación. Debido a que la cantidad de proteína de suero directamente en contacto con la fase lipídica (proteína de suero adsorbida) aumenta con el área interfacial, cuanto más pequeñas son las gotas de aceite, mayor es la capacidad antioxidante de la interfase.

Los resultados obtenidos de oxidación lipídica en este estudio se pueden justificar principalmente por el menor tamaño de partícula lipídica obtenido en las FLIs con emulsión

UHPH, cuya mayor interfaz contendría una mayor concentración de material emulgente con actividades antioxidantes (proteínas del suero, caseínas y fosfolípidos), y por su mayor estabilidad física frente al cremado que evitaría la exposición directa al oxígeno en el espacio de cabeza.

### 6.3 Conclusiones

Este estudio se ha centrado en la caracterización de FLIs líquidas UHT, las cuales fueron elaboradas mediante emulsiones formuladas con aceites vegetales ricos en ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, altamente susceptibles a la oxidación lipídica, y mazada como agente emulgente. Estas emulsiones fueron sometidas a diferentes tratamientos de homogenización (CH y UHPH).

Los resultados muestran que el tratamiento UHPH muestra una capacidad superior para reducir el tamaño de partícula, generando emulsiones 6 veces menores que las obtenidas por CH. A pesar de ello, las FLIs elaboradas a partir de estas emulsiones presentan tamaños de partícula similares debido a la presencia de agregados lipoproteicos, más prominentes en la FLI con emulsión UHPH, posiblemente inducidos por la gran concentración de proteína del suero presente, el tratamiento UHT aplicado y la redistribución diferencial de los componentes emulgentes de la mazada entre el interfaz y la fase continua de la emulsión.

Los resultados del estudio indican variaciones significativas en la percepción del color durante el almacenamiento y entre tratamientos. Inicialmente, las FLIs con emulsión CH presentaron un color más amarillo (mayor valor de  $b^*$  y YI) comparado con las FLIs con emulsión UHPH, diferencia de color que se fue atenuando hasta no ser relevante en el día 60. Aunque la luminosidad ( $L^*$ ) se mantuvo constante durante el almacenamiento, las FLIs con emulsión UHPH terminaron siendo más luminosas. Además, ambas FLIs mostraron un aumento en tonalidades amarillentas y rojizas a lo largo del tiempo, posiblemente debido a la reacción de pardeamiento no enzimático. Sin embargo, la comparación directa entre FLIs con emulsión CH y UHPH mostró una diferencia de color ( $\Delta E > 3$ ) claramente perceptible por el ojo humano tanto al inicio como después de 60 días de almacenamiento, sugiriendo que los tratamientos de homogeneización afectan de manera duradera y distintiva la apariencia visual de las FLIs.

El análisis reológico y de estabilidad física sugiere que la FLI con emulsión UHPH es más estable a nivel físico en comparación con a su homóloga elaborada con emulsión CH, observándose menores fenómenos de cremado, un indicador crítico de inestabilidad física que podría desencadenar la coalescencia y afectar la vida útil del producto de manera irreversible.

Además, la FLI con emulsión UHPH muestra una menor susceptibilidad a la oxidación lipídica en comparación con aquella elaborada con emulsión CH. Este resultado podría atribuirse al menor tamaño de partícula lipídica en las FLIs con emulsión UHPH, que proporciona una mayor interfaz con una mayor concentración de material emulgente protector con propiedades antioxidantes. La mayor estabilidad física frente al cremado también contribuiría a evitar la exposición directa al oxígeno en el espacio de cabeza.

Los hallazgos de este estudio sugieren la viabilidad de producir FLIs formuladas con aceites vegetales ricos en ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, y mazada como material emulgente enriquecido en MFGM. Estas fórmulas presentan beneficios nutricionales y funcionales para el lactante derivados de los componentes bioactivos de estos ingredientes, junto con una destacada estabilidad física y resistencia a la oxidación lipídica, lo que podría extender significativamente su vida útil comercial al incorporar emulsiones obtenidas mediante la tecnología UHPH.

### 6.4 Referencias bibliográficas

- Abedi, E. & Sahari, M.A. (2014), Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food Science and Nutrition*, 2, 443-463. <https://doi.org/10.1002/fsn3.121>
- Aghababaei, F., Cano-Sarabia, M., Trujillo, A. J., Quevedo, J. M., & Ferragut, V. (2021). Buttermilk as Encapsulating Agent: Effect of Ultra-High-Pressure Homogenization on Chia Oil-in-Water Liquid Emulsion Formulations for Spray Drying. *Foods*, 10 (5), 1059. <https://doi.org/10.3390/foods10051059>

- Atarés, L., Marshall, L. J., Akhtar, M., & Murray, B.S. (2012). Structure and oxidative stability of oil in water emulsions as affected by rutin and homogenization procedure. *Food Chemistry*, *134* (3), 1418-1424. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.221>
- Ayerza, R., & Coates, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Industrial Crops and Products*, *34* (2), 1366-1371. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.12.007>
- Bourlieu, C., Ménard, O., De La Chevasnerie, A., Sams, L., Rousseau, F., Madec, M. N., Robert, B., Deglaire, A., Pezennec, S., Bouhallab, S., Carrière, F., & Dupont, D. (2015). The structure of infant formulas impacts their lipolysis, proteolysis and disintegration during in vitro gastric digestion. *Food Chemistry*, *182*, 224–235. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.001>
- Bhinder, G., Allaire, J. M., Garcia, C., Lau, J. T., Chan, J. M., Ryz, N. R., Bosman, E. S., Graef, F. A., Crowley, S. M., Celiberto, L. S., Berkmann, J. C., Dyer, R. A., Jacobson, K., Surette, M. G., Innis, S. M., & Vallance, B. A. (2017). Milk Fat Globule Membrane Supplementation in Formula Modulates the Neonatal Gut Microbiome and Normalizes Intestinal Development. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep45274>
- Cattaneo, S., Masotti, F & Pellegrino, L. (2009). Liquid Infant Formulas: Technological Tools for Limiting Heat Damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57* (22), 1068910694. <https://doi.org/10.1021/jf901800v>
- Chen, M., & Sun, Q. (2021). Current knowledge in the stabilization/destabilization of infant formula emulsions during processing as affected by formulations. *Trends in Food Science & Technology*, *109*, 435–447. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.036>
- Chowdhury, K., Banu, L., Khan, S., & Latif, A. (2007). Studies on the Fatty Acid Composition of Edible Oil. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, *42*(3), 311-316. <https://doi.org/10.3329/bjsir.v42i3.669>
- Cole, B. R., & Leadbeater, L. (2011). A critical assessment of an accelerated storage test. The *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *18*(2), 101–111. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1966.tb07831.x>
- Contreras-Calderón, J., Guerra-Hernández, E. & García-Villanova, B. (2008). Indicators of non-enzymatic browning in the evaluation of heat damage of ingredient proteins used in manufactured infant formulas. *European Food Research and Technology*, *227*, 117–124. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0700-2>.
- Dumay, E., Chevalier-Lucia, D., Picart-Palmade, L., Benzaria, A., Gràcia-Julià, A., & Blayo, C. 2013. Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. *Trends in Food Science & Technology*, *31*(1), 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.005>.

- Fernández-Avila, C & Trujillo, A.J. (2017). Enhanced stability of emulsions treated by UltraHigh Pressure Homogenization for delivering conjugated linoleic acid in Caco-2 cells, *Food Hydrocolloids*, 71:271-281, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.017>.
- Fernández-Avila, C., Gutierrez-Merida, C., & Trujillo, A.J., (2017). Physicochemical and sensory characteristics of a UHT milk-based product enriched with conjugated linoleic acid emulsified by Ultra-High Pressure Homogenization, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 39, 275-283, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.01.001>.
- Furtado, G., da Silva Carvalho, A. G & Dupas Hubinger, M. (2021). Model infant formulas: Influence of types of whey proteins and oil composition on emulsion and powder properties, *Journal of Food Engineering*, 292, 110256. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110256>.
- Frankel, E. N. (1991). Review. Recent advances in lipid oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54(4), 495–511. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740540402>
- Frankel, E. N., Satué-Gracia, T., Meyer, A. S., & German, J. B. (2002). Oxidative stability of fish and algae oils containing long-chain polyunsaturated fatty acids in bulk and in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2094–2099. <https://doi.org/10.1021/jf0111458>
- Gallier, S., Vocking, K., Post, J. A., Van De Heijning, B., Acton, D., Van Der Beek, E. M., & Van Baalen, T. (2015). A novel infant milk formula concept: Mimicking the human milk fat globule structure. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 136, 329–339. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.09.024>.
- Grigioni, G., Biolatto, A., Irurueta, M., Sancho, A. M., Páez, R., & Pensel, N. (2007). Cambios en el color de leche en polvo debido a tratamientos térmicos y estación de elaboración. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(5), 335–339. <https://doi.org/10.1080/11358120709487709>
- Guo, M.R., (2021). Biochemistry of Human Milk. Cap. 2. En: *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2018-0-012773>
- Hageman, J., Danielsen, M., Nieuwenhuizen, A., Feitsma, A., & Dalsgaard, T. (2019). Comparison of bovine milk fat and vegetable fat for infant formula: Implications for infant health. *International Dairy Journal*, 92, 37-49. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.01.005>
- Hardas, N., Danvirivakul, S., Foley, J. L., Nawar, W. W., & Chinachoti, P. (2002). Effect of relative humidity on the oxidative and physical stability of encapsulated milk fat. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(2), 151–158. <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0450-5>
- Hebishy, E., Buffa, M., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2013). Stability of Sub-Micron Oil-in-Water Emulsions Produced by Ultra High Pressure Homogenization and Sodium

- Caseinate as Emulsifier. *Chemical Engineering Transactions*, 32, 1813–1818. <https://doi.org/10.3303/CET1332303>
- Hebishy, E., Buffa, M., Guamis, B., Blasco-Moreno, A., & Trujillo, A. J. (2015). Physical and oxidative stability of whey protein oil-in-water emulsions produced by conventional and ultra-high-pressure homogenization: Effects of pressure and protein concentration on emulsion characteristics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 32, 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.013>
- Hebishy, E., Zamora, A., Buffa, M., Blasco-Moreno, A., & Trujillo, A.J. (2017). Characterization of Whey Protein Oil-In-Water Emulsions with Different Oil Concentrations Stabilized by Ultra-High Pressure Homogenization. *Processes*, 5(4), 6. <http://dx.doi.org/10.3390/pr5010006>
- He, X., McClorry, S., Hernell, O., Lönnerdal, B., & Slupsky, C.M. (2020). Digestion of human milk fat in healthy infants, *Nutrition Research*, 83, 15-29. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2020.08.002>
- Hernell, O., Timby, N., Domellöf, M., & Lönnerdal, B. (2016). Clinical Benefits of Milk Fat Globule Membranes for Infants and Children. *Journal of Pediatrics*, 173, S60-S65. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.02.077>
- James, D.C., Lessen, R., & American Dietetic Association., (2009). Position of the American Dietetic Association: promoting and supporting breastfeeding. *Journal of the American Dietetic Association*, 109 (11), 1926-1942. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2009.09.018>
- Jukkola, A., Partanen, R., Xiang, W., Heino, A., & Rojas, O. J. (2019). Food emulsifiers based on milk fat globule membranes and their interactions with calcium and casein phosphoproteins. *Food Hydrocolloids*, 94, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.005>
- Kelishadi, R., & Farajian, S. (2014). The protective effects of breastfeeding on chronic non-communicable diseases in adulthood: A review of evidence. *Advanced Biomedical Research*, 3(1), 3. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.124629>
- Let, M. B., Jacobsen, C., Sørensen, A.-D. M., & Meyer, A. S. (2007). Homogenization conditions affect the oxidative stability of fish oil enriched milk emulsions: Lipid oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1773–1780. <https://doi.org/10.1021/jf062391s>
- Liang, Y., Patel, H., Matia-Merino, L., Ye, A., & Golding, M. (2013). Structure and stability of heat-treated concentrated dairy-protein-stabilised oil-in-water emulsions: A stability map characterisation approach. *Food Hydrocolloids*, 33(2). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.03.012>
- Lönnerdal, B., & Hernell, O. (1998). Effects of feeding ultrahigh-temperature (UHT)-treated infant formula with different protein concentrations or powdered formula, as compared with breast-feeding, on plasma amino acids, hematology, and trace element status, *The*

*American Journal of Clinical Nutrition*, 68(2), 350–356.  
<https://doi.org/10.1093/ajcn/68.2.350>

Lönnerdal, B. (2016). Bioactive Proteins in Human Milk: Health, Nutrition, and Implications for Infant Formulas. *The Journal of Pediatrics*, 173, S4-S9.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.02.070>

Lopez, C., Cauty, C., & Guyomarc'h, F. (2019). Unraveling the Complexity of Milk Fat Globules to Tailor Bioinspired Emulsions Providing Health Benefits: The Key Role Played by the Biological Membrane. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121, 1800201. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800201>.

Lopez, C. (2011). Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16(5), 391–404.  
<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2011.05.007>

Lund, P., Nielsen, S.B., Nielsen, C. F., Ray, C. A., & Lund, M.N (2021). Impact of UHT treatment and storage on liquid infant formula: Complex structural changes uncovered by centrifugal field-flow fractionation with multi-angle light scattering. *Food Chemistry*, 348, 129145. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129145>.

Martin, C. R., Ling, P. R., & Blackburn, G. L. (2016). Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula. *Nutrients*, 8(5), 279.  
<https://doi.org/10.3390/nu8050279>

Masum, A.K.M., Huppertz, T., Chandrapala, J., Adhikari, B., & Zisu, B. (2020). Physicochemical properties of spray-dried model infant milk formula powders: Influence of whey protein-to-casein ratio. *International Dairy Journal*, 100, 104565.  
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104565>

McClements, D. J. (2002). Colloidal basis of emulsion color. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(5–6), 451–455. [https://doi.org/10.1016/s1359-0294\(02\)00075-4](https://doi.org/10.1016/s1359-0294(02)00075-4)

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. (2010). Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 241–269.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100722>

McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 7(6), 2297–2316. <https://doi.org/10.1039/c0sm00549e>

McClements, D.J. (2016). Emulsion Properties. Cap. 1., 3. and 8. In *Food Emulsions, Principles, Practices, and Techniques*. CRC Press, Boca Raton, USA.

- McDermott, R. L. (1987). Functionality of dairy ingredients in infant formula and nutritional specialty products. *Food Technology*, 41(10), 91-92. <https://agris.fao.org/search/en/providers/122535/records/647751faf2e6fe92b364d1b5>
- Mengual, O., Meunier, G., Cayré, I., Puech, K., & Snabre, P. (1999). TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, 50 (2), 445-456. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00129-0)
- Morales, F. J., & van Boekel, M. A. J. S. (1998). A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: Colour formation. *International Dairy Journal*, 8(10–11), 907–915. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(99\)00014-x](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(99)00014-x)
- Murphy, E. G., Roos, Y. H., Hogan, S.A., Maher, P.G., Flynn, C.G., & Fenelon, M.A. (2015). Physical stability of infant milk formula made with selectively hydrolysed whey proteins. *International Dairy Journal*, 40, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.08.012>
- Nakaya, K., Ushio, H., Matsukawa, S., Shimizu, M., & Ohshima, T. (2005). Effects of droplet size on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Lipids*, 40(5), 501–507. <https://doi.org/10.1007/s11745-005-1410-4>
- Nunes, L., Martins, E., Tuler Perrone, Í., & Fernandes de Carvalho, A. (2019). The Maillard reaction in powdered infant formula. *Journal of Food and Nutrition Research*, 7(1), 33–40. <https://doi.org/10.12691/jfnr-7-1-5>
- O'Connor, T. P., & O'Brien, N. M. (2007). Lipid Oxidation. In *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids* (pp. 557–600). Springer US. [https://doi.org/10.1007/0-387-28813-9\\_16](https://doi.org/10.1007/0-387-28813-9_16)
- O'Mahony, S. M., McVey Neufeld, K. A., Waworuntu, R. V., Pusceddu, M. M., Manurung, S., Murphy, K., Strain, C., Laguna, M. C., Peterson, V. L., Stanton, C., Berg, B. M., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2020). The enduring effects of early-life stress on the microbiota–gut–brain axis are buffered by dietary supplementation with milk fat globule membrane and a prebiotic blend. *European Journal of Neuroscience*, 51(4), 1042–1058. <https://doi.org/10.1111/EJN.14514>
- Owens, C. J. W., Labuschagne, I. L., & Lombard, M. J. (2013). The basics of prescribing infant formulas. *South African Family Practice*, 55, 123-131. <https://doi.org/10.1080/20786204.2012.10874170>
- Pathare, P.B., Opara, U.L. & Al-Said, F.A.J. (2013). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food Bioprocess Technology*, 6, 36–60. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9>
- Phosanam, A., Chandrapala, J., Huppertz, T., Adhikari, B., & Zisu, B. (2021). In vitro digestion of infant formula model systems: Influence of casein to whey protein ratio. *International Dairy Journal*, 117, 105008. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105008>

- Romeu-Nadal, M., Chávez-Servín, J. L., Castellote, A. I., Rivero, M., & López-Sabater, M. C. (2007). Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas. *Food Chemistry*, *100*(2), 756–763. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.037>
- Sabater, C., Montilla, A., Ovejero, A., Prodanov, M., Olano, A., & Corzo, N. (2018). Furosine and HMF determination in prebiotic-supplemented infant formula from Spanish market. *Journal of Food Composition and Analysis*, *66*, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.004>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2010). Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*, *39*(11), 4067. <https://doi.org/10.1039/b922183m>
- Selway, N., & Stokes, J. R. (2014). Soft Materials Deformation, Flow, and Lubrication Between Compliant Substrates: Impact on Flow Behavior, Mouthfeel, Stability, and Flavor. *Annual Review of Food Science and Technology*, *5*, 373-393. <https://doi.org/10.1146/annurev-food030212-182657>
- Tari, N. R., Fan, M. Z., Archbold, T., Kristo, E., Guri, A., Arranz, E., & Corredig, M. (2018). Effect of milk protein composition of a model infant formula on the physicochemical properties of in vivo gastric digestates. *Journal of Dairy Science*, *101*(4), 2851–2861. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13245>
- Vanderghem, C., Bodson, P., Danthine, S., Paquot, M., Deroanne, C., & Blecker, C. (2010). Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization. *Biotechnology Agronomy Society and Environment*, *14*(3), 485-500.
- Valero, E., Villamiel, M., Miralles, B., Sanz, J., & Martínez-Castro, I. (2001). Changes in flavour and volatile components during storage of whole and skimmed UHT milk. *Food Chemistry*, *72*(1), 51-58. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00203-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00203-X)

# CAPÍTULO 7

## Conclusiones generales

1. Se ha podido encapsular con éxito una mezcla de aceites vegetales de chía y girasol (1:1) al 10% en emulsiones tipo aceite-en-agua (O/W) mediante la utilización de la mazada como emulgente al 7%, mediante las técnicas de homogeneización de convencional, ultra alta presión (UHPH), microfluidización y ultrasonidos. Una concentración del 7% de mazada se muestra ideal en todas las técnicas de homogeneización probadas, equilibrando eficazmente el tamaño de partícula con las estabilidades física y oxidativa.
2. La producción de emulsiones O/W utilizando mazada como agente emulgente y un 20% de fase oleosa ha demostrado ser viable mediante las técnicas de homogeneización convencional, UHPH y ultrasonidos. Estas emulsiones presentan un grado de oxidación inferior y una viscosidad superior en comparación con las emulsiones preparadas con un 10% de fase oleosa, independientemente de la técnica de homogeneización empleada. La estabilidad física también se ve influenciada positivamente por una mayor concentración de fase oleosa, especialmente con la homogeneización por ultrasonidos.
3. Las tecnologías de homogeneización por microfluidización a 100 MPa y UHPH a 200 MPa ha proporcionado los tamaños medios de partícula más pequeños y óptimos, y la mayor estabilidad física. Sin embargo, el grado de degradación oxidativa es superior en la emulsión obtenida por UHPH en comparación con la microfluidización. Por otro lado, la homogeneización convencional y por ultrasonidos han resultado las técnicas de emulsificación menos efectivas, ya que generan tamaños medios de partícula mayores, una estabilidad física reducida y una mayor susceptibilidad a la oxidación.
4. Se ha podido encapsular con éxito una mezcla de aceites vegetales de chía y girasol (1:1) al 10% en emulsiones O/W mediante la utilización de un producto enriquecido en membrana del glóbulo graso (MFGMP) como emulgente, mediante las técnicas

5. de homogeneización convencional, UHPH, microfluidización y ultrasonidos. Las tecnologías de homogeneización por microfluidización a 100 MPa y UHPH a 200 MPa han proporcionado los tamaños medios de partícula más pequeños y óptimos, y la mayor estabilidad física y oxidativa.
6. Se ha llevado a cabo un estudio comparativo entre las emulsiones preparadas con mazada y el MFGMP utilizando las técnicas de homogeneización mencionadas. Se ha confirmado que la naturaleza y composición del emulsionante ejercen una influencia significativa en la formación y estabilidad de las emulsiones. El uso del MFGMP como emulgente resulta en la formación de emulsiones con gotas más pequeñas con las técnicas de microfluidización y de UHPH, una estabilidad física mejorada para los tratamientos de homogeneización convencional y UHPH, pero un mayor nivel de oxidación lipídica en todos los tratamientos de homogeneización, mientras que la mazada aporta mayor consistencia y estabilidad oxidativa a las emulsiones.
7. Se han desarrollado con éxito fórmulas lácteas infantiles líquidas UHT a partir de emulsiones O/W formuladas con mazada y aceites ricos en ácidos grasos w-3 y w-6, y preparadas mediante las técnicas de homogeneización convencional y UHPH.
8. Las fórmulas lácteas infantiles finales han presentado tamaños de partícula similares, aunque el tamaño medio de la emulsión preparada por UHPH fuese seis veces menor que el obtenido con homogeneización convencional. Este hecho se atribuye a la formación de agregados lipoproteicos, especialmente en las elaboradas con la emulsión tratada por UHPH, debido a la incorporación de grandes cantidades de proteína del suero en la formulación y al tratamiento térmico aplicado.
9. La fórmula láctea infantil preparada con emulsión tratada por UHPH ha mostrado una viscosidad aparente y estabilidad física superior, en comparación a su homóloga convencional, con una baja incidencia de fenómenos de cremado y sedimentación, además de una reducida susceptibilidad a la oxidación lipídica. Este hallazgo es de suma importancia para mejorar la calidad y la vida útil comercial de las fórmulas lácteas infantiles, y, por tanto, el desarrollo de fórmulas lácteas infantiles más seguras y nutritivas.



