



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Facultat de Veterinària

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Trabajo presentado para la superación de los 15 créditos del Módulo Trabajo Fin de
Máster del **Máster Oficial en Calidad de Alimentos de Origen Animal**

**“ELABORACIÓN DE EMULSIONES DE ACEITE EN AGUA A PARTIR DE
ACEITES VEGETALES Y ESENCIALES MEDIANTE HOMOGENEIZACIÓN A
ULTRA ALTA PRESIÓN”**

Alumna: Gladys Elizabeth González Ramírez

Tutores: Dr. Antonio José Trujillo Mesa

Dra. Manuela Hernández Herrero



Bellaterra (Barcelona), 4 de septiembre de 2016.

*“No es el conocimiento, sino el acto de aprendizaje;
y no la posesión, sino el acto de llegar a ella,
lo que concede el mayor disfrute”.*
Carl Friedrich Gauss

Dedicado a mi hermana Diana y a mi cuñado Darío por desafiarme, incentivarme e inspirarme siempre a trazar nuevas metas y a luchar por llegar a ellas.

AGRADECIMIENTOS

La culminación del presente trabajo representa el término de un proceso personal a nivel académico. Primeramente doy gracias a Dios quien me bendijo con la posibilidad de poder escalar académicamente, y al gobierno de mi país, Paraguay, quien lo hizo posible.

Durante el tiempo de realización de esta memoria he recibido la ayuda y el apoyo invaluable de muchas personas a quienes quiero agradecer:

Advelí Durand, Noemí Ayala, Verónica Torres, Julio Palmay, Cristina Gutiérrez, Idoia Codina, Ramón Gervilla, Joan Miquel Quevedo, Dolors Busquets, Sònia Llorens, Victoria Ferragut, Elizabeth Delpech y en especial a mis profesores y directores de trabajo fin de Máster, Toni Trujillo y Manuela Hernández, por el interés, consejos, guía y confianza, por entregarme las herramientas para mi desarrollo profesional y sobre todo, personal, muchas gracias.

Antonio José Trujillo Mesa, Profesor Titular del Departament de Ciència Animal i dels Aliments, de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona, y **Manuela Hernández Herrero**, Profesora Titular de Departament de Ciència Animal i dels Aliments, de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona,

INFORMAN:

Que el trabajo de investigación titulado: “ *Elaboración de emulsiones de aceite en agua a partir de aceites vegetales y esenciales mediante homogeneización a ultra alta presión*” ha sido realizado bajo su supervisión dentro del módulo Trabajo Fin de Máster del Máster Oficial en Calidad de Alimentos de Origen Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que así conste firman el presente documento en:

Bellaterra, 5 de septiembre de 2016

Dr. Antonio José Trujillo Mesa

Dra. Manuela Hernández Herrero

RESUMEN

Se ha estudiado el efecto de diferentes tratamientos de homogeneización en emulsiones de aceite en agua, conteniendo caseinato sódico como emulgente proteico de origen animal, aceites vegetales (oliva y chía) ricos en omega-3, y aceites esenciales. Para ello la pre-emulsión (20% aceite) se trató por diferentes métodos de homogeneización incluyendo la homogeneización convencional (CH, 15 MPa) y la homogeneización a ultra alta presión (UHPH, 200 MPa), en presencia de caseinato sódico al 5%, incluyendo o no aceites esenciales (tomillo y clavo) que poseen propiedades antioxidantes. Las emulsiones se almacenaron en refrigeración a 4°C, y se tomaron muestras los días 1, 10, 20 y 30 de almacenamiento, evaluándose diferentes características físico-químicas como el tamaño de partícula, pH, comportamiento reológico, y estabilidad física y oxidativa).

Las emulsiones obtenidas por UHPH presentaron un tamaño de partícula menor (submicrón) y una estabilidad física mejorada, durante su almacenamiento en refrigeración, en comparación a sus homólogas tratadas por CH. Ambos tratamientos de homogeneización produjeron emulsiones con un comportamiento reológico pseudoplástico, aunque las emulsiones tratadas por UHPH fueron menos pseudoplásticas y presentaron índices de consistencia menores, en comparación a las tratadas por CH. A nivel oxidativo, las emulsiones UHPH presentaron niveles de oxidación más elevados desde el día 1 de producción, en comparación a las CH, no teniendo un efecto antioxidante significativo. La inclusión en las emulsiones de los aceites esenciales de clavo o tomillo.

Palabras clave: Emulsiones, caseinato sódico, aceites vegetales, aceites esenciales, homogeneización a ultra alta presión.

ABSTRACT

The effect of different treatments of homogenization on oil-in-water emulsions containing sodium caseinate, as protein emulsifier of animal origin, vegetable oils (olive and chia), rich in omega-3 and essential oils, were studied. The pre-emulsions (20% oil) were treated by different homogenization methods such as conventional homogenization (15 MPa) and ultra-high pressure homogenization (200 MPa) in the presence of 5% sodium caseinate, including or not essential oils (thyme and clove) that have antioxidant properties. The emulsions were stored in refrigeration at 4 ° C. The samples were taken on days 1, 10, 20 and 30 of storage, and different physico-chemical characteristics such as particle size, pH, rheological behavior, and physical and oxidative stability, were evaluated.

The emulsions obtained by UHPH presented lower values of particle size, in the range of submicron, and an improved physical stability, during storage in refrigeration, compared to their counterparts treated by CH. Both homogenization treatments, produced pseudoplastic emulsions, although the UHPH emulsions presented lower pseudoplasticity and consistency indexes, compared to those obtained by CH. Nevertheless, at oxidative level, UHPH emulsions were less stable from day 1, compared to CH emulsions, with the inclusion of essential oils of clove or thyme showing no significant antioxidant effects in the emulsions.

Keywords: Emulsions, sodium caseinate, vegetable oil, essential oils, ultra-high pressure homogenization.

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

AA	Antioxidante
ANOVA	Análisis de Varianza
AE	Aceite Esencial
BS	Backscaterring
CH	Homogeneización Convencional
CH C	Emulsión Control tratada por Homogeneización Convencional
CH A1	Emulsión con Aceite Esencial de Clavo tratada por Homogeneización Convencional.
CH A2	Emulsión con Aceite Esencial de Tomillo tratada por Homogeneización Convencional.
<i>d</i> 3.2	Diámetro medio superficial
<i>d</i> 4.3	Diámetro medio volumétrico
<i>k</i>	Índice de consistencia
MDA	Malonaldehído
MPa	Megapascals
mEq	Miliequivalente
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
<i>n</i>	Índice de comportamiento al flujo
nm	Nanómetro
NaCn	Caseinato de Sodio

ND	No Determinado
O/W	Aceite en agua
s	Segundos
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TEP	Tetra Etoxy Propano
TBARS	Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico
UHPH	Homogeneización a Ultra Alta Presión
UHPH C	Emulsión Control tratada por Homogeneización a Ultra Alta Presión
UHPH A1	Emulsión con Aceite Esencial de Clavo tratada por Homogeneización a Ultra Alta Presión
UHPH A2	Emulsión con Aceite Esencial de Tomillo tratada por Homogeneización a Ultra Alta Presión
µg	Microgramo
µL	Microlitro
ω-3	Omega 3
ω-6	Omega 6
ω-9	Omega 9
%	Por ciento

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
2.1. Generalidades.....	5
2.2. Materiales.....	5
2.3. Preparación de las emulsiones O/W.....	6
2.4. Determinación de la distribución del tamaño de partícula.....	7
2.5. Determinación del pH.....	8
2.6. Caracterización reológica.....	8
2.7. Estabilidad física.....	8
2.8. Estabilidad frente a la oxidación.....	10
2.9. Análisis estadístico.....	11
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
3.1. Distribución del tamaño de partícula.....	11
3.2. Determinación del pH.....	12
3.3. Caracterización reológica.....	13
3.4. Estabilidad física.....	18
3. 5. Estabilidad frente a la oxidación.....	22
4. CONCLUSIÓN.....	26
5. BIBLIOGRAFIA.....	27

1. INTRODUCCIÓN

Existe un interés constante y una creciente demanda en el desarrollo de alimentos que mantengan estables, por un tiempo más prolongado, sus propiedades físico-químicas y organolépticas y además de ello sean beneficiosos para la salud, por lo que existen cada vez más empresas alimentarias que están dispuestas a introducir en sus productos tanto componentes funcionales como nuevas tecnologías en sus procesos de elaboración que aporten dichas mejoras.

Una emulsión se compone de dos líquidos inmiscibles (por lo general aceite y agua) con uno de los líquidos dispersos en forma de pequeñas gotas esféricas en la otra (McClements, 2005). Entre las estructuras y unidades formadoras de estructura dentro de los alimentos, las emulsiones juegan un papel importante. De hecho, las emulsiones son ingredientes clave en la formación de estructuras en ciertos productos, tales como batidos, helados, leche, salsas, etc. La formulación de una estructura de los alimentos que involucra emulsiones es un proceso complejo, ya que depende de las cualidades deseadas del alimento y la función de la emulsión en el producto. Por lo tanto, la comprensión de la formación, estructuras y propiedades de las emulsiones es esencial para la creación y estabilización de estructuras en los alimentos (Dickinson, 2003).

Las emulsiones se clasifican en función de la distribución de las fases de aceite y acuosa (Dickinson, 2003; McClements, 2005). La sustancia que forma las gotitas en una emulsión se conoce como la fase dispersa, mientras que la sustancia que compone el líquido circundante se denomina la fase continua. Hay tres tipos principales de emulsión que son importantes en los alimentos: O/W (aceite en agua) donde las gotas de aceite se dispersan en una fase acuosa (por ejemplo: mayonesa, leche, crema, sopas y salsas); W/O (agua en aceite) donde las gotitas de agua se dispersan en una fase de aceite (por ejemplo: margarina, mantequilla); y las emulsiones múltiples del aceite en agua en aceite (O/W/O) o agua en aceite en agua (W/O/W). Por ejemplo, una emulsión W/O/W se compone de gotitas de agua dispersadas dentro de las gotitas de aceite más grandes, que a su vez se dispersan en una fase continua acuosa. Las emulsiones pueden ser utilizadas para controlar la liberación de determinados ingredientes, reducir el contenido de grasa total o aislar un ingrediente de otro (Clegg *et al.*, 2016).

Todas las emulsiones alimenticias son sistemas termodinámicamente inestables que con el tiempo terminan descomponiéndose, y la estabilidad cinética nos indica la velocidad

a la que esto ocurrirá. La estabilidad de una emulsión se define como la capacidad de una emulsión de resistir cambios físicos y químicos en el tiempo (McClements, 2005). Los cambios físicos corresponden a modificaciones en la organización estructural de las moléculas, mientras que los cambios químicos resultan en la alteración de dichas moléculas (por ejemplo, oxidación de lípidos, lipólisis). Los mecanismos por los cuales estos cambios se llevarán a cabo dependerán de la composición de emulsión (por ejemplo concentración del emulsionante insuficiente/excesiva), de los tratamientos aplicados, de las interacciones coloidales entre ingredientes y condiciones ambientales durante el almacenamiento, tales como variaciones de temperatura (Palazolo *et al.*, 2011).

Hay cinco mecanismos que contribuyen a la inestabilidad física de las emulsiones: el cremado, la sedimentación, la agregación (floculación o coalescencia), la maduración de Ostwald (moléculas que se difunden a partir de pequeñas gotas para formar grandes gotas) y la inversión de fase (McClements, 2005). La floculación, la sedimentación y el cremado son fenómenos reversibles que resultan en la migración de las partículas y puede acabar resultando en la separación de las dos fases. La coalescencia, considerado el fenómeno de degradación final, es un fenómeno irreversible que se caracteriza por una modificación del tamaño de partícula.

La homogeneización mecánica es un proceso capaz de producir un tamaño homogéneo en la distribución de partículas en suspensión en un líquido, obligando al líquido bajo el efecto de la presión, a pasar por una válvula de interrupción, obteniendo productos más estables a nivel físico. La homogeneización convencional (CH), desde sus orígenes hasta el día de hoy, ha ampliado el intervalo de presión de trabajo hasta 60 MPa, forzando el fluido por un espacio de aproximado de entre 100-300 μm . La homogeneización a alta presión o alta presión dinámica (esta tecnología no debe confundirse con la alta presión hidrostática) permite presiones 10-15 veces más altas que los homogeneizadores convencionales y cubre el intervalo de presiones entre 100 y 400 MPa, donde el intervalo de presión de 200 a 400 MPa ha sido denominado por algunos autores Homogeneización a Ultra Alta Presión (UHPH), a pesar de la controversia que existe en la literatura en estos términos (Dumay *et al.*, 2013).

La tecnología UHPH se basa en los mismos principios que la CH con la gran diferencia de que se pueden alcanzar presiones superiores a 200 MPa gracias al diseño de las

válvulas y a la utilización de nuevos materiales, y permite tratar en continuo grandes volúmenes de alimentos bombeables. Hasta el momento, se han utilizado diferentes equipos de homogenización por alta presión en industrias químicas, farmacéuticas y especialmente de alimentos y biotecnología con el fin de emulsificar, dispersar, mezclar y procesar sus productos (Popper y Knorr, 1990; Paquin, 1999; Floury *et al.*, 2000; Hayes *et al.*, 2005; Gràcia *et al.*, 2008). Esta tecnología permite obtener emulsiones submicrónicas finas y estables ($< 1 \mu\text{m}$) (Trujillo *et al.*, 2006; Chevalier *et al.*, 2009; Dumay *et al.*, 2013; Fernández-Ávila *et al.*, 2015), y está siendo empleada para mejorar la estabilidad física y microbiológica de las emulsiones, al someter a los líquidos a un intenso proceso de agitación mecánica (Perrier *et al.*, 2005; Dumay *et al.*, 2013; Fernández-Ávila *et al.*, 2015). Además, induce cambios adicionales en el producto tratado, como modificación de las propiedades reológicas, organolépticas y funcionales (Amador y Ruiz, 2009). Dentro de los efectos no deseables de esta tecnología se encuentran los procesos de oxidación derivados del aumento del área superficial de las partículas lipídicas debido a la reducción del tamaño de partícula, aunque diferentes estudios han mostrado que la elección del emulgente y su concentración, así como la presión de homogeneización utilizada puede reducir considerablemente la oxidación producida por esta tecnología (Hebishy, 2013).

Un componente esencial de las emulsiones es el agente emulsionante utilizado. Las proteínas son una clase de agente emulsionante más comúnmente utilizado por la industria alimentaria ya que son naturales, de bajo coste y están ampliamente disponibles, lo que las hace ingredientes ideales. Las mismas, por su carácter anfílico, actúan como tensoactivos macromoleculares y tienen la particularidad de estabilizar la emulsión a través de la formación de una cubierta viscoelástica cuyas propiedades mecánicas influyen en la estabilidad del sistema coloidal (Dickinson y McClements, 1996; Damodaran, 1997; Cortés *et al.*, 2009). Las proteínas lácteas, tanto en su forma soluble como dispersas, son de gran valor como ingredientes alimenticios con excelentes características surfactivas y estabilizantes. Las dos principales clases de proteínas lácteas son las caseínas y las proteínas del suero. En términos de estructura es conveniente distinguir entre ellas ya que las caseínas poseen una estructura desordenada y flexible mientras que las proteínas del suero tienen una estructura globular compacta. A diferencia de las caseínas, el caseinato no se agrega en forma de micelas y puede ser fabricado por precipitación de las caseínas de la leche, y es uno de los emulgentes

proteicos de origen animal más utilizado en la industria alimentaria. En varias aplicaciones alimenticias se ha visto que el caseinato es más funcional que la caseína en términos de propiedades funcionales tales como la viscosidad, la solubilidad y el poder emulsionante (Srinivasan *et al.*, 1999).

Un componente de las emulsiones O/W es el tipo y cantidad de aceite utilizado. Los aceites vegetales, en general, aportan una mayor concentración de ácidos grasos insaturados, en comparación a las grasas animales como la grasa láctea, pero son muy susceptibles a reacciones de oxidación. En este estudio se utilizaron aceite de oliva, el cual es un aceite rico en ácidos grasos monoinsaturados como el ácido oleico (C18:1) de la serie ω -9, y aceite de chía, rico en ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linolénico (C18:3, ω -3) y el ácido linoleico (C18:2, ω -6). La chía es considerada una fuente rica de ácidos grasos ω -3 y ω -6 (Ayerza y Coates, 2005). Entre los beneficios para la salud tras el consumo de ácidos grasos ω -3 hay que destacar la reducción de los niveles perjudiciales de colesterol LDL y aumento en los niveles de colesterol HDL en la sangre (Tepeet *et al.*, 2006). Se ha encontrado efectos terapéuticos de los ácidos grasos ω -3 en enfermedad inflamatoria intestinal crónica, asma, fibrosis, artritis reumatoide, desarrollo y función del cerebro, depresión y la enfermedad bipolar (Woods *et al.*, 1997).

Los aceites esenciales (AEs) están constituidos por una mezcla compleja de metabolitos secundarios volátiles con numerosas actividades, entre ellas antimicrobiana, antioxidante, antigenotóxica y de inhibición del crecimiento celular tumoral (Jaramillo *et al.*, 2010). Los AEs por lo general consisten en mezclas complejas de compuestos acíclicos, cíclicos, aromáticos, heterocíclicos y sus derivados oxigenados. La mayoría de sus componentes se dividen en cuatro grupos principales: compuestos alifáticos, no terpénicos, compuestos aromáticos, terpenos y terpenoides, entre otros (Martínez, 2003). Numerosos estudios realizados han señalado que muchos de los AEs tienen marcada actividad antioxidante (Baratta *et al.*, 1998; Puertaset *et al.*, 2002; Stashenko *et al.*, 2004; Guimarães *et al.*, 2010), por lo que muchas ramas de la industria, que usan antioxidantes en sus procesos, se han interesado en ellos. Dentro de los aceites esenciales, el de clavo y tomillo son referenciados como aceites esenciales con alta actividad antimicrobiana y antioxidante, por lo cual son objeto de estudio en la presente investigación.

El objetivo principal de este estudio ha sido elaborar y caracterizar emulsiones O/W, utilizando aceites vegetales de alta insaturación ricos en ω -3 (aceites de oliva y chía), aceites esenciales (clavo y tomillo) con propiedades antioxidantes y antimicrobianas, adicionadas con caseinato sódico (5%) como emulgente proteico de origen animal, y estabilizadas mediante un tratamiento de UHPH (200 MPa), en comparación a las obtenidas por homogenización convencional (15 MPa).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Generalidades

La preparación, análisis y almacenamiento de las emulsiones se realizó en los laboratorios de Tecnología de los Alimentos y de Higiene e Inspección de los Alimentos del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Los tratamientos realizados de homogeneización convencional (CH) y de homogeneización a ultra alta presión (UHPH) se llevaron a cabo en el Servicio Planta de Tecnología de los Alimentos de la UAB.

2.2. Materiales

El caseinato de sodio (NaCn) utilizado fue un aislado de proteína (Caséinate de sodium 110), extraído directamente de la leche, que fue adquirido al productor francés Epi Ingrédients (Ancenis, Francia). De acuerdo con las especificaciones del fabricante, este producto contiene 91% de materia nitrogenada total (N x 6,38), 1% de materia grasa, 3,68% de minerales y 5,8% de humedad.

El aceite de oliva refinado utilizado en la fabricación de las emulsiones fue adquirido de la empresa Gustav Heess (Barcelona, España) y fue obtenido a partir de las pulpas de las drupas maduras de *Olea europaea* L., mediante prensado en frío. De acuerdo a las especificaciones técnicas del fabricante, este aceite presenta una acidez <0,3 mg KOH/g y un índice de peróxidos de <10 meq O₂/kg. Su composición en ácidos grasos es la siguiente: ácido palmítico (C16:0) = 11,97%; ácido esteárico (C18:0) = 3,30%; ácido oleico (C18:1) = 75,23%; ácido linoleico (C18:2) = 6,75%; ácido linolénico (C18:3) = 0,38%.

El aceite de chía es un aceite de origen vegetal proveniente de las semillas de la planta de Chía (*Salvia hispánica*), el cual tiene un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, en concreto ácido linolénico (ω -3; 62%) y linoléico (ω -6; 18%), y además contiene ácidos grasos monoinsaturados como el oléico (ω -9; 8%). El aceite de chía fue obtenido de semillas seleccionadas y limpias de impurezas, mediante prensado en frío, con un índice de peróxido de 2,19 mEq O₂/kg de aceite y un pH de 6,52 y fue adquirido al productor Foods Alive (Angola, Indiana, EEUU).

Los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) fueron adquiridos del proveedor Esencias Martínez Lozano, S.A. (Murcia).

2.3. Preparación de las emulsiones O/W

Se prepararon tres pre-emulsiones O/W a base de NaCn (3%) y agua destilada (77%), con un contenido fijo de materia grasa vegetal del 20% (15% de aceite de oliva refinado y 5% de aceite de chía). Finalmente a una de ellas se le adicionó 0,5% de aceite esencial de clavo, a otra 0,5% de aceite esencial de tomillo, y una tercera no se le añadió ningún aceite esencial actuando como control. Para su elaboración se disolvió el NaCn en agua destilada de forma manual, agregando progresivamente el agua necesaria, y removiendo suave y constantemente la solución proteica que posteriormente se almacenó en refrigeración durante toda la noche a 4 °C para conseguir una completa hidratación del NaCn. Las dispersiones de proteínas, se equilibraron a 20 °C antes de proceder a su mezcla con los aceites. Una vez incorporado los aceites vegetales y esenciales, las mezclas se pre-homogeneizaron usando un sistema rotor-estator CAT Unidrive X1000 Homogeneizer Drive (CAT Scientific, Inc., Paso Robles, CA, EEUU) durante 2 min (1 min a 4000 rpm y 1 min a 8500 rpm) para así obtener las tres pre-emulsiones. Estas se dividieron en 2 partes para ser tratadas por los tratamientos de HC y de UHPH. Finalmente, fueron sometidas a HC a 15 MPa (una etapa), en un homogeneizador de dos etapas (*Tetra Alex*, modelo S05, Tetra Pak, Lund, Suecia) con un caudal de 225 L/h a 20 °C. La homogeneización a ultra alta presión, se realizó también en una sola etapa a 200 MPa, usando un homogeneizador Stansted Benchtop (modelo FPG 12500, Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Reino Unido), con un caudal de 15 L/h. Se introdujo el producto a temperatura ambiente, entre 20 y 21 °C aproximadamente y durante el procesamiento se monitorizaron las temperaturas siguientes: T₁: temperatura de tanque

de llenado (20 ± 1 °C); T_{in} : temperatura antes de la válvula de HP (20 ± 1 °C); T_{va} : temperatura inmediatamente después de la válvula de HP (88 ± 4 °C); T_{fi} : temperatura después de pasar por el intercambiador de frío (10 ± 3 °C). Con estos tratamientos de homogenización se obtuvieron un total de seis emulsiones que se mantuvieron en almacenamiento en refrigeración a 4 °C hasta final de vida útil microbiológica (20 días para las emulsiones HC y 30 días para las emulsiones UHPH). La vida útil microbiológica de las emulsiones y la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se estableció en un trabajo previo por otro investigador del centro, y no forma parte de este estudio.

Se realizaron dos repeticiones completas del experimento de manera independiente.

2.4. Determinación de la distribución del tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partícula en las emulsiones se determinó tras 24 h del proceso de homogeneización utilizando un espectrofotómetro de difracción por rayos láser Beckman Coulter (modelo LS 13 320 series, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EEUU). Este dispositivo proporciona mediciones indirectas del tamaño de partícula de forma esférica, basándose en el principio físico de que toda partícula, en función de su tamaño, difracta la luz incidente en un ángulo determinado que aumenta logarítmicamente al disminuir el tamaño de la misma. La intensidad de la luz absorbida por el material se mide como oscurecimiento e indica la cantidad de la muestra añadida al líquido dispersante (Storti y Balsamo, 2010). Para ello, las muestras se diluyeron en agua destilada hasta alcanzar un índice de obscuración apropiado en la célula del difractómetro (40-50%).

En cuanto a los parámetros ópticos se refiere, se emplearon índices de refracción de 1,472 y 1,332 para la mezcla de aceites y el agua, respectivamente. Cada muestra diluida se analizó un total de cuatro veces, de forma sucesiva, para obtener los valores medios correspondientes al diámetro medio ponderado en función de la superficie ($d_{3,2}$, μm) y al diámetro medio ponderado en función del volumen ($d_{4,3}$, μm).

2.5. Determinación del pH

El pH de la emulsión fue medido a través de un electrodo de inmersión con un micro medidor de pH (GLP 21 model 2001; Crison Instruments SA, Alella, Spain). Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

2.6. Caracterización reológica

La caracterización reológica de las emulsiones fue determinada según la vida útil de cada tipo de emulsión, realizándose para las de CH en los días 1, 10 y 20, y en los días 1, 10, 20 y 30 para las emulsiones tratadas por UHPH. La primera medida, en ambos casos, se llevó a cabo tras 24 h de almacenamiento en refrigeración a 4°C. Los ensayos reológicos se realizaron con un Reómetro rotacional HAAKE™ RheoStress™ 1 (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Alemania), equipado con un sensor de cilindros concéntricos, (Z34 DIN) aptos para muestras líquidas. Las curvas de flujo (esfuerzo cortante frente a gradiente de velocidad) se determinaron en función del incremento y, posterior disminución de la velocidad de cizallamiento entre 0,001 s⁻¹ y 100 s⁻¹ durante 1 min, respectivamente. Estas curvas de flujo fueron ajustadas al modelo reológico de Ostwald de Waele o ley de la potencia: $\tau = k (\dot{\gamma})^n$, donde τ es el esfuerzo cortante (Pa), k es el índice de consistencia (Pa·sⁿ), $\dot{\gamma}$ la velocidad de cizallamiento (s⁻¹) y n es el índice de comportamiento al flujo. Las mediciones se realizaron por duplicado, homogeneizando manualmente el contenido de los mismos, previamente al análisis, que fue realizado una temperatura de 21°C.

2.7. Estabilidad física

La estabilidad física de las emulsiones se determinó utilizando un analizador óptico Turbiscan™ LAB (Formulacion, Toulouse, Francia), versión 2.1. El Turbiscan nos permite escanear el perfil de turbidez de una emulsión a lo largo del tubo de vidrio que contiene la emulsión, con el fin de determinar el perfil de turbidez en el tiempo. Estos perfiles constituyen la huella digital macroscópica de las muestras de emulsión en un momento dado (Herrera, 2011). Los resultados expresados se basan en el aumento de la señal de luz refractada en el producto (retrodispersión), que es directamente proporcional a la concentración de partículas. Esto se traduce en la posibilidad de

detectar los dos principales fenómenos de desestabilización que afectan a la homogeneidad de las dispersiones: migración de partículas (cremado y sedimentación) y la variación de tamaño de partícula o agregación (coalescencia y floculación) (Mengual *et al.*, 1999).

Este equipo permite la caracterización óptica de cualquier tipo de dispersión. La tecnología del Turbiscan consiste en medir las intensidades de luz en Transmisión (T) y Retrodispersión, más comúnmente denominada “Backscattering” (BS), para detectar el cambio de tamaño de partícula en procesos de coalescencia y floculación, y la separación de fases en procesos de sedimentación o cremado. Para ello, el equipo dispone de un cabezal óptico con una fuente de luz infrarroja ($\lambda_{aire}=850\text{ nm}$) que emite una cantidad de energía en forma de fotones a través de la solución que se va a analizar, y dos detectores (T y BS). Una parte de la energía incidente logra atravesar la muestra y es detectada mediante el detector T, es la que se conoce como energía transmitida. Por el contrario, a la energía que no logra atravesar la muestra se la llama energía de retrodispersión o BS y es detectada por el detector de BS. El proceso consiste en un barrido de energía luminosa a lo largo de toda la longitud del cristal en el que se encuentra la muestra. Cada 0,5 mm, el cabezal óptico libera un pulso de fotones que son detectados, registrándose la evolución de la señal de transmisión y de retrodispersión. La interpretación de la secuencia que muestra la señal permite caracterizar la dispersión y, determinar si la emulsión es estable o si ésta sigue un mecanismo de desestabilización (sedimentación, floculación, coalescencia, separación de fases, etc.) (Buonanno *et al.*, 2008).

La propagación de la luz a través de la dispersión concentrada se puede utilizar para caracterizar la estabilidad físico-química de la emulsión (Juliano *et al.*, 2011). Por lo tanto, cualquier cambio debido a una variación del tamaño de partícula (floculación, coalescencia) o una variación local de fracción de volumen (fenómenos de migración como cremado o sedimentación) es detectado por el Turbiscan™ LAB (Fernández-Ávila *et al.*, 2015).

En el presente estudio, las muestras fueron escaneadas por triplicado, a intervalos preestablecidos durante un periodo de tiempo máximo de 20 días para HC (días 1, 2, 10 y 20) y 30 días para UHPH (días 1, 2, 10, 20 y 30).

Las cinéticas de desestabilización de los seis tipos de emulsiones objeto de estudio, se evaluaron a partir de los perfiles de retrodispersión (BS) medidos de acuerdo a los intervalos preestablecidos a lo largo del periodo de almacenamiento (BSt), utilizando el día 0 (BS0) como referencia; $\Delta BS = BSt - BS0$ (zona superior, media e inferior) (Herrera, 2012).

2.8. Estabilidad frente a la oxidación

Los productos de la oxidación primaria (hidroperóxidos) se determinaron usando el método propuesto por Huet *al.* (2004). El procedimiento seguido fue el siguiente: se tomaron, por triplicado, 300 μL de muestra de cada emulsión y un blanco con agua destilada, se mezcló con 1,5 mL de una solución de isooctano/2-propanol (3:1, v/v), en tubos de vidrio, se agitó en vórtex 30s (10s \times 3), luego se centrifugó a 1000 g a 20-25 °C durante 2 min con el fin de separar la fase orgánica. Se añadieron 200 μL de la fase orgánica (parte líquida suspendida en la parte más superficial) a 2,8 mL de la solución de metanol/1-butanol (2:1, v/v). A continuación, se pipetearon, de forma sucesiva, 15 μL de amonio tiocianato 3,97 M y 15 μL de una solución de hierro (preparada mezclando 0,132 MBaCl₂ + 0,144 M FeSO₄). Finalmente, los tubos de ensayo se volvieron a agitar en vórtex (10s) y, transcurridos 20 min de espera, para permitir que tuviese lugar la reacción, se midió la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 532 nm. Este método espectrofotométrico mide la capacidad de los hidroperóxidos para oxidar los iones ferrosos a férricos, al interaccionar con amonio tiocianato y una solución de hierro. Los iones ferrosos (Fe²⁺) son oxidados, por el peróxido de hidrógeno, a iones férricos (Fe³⁺) y éste se combina con el tiocianato, en medio clorhídrico, dando lugar a un complejo de color rojo-violeta que muestra una absorbancia máxima a 500-510 nm (Dobarganes y Velasco, 2002).

Para la determinación de los productos de la oxidación secundaria (TBARS), se cuantificaron las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA). Para ello, se empleó una adaptación del método propuesto por Sørensen y Jørgensen (1996). Se tomaron 7,5 g de muestra de cada una de las emulsiones y se les añadieron 15 mL de ácido tricloroacético al 7,5%. La mezcla se agitó al vórtex (10s) y, tras 20 min de reacción, se filtraron a través de un filtro Whatman nº 1. A continuación, se transfirieron 2 mL del filtrado a tubos de ensayo, se pipetearon 2 mL de una solución de TBA al 0,8%, se

agitaron en vórtex (10s) y se incubaron en un baño maría a 70 °C durante 40 min. Las muestras se enfriaron rápidamente mediante un baño de hielo durante 5 min y, finalmente, se midió la absorbancia de la solución (tras la reacción colorimétrica) a la longitud de onda a 532 nm. Este método se basa en la reacción de una molécula de malonaldehído (MDA) con dos moléculas TBA para formar un complejo coloreado MDA-TBA (color rosa), que puede ser cuantificado mediante espectrofotometría con un máximo de absorción a longitudes de onda de 530-535 nm (Sahidi y Zhong, 2005).

2.9. *Análisis estadístico*

Se realizó un análisis estadístico ANOVA, de los datos experimentales utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion XVI, con un nivel de significación del 95%.

En cuanto a la estadística descriptiva se refiere, se calculó la media y la desviación estándar para cada variable en estudio. Igualmente, se utilizó el test Tukey, de comparaciones múltiples, para contrastar las medias de los diferentes niveles de un mismo factor a lo largo del tiempo y de diferentes factores en los diferentes días de análisis.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. *Distribución del tamaño de partícula*

El estudio de la distribución del tamaño de partícula de la emulsión se realizó mediante el análisis de las curvas de distribución de tamaño de partícula y la evaluación de los parámetros $d_{3,2}$ (diámetro medio en relación a la superficie-peso de las partículas) y $d_{4,3}$ (diámetro medio en relación al volumen-peso de las partículas, relacionado con la presencia de agregados de las partículas en el producto) (Cortés *et al.*, 2009).

En la Tabla 1 se puede apreciar que la aplicación de la UHPH redujo considerablemente el tamaño de las partículas de la emulsión, en comparación con el tratamiento de CH. Como se ha comentado anteriormente, la UHPH es una tecnología de homogeneización que permite obtener emulsiones submicrónicas finas y físicamente estables ($< 1 \mu\text{m}$) (Trujillo *et al.*, 2006; Chevalier *et al.*, 2009; Dumay *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2015). Otros estudios (Hebishy, 2013) también han utilizado el caseinato sódico como

emulgente además de la tecnología UHPH para producir emulsiones O/W dando como resultado tamaños de partícula similares al obtenido en nuestro estudio.

En relación a la adición de aceites esenciales, no hubo diferencias significativas en las emulsiones añadidas de aceites esenciales de clavo o de tomillo.

Tabla 1. Parámetros correspondientes al análisis de tamaño de partícula de las emulsiones O/W producidas con caseinato sódico, aceites vegetales y esenciales, y tratadas por homogeneización convencional (CH) o por homogeneización a ultra alta presión (UHPH).

Tamaño de partícula ¹ (µm)		
Tratamientos	$d_{3,2}$	$d_{4,3}$
CH C	1,45 ^b ± 0,14	0,74 ^b ± 0,07
CH A1	1,49 ^b ± 0,02	0,71 ^b ± 0,02
CH A2	1,51 ^b ± 0,07	0,77 ^b ± 0,05
UHPH C	0,70 ^a ± 0,06	0,27 ^a ± 0,02
UHPH A1	0,69 ^a ± 0,09	0,28 ^a ± 0,02
UHPH A2	0,70 ^a ± 0,03	0,31 ^a ± 0,02

¹Media ± error estándar. CH: Homogeneización convencional; UHPH: Homogeneización a ultra alta presión; C: Emulsión control; A1: Emulsión con aceite esencial de clavo; A2: Emulsión con aceite esencial de tomillo. ^{a-b} Valores en la misma columna con diferente superíndice indican diferencias significativas entre las emulsiones (P<0,05).

3.2. Determinación del pH

La Tabla 2 muestra los valores de pH de las distintas emulsiones tratadas con ambos tratamientos de homogeneización. Los valores de pH de las diversas emulsiones, al día 1 se situaron entre 6,82 y 6,95 indicando diferencias significativas (P<0,05), entre las emulsiones producidas por los diferentes tratamientos de homogeneización, y entre las emulsiones control y aquellas con adición de aceites esenciales (~ 0,1 unidades). Las emulsiones UHPH presentaron mayores niveles de pH en comparación a las obtenidas mediante CH. Durante el tiempo de almacenamiento, el comportamiento del pH de las emulsiones tendió en general a disminuir, haciéndolo de manera significativa (P < 0,05) en las emulsiones UHPH, a diferencia de sus homólogas tratadas por CH. En los días de almacenamiento 10 y 20 no hubo diferencias significativas entre las emulsiones tratadas por CH.

Tabla 2. Parámetros correspondientes al pH de la emulsión O/W, emulsiones tratadas por homogeneización convencional y a ultra alta presión..

Tratamientos	pH ¹			
	Día 1	Día 10	Día 20	Día 30
CH C	6,82 ^{c,x} ± 0,007	6,82 ^{a,x} ± 0,028	6,72 ^{a,x} ± 0,170	ND
CH A1	6,72 ^{a,x} ± 0,014	6,75 ^{a,x} ± 0,021	6,73 ^{a,x} ± 0,110	ND
CH A2	6,76 ^{b,x} ± 0,007	6,81 ^{a,x} ± 0,099	6,57 ^{a,x} ± 0,134	ND
UHPH C	6,94 ^{e,yz} ± 0,014	7,05 ^{b,z} ± 0,042	6,80 ^{a,xy} ± 0,078	6,65 ^{a,x} ± 0,053
UHPH A1	6,84 ^{d,y} ± 0,028	6,92 ^{ab,y} ± 0,049	6,91 ^{a,y} ± 0,099	6,55 ^{a,x} ± 0,060
UHPH A2	6,95 ^{f,y} ± 0,007	6,95 ^{ab,y} ± 0,064	6,84 ^{a,xy} ± 0,018	6,69 ^{a,x} ± 0,095

¹Media ± error estándar. CH: Homogeneización convencional; UHPH: Homogeneización a ultra alta presión; C: Emulsión control; A1: Emulsión con aceite esencial de clavo; A2: Emulsión con aceite esencial de tomillo. ND: No determinado. ^{a-f} Valores en la misma columna con diferente superíndice indican diferencias significativas entre las emulsiones (P<0,05). ^{x-z} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas a lo largo del tiempo (P<0,05).

3.3. Caracterización reológica

El ajuste de las curvas de flujo al modelo generalizado de Ostwald de Waele mostró valores de n correspondientes a un comportamiento no Newtoniano en todas las emulsiones estudiadas (Tabla 3). Sin embargo, las emulsiones tratadas por UHPH presentaron valores de n muy próximos a 1, indicando con ello que se acercan mucho más al comportamiento Newtoniano que sus homólogas tratadas por CH. En todos los casos, n fue menor que 1, lo que indica que se trata de líquidos pseudoplásticos, en los que la viscosidad disminuye al aumentar el gradiente de velocidad aplicado. De los valores observados, podemos decir que las muestras tratadas mediante CH son marcadamente pseudoplásticas y las tratadas a UHPH son ligeramente pseudoplásticas. A lo largo del tiempo de almacenamiento en la mayoría de los casos, n mostró un aumento, indicando una mayor tendencia al comportamiento pseudoplástico, debido probablemente a la interacción entre gotas producida por interacciones atractivas. La excepción observada de esta tendencia la presentó la emulsión UHPH A2, la cual mantuvo un comportamiento estable no existiendo diferencias significativas a lo largo del almacenamiento.

Según lo expuesto por los autores Flourey, Desrumaux y Lardieres (2000), las emulsiones que contienen hasta un 20% de fase dispersa y que son sometidas a un proceso de homogeneización en un intervalo de presión de 20-300 MPa, presentan comportamientos newtonianos ($n \approx 1$). Esto es debido a la baja interacción entre partículas que existen en este tipo de emulsiones, como consecuencia de la disminución en el tamaño de partícula que, a su vez, conlleva la reducción de la tensión interfacial. Esta teoría es respaldada por otros autores como Samavati *et al.* (2002).

Hay diversos estudios que relacionan el pH con la respuesta viscoelástica, Calero *et al.* (2013) afirma que a pH elevado puede ser atribuida a la formación de redes de las gotas de fase dispersa cuya superficie se encuentra rodeada de capas de proteína cargadas negativamente y que por tanto interaccionan moléculas con carga positiva localizadas preferentemente en la fase continua. Sin embargo a menor pH, lo cual coincide con este estudio, provoca una disminución de las cargas negativas superficiales de la proteína, al aproximarse a su punto isoelectrico, que produce un claro debilitamiento de estas redes estructurales.

Tabla 3. Valores medios y desviaciones estándar del índice de comportamiento al flujo ($n = \text{Pa} \times \text{s}$) de las emulsiones tratadas por homogeneización convencional (CH) y a ultra alta presión (UHPH). Evolución durante el almacenamiento en refrigeración a 4 °C.

Tratamientos	<i>n</i> (Pa ×s)															
	Día 1				Día 10				Día 20				Día 30			
CH C	0,67	^{b, x}	±	0,041	0,75	^{a, xy}	±	0,225	0,79	^{b, y}	±	0,055			ND	
CH A1	0,69	^{b, x}	±	0,005	0,71	^{a, y}	±	0,860	0,72	^{a, y}	±	0,006			ND	
CH A2	0,56	^{a, x}	±	0,007	0,67	^{a, y}	±	3,164	0,76	^{ab, z}	±	0,012			ND	
UHPH C	0,91	^{c, x}	±	0,006	0,93	^{b, x}	±	0,782	0,97	^{c, y}	±	0,005	1,03	^{b, z}	±	0,017
UHPH A1	0,90	^{c, xy}	±	0,009	0,89	^{b, x}	±	0,733	0,95	^{cd, xy}	±	0,023	0,97	^{b, y}	±	0,055
UHPH A2	0,90	^{c, x}	±	0,019	0,87	^{b, x}	±	0,493	0,88	^{c, x}	±	0,056	0,89	^{a, x}	±	0,032

CH: Homogeneización convencional; UHPH: Ultra alta presión de homogeneización; C: emulsión control; A1: Emulsión con aceite de clavo; A2: Emulsión con aceite de tomillo. ^{a-d} Valores en la misma columna con diferente superíndice indican diferencias significativas entre las emulsiones ($P < 0,05$). ^{x-z} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas a lo largo del tiempo ($P < 0,05$).

Tabla 4. Valores medios y desviaciones estándar del índice de consistencia ($k = \text{mPa} \times \text{s}^n$) de las emulsiones tratadas por homogeneización convencional y a ultra alta presión. Evolución durante el almacenamiento en refrigeración a 4 °C.

Tratamientos	$k \text{ (mPa} \times \text{s}^n)$									
	Día 1		Día 10		Día 20		Día 30			
CH C	44,72	^{b, z} ± 0,06	25,68	^{c, y} ± 0,23	18,56	^{d, x} ± 0,22	ND			
CH A1	42,28	^{b, z} ± 0,53	37,09	^{d, y} ± 0,86	33,25	^{f, x} ± 0,46	ND			
CH A2	64,93	^{c, z} ± 4,37	51,78	^{e, y} ± 3,16	21,26	^{e, x} ± 0,46	ND			
UHPH C	11,42	^{a, z} ± 0,27	10,52	^{a, z} ± 0,78	6,78	^{a, y} ± 0,46	2,85	^{a, x} ± 0,27		
UHPH A1	11,86	^{a, z} ± 0,92	14,09	^{b, z} ± 0,73	8,59	^{b, y} ± 0,80	5,64	^{b, x} ± 1,90		
UHPH A2	12,66	^{a, x} ± 2,03	12,10	^{ab, x} ± 0,49	12,29	^{c, x} ± 0,57	13,34	^{c, x} ± 0,21		

CH: Homogeneización convencional; UHPH: Homogeneización a ultra alta presión de; C: Emulsión control; A1: Emulsión con aceite de clavo; A2: Emulsión con aceite de tomillo. ND: No determinado. ^{a-f} Valores en la misma columna con diferente superíndice indican diferencias significativas entre las emulsiones ($P < 0,05$). ^{x-z} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas a lo largo del tiempo ($P < 0,05$).

En la Tabla 4 se evidencia una marcada diferencia del índice de consistencia entre los dos tipos de tratamientos realizados en este estudio, teniendo valores mayores las emulsiones tratadas por CH, en comparación a las emulsiones tratadas por UHPH. Se puede observar que a lo largo del tiempo de almacenamiento, en ambos casos, el índice de consistencia disminuyó considerablemente. Cabe destacar que la emulsión formulada con aceite de tomillo y tratada a UHPH es la excepción, manteniendo valores estables de k a lo largo del almacenamiento. Según Cortés-Muñoz *et al.* (2009), para una fracción de volumen de aceite dada, la viscosidad de las emulsiones UHPH está inversamente correlacionada con los valores $d_{4,3}$, lo que implica un aumento de la viscosidad de la emulsión al incrementarse el número de gotas de aceite, lo cual no aplica en el presente estudio, donde la viscosidad se ve directamente relacionada con los valores $d_{4,3}$. Esto podría deberse presumiblemente a la presencia del aceite de chía, pero no hay suficientes estudios que expliquen este comportamiento inusual.

En general, podemos decir que los valores de los parámetros reológicos observados el día 1 pueden explicarse a partir de los valores observados de tamaño de partícula. En las muestras CH tanto el tamaño medio de partículas ($d_{3,2}$) como el indicativo de la presencia de agregados ($d_{4,3}$) son mayores que en las emulsiones tratadas por UHPH, de ahí la mayor consistencia observada en las primeras. En general, tanto en los valores de k como en los de n de las emulsiones tratadas por CH, se observó una marcada influencia del aceite esencial de tomillo, las cuales presentaron una consistencia significativamente mayor que la emulsión control y las formuladas con aceite esencial de clavo. Sin embargo, en las emulsiones UHPH, al día 1 no se observó la influencia del aceite esencial utilizado. En cuanto a la evolución de k durante el almacenamiento de las emulsiones UHPH, a excepción de la formulada con aceite de tomillo y como hemos comentado anteriormente, se observó una tendencia a la disminución de este parámetro. Esta tendencia se contradice con estudios realizados recientemente, donde se muestra que el comportamiento de las emulsiones tratadas por UHPH mantienen un comportamiento reológico mucho más estable durante el almacenamiento que los obtenidos en el presente trabajo (Hebishy, 2013; Fernandez-Ávila *et al.*, 2015). Esto podría deberse al tipo de constituyentes incluidos en la emulsión, ya que la presencia del aceite de chía podría causar en la misma una cierta inestabilidad, probablemente por coalescencia, que daría lugar a gotas más grandes, pero en dichas emulsiones habría una superficie eficaz menor de gotas que produciría los cambios de consistencia

anteriormente mencionados. No hay estudios que nos permitan explicar el efecto combinado de la utilización de aceites esenciales, aceite de chía y de oliva, en la elaboración de emulsiones. A la vista del comportamiento de las muestras control, sin aceite esencial, parece probable que el aceite de chía podría tener una influencia importante en el comportamiento reológico observado. Sin embargo, deberían hacerse más estudios, que incluyan un número mayor de muestras con diferentes porcentajes de aceite de chía y esenciales, para tratar de explicar el comportamiento reológico atípico encontrado en este estudio.

3.4. Estabilidad física

La Figura 1 muestra el perfil de las curvas de BS para las emulsiones tratadas por CH y UHPH. En la parte superior, en todos los casos, se muestra formación de cremado, representado por un intenso color naranja, mientras que en la parte inferior, puede distinguirse, una zona de clarificación más o menos intensa según la emulsión, indicando que las partículas menos densas migran hacia la superficie. Como consecuencia de esta migración, el producto clarifica en la parte inferior y crema en la superior, siendo estos fenómenos mucho más marcados en las emulsiones tratadas por CH en comparación a las UHPH; en las emulsiones UHPH, si bien ocurrió clarificación y cremado, éstos fueron menores.

El cremado en las emulsiones apareció en periodos tempranos de almacenamiento y se mantuvo durante el tiempo de almacenamiento. En la zona inferior del recipiente de análisis, se observó una marcada clarificación en las emulsiones tratadas por CH en comparación a las UHPH debido a la migración de las partículas hacia la superficie del recipiente, mostrando que las emulsiones CH fueron más inestables desde el punto de vista físico. Una posible explicación podría ser el tamaño de partícula más grande en las emulsiones CH en comparación a las UHPH.

Los hallazgos en la literatura sugieren que la UHPH mejora la estabilidad de las emulsiones debido a la disminución del diámetro de las partículas que las componen (Floury *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2009). A parte de disminuir el tamaño de partícula, en emulsiones formuladas con proteína como emulsionante, la UHPH mejora la estabilidad de la emulsión creada, por modificar las propiedades y características del emulsionante proteico utilizado por diferentes mecanismos (desnaturalización, cambios

conformacionales aumentando la exposición de zonas hidrofóbicas, etc.), haciendo que en algunos casos recubra mejor las gotas lipídicas y se favorezca su estabilidad en la emulsión (McClements, 2005).

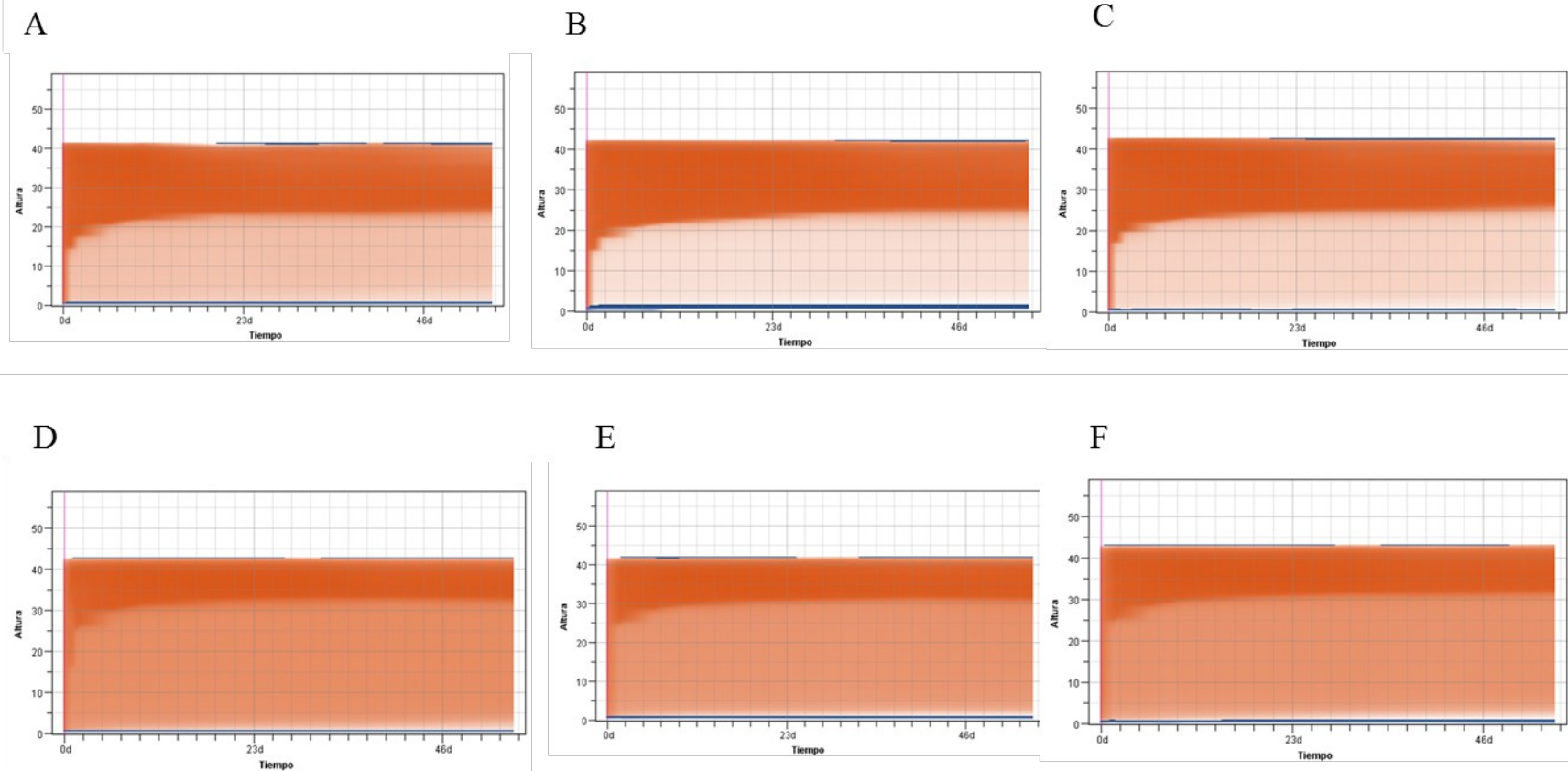


Figura 1. Evolución del *backscattering* (BS) de las emulsiones obtenidas por homogeneización convencional (A: control; B: en presencia de aceite esencial de clavo; C: en presencia de aceite esencial de tomillo) y por homogeneización a ultra alta presión (D: control; E: en presencia de aceite esencial de clavo; F: en presencia de aceite esencial de tomillo) durante el periodo de almacenamiento a 4 °C.

Es posible realizar un seguimiento de la cinética de coalescencia en las muestras en función del tiempo de almacenamiento, gracias al índice de estabilidad calculado por el Turbiscan y denominado *Turbiscan Stability Index* (TSI), el cual resume todas las variaciones detectadas en la muestra (tamaño y/o la concentración) en un periodo de tiempo dado. A mayor TSI, peor es la estabilidad de la muestra.

En general podemos decir que el TSI muestra una marcada diferencia entre las emulsiones tratadas por CH y las UHPH, presentando una cinética de coalescencia mayor y así siendo más inestables las emulsiones CH, en comparación a las emulsiones tratadas por UHPH (Fig. 2). Cabe mencionar, en el caso de las emulsiones CH, un comportamiento más estable en la emulsión que contiene el aceite esencial de tomillo.

Los hallazgos en la literatura sugieren que la UHPH mejora la estabilidad de formación de cremado en las emulsiones, por la disminución del diámetro de las gotas (Floury *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2009). Cuando el tamaño de partícula es < 100 nm, la formación de cremado se reduce considerablemente y la agregación se convierte en un mecanismo dominante para la inestabilidad de la emulsión (McClements, 2005).

Figura 4. Valores del índice de estabilidad del Turbiscan para las emulsiones elaboradas por homogeneización convencional o por ultra alta presión durante su almacenamiento en refrigeración. CH: Homogeneización convencional; UHPH: Ultra alta presión de homogeneización; C: emulsión control; A1: Emulsión con aceite de clavo; A2: Emulsión con aceite de tomillo.

3. 5. Estabilidad frente a la oxidación

La oxidación lipídica es la principal razón del deterioro de las grasas y aceites (Matthäus *et al.*, 2010) que consiste en la reacción del oxígeno molecular con ácidos grasos insaturados, dando como resultado hidroperóxidos insaturados (Gunstone y Martini, 2010). Los hidroperóxidos lipídicos, productos de oxidación primaria, son moléculas inestables que pueden descomponerse en una amplia gama de productos secundarios volátiles y no volátiles, principalmente aldehídos, responsables de olores y sabores indeseables (McClements y Decker, 2000).

En las Tabla 5 y 6 se presentan los valores obtenidos en oxidación primaria y secundaria por análisis de hidroperóxidos y TBARs, respectivamente. Podemos observar que no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) en hidroperóxidos para las emulsiones tratadas por CH y UHPH, a excepción de la emulsión conteniendo aceite esencial de tomillo tratada por UHPH, la cual presentó concentraciones significativamente ($P < 0,05$) menores de hidroperóxidos a partir del día 10 de almacenamiento.

A lo largo del periodo de almacenamiento en general se puede observar, leves ascensos y descensos en los valores de hidroperóxidos. Este comportamiento irregular con aumento y disminución de los hidroperóxidos lipídicos se puede explicar debido a la inestabilidad de los productos de oxidación primarios. Como los peróxidos son productos de oxidación primarios inestables, éstos se pueden transformar rápidamente en productos de oxidación secundaria, incluyendo aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos, ácidos orgánicos volátiles, y compuestos epoxi (McClements y Decker, 2000).

Tabla 5. Valores medios y desviaciones estándar de hidroperóxidos (mmol/L) de las emulsiones tratadas por homogeneización convencional y a ultra alta presión durante su almacenamiento en refrigeración.

Tratamientos	Hidroperóxidos (mmol/L)												
	Día 1			Día 10			Día 20			Día 30			
CH C	1,16	^{a, x}	±	0,09	1,14	^{b, x}	±	0,15	0,90	^{b, x}	±	0,24	ND
CH A1	0,84	^{a, x}	±	0,20	1,05	^{b, x}	±	0,26	0,87	^{b, x}	±	0,16	ND
CH A2	1,00	^{a, x}	±	0,04	0,89	^{b, x}	±	0,24	0,79	^{b, x}	±	0,02	ND
UHPH C	1,01	^{a, x}	±	0,17	0,99	^{b, x}	±	0,27	0,91	^{b, x}	±	0,06	1,02 ^{b, x} ± 0,25
UHPH A1	0,92	^{a, x}	±	0,24	1,08	^{b, x}	±	0,14	0,85	^{b, x}	±	0,11	0,93 ^{b, x} ± 0,23
UHPH A2	0,80	^{a, y}	±	0,20	0,68	^{a, xy}	±	0,06	0,46	^{a, x}	±	0,11	0,43 ^{a, x} ± 0,03

CH: Homogeneización convencional; UHPH: Homogeneización a ultra alta presión; C: Emulsión control; A1: Emulsión con aceite de clavo; A2: Emulsión con aceite de tomillo. ^{a-b} Valores en la misma columna con diferente superíndice indican diferencias significativas entre las emulsiones (P<0,05). ^{x-y} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas a lo largo del tiempo (P<0,05).

El análisis de oxidación secundaria de las emulsiones a través de la técnica de TBARS mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) obteniendo concentraciones mayores de MDA en las emulsiones tratadas por UHPH que en las tratadas por CH a día 1 de su producción. Sin embargo, y en general, los niveles de MDA se mantuvieron constantes durante el almacenamiento de las emulsiones, a excepción de la emulsión formulada con aceite esencial de tomillo tratada por UHPH que presentó pequeñas variaciones. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Hebishy (2013) utilizando caseinato sódico (5%) como emulsificante en la producción de emulsiones tratadas por UHPH (200 MPa). La oxidación lipídica se acelera por reacciones que tienen lugar en la superficie de las gotas de la emulsión O/W. Basándose en este principio, como era de esperar, la tasa de oxidación de lípidos aumentó en las emulsiones tratadas a UHPH comparadas con las emulsiones tratadas CH, ya que el tamaño de las gotas lipídicas disminuyó por el tratamiento de UHPH y por lo tanto el área de superficie aumentó. La ruptura de las gotas por fenómenos de cavitación y la posterior reorganización de las gotitas de aceite durante la homogeneización promueve la distribución de oxígeno, catalizadores y productos de oxidación lipídica entre las gotas de aceite recién dispuestas, pudiendo acelerar de este modo la oxidación de los lípidos durante el proceso de homogeneización. Incluso si las emulsiones UHPH presentaron altos valores de TBARS en el día 1, la evolución de los productos de oxidación secundaria durante 30 días de almacenamiento en general no fue muy diferente indicando que la oxidación fundamentalmente se produce durante el proceso de homogeneización.

La inclusión de aceites esenciales en la formulación de las emulsiones no produjeron, un efecto positivo sobre la reducción de la oxidación secundaria de las emulsiones (CH o UHPH), si bien los resultados muestran una tendencia en la reducción de la oxidación secundaria en el caso del uso del aceite esencial de tomillo en las emulsiones tratadas por UHPH a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Sin embargo, existen varios estudios como los de Fernandez-Avila *et al.* (2015; 2016) y Hebishy (2013) donde utilizando otros tipos de emulgentes o condiciones de homogeneización resulta interesante observar que las emulsiones obtenidas por UHPH presenta mejor estabilidad frente a la oxidación que las CH, indicando que otros factores, además del tamaño de partícula o del área de superficie, también son importantes para determinar la estabilidad oxidativa, como por ejemplo, la cantidad de proteínas directamente en contacto con la fase lipídica.

Tabla 6. Valores medios y desviaciones estándar de TBARS ($\mu\text{g MDA/ml}$ de emulsión) de las emulsiones tratadas por homogeneización convencional y a ultra alta presión durante su almacenamiento en refrigeración.

Tratamientos	TBARS ($\mu\text{g MDA/ml}$ de emulsión)											
	Día 1			Día 10			Día 20			Día 30		
CH C	0,07 ^{a, x}	±	0,02	0,12 ^{a, y}	±	0,04	0,05 ^{a, x}	±	0,01	ND		
CH A1	0,07 ^{a, y}	±	0,01	0,06 ^{a, y}	±	0,07	0,05 ^{a, x}	±	0,01	ND		
CH A2	0,07 ^{a, y}	±	0,02	0,06 ^{a, xy}	±	0,01	0,04 ^{a, x}	±	0,00	ND		
UHPH C	0,23 ^{c, x}	±	0,02	0,27 ^{b, x}	±	0,02	0,23 ^{c, x}	±	0,05	0,29 ^{b, x}	±	0,09
UHPH A1	0,18 ^{b, x}	±	0,02	0,23 ^{b, xy}	±	0,02	0,24 ^{c, y}	±	0,04	0,20 ^{a, xy}	±	0,03
UHPH A2	0,22 ^{c, xy}	±	0,02	0,26 ^{b, y}	±	0,11	0,16 ^{b, x}	±	0,02	0,17 ^{a, x}	±	0,02

CH: Homogeneización convencional; UHPH: Homogeneización a ultra alta presión de; C: Emulsión control; $\Delta 1$: Emulsión con aceite de clavo; $\Delta 2$: Emulsión con aceite de tomillo. ^{a-c} Valores en la misma columna con diferente superíndice indican diferencias significativas entre las emulsiones ($P < 0,05$). ^{x-y} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas a lo largo del tiempo ($P < 0,05$).

4. CONCLUSIÓN

Este estudio ha valorado la utilización de la UHPH en la obtención de emulsiones formuladas con caseinato sódico como emulgente proteico de origen animal y aceites vegetales ricos en ácidos grasos ω -3 (oliva y chía) altamente propensos a la oxidación lipídica, y la inclusión en ellas de aceites esenciales (clavo o tomillo) con características antioxidantes, en comparación al proceso de CH.

Los procesos de homogenización utilizados (CH y UHPH) conjuntamente con la utilización del emulgente proteico caseinato sódico produjeron emulsiones con tamaños de partícula reducidos. Sin embargo, las emulsiones obtenidas por UHPH presentaron un tamaño de partícula menor (submicrón) y una estabilidad física muy superior, durante su almacenamiento en refrigeración, en comparación a sus homólogas tratadas por CH.

Todas las emulsiones presentaron un comportamiento reológico pseudoplástico ($n < 1$), aunque las procesadas por UHPH presentaron valores de n más cercanos a 1 indicando un comportamiento menos pseudoplástico en comparación a las emulsiones CH.

Las emulsiones procesadas por CH o por UHPH presentaron niveles de hidroperóxidos muy similares; sin embargo, las emulsiones UHPH presentaron valores mayores de oxidación secundaria desde el primer día de su elaboración, en comparación a las tratadas por CH, si bien estos valores se mantuvieron en general constantes durante los 30 días de vida útil de estas emulsiones. La inclusión de los aceites esenciales de clavo o tomillo, a la concentración utilizada, no mostraron un efecto neto antioxidante en las emulsiones.

Los resultados obtenidos en este estudio, sobre la aplicación de la UHPH en la producción de emulsiones formuladas con aceites vegetales altamente susceptibles a la oxidación lipídica, son limitados derivado de los resultados obtenidos en la oxidación de las emulsiones. Por ello son necesarios más trabajos donde se prueben nuevas condiciones en la obtención de las emulsiones utilizando nuevas condiciones en el proceso UHPH o incluyendo otras concentraciones de los aceites esenciales, para definitivamente mostrar su potencial aplicabilidad.

5. BIBLIOGRAFIA

- Amador, G., Ruiz, H. (2009). Inactivación de microorganismos por homogeneización a alta presión. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3:74-84.
- Ayerza, R. and W. Coates. (2005). Chia: Rediscovering an Ancient Crop of the Aztecs. University of Arizona Press.
- Baratta, M., Dorman, H., Deans, S., Figueiredo, A., Barroso, J. G., & Ruberto, G. (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and fragrance journal*, 13: 235-244.
- Buonanno, A., Kidder, L., Lehner, L. (2008). Estimating the final spin of a binary black hole coalescence. *Physical Review D*, 77(2), 026004.
- Calero, N., Muñoz, J. Guerrero, A. (2013). Efecto del pH en emulsiones o/w formuladas con proteína de patata y quitosano. *Grasas y aceites*, 64 (en prensa).
- Calero N, Muñoz J, Cox PW. Heuer A, Guerrero A. (2013). Influence of chitosan concentration on the stability, microstructure and rheological properties of O/W emulsions formulated with high-oleic sunflower oil and potato protein. *Food Hydrocolloids*, 30: 152-162.
- Chevalier-Lucia, D., Cortés-Muñoz, M., Picart-Palmade, L., Dumay, E. (2009). Submicron emulsions processed by ultra-high pressure homogenization. *High Pressure Research*, 29(4), 732-738.
- Clegg, P., Tavacoli, J., Wilde, P. J. (2016). One-step production of multiple emulsions: microfluidic, polymer-stabilized and particle-stabilized approaches. *Softmatter*, 12: 998-1008.
- Cortés-Muñoz, M., Chevalier-Lucia, D., Dumay, E. (2009). Characteristics of submicron emulsions prepared by ultra-high pressure homogenization: Effect of chilled or frozen storage. *Food hydrocolloids*, 23: 640-654.
- Damodaran, S. (1997). *Protein-stabilized foams and emulsions*. Food Science and Technology. Marcel Dekker. New-York. 57-110.
- Dickinson, E. McClements, D.J. (1996). *Advances in Food Colloids*. Blackie Academic & Professional. London.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*. 17: 25-39.
- Dobarganes, M., Velasco, J. (2002). Analysis of lipid hydroperoxides. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104:420-428.

- 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 homogenization. *Trends in Food Science & Technology*, 31(1), 13-26.
- 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.
- Floury, J., Desrumaux, A., Lardieres, 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.
- Floury, J., Desrumaux, A., Legrand, J. (2002). Effect of Ultra-high-pressure Homogenization on Structure and on Rheological Properties of Soy Protein-stabilized Emulsions. *Journal of food science*, 67(9), 3388-3395.
- Floury, J., Bellettre, J., Legrand, J., Desrumaux, A. (2004). Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. *Chemical Engineering Science*, 59(4), 843-853.
- Gràcia, J., Rene, M., Cortes-Muñoz, M., Picart, L., Lopez, T., Chevalier, D., Dumay, E. (2008). Effect of dynamic high pressure on whey protein aggregation: a comparison with the effect of continuous short-time thermal treatments. En: *Food Hydrocolloids*. 22:1014-1032.
- Guimarães, J., Nogueira, L. (2010). Directrices para el tratamiento de úlcera venosa. *Enfermería global*, (20), 0-0.
- Gunstone, F. D., Martini, S., Skibsted, L., Risbo, J., Andersen, M. (2010). Chemical and physical deterioration of bulk oils and shortenings, spreads and frying oils. *Chemical deterioration and physical instability of food and beverages*, 413-438.
- Hayes, M., Fox, P., Kelly, A. (2005). Potential applications of high pressure homogenization in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*, 72(01), 25-33.
- 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*, 32.
- Hebishy, E., Buffa, M., Trujillo, A. J. (2013). Application of ultra high-pressure homogenization (UHPH) in the production of submicron/nano-oil-in-water emulsions using vegetable oils and milk proteins as emulsifiers.
- Herrera-Urbina, R., Godoy-Faúndez, A., Sáez-Navarrete, C., Herrera, M., Ginocchio, R. (2011). Uso de biosólidos como reactivo espumante en procesos de flotación: caracterización física y química. *Dyna*, 78 (167), 66.
- Herrera, M. (2012). *Analytical techniques for studying the physical properties of lipid emulsions*. Springer Science & Business Media.

- Hu, M., McClements, D., Decker, E. (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.
- Jaramillo, B., Duarte, E., Muñoz, K., Stashenko, E. (2010). Composición química volátil del aceite esencial de Croton malambo H. Karst. colombiano y determinación de su actividad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(3), 133-142.
- Juliano, P., Kutter, A., Cheng, L., Swiergon, P., Mawson, R., Augustin, M. (2011). Enhanced creaming of milk fat globules in milk emulsions by the application of ultrasound and detection by means of optical methods. *Ultrasonics sono chemistry*, 18(5), 963-973.
- Lee, S., Lefèvre, T., Subirade, M., Paquin, P. (2009). Effects of ultra-high pressure homogenization on the properties and structure of interfacial protein layer in whey protein-stabilized emulsion. *Food Chemistry*, 113(1), 191-195.
- Martínez, J., de Ferrer, B., de Rodríguez, G., Ferrer, A., Nava, R. (2003). Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 20(4).
- Matthäus, B., Guillaume, D., Gharby, S., Haddad, A., Harhar, H., Charrouf, Z. (2010). Effect of processing on the quality of edible arganoil. *Food chemistry*, 120(2), 426-432.
- McClements, D. (2005). Food Emulsions. Principles Practice and Techniques. 2nd ed. CRC Press. Elsevier. Florida. USA.
- McClements, D., Decker, E. (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.
- 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.
- Palazolo, G., Sobral, P., Wagner, J. (2011). Freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions prepared with native and thermally-denatured soybean isolates. *Food hydrocolloids*, 25(3), 398-409.
- Paquin, P. (1999). Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. *International Dairy Journal*, 9(3), 329-335.
- Perrier-Cornet, J., 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.

- Popper, L., Knorr, D. (1990). Applications of high-pressure homogenization for food preservation: high-pressure homogenization can be used alone or combined with lytic enzyme or chitosan to reduce the microbial population and heat treatment damage in foods. *Food Technology*, 44(7), 84-89.
- Puertas-Mejía, M., Hillebrand, S., Stashenko, E., Winterhalter, P. (2002). In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(5), 380-384.
- Samavati, V., Emam-Djomeh, Z., Mohammadifar, M., Omid, M., Mehdinia, A. (2012). Stability and rheology of dispersions containing polysaccharide, oleic acid and whey protein isolate. *Journal of Texture Studies*, 43(1), 63-76.
- Singh, R., Heldman, D. (1997). *Introducción a la ingeniería de los alimentos*. Acribia.
- Shahidi, F., Zhong, Y. (2005). Lipid oxidation: measurement methods. *Bailey's industrial oil and fat products*.
- Stashenko, E., Jaramillo, B., Martinez, J. (2004). Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1025(1), 105-113.
- Storti, F., Balsamo, F. (2010). Particle size distributions by laser diffraction: sensitivity of granular matter strength to analytical operating procedures. *Solid Earth*, 1(1), 25.
- Srinivasan, M., Singh, H., Munro, P. A. (1999). Adsorption behaviour of sodium and calcium caseinates in oil-in-water emulsions. *International Dairy Journal*, 9(3), 337-341.
- Sørensen, G., Jørgensen, S. S. (1996). A critical examination of some experimental variables in the 2-thiobarbituric acid (TBA) test for lipid oxidation in meat products. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 202(3), 205-210.
- Tepe, B., Akpulat, H., Sokmen, M., Daferera, D., Yumrutas, O., Aydin, E., Sokmen, A. (2006). Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisatum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. *Food Chemistry*, 97(4), 719-724.
- Trujillo, A., Pereda, J., Ferragut, V., Guamis, B. (2006). Effect of Ultra High-Pressure Homogenisation on Natural-Occurring Micro-Organisms of Bovine Milk. In *13th World Congress of Food Science & Technology 2006* (pp. 250-250).

Wood, J. D., Enser, M. (1997). Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. *British journal of Nutrition*, 78(01), S49-S60.