

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EMULSIONES ELABORADAS CON
ACEITES VEGETALES RICOS EN ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 UTILIZANDO LA
MAZADA COMO AGENTE EMULGENTE**

Máster Oficial en Calidad de Alimentos de Origen Animal:

“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**”

LIBNI MARIOT TURITICH CANTERO

Directores:

DR. ANTONIO JOSÉ TRUJILLO MESA / DRA. A. MARÍA CANO SARABIA

Facultad De Veterinaria
Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos

Instituto Catalán de Nanociencia y Nanotecnología (ICN2)
Departamento de Nanoquímica supramolecular y Materiales



LISTAS DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de Varianza
BS	Backscattering/ Retrodispersión
D_{3,2}	Diámetro medio en relación a la superficie-peso
D_{4,3}	Diámetro medio en relación al volumen-peso
K	Índice de consistencia
MDA	Malonaldehído
mEq	Miliequivalente
MFGM	Membrana del glóbulo graso de la leche
MPa	Megapascales
MZ	Mazada
n	Índice de comportamiento al flujo
O/W	Aceite en agua
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volumen
PS	Proteína del suero
SDS	Dodecilsulfato sódico
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico
TSI	Turbiscan Stability Index / Índice de estabilidad del Turbiscan
v/v	Volumen/volumen
γ	Velocidad de deformación o cizallamiento
τ	Esfuerzo cortante
ω-3	Omega 3
ω-6	Omega 6
ω-9	Omega 9

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MATERIALES Y MÉTODOS	8
2.1 Materiales	8
2.2 Preparación de las emulsiones	9
2.3 Caracterización de las emulsiones	9
2.3.1 Determinación de la distribución del tamaño de partícula	9
2.3.2 Análisis de microestructura	10
2.3.3 Determinación de la estabilidad física	10
2.3.4 Propiedades reológicas	11
2.3.5 Determinación de la oxidación	12
2.4 Análisis estadístico	13
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
3.1 Tamaño de partícula y perfil de la distribución de tamaños	14
3.2 Microestructura de las emulsiones	17
3.3 Comportamiento reológico de las emulsiones	18
3.4 Estabilidad física de las emulsiones	21
3.5 Oxidación lipídica de las emulsiones	24
4. CONCLUSIÓN	33
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

RESUMEN

Este estudio ha tenido como objetivo dilucidar el potencial de la mazada como agente emulgente y su comportamiento en una emulsión O/W formulada con aceites altamente insaturados. Para ello se prepararon 4 tipos de emulsiones “aceite-en-agua” estabilizadas por homogeneización a alta presión (100 MPa), con un contenido fijo de una mezcla de aceites de chía (*Salvia hispanica L.*) (10%) y de girasol (*Helianthus annus L.*) (10%). Como emulgentes se utilizaron la mazada (MZ) a concentraciones de 2, 4 y 6% (MZ2, MZ4 y MZ6, respectivamente) y la proteína del suero (PS) al 4% (PS4). Las emulsiones fueron caracterizadas en cuanto a la distribución del tamaño de partícula, viscosidad y comportamiento reológico, y estabilidades física y oxidativa (oxidación primaria y secundaria).

Los resultados mostraron que las emulsiones que incluyeron la MZ presentaron un mayor tamaño de partícula y con fenómenos de floculación en comparación a la PS, aunque todas ellas exhibieron una distribución monomodal. La emulsión de PS presentó un comportamiento reológico newtoniano con una viscosidad menor en comparación a las emulsiones MZ. Estas mostraron un incremento de la viscosidad aparente y cambios en el comportamiento reológico aumentando la viscosidad aparente y cambiando sus curvas de flujo desde unas características de flujo cercanas a los fluidos newtonianos a pseudoplásticos a medida que aumentó la concentración de MZ.

Todas las emulsiones incrementaron sus niveles de oxidación primaria a lo largo del periodo de almacenamiento. Las emulsiones PS4 y MZ6 fueron las emulsiones más estables a nivel oxidativo primario con valores similares de hidroperóxidos medidos como valores de absorbancia. Las emulsiones PS y MZ presentaron un comportamiento diferente al aplicar el método TBARS imposibilitando hacer comparaciones realistas entre las emulsiones.

El análisis de estabilidad física de las emulsiones mostró que la emulsión PS4 fue la más estable, en comparación a las formuladas con MZ, que mejoraron su estabilidad física al incrementar la concentración de MZ.

Palabras Claves: Mazada, proteína del suero, emulsiones “aceite-en-agua”, ácidos grasos ω-3

ABSTRACT

The aim of this study was to elucidate the potential of buttermilk as emulsifier agent and the behavior in O/W emulsion formulated with highly unsaturated fatty acid. Four types of emulsions were stabilized by high pressure homogenization (100 MPa), with a fixed content of vegetable oils (20%) rich in ω -3, ω -6 and ω -9 fatty acids prepared from chia (*Salvia hispanica* L.) (10%) and sunflower (*Helianthus annus* L.) (10%) oil. Buttermilk (MZ) were used as emulsifier at 2, 4 and 6% concentrations (MZ2, and MZ4 MZ6 respectively) and whey protein (PS) at 4% (PS4). The emulsions were characterized by particle size distribution, viscosity and rheological behavior, physical and oxidative stabilities (primary and secondary oxidation).

The results showed that the emulsions containing MZ presented greater particle size and more flocculation compared to that obtained from PS emulsions, although all emulsions exhibit a monomodal distribution. PS emulsion had a Newtonian rheological behavior with a lower viscosity compared to the emulsions containing MZ. The MZ emulsions presented an increase in apparent viscosity and changes in the rheological behavior, changing their flow curves near to Newtonian characteristics to pseudoplastic fluids due to an increase of MZ concentration.

All emulsions showed an increase of primary oxidation levels during the storage period. The PS4 and MZ6 emulsions had more oxidative primary stability with similar hydroperoxides values measuring as absorbance values. The PS and MZ emulsions presented a different behavior with a TBARS method, having an unrealistic results for make a comparison between them.

The analysis of physical stability of the emulsions showed that the PS4 emulsion was more stable than the emulsions containing MZ, who improved the physical stability due to the increasing of MZ concentration.

Keywords: Buttermilk, whey protein, w/o emulsions, ω -3 fatty acids

1. INTRODUCCIÓN

Una emulsión es un sistema que consiste en dos fluidos inmiscibles, donde uno de ellos está disperso en pequeñas gotas (fase dispersa) dentro de otro fluido que constituye la fase continua. El tamaño de las gotas de la fase dispersa se encuentra típicamente en un intervalo de entre 0.1 a 100 micras (McClements, 2007).

Basado en la composición de las fases dispersas o continuas, las emulsiones se pueden clasificar en sistemas simples como de aceite en agua (O/W, por sus siglas en inglés), agua en aceite (W/O, por sus siglas en inglés) y en sistemas múltiples como agua en aceite en agua (W/O/W), o aceite en agua en aceite (O/W/O) (Leal-Calderon et al., 2007; Santana et al., 2013).

En una emulsión las gotas son dispersadas en una fase continua, donde la interfase tiene una gran energía libre, por lo que las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables. Sin embargo, es posible formar emulsiones que sean cinéticamente estables por un intervalo razonable de tiempo mediante la incorporación de emulsionantes. Éstos disminuyen la energía libre total del sistema al disminuir la tensión interfacial entre las dos fases (Yáñez, 2002), por lo que es esencial el uso de emulgentes que brinden una estabilidad cinética por períodos razonables de tiempo (Choit et al., 2007; DeHoog, 2011).

Un emulsionante es una molécula anfifílica de bajo o alto peso molecular que tiende a migrar y adsorberse rápidamente en la interfase aceite (apolar) y agua (polar) favoreciendo la formación de gotas con un menor consumo de energía y por tanto la formación de la emulsión al reducir la tensión interfacial (Muñoz y Alfaro, 2007). Como ejemplos de emulsionantes de bajo peso molecular se pueden citar los tensioactivos, lípidos polares y glicolípidos, y entre los emulsionantes de alto peso molecular se pueden citar las proteínas y las lipoproteínas. En el campo de las emulsiones alimentarias es evidente el predominio de las proteínas como emulsionantes macromoleculares, debido a que están presentes en cantidades significativas en materias primas naturales comestibles. Las proteínas más destacadas para uso como emulsionantes de origen animal son las del huevo y leche (Raymundo et al., 2001).

Las proteínas lácteas, y en particular las proteínas del suero de la leche, son muy valoradas como ingredientes alimentarios tanto por sus propiedades funcionales como nutricionales; de hecho, se utilizan como emulsionantes en múltiples preparaciones alimentarias (Adjonu et al., 2014).

El suero lácteo representa una mezcla rica y heterogénea de proteínas con un amplio espectro de propiedades nutricionales y funcionales. Contiene alrededor del 20% de las proteínas de la leche de vaca (Baro et al., 2001), siendo su principal componente la β -lactoglobulina (β -Lg) con ~10% y α -lactoalbúmina (α -La) con ~4% del total de la proteína láctea (Hinrichs et al., 2001), y además, contiene otras proteínas como, lactoferrina, lactoperoxidasa, inmunoglobulinas, y glicomacropéptidos (Baro et al., 2001). Las propiedades funcionales de este subproducto son usualmente atribuidas a la fracción proteica, principalmente β -Lg y α -La, que es responsable de las propiedades emulsificante y gelificante (Aider et al., 2009).

Otro subproducto utilizado en la industria alimentaria es la mazada o suero de manteca, que es un ingrediente lácteo ampliamente utilizado debido a su capacidad emulsionante y su impacto positivo en el sabor (Sodini et al., 2006). La mazada es la fase líquida liberada durante el batido de la nata en el proceso de fabricación de la manteca, y contiene la mayoría de los componentes solubles de la nata en agua. Tras un secado por atomización de esta fase líquida, se obtiene un producto en polvo cuyos componentes mayoritarios son lactosa, proteínas (caseínas, proteínas del suero y glicoproteínas), grasa (triglicéridos y fosfolípidos o lípidos polares), sales minerales, entre otros, algunos de ellos con origen o procedencia en la membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM) (Govindasamy et al., 2006). Los fosfolípidos y la proteína en la mazada hacen que este subproducto lácteo sea interesante para usar como ingrediente funcional debido a las propiedades emulsionantes del producto (Wong y Kitts, 2003; Vanderghem et al., (2010) que hace de la mazada, un ingrediente funcional y tecnológico muy interesante para la industria alimentaria.

La MFGM actúa como un agente emulsificante natural, previene la coalescencia de los glóbulos grasos y protege a la grasa de la degradación enzimática. Debido a su naturaleza anfifílica y a su función de estabilizar los glóbulos de grasa en la leche, los fragmentos de la MFGM se pueden considerar unos emulsificantes muy eficientes (Corredig y Dagleish, 1997). No se conoce con exactitud si son las proteínas o los fosfolípidos los componentes responsables de esta capacidad emulsificante que tiene la membrana del glóbulo graso, al igual que también se desconoce cómo afectan a esta propiedad las interacciones de la MFGM con las caseínas y las proteínas del suero (Singh, 2006).

Los lípidos presentes principalmente en la membrana del glóbulo graso de la leche son de característica tanto polar como no polar, con predominio de lípidos polares. Los lípidos no polares incluyen mono, di y triglicéridos, colesterol y ésteres de colesterol, mientras que sus componentes polares están compuestos por fosfolípidos y esfingolípidos (Dewettinck et al., 2008).

Las proteínas de la membrana del glóbulo graso representan del 25 al 70% del total de sus componentes. Se han descrito alrededor de 40 proteínas con masas moleculares entre 15.000 y 240.000 Da. Representan alrededor del 1-2% del total de proteínas de la leche siendo la mayoría de ellas de naturaleza glicoproteica (Riccio, 2004). Se ha demostrado que algunas proteínas y lípidos de la MFGM poseen propiedades funcionales y beneficiosas para la salud y desarrollo del lactante. Así a nivel intestinal se ha descrito un efecto protector frente a infecciones, modulan la microbiota intestinal e intervienen en el desarrollo de la función inmune. A nivel cerebral los gangliósidos están involucrados en numerosos procesos del desarrollo neuronal, como la mielinización y mantenimiento de la integridad axonal, en el desarrollo, diferenciación y maduración neuronal, en la transmisión de impulsos nerviosos, y en los procesos de formación de la memoria (Hernell et al., 2016).

La composición de la mazada es similar a la de la leche desnatada, aunque la concentración de lípidos polares sobre extracto seco es 4, 5 y 10 veces más alta que en la leche desnatada, la leche entera y la nata, respectivamente. La mayoría de los lípidos polares de la leche están presentes en la MFGM, que representa menos del 5% del total de sólidos de la mazada. Por otra parte, diversos estudios han confirmado que aproximadamente el 19% de la mazada son proteínas (Vanderghem et al., 2010).

Para formar una emulsión, generalmente, se consigue mediante la aplicación de energía mecánica que permite deformar la interfase en una extensión tal que origine la formación de gotas, y posteriormente, su división en gotas aún más pequeñas (McClements, 2005). El tamaño de gota es una propiedad importante porque determina la estabilidad de la vida útil, la consistencia y las propiedades reológicas de una emulsión (Israelachvili, 1994). En muchos casos el objetivo de la emulsificación es producir gotas lo más finas posibles ($d < 1 \mu\text{m}$). Los procesos de emulsificación más frecuentes utilizados en la industria alimentaria son los sistemas rotor-estator y los homogeneizadores de alta presión (Schultz et al., 2004). La homogenización a alta presión basada en la tecnología de microcanales (microfluido) es una

metodología utilizada en la obtención de emulsiones fluidas con diámetros medios submicrométricos y con distribuciones de tamaño de gotas estrechas, ya que pueden alcanzar tasas de cizalladura extremadamente altas (Vladisavljevic' et al., 2004). El procesamiento por microfluidización implica que una emulsión gruesa pase a través de una cámara de interacción usando un dispositivo de bombeo de alta presión (Jafari et al., 2007). La cámara de interacción consiste en dos canales de flujo que están diseñados para hacer que dos corrientes de emulsión gruesas colisionen entre sí a grandes velocidades, creando así una acción de cizallamiento muy alta que proporciona una emulsión excepcionalmente fina (Salvia-Trujillo et al., 2014).

Durante el proceso de homogenización, las proteínas incorporadas como agentes emulsionantes, tienden a adsorberse en la superficie de las gotas formando una barrera protectora que previene frente a la agregación, facilitando una distribución homogénea de las partículas que constituyen el sistema y reduciendo sustancialmente la tensión superficial (Amador-Espejo et al., 2009). Las interacciones repulsivas inducidas por las proteínas adsorbidas en la interfase previenen frente a futuros fenómenos de floculación y coalescencia, estabilizando la emulsión durante largos períodos de tiempo (Cortez-Muñoz et al., 2009).

Con respecto a la fase oleosa de la emulsión se han utilizado aceites de origen vegetal, entre ellas el aceite de girasol (*Helianthus annus* L.), 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 (*Salvia hispanica* L.), 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). Además, dicho aceite es muy efectivo a la hora de reducir los niveles colesterol malo (LDL (lipoproteínas de baja densidad) y aumentar los niveles de colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidad) bueno en sangre (Tepe et al., 2006).

El aporte de los lípidos a la salud y el bienestar, está determinado fundamentalmente por su composición. Se demostrado que tanto el perfil de ácidos grasos, especialmente los niveles relativos de ácidos grasos ω -9, ω -6 y ω -3 así como la presencia de ciertos componentes minoritarios, pueden ejercer una influencia positiva en las funciones fisiológicas de nuestro organismo (Julio, 2017). Diversas investigaciones han probado que el consumo de ω -3 beneficia a pacientes con enfermedades relacionadas con un estado inflamatorio como lupus eritematoso, artritis, cáncer, síndrome metabólico, diabetes mellitus, entre otras (Dimri et al., 2010).

El objetivo de este estudio fue dilucidar el potencial de la mazada como agente emulgente y su comportamiento en la formación de emulsiones “aceite-en-agua”, homogenizadas por alta presión (100 Mpa). A tal fin se procedió a caracterizar las emulsiones en cuanto a la distribución del tamaño de partícula, viscosidad y comportamiento reológico, estabilidades física y oxidativa (oxidación primaria y secundaria).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

La mazada en polvo se adquirió de Innova Food Ingredients (CAPSA, 33199 Granda-Siero, Asturias) con las siguientes especificaciones de composición proporcionadas por la empresa productora: Sólidos totales: >96%; Materia grasa: $7 \pm 2\%$; proteínas ($N \times 6,38$): $30 \pm 2\%$; Lactosa: $52 \pm 5\%$; pH (10% a 20°C): 6,6- 6,8; Humedad: < 4%; Acidez (%): $14 \pm 2\%$; Cenizas (%): $7 \pm 1\%$; Índice de solubilidad: < 0,5 mL; Inhibidores: ausentes.

El aislado de proteína de suero (WPI) se adquirió de Lactalis (Prolacta 90, Retiers, Francia). La proteína del suero contiene en su composición según datos proporcionados por el productor: Sólidos totales: 95,9%; Nitrógeno no proteico (NPN): 1,04%; Proteína [($N - NPN$ total) $\times 6,38$]: 89,3%; de Cenizas (incluyendo 0,27% de calcio): 1,1%; y Lactosa: 1,6%. Los constituyentes proteicos correspondieron principalmente a β -lactoglobulina (β -Lg) y α -lactalbúmina (α -La) (68,5% β -Lg y 21,5% α -La por 100 g de proteína soluble) más pequeñas cantidades o trazas de inmunoglobulinas, seroalbúmina bovina (BSA) y lactoferrina.

El aceite de chía (*Salvia hispanica* L.) utilizado en la fabricación de las emulsiones fue adquirido de la empresa ChiaSa (Alboraya, Valencia) y fue obtenido mediante prensado en frío. De acuerdo a las especificaciones técnicas del fabricante, este aceite presenta un grado de acidez de 1,13% y un índice de peróxidos de 1,1 meq O₂/kg. Su composición en ácidos grasos es la siguiente: ácido palmítico (C16:0) = 6,7%; ácido esteárico (C18:0) = 3,5%; ácido oleico (C18:1) = 8,5%; ácido palmitoléico (C 16:1) = 0,13%; ácido linoléico (C18:2) = 18,4%; ácido linolénico (C18:3) = 61,7%. El aceite refinado de girasol (*Helianthus annuus* L.) marca Masía (Grupo Ybarra Alimentación, Dos Hermanas, Sevilla) fue adquirido en supermercado y de acuerdo a las especificaciones del fabricante la acidez e índice de peróxidos fue de <0,1% y <2 meq O₂/kg, respectivamente, y composición en ácidos grasos la siguiente: ácido palmítico (C16:0) = 6,72%; ácido esteárico (C18:0) = 3,35%; ácido oleico (C18:1) = 30,6%; ácido palmitoléico (C 16:1) = 0,17%; ácido linoléico (C18:2) = 58%; ácido linolénico (C18:3) = 0,06%.

2.2 Preparación de las emulsiones

Se prepararon 4 tipos de emulsiones del tipo O/W con un contenido fijo de una mezcla de aceites vegetales (20%, p/p) siendo un 10% aceite de chía y 10% aceite de girasol. Para la elaboración de las emulsiones, primero se dispersaron los emulgentes (MZ y PS) a las concentraciones de 2, 4 y 6% para la mazada y 4% para la proteína del suero en agua destilada usando un agitador STIRRER type BS (VELP Scientifica, Usmate, Italia) a 100 rpm durante 15 minutos. Una vez preparadas las suspensiones, estas fueron almacenadas en refrigeración durante toda la noche a 4 °C para conseguir una hidratación completa. Las preemulsiones (o emulsiones gruesas) se prepararon por adición lenta de la fase oleosa a la fase acuosa utilizando un homogeneizador Ultraturrax (modelo IKA T25, Staufen, Alemania) con un sistema rotor-estator (vástago S25N-18G) a 11.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se redujo el tamaño de gotas de las preemulsiones utilizando un homogeneizador Microfluidizer M-110L (Microfluidics, Westwood, Massachusetts, Estados Unidos) a una presión de 100 MPa, obteniendo las emulsiones con mazada al 2% (MZ2), 4% (MZ4) y 6 % (MZ6), y la emulsión con proteína del suero al 4% (PS4), emulsión que se utilizó para el control del experimento.

2.3 Caracterización de las emulsiones

2.3.1 Determinación de la distribución del tamaño de partícula

Las lecturas se determinaron inmediatamente después del proceso de homogenización utilizando un analizador de tamaño de partícula por dispersión 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 éstas, 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. 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. 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.

2.3.2 Análisis de microestructura

Para el estudio de la microestructura de las diferentes emulsiones tras la homogenización, se utilizó un microscopio óptico ZEISS Axio Observer (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). Para ello se dispuso una gota de las muestras sin diluir en el portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos de vidrio. Se visualizaron y registraron las diferentes muestras a 5×, 10×, 20× y 50× aumentos de los cuales se eligió la más representativa para su posterior descripción.

2.3.3 Determinación de la estabilidad física

La estabilidad física de las emulsiones se determinó utilizando un analizador óptico Turbiscan™ LAB (Formulaction, Toulouse, Francia), versión 2.1. La tecnología del Turbiscan mide las intensidades de luz en Transmisión (T) y Retrodispersión esta última más comúnmente conocida como “Backscattering” (BS) de su denominación en inglés, 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 ($\lambda_{aire} = 850$ 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 (ideal para muestras transparentes), 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 (ideal para muestras opacas) 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.

Este principio de funcionamiento se utiliza para analizar la estabilidad de las emulsiones en función del tiempo y el espacio. Para este propósito la emulsión se deposita en un vial y un cabezal móvil en el interior del equipo se desplaza de forma automática cada 40 mm desde la

base del vial hasta la altura final de la muestra. De acuerdo con los perfiles de transmisión y retro dispersión de la luz, obtenidos a lo largo del vial, es posible conocer el comportamiento dinámico de las emulsiones que se traduce en la posibilidad de detectar los dos principales fenómenos de desestabilización que afectan a la homogeneidad de las dispersiones como la migración de partículas (cremado y sedimentación) y la variación de tamaño de partícula o agregación (coalescencia y floculación) (Mengual et al., 1999).

El índice de estabilidad del Turbiscan ((Turbiscan Stability Index (TSI)) proporciona información sobre la estabilidad global de la muestra y se obtiene de la siguiente fórmula:

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

Donde:

n: números de escaneos; **X_i** valor de retrodispersión promedio para cada minuto de medición;
X_{BS}: Valor promedio de x_i

Los valores de este índice cambian en un rango de 0 a 100. Valores más bajos de TSI se traducen a un sistema más estable

En el presente estudio las emulsiones se depositaron en los viales conteniendo azida sódica (NaN₃) al 0,02% (p/v) para evitar la proliferación del crecimiento microbiano. Las emulsiones se almacenaron a temperatura ambiente (20 °C) y fueron escaneadas por duplicado durante un periodo de 15 días.

2.3.4 Propiedades reológicas

La caracterización reológica se llevó a cabo en el mismo día de la homogenización por medio de 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 con el objeto de conocer las propiedades visco elásticas de las emulsiones. 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⁻¹ y 100 s⁻¹ 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 τ es el esfuerzo cortante (Pa), es K el índice de consistencia (Pa × sⁿ), y 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 cuidadosamente, previamente al análisis.

2.3.5 Determinación de la oxidación

Con el objetivo de estudiar la propensión a la oxidación de las emulsiones elaboradas éstas fueron añadidas de NaN_3 al 0,02% (p/v), para evitar la proliferación del crecimiento microbiano, e incubadas en estufa a 37 °C tomándose muestras tras su elaboración y a los 4, 7, 11 y 15 días. Las muestras tras la incubación en estufa fueron congeladas a -80 °C para su posterior análisis por triplicado.

Los productos de la oxidación primaria (hidroperóxidos) en las emulsiones se determinaron usando el método propuesto por Hu et al. (2004). Se tomaron, por triplicado, 300 μL de muestra de cada emulsión y se mezcló con 1,5 mL de una solución de isoctano/2-propanol (3:1, v/v) en tubos de vidrio, y se agitó en vórtex 30 s (10 s \times 3). La fase orgánica de las mezclas se separó por centrifugación a 1000 g a 20-25 °C durante 2 minutos. Se añadieron 200 μL de la fase orgánica a 2,8 mL de una solución de metanol/1-butanol (2:1, v/v). A continuación, se pipetaron, de forma sucesiva, 15 μL de amonio tiocianato 3,97 M y 15 μL de una solución de hierro (preparada mezclando 0,132 M BaCl_2 + 0,144 M FeSO_4). Finalmente, los tubos de ensayo se volvieron a agitar en vórtex (10 s) y, transcurridos 20 minutos de espera, para permitir que tuviese lugar la reacción, se midió la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 510 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 (Fe^{2+}) son oxidados, por el peróxido de hidrógeno, a iones férricos (Fe^{3+}) y éste se combina con el tiocianato, en medio clorídrico, dando lugar a un complejo de color rojo-violeta que muestra una absorbancia máxima a 500-510 nm (Dobarganes y Velasco, 2002). Los hidroperóxidos en las emulsiones se expresaron como valores de absorbancia a una longitud de onda de 510 nm (A_{510}).

Para la determinación de los productos de la oxidación secundaria se cuantificaron las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs). Para ello, se empleó una adaptación del método propuesto por Sørensen y Jørgensen (1996). Se tomaron 3 mL de muestra de cada una de las emulsiones y se les añadieron 6 mL de ácido tricloroacético al 7,5%. La mezcla se agitó al vórtex (10 s) 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 conteniendo 2 mL de una solución de TBA al 0,8%, y se agitaron en vórtex (10 s). Las mezclas resultantes se incubaron en un baño maría a 95 °C durante 10 min, para después enfriarse rápidamente mediante un baño de hielo durante 5 min. Finalmente, se midió la absorbancia de la solución (tras la reacción colorimétrica) a las longitudes de onda a 532 y 450 nm y los resultados se expresaron como valores de absorbancia a estas dos longitudes onda (A_{532} y A_{450}).

2.4 Análisis estadístico

Se realizó una estadística descriptiva calculando la media y la desviación estándar para cada variable en estudio. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa estadístico R (versión 3.0.1) para cada variable y al denotar una diferencia significativa (95%) entre los tratamientos se procedió a la comparación de medias por el Test de Tukey ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Tamaño de partícula y perfil de distribución

El tamaño de partícula es definido como el diámetro del glóbulo o gota de la fase interna, el cual, es de vital importancia para una emulsión ya que influye en el color, textura y estabilidad de la misma, asociándose un tamaño de partícula uniforme y pequeña con una emulsión con buena estabilidad (McClements et al., 2006).

En la Tabla 1 se muestran los diferentes tamaños medios de partícula expresados en superficie ($D_{3,2}$) y volumen ($D_{4,3}$) de las diferentes emulsiones obtenidas con la MZ y PS diluidas en agua destilada y en dodecilsulfato sódico (SDS) al 1%. Los tamaños medios muestran que las emulsiones incluyendo mazada al 2, 4 y 6% como emulgente no presentaron diferencias significativas ($P \geq 0,05$) entre ellas en tamaño de partícula con una media de $D_{3,2} \sim 20,64 \mu\text{m}$ y $D_{4,3} \sim 30,85$. Sin embargo estas emulsiones tuvieron tamaños de partícula significativamente ($P \leq 0,05$) más grandes en comparación a la emulsión con proteína de suero al 4%. Esta última emulsión presentó un tamaño de partícula mucho más pequeño con una media de tamaño de partícula de $0,33 \mu\text{m}$ en relación a la superficie y $0,48 \mu\text{m}$ en relación al volumen.

Tabla 1. Medias y desviaciones estándar de los parámetros de tamaño de partícula $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ para las emulsiones objeto de estudio diluidas en agua o en dodecilsulfato sódico (SDS) al 1%.

Emulsiones ¹	Agua		SDS	
	$D_{3,2} (\mu\text{m})$	$D_{4,3} (\mu\text{m})$	$D_{3,2} (\mu\text{m})$	$D_{4,3} (\mu\text{m})$
PS4	$0,33 \pm 0,51^{\text{a}, \text{x}}$	$0,48 \pm 0,11^{\text{a}, \text{x}}$	$0,31 \pm 0,01^{\text{a}, \text{x}}$	$0,54 \pm 0,01^{\text{a}, \text{x}}$
MZ2	$21,96 \pm 2,48^{\text{a}, \text{y}}$	$32,26 \pm 6,83^{\text{a}, \text{y}}$	$14,01 \pm 3,04^{\text{b}, \text{y}}$	$21,61 \pm 7,85^{\text{b}, \text{y}}$
MZ4	$20,93 \pm 1,84^{\text{a}, \text{y}}$	$31,24 \pm 8,42^{\text{a}, \text{y}}$	$13,52 \pm 4,47^{\text{b}, \text{y}}$	$22,85 \pm 7,85^{\text{b}, \text{y}}$
MZ6	$19,02 \pm 3,90^{\text{a}, \text{y}}$	$29,05 \pm 11,19^{\text{a}, \text{y}}$	$14,10 \pm 5,94^{\text{a}, \text{y}}$	$27,23 \pm 11,59^{\text{a}, \text{y}}$

¹Emulsiones elaboradas con distintas concentraciones de mazada (MZ) al 2, 4 y 6% (p/p) y proteína del suero (PS) al 4% (p/p), conteniendo aceite de chía (10% p/p) y de girasol (10% p/p), y estabilizadas por homogenización a alta presión (100 MPa).

$D_{3,2}$ diámetro medio en relación a la superficie-peso de las partículas.

$D_{4,3}$ diámetro medio en relación al volumen-peso de las partículas.

^{a-y} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) para los parámetros de tamaño de partícula entre emulsiones.

^{a-b} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) para los parámetros de tamaño de partícula para las diferentes emulsiones diluidas en agua o en SDS.

Al comparar los tamaños medios de partícula obtenidos para las emulsiones con PS diluidas con agua destilada o bien con SDS al 1%, se pudo apreciar valores muy similares, lo que indicaría la ausencia de fenómenos de floculación de partículas en esta emulsión. Estos resultados están en línea con los obtenidos por Hebishy et al. (2015), en emulsiones a base de proteína del suero al 4% (p/p), y aceite (20%) homogeneizadas a 100 MPa en un homogeneizador de ultra alta presión Stansted (modelo DRG number FPG 11300:400 Hygienic Homogenizer, Stansted Fluid Power Ltd., Harlow, Essex, UK) aunque en este estudio obtuvieron tamaños de partícula menores de 0,13 y 0,21 μm para $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$, respectivamente. Esta diferencia en el tamaño de partícula se podría explicar por las diferencias existentes en los equipos utilizados (Microfluidizer vs. Stansted) en cuanto al mecanismo de homogeneización aplicado, si bien los resultados antes referenciados se obtuvieron en ambos estudios a una presión de 100 MPa.

El Microfluidizer se basa en forzar a alta presión al producto a través de una cámara de interacción formada por dos microcanales, que hacen que el producto se divida en dos corrientes al entrar a la cámara. Dichas corrientes se aceleran debido a la disminución del diámetro del tubo, y terminarán colisionando entre sí desde direcciones opuestas causando la ruptura de partículas en otras más pequeñas. (Olson et al., 2004). A diferencia del equipo Stansted, lo interesante de este equipo es que la geometría de la válvula ha sido modificada respecto a la de válvula clásica y el paso del fluido en el equipo realiza de manera inversa lo permite aumentar la presión de homogenización. El paso entre la válvula y el asiento en este diseño es mucho más estrecho. Además, este homogeneizador cuenta con una segunda válvula neumática, localizada después de la primera válvula de cerámica. Por lo tanto, se pueden realizar procesos utilizando la primera válvula de presión (primera etapa) o la segunda válvula de presión (segunda etapa) o una combinación de ambas haciendo más eficiente el sistema. Al comparar los tamaños de partícula obtenidos de las emulsiones elaboradas con MZ diluidas en agua o en SDS se observaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) para los parámetros $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$. Las emulsiones diluidas en SDS presentaron, excepto aquellas con un 6% de mazada, tamaños inferiores que las diluidas en agua, esto indica la presencia de fenómenos de agregación o floculación entre partículas, ya que el SDS se encarga de disociar las partículas, indicando un factor de inestabilidad en estas emulsiones. En cambio, en la muestra MZ6 se observaron tamaños medios de partícula similares en la emulsión

Estos resultados están en acuerdo con los publicados por Phan et al. (2016) que produjeron emulsiones con material emulgente a base de mazada (6,71%) de sólidos totales que contenían aceite de soja (35%) estabilizados con un homogenizador de alta presión de dos etapas Avestin (APV Systems, Albertslund, Dinamarca) a diferentes presiones encontrando que a presiones por encima de 15/2 MPa hay presencia de agregación de gotas en la emulsión, mostrando una distribución de tamaño de partícula monomodal con un tamaño de gota.

En la Figura 1 se muestran las curvas de distribución del tamaño de partícula de las 4 emulsiones en estudio tras el proceso de homogenización a 100 MPa.. Las curvas de distribución de tamaño son monomodales para las emulsiones preparadas con MZ, mientras que la preparada con PS es bimodal. Este último resultado ya ha sido descrito por por Hebishy et al. (2015) utilizando proteína de suero al 4% en la estabilización de una emulsión al 20% de aceite utilizando un homogeneizador Stansted a 100 MPa.

Por otro lado, las emulsiones de MZ al diluirlas en SDS (Figura 1B) presentaron modificaciones en las curvas de distribución del tamaño de partícula haciéndose más estrechas y delimitadas, indicando fenómenos de floculación en estas emulsiones. La emulsión MZ6 fue la que presentó un mejor comportamiento en cuanto a su curva de distribución en comparación con la MZ2 y MZ4 al presentar una mínima modificación de su curva referente a la emulsión diluida en agua y en SDS, indicando ausencia o escasos fenómenos de floculación en la emulsión. Estos resultados pueden ser atribuidos a la mayor fracción de volumen de fase acuosa que posee, lo que permite una mayor movilidad de las gotas de aceites favoreciendo su colisión entre sí y la formación de floculación o gotas más grandes.

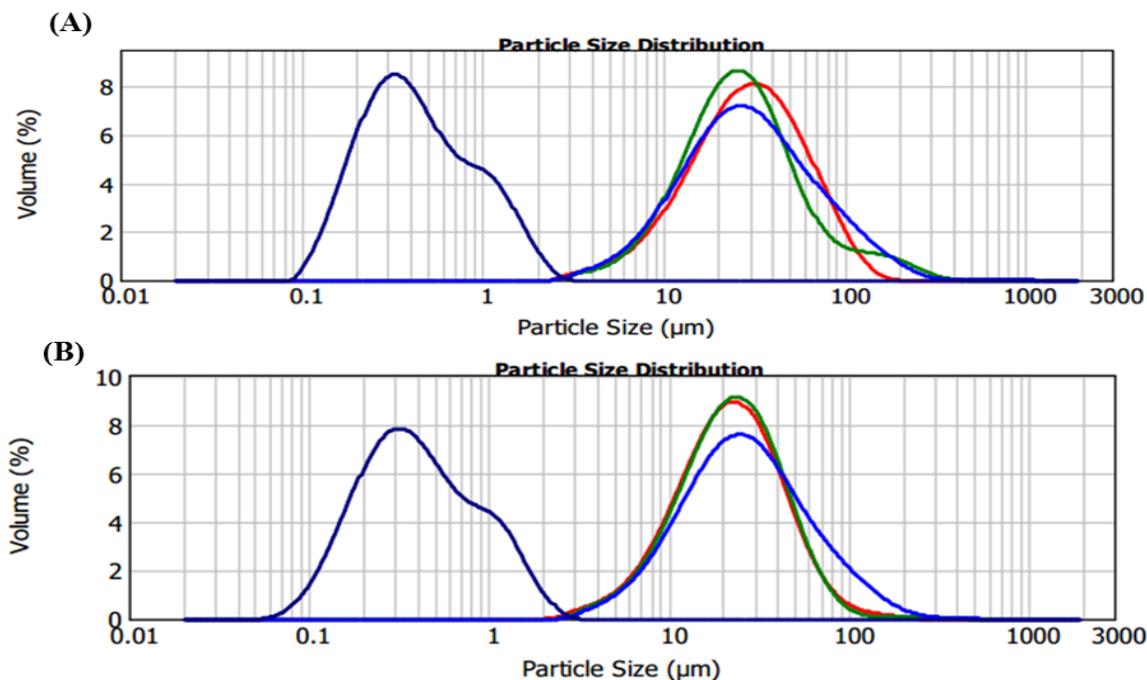


Figura 1. Perfil de distribución del tamaño de partículas de las emulsiones elaboradas con mazada al 2, 4 y 6% (MZ2 (—), MZ4 (—), MZ6 (—), respectivamente) y con concentrado de proteína del suero al 4% (PS4 (—)) diluidas en agua destilada (A) y en dodecilsulfato sódico (B).

3.2 Microestructura de las emulsiones

La Figura 2 muestra las imágenes obtenidas por microscopio óptico de las emulsiones preparadas con mazada y concentrado de proteínas del suero. Las mismas muestran que las emulsiones MZ2 (Figura 2A) no presentan uniformidad en su microestructura comparadas a las obtenidas con 4 y 6% de mazada (Figura 2B y 2C), apreciándose grandes agregados de partículas y fenómenos de floculación. Estos resultados confirman los datos obtenidos de tamaño de partícula, ya que las emulsiones MZ2 y diluidas en solución SDS mostraron valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ muy bajos en comparación a la emulsión diluida en agua, indicando la presencia de flóculos en forma de partículas grandes fácilmente disociables en presencia de SDS, producidos por escasez de agente emulsionante que conduce a una menor cobertura de la interfaz de la emulsión (McClements, 2005). Los tamaños de los glóbulos de grasa en las emulsiones MZ6 (Figura 2C) fueron más pequeños que las emulsiones MZ2 y MZ4, y esto podría ser debido a que la emulsión MZ6 posee mayor cantidad de emulsionante como para cubrir la totalidad de la superficie de las partículas recién creadas por el tratamiento de homogeneización a alta presión generando partículas de menor tamaño. También de las imágenes de microscopio óptico se puede observar que la emulsión PS4 conteniendo proteína del suero al 4% (Figura 2D) posee una buena homogeneidad así como también menor tamaño

de partícula debido a la alta capacidad emulsionante de la proteína del suero. Sin embargo, las imágenes también muestran en todas las emulsiones algunas gotas o partículas más grandes, partículas que según Fernández-Ávila et al. (2015) pueden ser debidas a que las emulsiones procesadas por homogenización a alta presión con contenidos elevados de aceite (p.e. 20% de aceite), poseen gotas más grandes debido a procesos de acumulación y ruptura que se producen durante la formación de la emulsión, como resultado del aumento del contenido de aceite en las formulaciones.

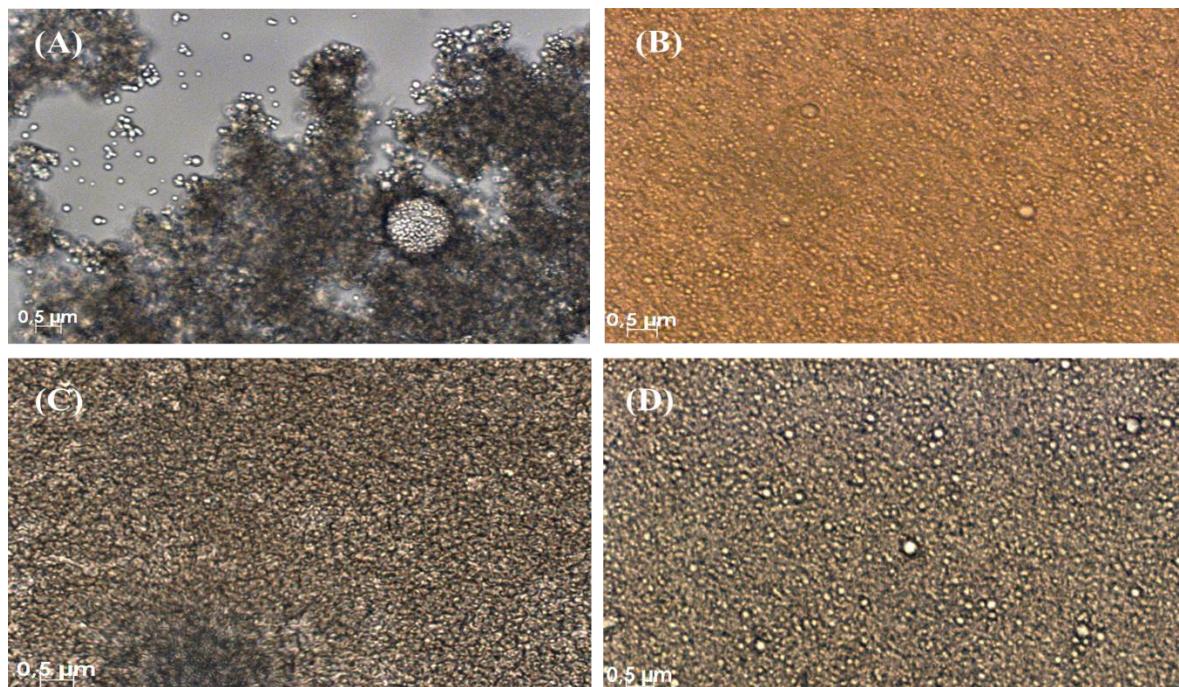


Figura 2. Imágenes de microscopía óptica obtenidas para las emulsiones “aceite-en-agua” que contienen un 2, 4 y 6% de mazada (A, B y C, respectivamente) y 4% de proteína del suero (D). (Escala de 0,5 μm).

3.3 Comportamiento reológico de las emulsiones

Las propiedades reológicas de los alimentos se basan en las respuestas de flujo y deformación cuando se someten a tensiones normales y tangenciales. Los estudios sobre estas propiedades son útiles e importantes para las aplicaciones, procesamiento, control de calidad y evaluación sensorial de los alimentos (Rao, 2014).

Estas dependen fuertemente de las propiedades las fases (continua y dispersa) de las emulsiones, pero principalmente con la fase dispersa. El tamaño y distribución de las gotas de fase dispersa, así como las interacciones que ocurren entre ellas. Esto no sólo cambia la viscosidad de la emulsión respecto a la viscosidad de las fases, sino también hace que el

comportamiento de la emulsión difiera del caso más simple: el fluido newtoniano (Gallardo, 2012).

De acuerdo a los resultados de los parámetros reológicos estudiados, las emulsiones PS4 presentaron los índices de consistencia significativamente ($P \leq 0,05$) más bajos en comparación a las emulsiones añadidas de mazada. En las emulsiones elaboradas con mazada el índice de consistencia aumentó (de 0,0257 a 0,9799 Pa × s) al hacerlo el contenido de mazada en la emulsión (de 2 al 6%), existiendo diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre ellas (Tabla 2). Este hecho puede atribuirse a un aumento en el contenido de sólidos debido a un mayor contenido de los componentes de la mazada en la fase acuosa, lo que se traduce en una mayor resistencia a flujo y, por lo tanto, la viscosidad del sistema promueve la formación de una estructura intergotas.

Tabla 2. Medias y desviaciones estándar de los parámetros reológicos de índice de consistencia (K) e índice de comportamiento al fluido (n) e Índice de correlación (R^2) de las emulsiones objeto de estudio.

Emulsiones ¹	K (Pa × s)	n	R^2
PS4	0,0019 ± 0,0001 ^a	1,0595 ± 0,0048 ^a	0,999
MZ2	0,0257 ± 0,016 ^b	0,8277 ± 0,0708 ^b	0,999
MZ4	0,3890 ± 0,068 ^c	0,5176 ± 0,0204 ^c	0,999
MZ6	0,9799 ± 0,2548 ^d	0,4490 ± 0,0382 ^d	0,999

¹ Emulsiones elaboradas con distintas concentraciones de mazada (MZ) al 2, 4 y 6% (p/p) y proteína del suero (PS) al 4% (p/p), conteniendo aceite de chía (10% p/p) y de girasol (10% p/p), y estabilizadas por homogenización a alta presión (100 MPa).

^{a-d} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre emulsiones.

En cuanto al comportamiento del fluido, la emulsión PS4 presentó un comportamiento newtoniano ($n \approx 1$) lo que se traduce como aquellos cuya viscosidad puede considerarse constante con el tiempo, existiendo una relación lineal entre el esfuerzo cortante y la velocidad de cizallamiento (Figura 3). Sin embargo, el comportamiento al flujo en las emulsiones adicionadas de mazada como agente emulgente se pudo observar que a medida que aumentó la incorporación de mazada a la emulsión, el valor obtenido de n se alejó de 1 (Tabla 2) alejándose así del comportamiento Newtoniano, sobre todo las emulsiones MZ4 y MZ6, presentando un

comportamiento pseudoplástico, característica de aquellos fluidos que disminuyen su viscosidad al aumentar la velocidad de deformación aplicada

Las curvas de flujo obtenidas en el reómetro de las emulsiones en estudio se muestran en la Figura 3, y fueron ajustadas al modelo reológico de Ostwald de Waele, observándose el carácter newtoniano de la emulsión PS4, y como a medida que se incrementó la concentración de mazada a las emulsiones adicionadas de este emulgente, cambiaron sus curvas de flujo desde unas características cercanas a los fluidos newtonianos a pseudoplásticos, indicando que el índice de consistencia de flujo (K) se traduce como una viscosidad aparente debido al que el fluido no es newtoniano.

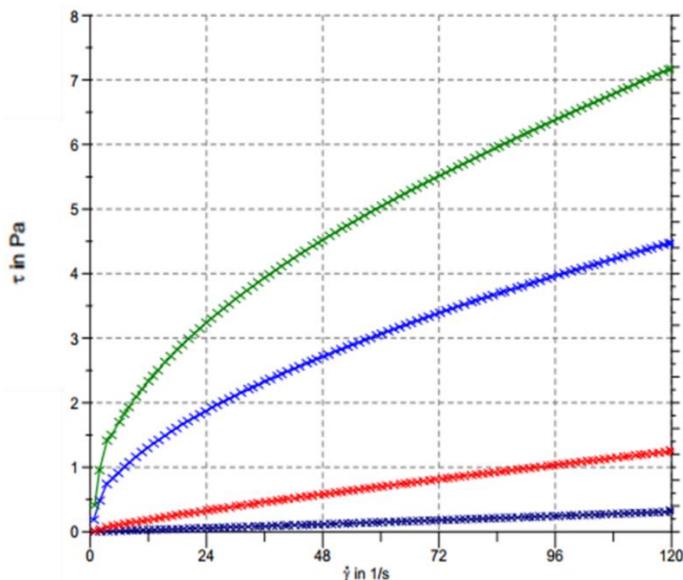


Figura 3. Curva de flujo de las emulsiones elaboradas con mazada al 2, 4 y 6% (MZ2 (X), MZ4 (X), MZ6 (X), respectivamente) y con concentrado de proteína del suero al 4% (PS4 (X)) con el ajuste a la ley de Ostwald de Waale.

En un estudio similar, Phan et al. (2016) produjeron emulsiones con material emulgente a base de mazada (6,71%) de sólidos totales que contenían aceite de soja (35%) estabilizados con un homogenizador de alta presión de dos etapas (APV Systems, Albertslund, Dinamarca) a una presión de 9/2 MPa, obtuvieron valores de $K:3,78$ Pa y $n:0,54$. En comparación a las emulsiones MZ (6%) este resultado de índice de consistencia es mayor a lo obtenido, debido a su menor tamaño de partícula ($D_{3,2}:6,36$), que también pueden estar relacionados con las propiedades de las moléculas estabilizadoras y el aumento de la superficie de los glóbulos gramos, como

consecuencia de proteínas a nivel de la interfase juega un papel fundamental en la viscosidad de la emulsión (Hayes et al., 2003).

Los resultados de la emulsión PS4 (Tabla 2) concuerda con el estudio realizado por Hebishy et al. (2015) demostrando que en emulsiones al 4% de concentrado de proteína del suero (20% v/v fase oleosa), tienen un comportamiento reológico cercano a nuestro resultado teniendo una $K: 0,0034$ y $n: 0,98$ a una presión de 100 Mpa con un equipo Stansted Benchtop (Model/DRG number FPG 11300:400). Esta diferencia está dada por el tipo de tecnología utilizada.

3.4 Estabilidad física de las emulsiones

La estabilidad física hace referencia a la capacidad de una emulsión para permanecer invariable frente a los principales procesos de alteración durante un determinado periodo de tiempo. Las emulsiones del tipo “aceite-en-agua” tienden a ser termodinámicamente inestable debido a la gran área interfacial existente entre la fase oleosa y la fase acuosa (McClements, 2005). La tendencia a la reorganización hacia su estado inicial con lleva a cambios locales de tamaño y concentración de partículas o gotas. Por lo tanto, el análisis de la estabilidad se fundamenta en la medición de estos cambios. La cinética de desestabilización de las emulsiones opacas se puede monitorizar con ayuda del equipo Turbiscan en función del tiempo de envejecimiento, gracias a las lecturas de la retrodispersión y al cálculo del índice de estabilidad que realiza el equipo (*Turbiscan Stability Index*, TSI), indicando valores más altos del TSI, más inestabilidad en la emulsión (Poteau et al., 2005).

En la Figura 4 se muestran los perfiles de retrodispersión de luz en función al tiempo, en todo el volumen de las emulsiones estudiadas. En la zona inferior del tubo de depósito de las muestras se observó una disminución de los valores de retrodispersión con el transcurso de tiempo, lo que evidencia el desarrollo de un proceso de clarificación, mientras que en la zona superior del tubo el valor aumentó, producto de la acumulación de gotas de aceite en la parte superior del tubo poniendo de manifiesto el cremado de la emulsión, dichos fenómenos que se pueden observar visualmente en la Figura 5 (A, B, C y D). En el transcurso del tiempo la emulsión que menos presentó cambios en su perfil de retrodispersión fue la PS4, resultado que también es evidente a simple vista en comparación a las emulsiones elaboradas con mazada. La gran capacidad emulsionante de los concentrados de proteína de suero ha sido también

mostrado en los estudios de Hebishi et al. (2015) obteniendo emulsiones de 20% aceite utilizando proteína del suero al 4% (p/p) como agente emulsionante y estabilizadas por homogeneizadoras a alta presión a 100 MPa utilizando un homogeneizador Stansted, logrando una estabilidad física de aproximadamente 17 días de almacenamiento sin cambios visuales.

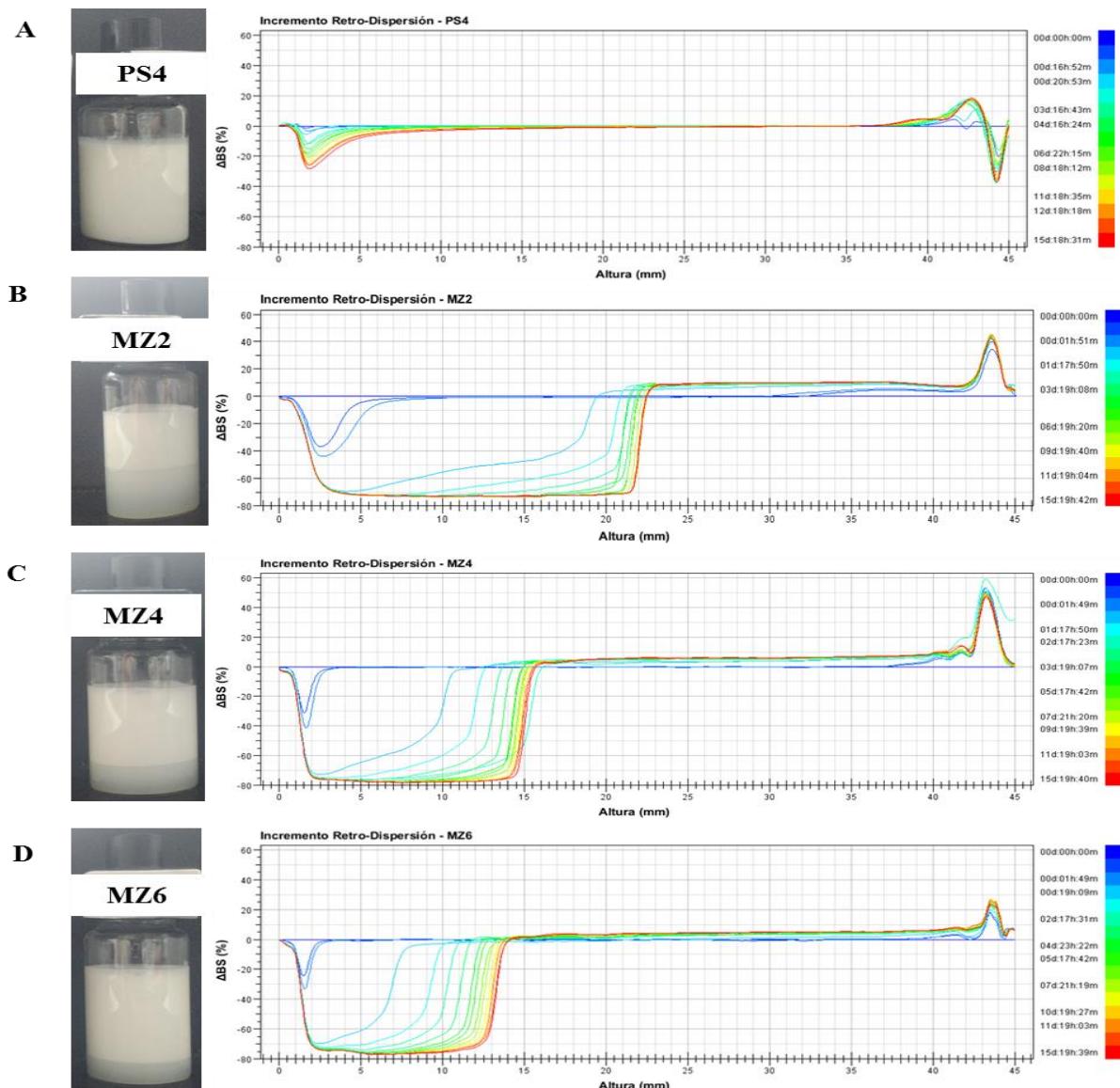


Figura 4. Perfiles de retrodispersión y aspecto visual de las emulsiones O/W (20% aceite) que contienen 2, 4 y 6 % de mazada (MZ) y 4% de aislado de proteína de suero (PS4) estabilizadas por homogeneización a presión a 100 MPa, en función del tiempo de almacenamiento (15 días).

En cuanto a las emulsiones elaboradas con mazada a simple vista se observaron cambios en solo 24 horas en todas las emulsiones, siendo las MZ2 la que presentaron una gran variación

con el tiempo como se visualiza en la Figura 5B, presentando fenómenos tempranos de clarificación y cremado debido al tamaño de partícula, su baja viscosidad y alta tasa de floculación como se describió anteriormente en las secciones de distribución de tamaño y reología. Aunque también las emulsiones MZ4 y MZ6 presentaron desestabilización, visibles a nivel visual, éstas necesitaron más tiempo para ser notoria. Si observamos los gráficos de retrodispersión de ambas emulsiones, la MZ6 presentó menor variación con el tiempo, que puede ser debido a su mayor viscosidad que enlentece el movimiento de las partículas en la emulsión como también al poseer mayor contenido sólidos emulgentes que hace que las gotas de la emulsión tengan un mejor recubrimiento enlenteciendo los fenómenos de floculación entre partículas.

Estos resultados están en acuerdo con los publicados por Agustín et. al. (2015) que produjeron emulsiones con material emulgente a la mazada (35% de sólidos totales que contenían aceite de 17,5% de pescado como fuente de omega-3), concluyeron que la mazada es buen agente estabilizador debido que después de 18 meses demostraron cambios estructurales durante el almacenamiento y fenómenos de coalecencia.

Los resultados obtenidos de estabilidad física (TSI) de las emulsiones durante un periodo de 15 días desde su producción se pueden apreciar en la Figura 5, mostrando que las emulsión MZ2 presentó el mayor TSI, seguida de la MZ4, MZ6 y por último la PS4, exhibiendo esta última la mayor estabilidad. La curva de desestabilización para la emulsión MZ2 ya se inicia desde su elaboración y va en aumento hasta el día 15, mientras que en las emulsiones MZ4 y MZ6 la desestabilización va en aumento hasta el día 8-10 para después frenarse y estabilizarse.

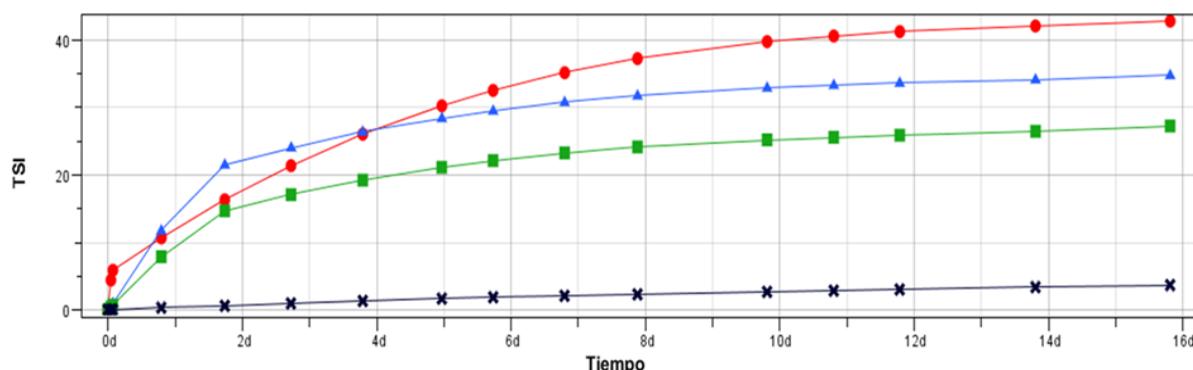


Figura 5. Índice de estabilidad del Turbiscan (TSI siglas en inglés) en función del tiempo de las emulsiones O/W (20% aceite) que contienen 2 % Mazada (●), 4% Mazada (▲), 6% Mazada (■) y 4% Proteína del Suero (✖).

3.5 Oxidación lipídica de las emulsiones

Los lípidos proporcionan propiedades únicas de textura, apariencia, flavor y la densidad calórica en los alimentos (Damodaran y Parkin, 2008). Sin embargo, estos al mismo tiempo son propensos a la oxidación, lo que repercute negativamente no sólo en la calidad y el valor nutritivo de los alimentos, sino también a la salud del consumidor.

La oxidación de lípidos en una emulsión es un fenómeno interfacial inducido por metales de transición, la luz, la temperatura y el oxígeno, pudiendo verse también afectada por el pH, el tamaño de partículas y otros factores relacionados con la composición de las fases que la constituyen (Nielsen et al., 2013).

Los hidroperóxidos son productos de oxidación primaria que debido a su carácter inestable, se descomponen en una amplia gama de compuestos de naturaleza muy diversa, que constituyen los denominados productos de oxidación secundaria (Navarro-García et al, 2004), principalmente aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos, ácidos orgánicos volátiles, y compuestos epoxi, responsables de olores y sabores indeseables (McClements y Decker, 2006).

Cuando los productos de la oxidación lipídica secundaria se forman a partir de peróxidos de ácidos grasos monoinsaturados, se obtienen, fundamentalmente, aldehídos saturados. Estos productos de la oxidación, no forman el complejo rosáceo característico al interaccionar con el ácido tiobarbitúrico (malonaldehido-TBA) a diferencia de lo que ocurre con los ácidos grasos poliinsaturados oxidados. En su lugar, se desarrolla un complejo específico de color amarillo (Kristensen y Skibsted, 1999). La formación del complejo malonaldehído-TBA (color rosa) se cuantifica mediante espectrofotometría debido a que presenta una absorbancia máxima a una longitud de onda de 532nm. Sin embargo, los productos lácteos poseen un bajo contenido de lípidos poliinsaturados por lo que esta determinación puede resultar poco representativa del grado de oxidación real. Por ello, para este tipo de productos también se realiza una segunda medición a una longitud de onda de 450 nm, que permita poner en manifiesto la formación de los productos de oxidación secundarios de los ácidos grasos monoinsaturados (Stapelfeldt et al., 1997). En este estudio como las emulsiones se formularon con aceites de girasol y de chía ricos en ácidos mono y poliinsaturados se tomaron las lecturas de TBARS a las dos longitudes de onda.

En las Tablas 4, 5 y 6 se presentan los valores obtenidos en oxidación primaria y secundaria por análisis de hidroperóxidos y TBARS, respectivamente. Al comparar los niveles de hidroperóxidos en términos de absorbancias entre las emulsiones (Tabla 4) se pudo observar que todas las emulsiones incrementaron sus niveles de oxidación primaria a lo largo del periodo de almacenamiento (del día 1 al 15). Tras la elaboración de las emulsiones (día 1) la emulsión que presentó valores de oxidación primaria más bajos ($P<0,05$) fue la PS4 seguida de la MZ6 y finalmente las MZ2 y MZ4, las cuales presentaron valores similares. Sin embargo, al día 15 las emulsiones PS4 y MZ6 fueron las emulsiones más estables a nivel oxidativo con valores similares de hidroperóxidos ($P>0,05$), seguidas de las MZ4 y finalmente la MZ2, emulsión que presentó un nivel de oxidación primaria muy elevado en comparación al resto de emulsiones.

En el análisis de oxidación secundaria de las emulsiones a través de la técnica de TBARS, las emulsiones MZ mostraron una coloración rosácea a diferencia de la emulsión PS que presentó una coloración amarillenta. Por lo tanto, si se comparan las emulsiones en las diferentes longitudes de onda (A_{532} y A_{450}), todas presentaron un comportamiento diferente.

La emulsión PS4 presentó menores valores de absorbancia medida a una longitud de onda 532 nm, pero por el contrario valores mayores de absorbancia cuando la medida se realizó a una longitud de onda de 450 nm, en comparación a las emulsiones adicionadas de mazada (MZ) como agente emulgente, mostrando diferencias significativas ($P < 0,05$) y un aumento paulatino de la oxidación secundaria a ambas longitudes de onda al transcurrir los días de almacenamiento.

Diferentes autores (ver revisión de Guillen-Sans et al. (1998)) han mostrado que diferentes componentes presentes en las matrices de alimentos, como los productos de reacción de Maillard y los productos de degradación de proteínas y azúcares, participan en la formación del complejo de color TBA, requiriéndose un análisis más específico del complejo TBA-MDA.

Más recientemente, Semeniuc et al. (2016) han identificado interferencias entre componentes de la matriz láctea como la lactosa y el ácido láctico y el método TBARS al estudiar la oxidación secundaria en yogures aromatizados para beber enriquecidos en fitoesteroles, produciendo una sobreestimación en los valores de TBARS en este tipo de matrices con componentes lácteos. El diferente comportamiento encontrado entre las emulsiones PS y MZ al aplicar el método TBARS no posibilita hacer comparaciones realistas entre estos dos tipos de emulsiones, y en

este caso debemos considerar el método espectrofotométrico de TBARS como un método menos valioso y de difícil interpretación, en comparación a otros que se describen en la literatura como la cuantificación directa del malondialdehído por cromatografía líquida o la cuantificación de diferentes aldehídos como el hexanal por extracción en fase sólida en espacio de cabeza seguido de cromatografía de gases-masas (SPME-GC/MS) (Pereda et al., 2007).

Las reacciones de oxidación que ocurren en la interfaz aceite-agua tienen un gran impacto en la oxidación; por lo tanto, se puede lograr una reducción de la tasa de oxidación mediante un diseño adecuado de la interfaz aceite-agua (Frankel et al., 2002). El proceso de oxidación puede verse influido, además de las características de la capa interfacial (su composición, espesor y carga), también por la concentración y el estado físico de la fase dispersa y el tamaño de las gotas, la composición de la fase oleosa y la presencia de proteínas y péptidos (McClements & Decker, 2006).

Las proteínas lácteas, y en particular las proteínas del suero, se pueden usar para estabilizar emulsiones y pueden inhibir la oxidación de la fase dispersa, proporcionando así una barrera efectiva contra la oxidación del aceite microencapsulado (Kagami et al., 2003; Hebishi et al., 2015). La caseína y la proteína de suero de leche pueden estabilizar eficazmente las emulsiones de aceite de pescado y proporcionar una función antioxidante en la emulsión (Ye et al., 2009). Se piensa que la descomposición catalizada por metales de los peróxidos es la causa más común de inestabilidad oxidativa de las emulsiones de aceite en agua. La mayoría de los aceites, incluso después del refinado y la desodorización, todavía contienen niveles traza de peróxidos y varios ingredientes de alimentos contienen trazas de iones metálicos (Jacobsen, 2010).

Precisamente los valores bajos de absorbancia correspondientes a oxidación lipídica primaria y moderados de secundaria encontrados en la emulsión PS4 podrían deberse al efecto antioxidante descrita para la proteína del suero, al buen recubrimiento producido por esta proteína de la interfaz aceite-agua y al menor tamaño de partícula de esta emulsión. Cabe señalar que, en la literatura no existe una tendencia clara respecto a la oxidación de lípidos y su relación con los tamaños de partícula.

Algunos estudios sobre emulsiones confirman la teoría que al reducir el tamaño de partícula la emulsión es más susceptible a la oxidación, ya que el incremento en el área total interfacial

acelera la oxidación lipídica (Jacobsen et al., 2010). Sin embargo otros estudios muestran lo contrario. Lethuaut et al. (2002), Atarés et al. (2012) y más recientemente Hebishy et al. (2015) demostraron que la homogeneización a alta presión, a través de la reducción del tamaño de las gotas, estabiliza las emulsiones frente a la oxidación del aceite. Atribuyeron este resultado al aumento en la cantidad de proteína de suero directamente en contacto con la fase lipídica (proteína de suero de leche adsorbida) con la disminución en el tamaño de partícula (área interfacial alta), lo que hace que las propiedades antioxidantes de la proteína sea mayor.

En el caso de las emulsiones MZ se ha podido constatar valores de absorbancias moderados de hidroperóxidos a día 1 que han aumentado rápidamente hasta el día 15, excepto en la emulsión con mayor proporción de mazada (MZ6), sin embargo para todas ellas e incluso para la emulsión MZ6, se ha podido observar valores de absorbancias más elevadas, en comparación a la emulsión PS4, correspondientes a oxidación secundaria ya al día 1 tras su elaboración, con un aumento más o menos intenso hasta el día 15 según la emulsión, lo que muestra niveles de oxidación más avanzados que en el caso de la emulsión PS4.

En el estudio presentado por Affolter et al. (2010) se describe a la mazada como un producto lácteo que se obtiene del batido de la nata para obtener mantequilla. La ruptura de la membrana de los glóbulos gramos durante el proceso de batido libera al suero de mazada una importante cantidad de componentes lácteos (caseínas y proteínas del suero) y de MFGM rica en proteínas y péptidos de membrana que tienen propiedades antioxidantes y otras propiedades fisiológicas, así como una cantidad nada despreciable de fosfolípidos.

Los fosfolípidos poseen grandes capacidades emulgentes y a veces se usan como antioxidantes en los alimentos. Se han propuesto varios mecanismos de cómo los fosfolípidos podrían influir en la oxidación de los lípidos. En general, los fosfolípidos podrían quitar metales prooxidativos, producir compuestos antioxidantes a través de reacciones de Maillard durante la oxidación de lípidos, alterar la ubicación de otros antioxidantes y regenerar antioxidantes primarios como tocoferoles. Sin embargo, los fosfolípidos también podrían servir como sustratos de oxidación. Debido a su alto grado de insaturación, carga negativa que atrae metales prooxidantes y una gran área de superficie cuando existen como dispersiones, pueden ser un sustrato importante para la oxidación en alimentos que contienen cantidades considerables de membranas biológicas, como son las carnes o las leches en polvo (Cui y Decker, 2016).

Considerando los resultados obtenidos en el análisis de oxidación secundaria y si se calcula el incremento en absorbancia a longitud de onda de 532 nm entre el día inicial y el final del ensayo ($\Delta A_{1-15 \text{ días}}$) se obtienen valores de 0,0283; 0,0811; 0,0300 y 0,0642 para las emulsiones PS2, MZ2, MZ4 y MZ6, respectivamente, sugiriendo que la gran parte de la oxidación secundaria ya ocurre en el día 1 tras el tratamiento. A este respecto, se tiene que comentar que las condiciones de procesamiento tienen un gran impacto en la oxidación en el producto final.

Durante la preparación de la emulsión gruesa o preemulsión por el sistema de homogeneización rotor-estator (equipo Ultraturrax), se produce una intensa tensión mecánica y agitación causada por la cizalladura y la turbulencia, lo que puede promover la incorporación de oxígeno en la emulsión. Además, durante la homogeneización a 100 MPa la ruptura de gotitas causada por cavitación y reordenación de gotitas de aceite puede mejorar la distribución de oxígeno, catalizadores y productos de oxidación de lípidos entre las gotas de aceite, aumentando la tasa de oxidación de lípidos (Serfert et al., 2009), y en estas emulsiones de los fosfolípidos de la mazada que podrían explicar las elevadas absorbancias de oxidación secundaria, en comparación a la emulsión PS4, ya en el día 1 de almacenamiento en las emulsiones MZ (Tabla 5).

De los resultados obtenidos no se ha podido mostrar una tendencia clara a la oxidación según la cantidad de mazada utilizada en las emulsiones MZ, ya que si bien a nivel de oxidación primaria la emulsión que presentó valores de absorbancias mayores fue la MZ2, seguida de la MZ4 y por último la MZ6, las 3 emulsiones presentaron niveles similares de oxidación secundaria medida a longitud de onda 532, pero presentaron valores (Tabla 6) de absorbancia a 450 nm que aumentaron al aumentar el porcentaje de mazada en la emulsión.

Sin embargo, la mazada también es rica en componentes proteicos como las caseínas y proteínas del suero que también pueden actuar como agentes emulgentes, y como se ha comentado anteriormente proteínas con capacidad antioxidante que podrían modular los fenómenos de oxidación en las emulsiones.

Está claro que el diseño apropiado de la interfaz aceite-agua puede reducir la oxidación de lípidos en emulsiones enriquecidas con aceites insaturados, ya que se ha demostrado que la composición de la interfaz tiene un gran impacto en la estabilidad oxidativa del producto. Para comprender las propiedades de la interfaz y predecir los eventos que pueden ocurrir en las

emulsiones adicionadas de mazada, se necesita más conocimiento sobre la composición de la interfaz aceite-agua y las posibles interacciones entre proteínas y fosfolípidos a nivel de la interfaz.

Tabla 4. Medias y desviaciones estándar de las absorbancias medidas a una longitud de onda de 510 nm para el índice de hidroperóxidos de las emulsiones objeto de estudio durante un periodo de almacenamiento de 15 días a 37 °C.

Emulsiones ¹	Hidroperóxidos (A _{510 nm})				
	Día 1	Día 4	Día 7	Día 11	Día 15
PS4	0,2183 ± 0,0270 ^{a,w}	0,2536 ± 0,0215 ^{a,w}	0,3357 ± 0,0826 ^{b,w}	0,3514 ± 0,0333 ^{b,w}	0,4407 ± 0,2007 ^{c,w}
MZ2	0,3436 ± 0,0331 ^{a,x}	0,4585 ± 0,0808 ^{bx}	0,8300 ± 0,0461 ^{c,x}	1,0198 ± 0,0879 ^{d,x}	1,3980 ± 0,0510 ^{e,x}
MZ4	0,3550 ± 0,0928 ^{a,x}	0,4596 ± 0,0947 ^{b,x}	0,6411 ± 0,0867 ^{c,y}	0,8738 ± 0,1095 ^{d,y}	0,9000 ± 0,0241 ^{d,y}
MZ6	0,2527 ± 0,0667 ^{a,y}	0,3128 ± 0,0443 ^{ab,y}	0,3915 ± 0,1448 ^{bc,w}	0,4413 ± 0,1805 ^{c,z}	0,5856 ± 0,2462 ^{d,w}

¹ Emulsiones elaboradas con distintas concentraciones de mazada (MZ) al 2, 4 y 6% (p/p) y proteína del suero (PS) al 4% (p/p), conteniendo aceite de chía (10% p/p) y de girasol (10% p/p), y estabilizadas por homogenización a alta presión (100 MPa).

^{w-z} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) de las absorbancias entre emulsiones.

^{a-e} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) de las absorbancias de las emulsiones entre los diferentes días.

Tabla 5. Medias y desviaciones estándar de las absorbancias medidas a una longitud de onda de 532 nm para el índice de TBARS de las emulsiones objeto de estudio durante un periodo de almacenamiento de 15 días a 37 °C.

Emulsiones ¹	TBARS (A-532 nm)				
	Día 1	Día 4	Día 7	Día 11	Día 15
PS4	0,0274 ± 0,0046 ^{a,w}	0,0296 ± 0,0036 ^{ab,w}	0,0318 ± 0,0084 ^{ab,w}	0,0329 ± 0,0071 ^{b,w}	0,0557 ± 0,0043 ^{c,w}
MZ2	0,0717 ± 0,0081 ^{a,x}	0,0769 ± 0,0073 ^{a,x}	0,0793 ± 0,0149 ^{a,x}	0,0798 ± 0,0199 ^{a,x}	0,1085 ± 0,0291 ^{b,x}
MZ4	0,0600 ± 0,0059 ^{a,y}	0,0734 ± 0,0065 ^{a,x}	0,0796 ± 0,0219 ^{b,x}	0,0815 ± 0,0290 ^{b,x}	0,0900 ± 0,0253 ^{b,x}
MZ6	0,0511 ± 0,0057 ^{a,z}	0,0775 ± 0,0229 ^{b,x}	0,0821 ± 0,0283 ^{b,x}	0,1093 ± 0,0369 ^{c,y}	0,1153 ± 0,0275 ^{c,x}

¹ Emulsiones elaboradas con distintas concentraciones de mazada (MZ) al 2, 4 y 6% (p/p) y proteína del suero (PS) al 4% (p/p), conteniendo aceite de chía (10% p/p) y de girasol (10% p/p), y estabilizadas por homogenización a alta presión (100 MPa).

^{w-z} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) de las absorbancias entre emulsiones.

^{a-c} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) de las absorbancias de las emulsiones entre los diferentes días.

Tabla 6. Medias y desviaciones estándar de las absorbancias medidas a una longitud de onda de 450 nm para el índice de TBARS de las emulsiones objeto de estudio durante un periodo de almacenamiento de 15 días a 37 °C.

Emulsiones ¹	TBARS (A _{450 nm})				
	Día 1	Día 4	Día 7	Día 11	Día 15
PS4	0,0437 ± 0,0048 ^{a,w}	0,0461 ± 0,0027 ^{ab,w}	0,0480 ± 0,0052 ^{bc,w}	0,0520 ± 0,0047 ^{cd,w}	0,0557 ± 0,0071 ^{d,w}
MZ2	0,0187 ± 0,0022 ^{a,x}	0,0197 ± 0,0041 ^{ab,x}	0,0210 ± 0,0030 ^{bc,x}	0,0239 ± 0,0043 ^{bc,x}	0,0293 ± 0,0070 ^{c,x}
MZ4	0,0246 ± 0,0022 ^{a,y}	0,0274 ± 0,0041 ^{ab,y}	0,0292 ± 0,0019 ^{b,y}	0,0292 ± 0,0046 ^{b,y}	0,0308 ± 0,0052 ^{c,x}
MZ6	0,0336 ± 0,0074 ^{a,z}	0,0342 ± 0,0024 ^{a,z}	0,0337 ± 0,0018 ^{a,z}	0,0419 ± 0,0029 ^{b,z}	0,0422 ± 0,0046 ^{b,z}

¹ Emulsiones elaboradas con distintas concentraciones de mazada (MZ) al 2, 4 y 6% (p/p) y proteína del suero (PS) al 4% (p/p), conteniendo aceite de chía (10% p/p) y de girasol (10% p/p), y estabilizadas por homogenización a alta presión (100 MPa).

^{w-z} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) de las absorbancias entre emulsiones.

^{a-c} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) de las absorbancias de las emulsiones entre los diferentes días.

4. CONCLUSIÓN

En este estudio se han formulado, elaborado por homogeneización a alta presión (100 MPa) y caracterizado (tamaño de partícula, estabilidad física y oxidativa, y comportamiento reológico) diferentes emulsiones “aceite-en-agua” a partir de aceites altamente insaturados (10% girasol + 10 % chía) y diferentes concentraciones de mazada (MZ: 2, 4 y 6%) como agente emulsionante, comparándola con una emulsión control producida utilizando un aislado de proteína del suero (PS), obteniéndose las siguientes conclusiones.

Las emulsiones formuladas con MZ poseen un tamaño de partícula mucho mayor que la proteína de suero, mostrando la emulsiones con MZ una curva de distribución de tamaños monomodal y la PS bimodal.

En cuanto al comportamiento reológico, la emulsión formulada con PS presenta un comportamiento newtoniano ($n \approx 1$) con una viscosidad muy inferior a las emulsiones formuladas con mazada (MZ). Las emulsiones de mazada muestran un incremento de la viscosidad aparente y cambios en el comportamiento reológico en función de la concentración creciente de MZ, observándose un cambio en sus curvas de flujo desde unas características cercanas a los fluidos newtonianos a pseudoplásticos.

Los niveles de hidroperóxidos en términos de absorbancias de todas las emulsiones aumentaron indicando un incremento en los niveles de oxidación primaria a lo largo del periodo de almacenamiento, presentando los menores valores de absorbancia las emulsiones PS4 y MZ6. En el análisis de oxidación secundaria de las emulsiones utilizando la técnica de TBARS, las emulsiones MZ y PS mostraron coloraciones diferentes (rosácea y amarillenta, respectivamente), por lo que hace difícil su comparación a las diferentes longitudes de onda estudiadas (A_{532} y A_{450}), y plantea la necesidad de la búsqueda y aplicación de otras técnicas de estudio de oxidación secundaria para poder caracterizar de manera definitiva a nivel oxidativo las emulsiones objeto de estudio.

Finalmente, a nivel de estabilidad física se ha observado quelas emulsiones formuladas con MZ son más inestables en comparación a la preparada con PS. Asimismo, se ha observado quelas emulsiones con MZ tienden a mejorar su estabilidad física a medida que aumenta de concentración de MZ, tal y como se ha observado en los índices de estabilidad del Turbiscan. En este punto, se cree que la estabilidad de la emulsión preparada con mazada como emulgente

se podría mejorar sustancialmente si se consiguiese reducir el tamaño de partícula de la emulsión mediante la utilización de una mayor presión de homogeneización o utilizando un sistema de homogeneización más eficiente.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., & Agboola, S. (2014). Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. *Journal of Food Engineering*, 122(1). 15-27. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.034>
- Affolter, M., Grass, L., Vanrobaeys, F., Casado, B., & Kussmann, M. (2010). Qualitative and quantitative profiling of the bovine milk fat globule membrane proteome. *Journal of Proteomics*, 73(6), 1079–1088. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.11.008>
- Aider, M., D. Halleux & I. Melnikova. (2009). Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(3):334-341. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.01.005>
- Amador-Espejo, G. G., Suàrez-Berencia, A., Juan, B., Bárcenas, M. E., & Trujillo, A. J. (2014). Effect of moderate inlet temperatures in ultra-high-pressure homogenization treatments on physicochemical and sensory characteristics of milk. *Journal of dairy science*, 97(2), 659-671<https://doi.org/10.3168/jds.2013-7245>
- Atarés Huerta, LM. Marshall, LJ.; Akhtar, M.; & Murray, BS. (2012). Structure and oxidative stability of oil in water emulsions as affected by rutin and homogenization procedure. *Food Chemistry*, 134(3), 1418-1424. doi:[10.1016/j.foodchem.2012.02.221](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.221)
- 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>.
- Ayerza, R. & Coates, W. (2005). Chia: rediscovering a forgotten crop of the aztecs. Tucson: the University of De Arizona press.
- Baro, L., Jiménez, J., Martínez, A. & Bouza, J. (2001). Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Journal of Ars. Pharmaceutica*, 42(3-4), 135-145.
- Choi, M. J.; Briançon, S.; Bazile, D.; Royere, A., & Fessi, H. (2007). Effect of cryoprotectant and freeze-drying process. *Drying Technology*, 25(5), 809-819. <https://doi.org/10.1080/07373930701370183>
- 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>
- 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>

Damodaran, S., Parkin, K.L. (2008). Fennema's Food Chemistry. CRC Press, Boca Raton, FL, Estados Unidos.

DeHoog, E. (2011). Emulsions for new functionalities. *Prepared Foods*. 180(6), 99-105

Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T.T., Messens, K., & Van Camp, J. (2008). Review: Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, 18, 436-457. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.10.014>

Dimri M, Bommi PV, Sahasrabuddhe AA, Khandekar JD, & Dimri CP. (2010). Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress expression of EZH2 in breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 31(3), 489-495. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp305>

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>

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>

Gallardo, J. (2012). Reología de una emulsión de aceite en agua. Tesis Ing. México, Universidad Nacional Autónoma de México.

Govindasamy-Lucey, S., Lin, T., Jaeggi, J., Johnson, M., & Lucey, J. (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)

Guillen-Sans, R., & Guzman-Chozas, M. (1998). The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 38(4), 315-350. <https://doi.org/10.1080/10408699891274228>

Hayes, M. G., Lefrancois, A. C., Waldron, D. S., Goff, H. D., & Kelly, A. L. (2003). Influence of high pressure homogenization on some characteristics of ice cream. *Milchwissenschaft*, 58, 519-523.

Hebishi, 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>

Hernell, O., Timby, N., Domellöf, M., & Lönnadal, 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>

Hinrichs, J. (2001). Incorporation of whey proteins in cheese. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 495-503. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00071-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00071-1)

Israelachvili J. (1994). The science and applications of emulsions an overview. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 91, 1–8. [http://dx.doi.org/10.1016/0927-7757\(94\)02743-9](http://dx.doi.org/10.1016/0927-7757(94)02743-9)

Jacobsen, C. (2010). Enrichment of foods with omega-3 fatty acids: A multidisciplinary challenge. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1190, pp. 141–150). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05263.x>

Jafari, A. R.; Sarrafzadeh, M. H.; Alemzadeh, I., & Vosoughi, M. (2007). Effect of stirrer speed and aeration rate on the production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*. *Journal of Biological Sciences*, 7, 270-275 10.3923. <https://doi.org/10.270.275>

Julio, L. (2017). Trabajo de Tesis Doctoral Aplicación de subproductos de chía (*Salvia hispanica L.*) en emulsiones alimentarias funcionales Tesista Dra. Mabel Cristina Tomás Ms. Sc. Susana María Nolasco Año.

Kagami, Y., Sugimura, S., Fujishima, N., Matsuda, K., Kometani, T., & Matsumura, Y. (2003). Oxidative stability, structure and physical characteristics of microcapsules formed by spray drying of fish oil with protein and dextrin wall materials. *Journal of Food Science*, 68, 2248–2255. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05755.x>

Kristensen, D., & kibsted, L. H. (1999). Comparison of three methods based on electron spin resonance spectrometry for evaluation of oxidative stability of processed cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3099–3104. 10. <https://doi.org/10.1021/jf981396p>

Leal-Calderon, F., Schmitt, V., & Bibette, J. (2007). Emulsion science, basic principles (2nd ed). New York. *Springer*.

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), 425. <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0500-z>

McClements DJ, Chantrapornchai W y Clydesdale F. (2006). Prediction of Food Emulsion Color Using Light Scattering Theory. *Journal of Food Science*, 63(6), 935–939. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15827.x>

McClements, D. (2005). *Food Emulsions: principles, practice and techniques* (2nd ed). Boca Raton, Fl: CRC PreMss

McClements, D. J. (2007). Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408390701289292>

McClements, D. J., & Decker, E.A. (2006). Lipid oxidation in oil-inwater emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Sciencie*, 65(8), 1270-1282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10596.x>

Muñoz, J., & Alfaro, C. (2007). Avances en la formulación de emulsiones. *Grasas y Aceites*, 3495(1), 64–73. <https://doi.org/0017-3495>

Navarro-García, G., Bringas-Alvarado, L., y Pacheco-Aguilar, R. (2004). Nueva Herramienta para el Estudio de la Oxidación de los Ácidos Grasos, una de las Causas Fundamentales de la Pérdida de Calidad de los Alimentos para la Acuacultura. In L. E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. G. Nieto-López, D. Villarreal-Cavazos, U. Scholz, y M. González (Eds.), Avances en Nutrición Acuícola VII (pp. 480–503). Hermosillo, Sonora, México.

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>

Olson, D. W., White, C. H., & Richter, R. L. (2004). Effect of pressure and fat content on particle sizes in microfluidized milk. *Journal of Dairy Science*, 87(9), 3217–3223. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73457-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73457-8)

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)

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>

Poteau, S., Argillier, J. F., Langevin, D., Pincet, F., & Perez, E. (2005). Influence of pH on stability and dynamic properties of asphaltenes and other amphiphilic molecules at the oil– water interface. *Energy & Fuels*, 19(4), 1337-1341. <https://doi.org/10.1021/ef0497560>

Rao, M. A. (2014). Flow and functional models for rheological properties of fluid foods. In *Rheology of Fluid, Semisolid, and Solid Foods* (pp. 27-61). Springer, Boston, MA

Raymundo, PA, Empis, J., Sousa, I., y Gallegos, C. (2001). Influencia de la relación proteína de altramuz / tensioactivo en las propiedades de flujo y texturas de emulsiones aceite en agua. *Grasas y Aceites*, 52 (3-4), 235-240. <https://doi.org/10.3989/gya.2001.v52.i3-4.363>

Salvia-Trujillo L, Rojas-Graü MA, Soliva-Fortuny R, & Martín-Belloso O. (2014). Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against *Escherichia coli* of lemongrass oil-loaded nanoemulsions. *Food Control*, 37, 292–297. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.015>

Santana, R. C., Perrechil, F. A., & Cunha, R. L. (2013). High-and low-energy emulsifications for food applications: a focus on process parameters. *Food Engineering. Reviews*, 5(2), 107-122. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9065-4>

Schultz S, Wagner G, Urban K, & Ulrich J. (2004). High-pressure homogenization as a process for emulsion formation. *Chemical Engineering Technology*. 27, 361–368. <https://doi.org/10.1002/ceat.200406111>

- Semeniuc, C. A., Mandrioli, M., Rodriguez-Estrada, M. T., Muste, S., & Lercker, G. (2016). Thiobarbituric acid reactive substances in flavored phytosterol-enriched drinking yogurts during storage: Formation and matrix interferences. *European Food Research and Technology*, 242(3), 431–439. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2554-3>
- Serfert, Y., Drusch, S., & Schwarz, K. (2009). Chemical stabilisation of oils rich in long-chain polyunsaturated fatty acids during homogenisation, microencapsulation and storage. *Food Chemistry*, 113(4), 1106-1112. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.079>
- Singh, H. (2006). The milk fat globule membrane a biophysical system for food applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, 11 (2), 154-163. <https://doi.org/10.1016/j.jcocs.2005.11.002>
- 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)
- Sørensen, G., Jørgensen, S. S. (1996). A critical examination of some experimental variables in the 2-thiobarbituric acid (TBA) test for lipid oxidation in meatproducts. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 202(3), 205-210. <https://doi.org/10.1007/BF01263541>
- Stapelfeldt, H., Nielsen, BR., Skibsted, LH (1997). Effect of heat treatment, water activity and storage temperature on the oxidative stability of whole milk powder. *International Dairy Journal*, 7, 331–339. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00016-2)
- 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 aniseta and Pimpinella flabellifolia from Turkey. *Food Chemistry*, 97(4), 719-72. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.045>
- 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
- Vladisavljevic' G., Lambrich U., Nakajima, M., & Schubert, H. 2004. Production of O/W emulsions using SPG membranes, ceramic α-aluminum oxide membranes, microfluidizer and a silicon microchannel plate-a comparative study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 232(2-3), 199–207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2003.10.026>
- Wong, P., & Kitts, D. (2003). A comparison of the buttermilk solids functional properties to nonfat dried milk, soy protein isolate, dried egg white, and egg yolk powders. *Journal of Dairy Science*, 86,746–754. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73655-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73655-8)
- Yañez Fernández, J.; Salazar Montoya, J.A.; Chaires Martínez, L.; Jiménez Hernández, J.; Márquez Robles, M. y Ramos Ramírez, E.G. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación, *Avance y Perspectiva*, (21), 313 – 31

Ye, A., Cui, J., Taneja, A., Zhu, X., & Singh, H. (2009). Evaluation of processed cheese fortified with fish oil emulsion. *Food research international*, 42(8), 1093-1098. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.006>