



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Facultat de Veterinària, Departament de Ciència Animal i dels Aliments
Máster Oficial en Calidad de Alimentos de Origen Animal

Trabajo Fin de Máster

**Estabilidad microbiológica de emulsiones líquidas y
deshidratadas obtenidas por homogeneización a
ultra alta presión**

Tania Pamela Alejandro Naranjo

Directores: Dra. Marta Capellas Puig
Dra. Victoria Ferragut Pérez

Barcelona, noviembre de 2020

Agradecimientos

A Dios,

A mi familia,

A mis directoras, en especial a la Dra. Marta Capellas por su compromiso, apoyo y enseñanzas brindadas a lo largo de este trabajo.

Declaro ser la autora de este Trabajo Fin de Máster que se presenta para obtener el grado de Maestría en Calidad de Alimentos de Origen Animal en la Universidad Autónoma de Barcelona, España. Este trabajo no ha sido presentado antes para obtener ningún grado o examen en cualquier otra universidad.

Tania Alejandro

Bellaterra, 18 de noviembre de 2020

Las Doctoras Marta Capellas Puig y Victoria Ferragut Pérez (*Àrea de Tecnologia dels Aliments del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona*),

INFORMAN

Que el trabajo titulado: “Estabilidad microbiológica de emulsiones líquidas y deshidratadas obtenidas por homogeneización a ultra alta presión” ha sido realizado bajo su supervisión y tutela por Tania Alejandro durante la realización del Máster en Calidad de Alimentos de Origen Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, noviembre de 2020

Marta Capellas Puig

Victoria Ferragut Pérez

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Homogeneización Convencional	7
1.2. Tecnología de ultra alta presión de homogeneización (UHPH)	8
1.3. Homogeneización por microfluidización	12
1.4. Homogeneización por ultrasonidos	13
2. MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1. Descripción de las muestras	15
2.2. Análisis microbiológico	17
2.3. Análisis estadístico	18
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
3.1. Ingredientes	19
3.2. Pre-emulsiones y emulsiones líquidas	19
3.3. Pre-emulsiones y emulsiones deshidratadas	24
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	28

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la estabilidad microbiológica de emulsiones líquidas y deshidratadas obtenidas por UHPH y se comparó con otros sistemas de homogeneización. Las emulsiones líquidas, compuestas por agua, mazada y combinación de aceites de chía y girasol se sometieron a tres tratamientos de homogeneización: ultrasonidos, microfluidización y ultra alta presión de homogeneización (UHPH) a 300 MPa. Las emulsiones deshidratadas, compuestas por agua, maltodextrina, mazada y combinación de aceites de chía y girasol se homogenizaron mediante homogeneización convencional, acompañada de pasteurización, UHPH a 100 MPa y a 200 MPa. Después se deshidrataron por un atomización. Para analizar la estabilidad microbiológica de las muestras líquidas se evaluó la inactivación en el día 0 y la evolución de las poblaciones de microorganismos de aerobios mesófilos, esporas, coliformes, mohos y levaduras a lo largo de 28 días a 4 °C, con un intervalo de seguimiento de 7 días. En el caso de las emulsiones líquidas destinadas a ser deshidratadas y de las emulsiones deshidratadas, se realizaron los recuentos de las poblaciones mencionadas al día 0 de su obtención. Los resultados mostraron que la homogeneización por UHPH a 300 MPa y la homogeneización por ultrasonidos causaron una disminución significativa de las poblaciones de aerobios mesófilos, coliformes y mohos y levaduras, que no aumentaron durante los 28 días de conservación de las emulsiones a 4 °C. En las emulsiones destinadas a ser deshidratadas, el tratamiento de homogeneización por UHPH a 200 MPa causó un efecto similar en la reducción microbiana a la pasteurización que acompañaba al tratamiento de homogeneización convencional.

ABSTRACT

The microbiological stability of liquid and dehydrated emulsions obtained by UHPH was evaluated and compared with other homogenization systems. The liquid emulsions, composed by water, buttermilk and combination of sunflower and chia oils, were subjected to three homogenization treatments: ultrasound, microfluidization and ultra high pressure homogenization (UHPH) at 300 MPa. The dehydrated emulsions, composed of water, maltodextrin, buttermilk and combination of sunflower and chia oils were homogenized by conventional homogenization, pasteurization, UHPH at 100 MPa and 200 MPa. They were then dehydrated by atomization. To analyze the microbiological stability of the liquid samples, the inactivation on day 0 and the evolution of the mesophilic aerobic, spore, coliform, mold and yeast microorganism populations were evaluated over 28 days at 4 °C, with a 7-day follow-up interval. In the case of the liquid emulsions destined to be dehydrated and the dehydrated emulsions, the counts of the mentioned populations were made at day 0 of their obtaining. The results showed that homogenization by UHPH at 300 MPa and homogenization by ultrasound caused a significant decrease in the populations of mesophilic aerobes, coliforms and molds and yeasts, which did not increase during the 28 days of conservation of the emulsions at 4 °C. In the emulsions destined to be dehydrated, the homogenization treatment by UHPH at 200 MPa caused a similar effect in microbial reduction to the pasteurization that accompanied the conventional homogenization treatment.

1. INTRODUCCIÓN

Una emulsión consta de dos líquidos inmiscibles con uno de los líquidos disperso en forma de pequeñas gotas esféricas en el otro. El líquido disperso en gotas constituye la fase dispersa o discontinua y el líquido que envuelve las gotas constituye la fase continua. Los diámetros de las gotas dispersas se encuentran en un intervalo entre 0.1 y 100 μm . Aunque se traten de dispersiones termodinámicamente inestables, las emulsiones pueden mejorar su estabilidad desde un punto de vista cinético gracias a la presencia de agentes estabilizantes, que pueden ser emulsionantes, como los tensioactivos, moléculas que se sitúan en la superficie de las gotas dispersas y previenen su agregación, o modificadores de textura, moléculas que aumentan la viscosidad de la fase continua retrasando así el movimiento de las gotas dispersas (McClements, 2005). Las emulsiones son aplicadas en diversos sectores: alimentación, cosmética, farmacia, química agrícola, detergencia, industria de la pintura y polímeros, pretratamiento de crudos de petróleo en refinerías, tratamiento de mareas negras, recuperación terciaria de petróleo, asfaltos, etc.

Las emulsiones pueden clasificarse según la naturaleza de sus fases en: emulsiones de agua en aceite (W/O), cuando la fase dispersa está constituida por el agua (W), y la continua por el aceite (O); emulsiones aceite en agua (O/W), cuando la fase dispersa está constituida por el aceite (O) y la fase continua por el agua (W); y emulsiones múltiples (O/W/O) o (W/O/W) en las que las gotas dispersas, presentan en su interior gotas dispersas de otra fase, que puede ser el mismo medio que la fase continua o diferente (Martínez, 2014) (Fig. 1).

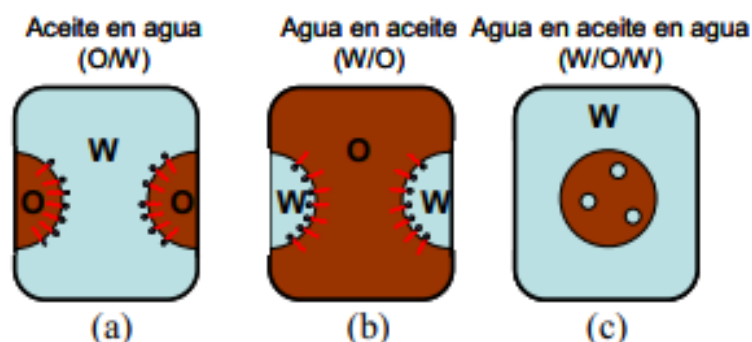


Figura 1. Representación de emulsiones tipo aceite en agua (a), agua en aceite (b), y agua en aceite en agua (c) (Martínez , 2014)

Otro criterio que se usa para clasificar las emulsiones es la fracción de volumen de la fase dispersa (Fig. 2). Las emulsiones diluidas tienen una fracción de volumen (Φ) de la fase dispersa menor a 0.2; las emulsiones concentradas, entre 0.2 y 0.74; y las emulsiones altamente concentradas presentan una fracción superior a 0.74(Lendínez, 2015).

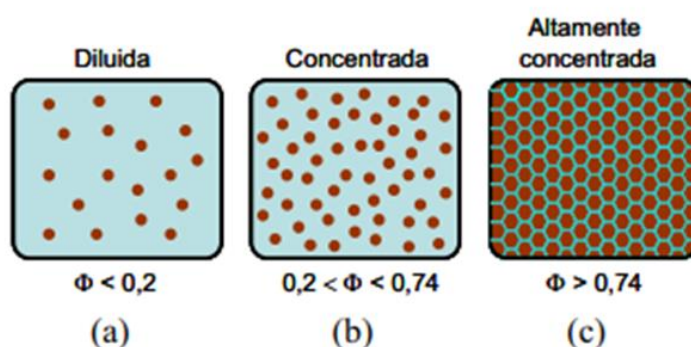





Figura 2. Representación de la clasificación de emulsiones según la fase de dispersión: emulsión diluida (a), emulsión concentrada (b), y emulsión altamente concentrada (c) (Martínez, 2014).

Las emulsiones también se pueden clasificar según el tamaño de las gotas dispersas. Dependiendo de la fuente consultada, varían los intervalos de tamaño de gota. En general, las macroemulsiones implican un tamaño de gota entre 1 y 100 μm ; mientras que las nanoemulsiones presentan tamaño entre 20 y 200 nm. Ambas poseen elevada estabilidad cinética, no requieren elevadas concentraciones de surfactantes, son termodinámicamente inestables, sus propiedades dependen del método de preparación, que requiere un elevado aporte de energía (Gómez, 2014). Las macroemulsiones presentan un aspecto lechoso debido al mayor diámetro de las gotas, mientras que las nanoemulsiones presentan un aspecto más translúcido (Tabla.1).

Las microemulsiones presentan un tamaño de gota entre 10 y 100 nm y presentan una apariencia transparente, ópticamente isotrópica y son termodinámicamente estables, siendo de interés para el sector farmacéutico por su considerable potencial de actuar como vehículos de liberación de una amplia variedad de moléculas activas (Carlucci et al., 2004) .

Tabla 1. Clasificación de emulsiones según el tamaño de las gotas (Fernández, 2006)

Propiedades	Emulsiones		Microemulsiones
	Nano-emulsión	Macro-emulsión	
aspecto visual			
diámetro característico típico	20-200 nm	> 1 μm	10-100 nm
estabilidad	Cinética		Termodinámica
formación	Aporte de energía		Espontánea
concentración tensioactivo	Baja		Alta

Salager et al. (1983) refiere que la variación de número de gotas en una muestra de emulsión con relación al tiempo es la única medida realmente absoluta de la estabilidad de una emulsión. Este parámetro es experimentalmente difícil de obtener, debido a que su medida supondría la perturbación o destrucción de la muestra, de manera que es buen criterio de estabilidad la medida del tiempo necesario para que se separe una fracción.

Existen varios procesos físicos y químicos que contribuyen a la desestabilización de una emulsión. La inestabilidad química puede ser debida a incompatibilidad entre los distintos componentes. También existe la posibilidad de una descomposición oxidativa de la fase oleosa, y de algunos fármacos o activos cosméticos. Esto no es únicamente debido a la cantidad de aire disuelto en la emulsión y a la posible incorporación de aire durante la preparación del producto, sino también a la extensa superficie de interfase entre la fase oleosa y la acuosa (Kabalnov, 1998)

La estabilidad física de una emulsión depende de diversos factores como: el tamaño de los glóbulos de la fase dispersa, la diferencia de densidad de ambas fases, la viscosidad de la fase continua y de la emulsión, las fuerzas de interfase que actúan en la superficie de los glóbulos, la naturaleza, eficacia y cantidad de emulsificante y estabilizante, y las condiciones de transporte y almacenamiento, como las temperaturas altas y bajas, agitación, vibración, y evaporación (Campo, 2018).

El proceso de desestabilización física de las emulsiones puede ocurrir mediante cuatro mecanismos diferentes (Fig. 3):

a) Cremado (o flotación) o sedimentación. Se trata de un proceso causado por la acción de la gravedad y produce un gradiente vertical de concentración de las gotas sin que varíe la distribución del tamaño de éstas. En emulsiones o/w, las gotas de aceite son menos densas que la fase continua y acuosa y, por lo tanto, ocurre el cremado o flotación.

b) Coalescencia. Es la fusión de gotas para crear gotas más grandes con la eliminación de parte de la interfase líquido/líquido. Esto causa que el proceso de cremado o de sedimentación sea más rápido debido al aumento de tamaño de las gotas.

c) Floculación. Es la adhesión de las gotas sin fusionarse y no existe una variación en la distribución de su tamaño, siendo controlado por un equilibrio global entre las fuerzas de atracción electrostáticas de van der Waals, repulsivas de tipo estéricas, y de hidratación.

d) Engrosamiento de gotas (*Ostwald ripening*). Se debe al crecimiento de las gotas más grandes a costa de las más pequeñas hasta que éstas últimas prácticamente desaparecen. Este proceso ocurre a una velocidad que es función de la solubilidad de la fase dispersa en la fase continua y se debe a que la presión interna de las gotas (presión de Laplace) es mayor en las gotas más pequeñas.

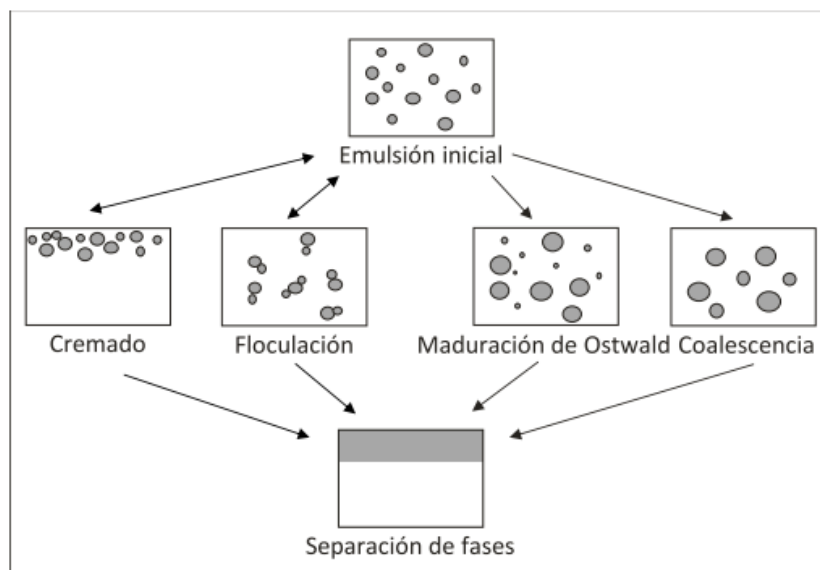


Figura 3. Tipos de inestabilidad en emulsiones (Lendínez, 2015)

Para obtener emulsiones son necesarios equipos que permitan reducir el tamaño de partículas de la fase dispersa hasta que sea lo suficientemente pequeño para evitar su unión posterior y mantener así su estabilidad. Este proceso se denomina homogeneización y, en la industria alimentaria, se realiza con equipos que someten a los líquidos a intensa agitación mecánica, como agitadores de alta velocidad, homogeneizadores con válvulas de alta presión o molinos coloidales (McClements, 2007).

Entre los homogeneizadores con válvulas de alta presión se encuentran los homogeneizadores convencionales de una o dos etapas, que aplican presiones entre 25 y 100 MPa; los homogeneizadores de ultra alta presión de homogeneización que aplican presiones entre 100 y 400 MPa; y los equipos de microfluidización que alcanzan hasta 200 MPa.

La homogeneización por ultrasonidos es otra tecnología que permite obtener emulsiones. En este caso, emplea la energía de ultrasonidos para dispersar las partículas y es capaz de destruir desde sedimentos hasta tejidos.

Puesto que este trabajo se han usado estas cuatro tecnologías, se describen con algo más de detalle a continuación.

1.1. Homogeneización Convencional

En 1899, Gaulin diseñó el homogeneizador convencional (figura 5) con la intención de estabilizar la grasa de la leche. A partir de este acontecimiento, el proceso de homogeneización convencional se empezó a utilizar en diferentes industrias puesto que entre sus beneficios se encuentran la mejora de: la estabilidad, la uniformidad, la consistencia, la viscosidad, la vida útil, el sabor y el color de los productos. La homogeneización se usa ampliamente en distintos tipos emulsiones para evitar los fenómenos de desestabilización, fundamentalmente el cremado, agregación y coalescencia (Pereda et al., 2008; Mayta-Hancco et al., 2020).

La homogeneización convencional utiliza presiones entre 25 y 100 MPa para forzar el paso del fluido a homogenizar a través de una válvula con el fin de conseguir la división de grandes glóbulos de grasa polidispersos de una emulsión o/w hacia un gran número de glóbulos grasos de tamaño menor y más homogéneo (Joubran et al., 1993). El líquido pasa a gran velocidad por la válvula y, a la salida, la presión cae bruscamente y se producen fuerzas de

cizalla y fenómenos de turbulencia, cavitación e impacto que reducen el tamaño de las partículas de la fase dispersa (Sajjadi et al., 2002; Wilbey, 2011).

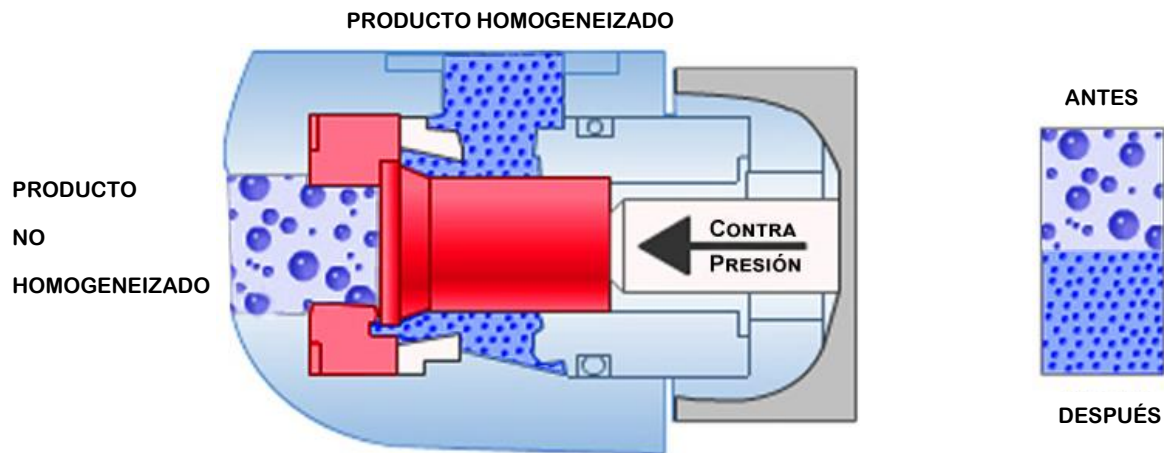


Figura 1. Proceso de homogeneización. (<https://www.artepecas.com.br>)

En la industria láctea las presiones utilizadas en los homogeneizadores convencionales oscilan entre ~20 y 60 MPa, y se emplean con el propósito de reducir el tamaño de los glóbulos de grasa que, en general, se encuentra entre 1-10 μm . Con el proceso de homogeneización se consigue reducir el tamaño inicial de las gotas e incrementar de 5 a 10 veces la superficie de los nuevos glóbulos de grasa. Además, la homogeneización de la leche estabiliza la emulsión como consecuencia de la inactivación de las inmunoglobulinas y de la interacción de la superficie de los glóbulos grasos con la caseína. La temperatura es un factor que se debe considerar durante el proceso de homogeneización de la leche ya que por debajo de 30°C es inefectiva al encontrarse los lípidos parcialmente en estado sólido. A mayor temperatura aumenta la eficiencia en la reducción del glóbulo graso (Thiebaud et al., 2003; Picart et al., 2006; Pereda et al., 2008).

1.2. Tecnología de ultra alta presión de homogeneización (UHPH)

La UHPH es una tecnología basada en los mismos principios de diseño de la homogeneización convencional, siendo el mecanismo de la UHPH un generador de alta presión ensamblado a una válvula diseñada específicamente para resistir la aplicación de presiones entre 100 y 400 MPa. En este proceso también se producen fuerzas de cizalla, y fenómenos de turbulencia, cavitación e impacto que reducen el tamaño de las partículas de la fase dispersa,

como en la homogeneización convencional, pero se consiguen menores tamaños de gota en la fase dispersa, lo que aumenta la estabilidad de las emulsiones (Pereda et al., 2007; Poliseli-Scopel et al., 2013, 2014; Addo y Codina, 2014; Ferragut, 2015; Hebishy et al., 2015; Fernández, 2016). En la válvula de UHPH se produce un aumento de temperatura de entre 2 y 2,5 °C por cada 10 MPa durante un tiempo inferior a 1 segundo, tiempo que tarda en pasar el líquido por la válvula. Este aumento de temperatura, sumado a los fenómenos físicos mencionados, contribuye a la desnaturalización proteica y a la inactivación microbiana, por lo que la UHPH es una tecnología capaz de producir emulsiones submicrónicas, inactivar microorganismos y enzimas y conferir nuevas características funcionales, debido a cambios en la estructura de los alimentos tratados (Floury et al., 2000; Pereda et al., 2008; Hebishy et al., 2013; Fernández, 2016). Los recientes desarrollos en la tecnología UHPH han abierto nuevas oportunidades para el procesamiento de homogeneización en las industrias alimentarias y, en consecuencia, han permitido el desarrollo de nuevos productos diferenciados de los tradicionales por sus características sensoriales y estructurales o sus propiedades funcionales. También se han identificado aplicaciones como la rotura celular para la extracción de componentes intracelulares o la modificación de estructuras de biopolímeros alimentarios para dirigir sus funcionalidades (Patrignani y Lanciotti, 2016; Comuzzo y Calligaris, 2019).

Cuando el objetivo que se persigue alcanzar con la UHPH es la inactivación microbiana, es necesario tener en cuenta que el nivel de destrucción microbiana que se alcance no solo dependerá de la presión, si no de la temperatura alcanzada en la válvula de homogeneización. Por ello, es importante regular la temperatura de entrada del líquido en el equipo UHPH (Pereda et al., 2008).

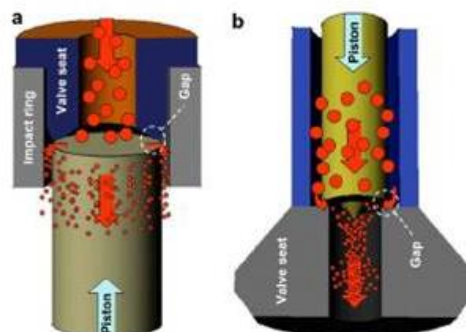


Figura 2. Válvulas de homogeneización de (a) Mantón-Gaulin APV (convencional), y (b) Stansted Fluid Power (UHPH) (Donsi et al., 2009)

Se han publicado numerosos trabajos que estudian los diferentes efectos y aplicaciones de la UHPH en alimentos líquidos, como su estabilidad física y la estabilidad oxidativa de los lípidos, como lo demuestran Fernández-Ávila et al. (2015), Flourey et al. (2000), González (2016), Mayta-Hanco et al. (2020), entre otros. La inactivación microbiológica causada por la UHPH ha sido estudiada en diferentes alimentos, como leche, licuado de soja, licuado de almendra o licuado de chufa (Cruz et al., 2007; Pereda et al., 2007; Codina, 2014; Poliseli-Scopel et al., 2013, 2014). (Fernández, 2016) resumió el efecto de distintos tratamientos de UHPH sobre la vida útil de algunos de estos alimentos (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la Ultra Alta Presión de Homogeneización (UHPH) en la estabilidad microbiológica de algunos alimentos.

Food emulsion	Pressure (MPa)	T _{in} (°C)	Max T (°C) UHPH-valve	Initial count (log cfu/mL)	Maximal microbial stability	Reference
Almond beverage	200	55	129.3±12.6	4.00	ND* after 20 days at 30 °C (300 MPa/65-75 °C)	(Valencia-Flores et al., 2013)
	300	65				
		75				
Soymilk	200	55	135.7±1.5	1.54	ND after 20 days at 30 °C (300 MPa/75 °C)	(Poliseli-Scopel et al., 2012)
	300	65				
		75				
Milk 3.5 % fat	200	55	139.0±2.7	1.00	ND after 15 days at 30 °C and 7 days at 45° (300 MPa/75-85 °C)	(Amador-Espejo et al., 2014)
	300	65				
		75				
		85				
Soymilk	300	80	144	2.18	ND after 20 days at 30 °C and 10 days at 55 °C	(Poliseli-Scopel et al., 2014)
Almond and soymilk beverage	200	55	135.7±1.5	3.18 (soymilk) - 4.21 (almond)	ND (200MPa/75°C and 300MPa/65- 75°C)	(Ferragut, Hernández-Herrero, Poliseli, Valencia, & Guamis, 2011)
	300	65				
		75				

ND, no detectado. Tomado de: Fernández (2016)

1.3. Homogeneización por microfluidización

La microfluidización utiliza el mecanismo de flujo a través de microcanales para la generación de gotas de tamaño nanométrico, usando un equipo que se denomina microfluidizador. En comparación con las emulsiones producidas en homogeneizadores convencionales, las emulsiones que se obtienen por microfluidización, además de un menor diámetro de gota, presentan una distribución de tamaño de gota más estrecha y son más estables pues exhiben un menor crecimiento de diámetro de gota con el paso del tiempo (Mahdi et al., 2006; Zhao et al., 2014).

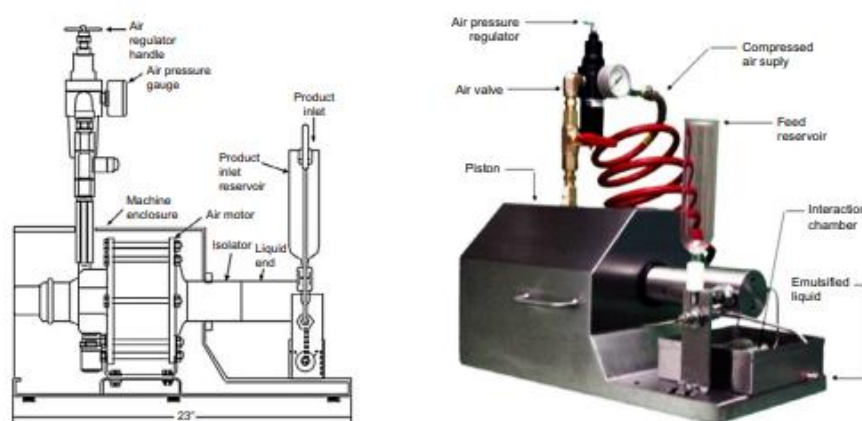


Figura 3. Dispositivo de microfluidización (Villalobos et al., 2018).

Los microfluidizadores habitualmente operan a temperaturas entre 44 y 88 °C. Incluyen una bomba neumática de alta presión de hasta 200 MPa, un filtro y una cámara de interacción donde se obtiene la emulsión. Pueden operar de forma continua o recirculando el fluido en circuito cerrado para aplicar ciclos repetidos (Mahdi et al., 2006).

La microfluidización se utiliza en operaciones industriales y cada vez recibe más atención en tecnología de alimentos ya que proporciona control sobre el tamaño de glóbulo y capacidad de producir emulsiones finas a partir de una gran variedad de materiales. Un ejemplo es la emulsión del aceite de linaza, en el que, después de pasar la emulsión gruesa a través del sistema de microfluidización, se observó un aumento en la carga eléctrica neta de las gotas de aceite de linaza que mejoró las propiedades de repulsión electrostática entre las mismas y la estabilidad de la emulsión (Mehling et al., 2013).

1.4. Homogeneización por ultrasonidos

Los ultrasonidos aplicados al 40, 60 y 80% de amplitud durante tiempos entre 10 y 15 min son herramientas poderosas para mezclar y homogeneizar suspensiones sólido-líquido y líquido-líquido. La homogeneización ultrasónica es un proceso mecánico que permite reducir las partículas en un líquido de modo que se vuelvan uniformemente pequeñas y se distribuyan uniformemente. El generador de ultrasonidos transforma la corriente eléctrica de 220V 50 Hz en energía ultrasónica de 20 KHz para alimentar al transductor ultrasónico (Robles y Ochoa-Martínez, 2012).



Figura 4. Dispositivo de ultrasonidos de laboratorio (<http://www.hwkessel.com.pe>)

El transductor produce un efecto de cavitación en la sonda de aleación de titanio inmersa en la solución a homogeneizar. Esto genera una multitud de microburbujas que liberan una energía considerable en la extremidad de la sonda, que permite una agitación y vibración intensa de la muestra (Kaci et al., 2017). La homogeneización por ultrasonidos tiene capacidad de dispersar partículas y destruir desde sedimentos hasta células y tejidos. Nguyen y Anema (2010) evaluaron la aplicación de ultrasonido (frecuencia de 22,5 kHz/50 W/20 a 80°C/0 a 30 min) en leche entera, observando que este reduce significativamente el tamaño los glóbulos de grasa de muestra en comparación de la homogenización convencional. Puesto que inactiva microorganismos, se ha propuesto como herramienta para la mejora de la seguridad alimentaria (Bilek y Turantaş, 2013).

El **objetivo de este trabajo** es evaluar la estabilidad microbiológica de emulsiones líquidas y deshidratadas obtenidas por UHPH y compararlas con otros sistemas de homogeneización. Para ello, se analizarán la inactivación y la evolución de las poblaciones de microorganismos aerobios mesófilos, psicrotrofos, coliformes, mohos y levaduras, y esporas durante el almacenamiento de las emulsiones líquidas a 4°C durante 28 días, así como el efecto del tratamiento secado en las emulsiones deshidratadas. Este trabajo se enmarca en el Proyecto “Emulsionantes bioactivos funcionalizados por UHPH para la microencapsulación de aceites vegetales. Aplicación a productos de base láctea” cuyo objetivo es mejorar los sistemas de protección y liberación de compuestos bioactivos basados en componentes de la membrana del glóbulo graso de la leche y aceites vegetales ricos en ω -3 frente a los producidos por homogeneización convencional.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Descripción de las muestras

2.1.1. Emulsiones líquidas.

Estas emulsiones están diseñadas para ser incorporadas en forma líquida a productos de base láctea. Se prepararon emulsiones con un contenido final de mazada (CAPSA FOOD S.A., Granda-Siero, España) al 7% (p/p), 73% (p/p) de agua y 20% (p/p) de aceite estando la mezcla de aceites al 10% (p/p), siendo la mezcla de aceite compuesta por 50% de aceite de girasol (Aceites La Masía, Dos Hermanas, España) y 50% de aceite de chía (Grupo nutracéutico Chiasa S.L., Meliana, España). Para incorporar la mazada en la emulsión se dispersó previamente en agua destilada utilizando un agitador tipo BS (VELP Scientifica, Usmate, Italia) a 100 rpm durante 10 min y se almacenó hasta el día siguiente a 4 °C, para su hidratación. Las pre-emulsiones se prepararon por adición lenta (durante 1 min) de la fase oleosa a la fase acuosa (dispersión de mazada), utilizando un homogeneizador Ultraturax (modelo IKA T25, Staufen, Alemania) con un sistema rotor-estator (vástago S25N-18G) a 15.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Estas pre-emulsiones se denominarán PRE en este trabajo.

Las pre-emulsiones PRE se homogeneizaron el mismo día de su obtención por tres métodos:

- Ultrasonidos, utilizando un equipo (Vibracell, Model VC-505, Sonics & Materials, Inc., US) a 40% amplitud por 10 min. Las emulsiones obtenidas se denominarán E-US en este trabajo.

- Microfluidización, utilizando un equipo Microfluidizer (M-110L, Microfluidics, US) a 100 MPa/3 ciclos (100ml). Las emulsiones obtenidas se denominarán E-MF en este trabajo.

- UHPH, en equipo UHPH-Ypsicon (Ypsicon Advanced Technologies, S.L., Barcelona, España) a 300 MPa. La temperatura de entrada y de salida de la muestra estuvo entre 23 y 25 °C y la muestra alcanzó una temperatura de 107-109 °C en la válvula de alta presión. Las emulsiones obtenidas por UHPH se denominarán E-300 en este trabajo.

El pH de las pre-emulsiones y las emulsiones fue de 6.87 ± 0.03 y la actividad de agua de 0.993 ± 0.001 . Las pre-emulsiones y emulsiones se conservaron a 4 °C durante 28 días. Se

realizó el análisis microbiológico el mismo día de su preparación y cada 7 días. El experimento completo se repitió tres veces de manera independiente.

2.1.2. Emulsiones deshidratadas.

Estas emulsiones están diseñadas para ser incorporadas en forma deshidratada a productos de base láctea. Se prepararon dispersiones aceite-agua con un contenido final de 30% (p/p) de maltodextrina (Glucidex 19 D, Roquette, Francia), 7% final de mazada (CAPSA FOOD S.A., Granda-Siero, España), 53% de agua destilada y 10% (p/p) de aceite. El aceite usado era una mezcla de aceite de chía (Grupo nutracéutico Chiasa S.L.) y girasol (Aceites La Masía) en una proporción 1:1 (p/p). Los componentes individuales (mazada y maltodextrina) se dispersaron en un equipo Thermomix TM 21 (Vorwerk España M.S.L., S.C., Madrid, España), operado a 600 rpm a 50 °C durante 10 min y se almacenaron hasta el día siguiente a 4 °C para su completa hidratación. Las pre-emulsiones se obtuvieron de la misma manera que en el apartado anterior y almacenaron en botellas de vidrio para proceder a su homogeneización. Estas pre-emulsiones se denominarán PREM en este trabajo, ya que básicamente se distinguen de las del apartado anterior por su contenido en maltodextrina.

Las PREM se homogeneizaron el mismo día de su obtención por dos métodos:

- Homogeneizador de dos etapas Homolab 2.20 (FBF Italia, S.R.L., Parma, Italia) a 30 MPa en la primera etapa y 3 MPa en la segunda. Posteriormente, se realizó un tratamiento de pasteurización a 63 °C durante 30 min en botellas de vidrio, seguido de un enfriamiento rápido. Las emulsiones obtenidas se denominarán EM-HC.

- UHPH, en equipo UHPH-Ypsicon (Ypsicon Advanced Technologies, S.L., Barcelona, España) a 100 o 200 MPa a una temperatura de entrada de 40 °C y temperaturas de salida de la válvula de 65 y 90 °C respectivamente. Las emulsiones obtenidas se denominarán EM-100 o EM-200.

Las emulsiones EM-HC, EM-100 y EM-200 se conservaron a 4 °C hasta el momento del análisis, en el mismo día de su obtención. Al día siguiente de su obtención se deshidrataron por atomización con el equipo Mini Spray-Dryer B-290 (Buchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza) en configuración de corriente paralela y equipado con una boquilla de dos fluidos (boquilla de 1,4 mm). Las muestras fueron previamente atemperadas a 60 °C y mezcladas con

un agitador magnético. La velocidad de alimentación de la emulsión varió de 150 a 200 ml/h. Las condiciones de trabajo del secado fueron de 150 °C de temperatura de entrada, 90% de aspiración y 20% de flujo de alimentación. Las muestras deshidratadas resultantes se recogieron en recipientes plásticos. Su contenido en agua fue de 2.78 ± 0.58 %. Las emulsiones deshidratadas se denominarán EMS-HC, EMS-100 y EMS-200 en este trabajo.

Se realizó el análisis microbiológico de las pre-emulsiones y emulsiones líquidas, así como de las emulsiones deshidratadas el mismo día de su preparación. El experimento completo se repitió tres veces de manera independiente.

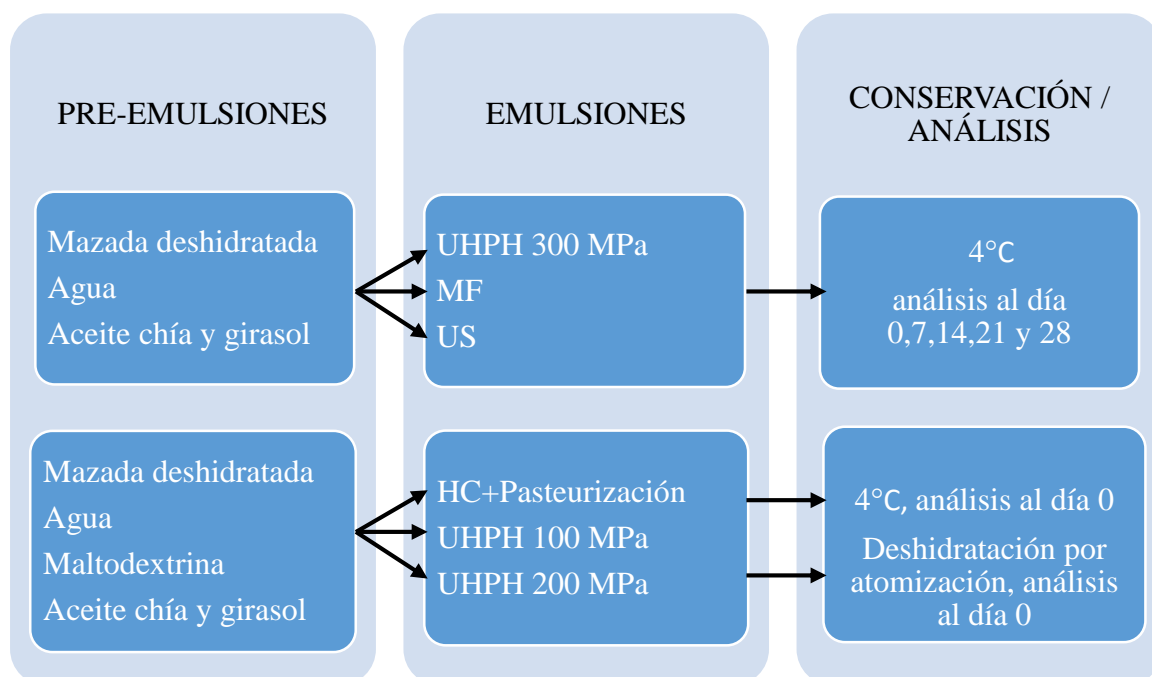


Figura 9. Esquema de la preparación, procesado y análisis de las muestras

2.2. Análisis microbiológico

Los ingredientes, las pre-emulsiones, las emulsiones líquidas y las emulsiones deshidratadas se sembraron directamente, o previa dilución decimal en agua de peptona (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK), por inclusión en medio de cultivo o por superficie cuando el nivel de detección permitió el uso de un equipo de siembra en espiral. Los recuentos se expresan en log de unidades formadoras de colonias (UFC) por ml o por g de muestra.

Se analizaron las siguientes poblaciones de microorganismos:

- Microorganismos aerobios mesófilos, en agar de recuento en placa (PCA, Oxoid), incubado durante 48 h a 30°C.
- Esporas aerobias mesófilas en PCA (Oxoid), incubado durante 48 h a 30°C. Previamente a la preparación de las diluciones decimales, las muestras se sometieron a un tratamiento térmico de 80 °C durante 10 min y posterior enfriamiento en agua helada.
- Coliformes y *Escherichia coli* en medio Brilliance *E. coli*/ Coliform Selective Medium (CCA, Oxoid), incubado durante 24 h a 37°C.
- Mohos y levaduras en medio Rosa de Bengala con cloranfenicol (RB, Oxoid), incubado durante 5 días a 22°C.

2.3. Análisis estadístico

Se usó el programa Minitab (Minitab Ltd., Coventry, UK) para realizar el análisis de la varianza y la comparación de medias con el método LSD de Fisher, con un intervalo de confianza del 95%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Ingredientes

Los resultados de los análisis microbiológicos realizados en los ingredientes para la formulación de las emulsiones se muestran en la Tabla 3. El aceite fue el único ingrediente en el que no se detectó crecimiento de ningún microorganismo. En el agua solo se evidenciaron aerobios mesófilos, mientras que en la maltodextrina se encontraron esporas y mohos y levaduras. La mazada fue el ingrediente con mayor recuento de esporas y de mohos y levaduras. Los recuentos de aerobios mesófilos en la mazada son atribuibles a la presencia de esporas. Los resultados de la mazada fueron comparados con los de Charris y Rois (2001) que indican que este producto puede contaminarse a su paso por los equipos con bacterias coliformes y levaduras. En el presente estudio no se detectaron coliformes ni en la mazada ni en ninguno de los ingredientes. Cabe destacar que en ninguna de las muestras analizadas en este estudio se detectaron colonias de *Escherichia coli*.

Tabla 3. Recuentos (Log UFC/ml o g, media±desviación estándar, n=3) de los ingredientes empleados en la elaboración de emulsiones.

Muestras	Aerobios mesófilos	Esporas	<i>E.coli</i> /coliformes	Mohos y levaduras
Agua	2,96±0,11	nd	nd	nd
Maltodextrina	nd	0,59±0,83	nd	1,09±1,54
Mazada	2,28±0,06	1,84±0,93	nd	1,93±2,73
Aceite C+G	nd	nd	nd	nd

C: chía; G: girasol; nd: no detectado, no se observaron colonias en ninguna de las placas.

3.2. Pre-emulsiones y emulsiones líquidas

En la Tabla 4 se muestran los recuentos de las pre-emulsiones y las emulsiones obtenidas por los distintos sistemas de homogeneización. La microfluidización no consiguió reducir los recuentos de aerobios mesófilos de la pre-emulsión. La homogeneización con ultrasonidos redujo ≈ 2 unidades logarítmicas. El tratamiento UHPH a 300 MPa consiguió una reducción por debajo del límite de detección del análisis (1 UFC/ml), es decir, no se observó crecimiento en ninguna de las placas sembradas (n=6). De manera similar, Cruz et al., 2007 y Polisel-Scopel et al. (2012) consiguieron reducciones de aerobios mesófilos por debajo del límite de detección en licuado de soja al aplicar un tratamiento de UHPH con condiciones de trabajo de 300 MPa y T^a de entrada de 40 °C y 55 °C, respectivamente.

Tabla 4. Recuentos (Log UFC/ml, media±desviación estándar, n=3) de aerobios mesófilos, esporas, *E. coli*/coliformes y mohos y levaduras de pre-emulsiones y emulsiones sin maltodextrina al día 0 de preparación de las emulsiones.

Tratamiento	Aerobios mesófilos	Esporas	<i>E. coli</i>/coliformes	Mohos y levaduras
PRE	4,32±0,83 ^a	0,94±0,04 ^a	3,37±0,81 ^a	2,73±0,87 ^a
E-MF	3,63±0,41 ^a	0,75±0,33 ^a	2,14±1,93 ^{ab}	1,73±1,58 ^{ab}
E-US	2,25±0,51 ^b	0,66±0,32 ^a	0,33±0,58 ^{bc}	nd
E-300	nd	0,13±0,23 ^b	nd	0,39±0,68 ^b

Las medias de una misma columna que no comparten superíndice son significativamente diferentes ($p < 0,05$). PRE, pre-emulsión; E-MF, microfluidización; E-US, Ultrasonido; E-300, UHPH a 300 MPa. nd: no detectado, no se observaron colonias en ninguna de las placas.

El único tratamiento de homogeneización con efecto significativo sobre los recuentos de esporas fue el de UHPH a 300 MPa, aunque la reducción conseguida fue inferior a 1 log. Cruz et al. (2007) consiguieron una reducción en el recuento de esporas ≈ 2 log con una presión de 300 MPa y una temperatura en la válvula de alta presión similar a la del presente trabajo pero no llegaron a disminuir el recuento por debajo del límite de detección. Los estudios a 300 MPa que logran recuentos de esporas inferiores al nivel de detección son aquellos que usan temperaturas de entrada superiores a 55 °C. La mayor temperatura de entrada del producto en el equipo UHPH permite alcanzar temperaturas en la válvula de alta presión superiores a 128 °C, lo que contribuye a la inactivación de las esporas (Poliseli-Scopel et al., 2012; Ferragut et al., 2014).

Con respecto a los recuentos de coliformes, la homogeneización por ultrasonidos y por UHPH a 300 MPa, causaron una reducción significativa de esta población. En las muestras tratadas por UHPH no se observó crecimiento de coliformes en ninguna de las placas sembradas. Estos tratamientos también causaron una reducción significativa de la población de mohos y levaduras aunque, en este caso, la ausencia total de crecimiento solo se observó en las emulsiones obtenidas por ultrasonidos.

En general, los resultados de las muestras obtenidas por ultrasonidos concuerdan con algunas de las observaciones de Feng et al. (2008) y Drakopoulou et al. (2009) que indican que las esporas bacterianas son mucho más resistentes a los ultrasonidos que las células vegetativas y que la resistencia de las bacterias Gram-positivas es mayor que la de las Gram-negativas. Porras et al. (2011) aplicaron ultrasonidos a 25 KHz durante 60 min a pulpa de mango

y observaron que los recuentos de aerobios mesófilos se redujeron en un 55% y los de mohos y levaduras, en un 62%, aplicando.

Los resultados de este trabajo, que indican que la microfluidización a 100 MPa no ha reducido significativamente los recuentos de ninguna de las poblaciones analizadas concuerdan con los resultados de otros autores. Feijoo et al. (1997) indica que en muestras de leche a 33 °C tratadas a 100 MPa solo se obtuvo una reducción de esporas del 26%. Bucci et al. (2018) no detectaron efecto de la microfluidización sobre los recuentos de aerobios mesófilos en leche homogeneizada a 42 °C y 75 MPa, mientras que a 125 MPa redujeron 1,3 log.

En el caso de las muestras líquidas sin maltodextrina, los recuentos microbiológicos de las pre-emulsiones y emulsiones se analizaron cada 7 días durante 28 días, a partir del día de su recepción. La figura 10 muestra la evolución a lo largo del tiempo de los recuentos de las cuatro poblaciones analizadas.

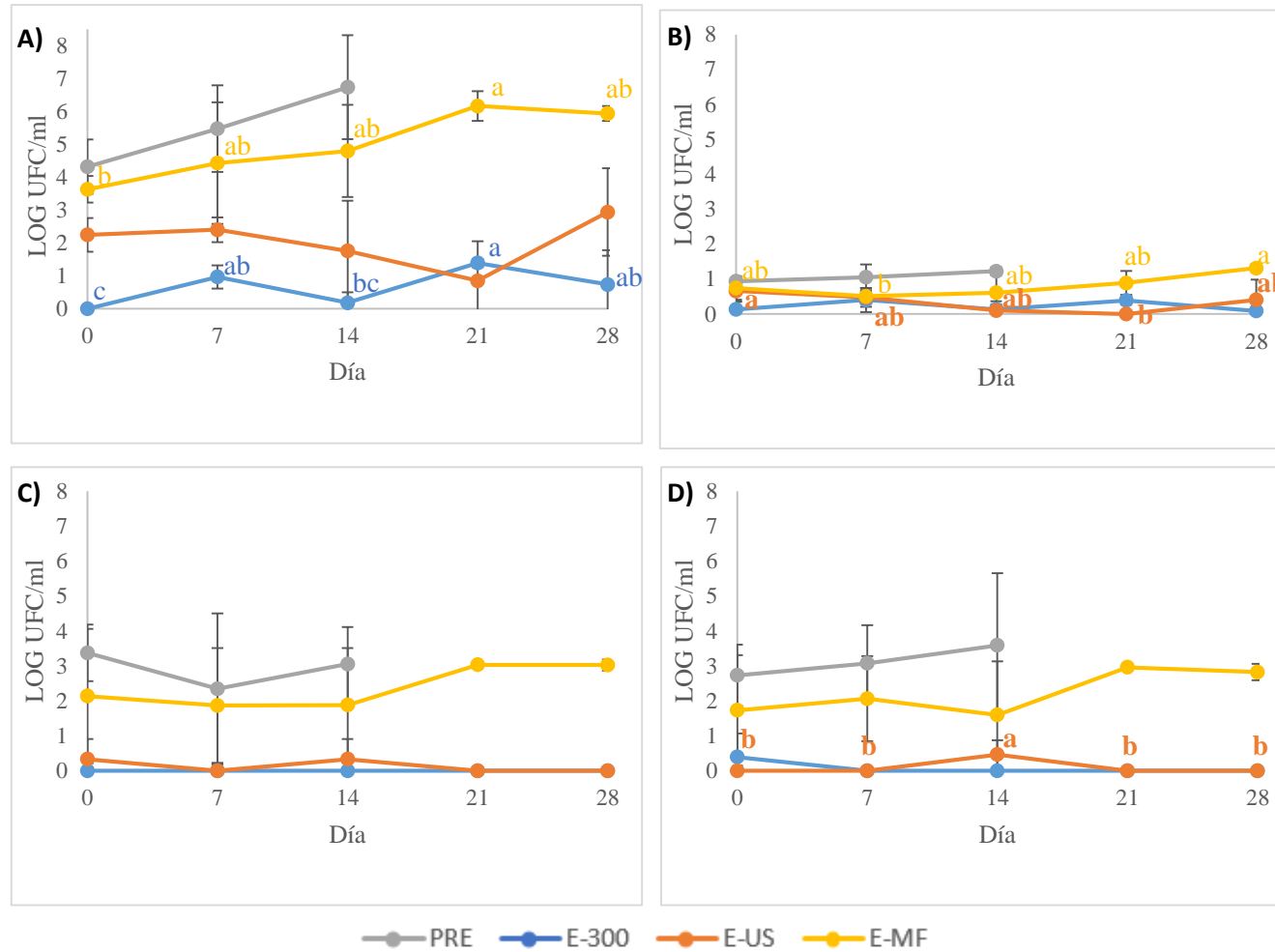


Figura 10. Evolución de los recuentos de aerobios mesófilos (A), esporas (B), *E. coli* /coliformes (C), mohos y levaduras (D) de las pre-emulsiones (PRE) y emulsiones obtenidas por UHPH a 300 MPa (E-300), ultrasonidos (E-US) y microfluidización (E-MF) durante 28 días a 4 °C. Las letras a, b, c, indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en distintos días de análisis. La ausencia de letras en una misma serie de datos indica la ausencia de diferencias significativas.

De forma general se puede observar que los recuentos de todas las poblaciones de las pre-emulsiones se mantuvieron más elevados a que los de las emulsiones. Cabe recalcar que las pre-emulsiones solo fueron analizadas hasta el día 14 ya que a los 14 días estaban desestabilizadas.

En las muestras homogeneizadas por microfluidización (E-MF), el recuento de aerobios mesófilos aumentó significativamente en el día 21 y se mantuvo hasta el día 28. No se produjo aumento significativo de esporas, ni coliformes y mohos y levaduras. Los recuentos de coliformes y mohos y levaduras se mantuvieron aproximadamente una unidad logarítmica por debajo de los de las pre-emulsiones. La evolución de las muestras E-MF confirma que la microfluidización es el tratamiento de homogeneización menos efectivo para estabilizar la leche desde el punto de vista microbiológico.

En las muestras homogeneizadas por ultrasonidos (E-US), los recuentos de todas las poblaciones se mantuvieron estables a lo largo del período de conservación a 4 °C. En el caso de coliformes y mohos y levaduras, se detectó alguna colonia puntualmente en la mayoría de las placas pero la mayoría de los recuentos se mantuvieron por debajo del límite de detección.

Las muestras homogeneizadas por UHPH (E-300) siguieron presentando los recuentos de aerobios mesófilos más bajos durante la conservación a 4 °C, a excepción del resultado a los 21 días, que sobrepasó el de la muestra E-US. A pesar de que a día 0 no había colonias en ninguna de las placas sembradas, a lo largo de la conservación sí se observaron recuentos en todas ellas, aunque muy bajos y que se mantuvieron estables. Este resultado podría indicar la presencia de células lesionadas por el tratamiento UHPH que necesiten un período de reparación para recuperar la capacidad de crecer en placa. Como en las muestras E-US, los recuentos de todas las poblaciones se mantuvieron estables a lo largo del período de conservación a 4 °C. En el caso de coliformes y mohos y levaduras, se detectó alguna colonia puntualmente en la mayoría de las placas pero la mayoría de los recuentos se mantuvieron por debajo del límite de detección. Los resultados de la evolución en conservación confirman que la homogeneización por UHPH a 300 MPa es más eficaz para alargar la vida útil de las emulsiones preparadas que el resto de tratamientos de homogeneización ensayados.

Todos estos resultados se confirman en un estudio de (Poliseli-Scopel et al., 2013) donde se realiza un seguimiento similar al del presente trabajo, los resultados obtenidos en este estudio van acorde a lo encontrado por observa que para tener una reducción o inactivación de

microorganismo efectiva es mejor aplicar un tratamiento UHPH con presión de 200 MPa en adelante el cual nos dará un producto de calidad y de mayor tiempo de vida útil por la estabilidad microbiológica que se produce.

3.3. Pre-emulsiones y emulsiones deshidratadas

En la figura 11 se muestran los recuentos de las distintas poblaciones de las pre-emulsiones y emulsiones líquidas que contenían maltodextrina y que se formularon para ser deshidratadas posteriormente.

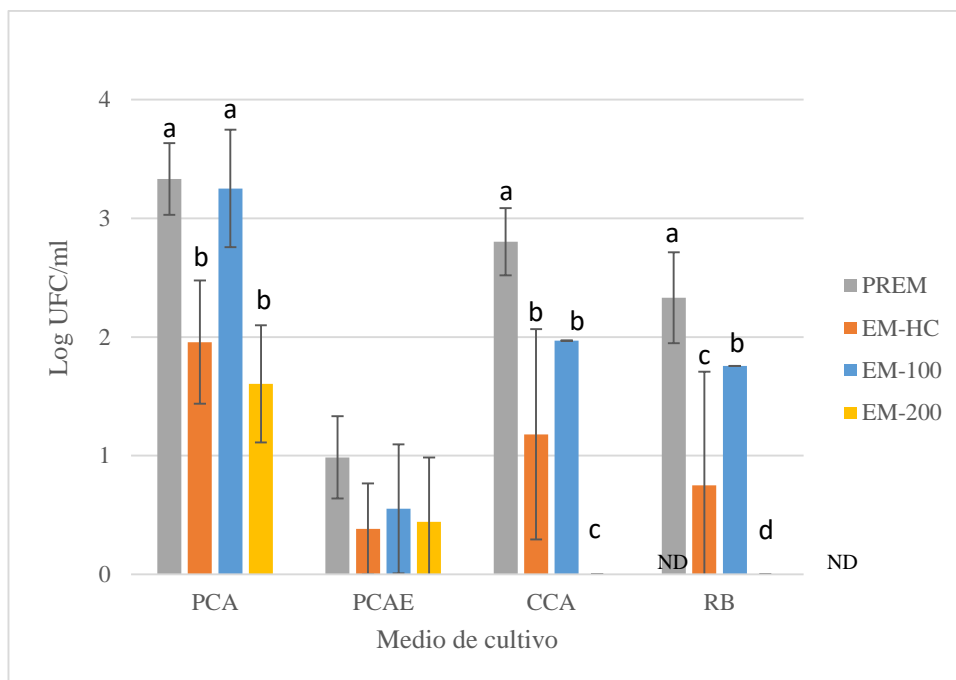


Figura 11. Recuentos de aerobios mesófilos (PCA), esporas (PCAE), *E. coli*/coliformes (CCA), mohos y levaduras (RB) de las pre-emulsiones (PREM) y emulsiones líquidas obtenidas por homogeneización convencional (EM-HC), UHPH a 100 MPa (EM-100) y 200 MPa (EM-200) en el día 0 de preparación de las emulsiones. Las letras a, b, c, indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en distintos días de análisis. La ausencia de letras en una misma serie de datos indica la ausencia de diferencias significativas.

Los tratamientos de homogeneización que redujeron el recuento de microorganismos aerobios mesófilos son la UHPH a 200 MPa y la homogeneización convencional, aunque en el caso de la homogeneización convencional, la disminución del recuento únicamente puede atribuirse al tratamiento de pasteurización que la acompaña. Bucci et al. (2018) no observaron disminución de la carga microbiana de la leche después de un tratamiento de homogeneización convencional de 2 etapas.

Ninguno de los tratamientos de homogeneización aplicados a las pre-emulsiones con maltodextrina (PREM) tuvo efecto sobre las esporas. Pereda et al. (2007) observaron resultados similares utilizando las mismas condiciones de tratamiento de HC y UHPH a 200 MPa. En cambio, todos los tratamientos redujeron significativamente la población de coliformes y mohos y levaduras. Al aplicar la homogeneización UHPH a 200 MPa se consiguieron recuentos inferiores al límite de detección en ambas poblaciones.

La figura 12 muestra los recuentos de las emulsiones anteriores una vez deshidratadas por atomización a 150 °C. No se observaron diferencias significativas entre los recuentos de aerobios mesófilos y esporas de distintos tratamientos. Este resultado es esperable porque la deshidratación a 150 °C causó un efecto similar sobre estas poblaciones, independientemente del recuento previo en las emulsiones líquidas. Lo mismo debería haber ocurrido con los coliformes y la población de mohos y levaduras, pero en algunas muestras hubo crecimiento que puede atribuirse a una contaminación posterior.

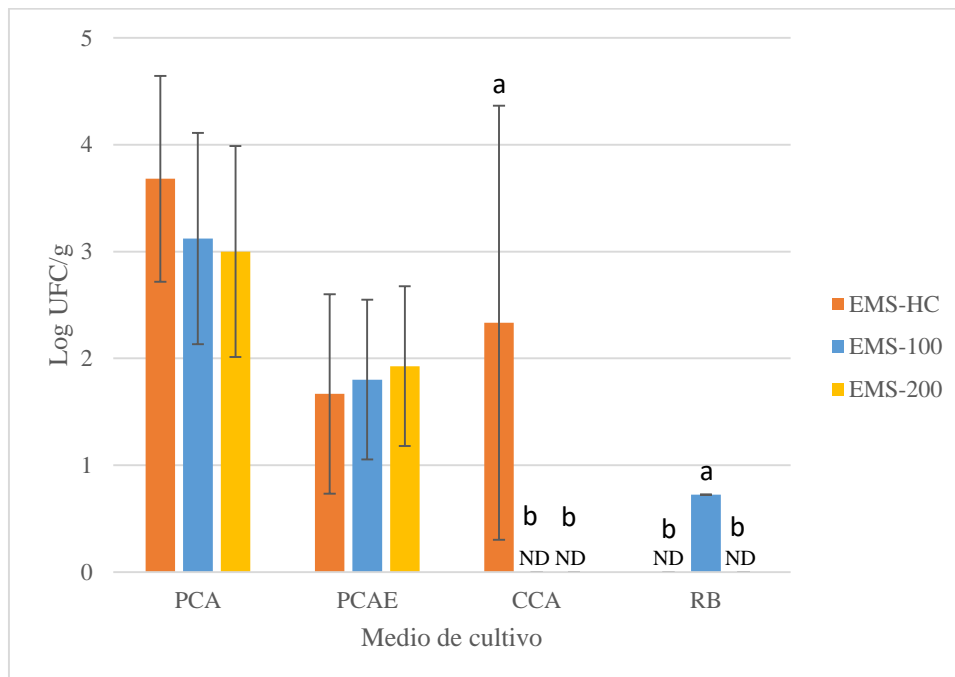


Figura 12. Recuentos de aerobios mesófilos (PCA), esporas (PCAE), *E. coli* /coliformes (CCA), mohos y levaduras (RB) de las emulsiones deshidratadas procedentes de las emulsiones líquidas con maltodextrina obtenidas por homogeneización convencional (EMS-HC), UHPH a 100 MPa (EMS-100) y 200 MPa (EMS-200) en el día 0 de preparación de las emulsiones. Las letras a, b, c, indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en distintos días de análisis. La ausencia de letras en una misma serie de datos indica la ausencia de diferencias significativas.

Si se comparan los resultados de las muestras líquidas con los de las deshidratadas puede observarse que, efectivamente, el tratamiento de deshidratación causó una reducción de coliformes y mohos y levaduras. Por el contrario, los recuentos de aerobios mesófilos y esporas son más elevados en las muestras deshidratadas. Esto se puede atribuir, principalmente, a la concentración que sufrieron las muestras, que pasaron de contener un contenido de agua del 53% al $\approx 2,8\%$, por lo que los microorganismos termorresistentes, que no se inactivaron durante el proceso de secado, quedaron concentrados en las muestras deshidratadas.

CONCLUSIONES

Para la obtención de emulsiones líquidas a base de mazada, agua y aceite, el tratamiento de homogeneización más efectivo para reducir la carga microbiana inicial de las pre-emulsiones es la homogeneización por UHPH a 300 MPa, seguido por la homogeneización por ultrasonidos. Ambos tratamientos causaron una disminución significativa de las poblaciones de aerobios mesófilos, coliformes y mohos y levaduras que no aumentó durante los 28 días de conservación de las emulsiones a 4 °C. La homogeneización por microfluidización no causó una reducción significativa de la carga microbiana inicial.

Para la obtención de emulsiones líquidas a base de mazada, maltodextrina, agua y aceite, el tratamiento de homogeneización por UHPH a 200 MPa causó un efecto similar en la reducción microbiana al tratamiento de pasteurización que acompañaba a la homogeneización convencional. La homogeneización por UHPH a 100 MPa solo consiguió una ligera disminución de los recuentos de coliformes y de mohos y levaduras. Cuando se aplicó la atomización para deshidratar las emulsiones, se concentraron los microorganismos termorresistentes, dando lugar a unos recuentos de aerobios mesófilos y esporas superiores a los de las muestra líquidas.

BIBLIOGRAFÍA

- Addo, C. N., Ferragut, V. (2015). Evaluating the Ultra-High Pressure Homogenization (UHPH) and pasteurization effects on the quality and shelf life of donkey milk. *International Journal of Food Studies*, 4(1), 104–115.
- Bilek, S. E., & Turantaş, F. (2013). Decontamination efficiency of high power ultrasound in the fruit and vegetable industry, a review. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 155–162.
- Bucci, A.J., Van Hekken, D.L., Tunick, M.H., Renye, J.A., Tomasula, P.M. (2018). The effects of microfluidization on the physical, microbial, chemical, and coagulation properties of milk. *J. Dairy Sci.* 101, 6990–7001.
- Carlucci, A. M., Cicconi Vidal, M., Bregni, C. (2004). Las microemulsiones como vehículos para administración de drogas. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 23(4), 550–557.
- Charris, M., Rois, R. (2001). *Elaboración De Una Bebida Lactea Fermentada Y Saborizada A Partir Del Suero Obtenido Como Subproducto De La Fabricación De Mantequilla* (Vol. 24).
- Codina, I. (2014). *Optimización del proceso de elaboración y aplicación de la homogenización a ultra alta presión como tecnología de conservación de licuado de chufa*. Tesis doctoral. UAB, Espana.
- Comuzzo, P., Calligaris, S. (2019). Potential Applications of High Pressure Homogenization in Winemaking: A Review. *Beverages*, 5(3), 56.
- Cruz, N., Capellas, M., Hernández, M., Trujillo, A. J., Guamis, B., Ferragut, V. (2007). Ultra high pressure homogenization of soymilk: Microbiological, physicochemical and microstructural characteristics. *Food Research International*, 40(6), 725–732.
- Donsì, F., Ferrari, G., Maresca, P. (2009). High-Pressure Homogenization for Food Sanitization. In *Global Issues in Food Science and Technology*.
- Drakopoullou, S., Terzakis, S., Fountoulakis, M.S. (2009) Ultrasound-induced inactivation of gram-negative and gram-positive bacteria in secondary treatment municipal water. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16:629– 634.
- Feijoo, S. C., Hayes, W. W., Watson, C. E., Martin, J. H. (1997). Effects of Microfluidizer®

- Technology on *Bacillus licheniformis* Spores in Ice Cream Mix. *Journal of Dairy Science*, 80(9), 2184–2187.
- Feng, H., Yang, W., Hielscher, T. (2008) Power ultrasound. *Food Science and Technology International*, 14 (5): 433.
- 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.
- Fernández, C. (2016). Stability assessment of emulsions treated by ultra-high pressure homogenization and their incorporation in a uht milk-based product for delivery of conjugated linoleic acid. *TDX (Tesis Doctorals En Xarxa)*, 190.
- Floury, J., Desrumaux, A., Lardières, J. (2000). Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1(2), 127–134.
- Gómez, A. G. (2014). *Formulación y caracterización de nano_emulsiones de aceite de parafina tipo agua_en_aceite*. 84.
- González, G. E. (2016). *Elaboración de emulsiones de aceite en agua a partir de aceites vegetales y esenciales mediante homogeneización a ultra alta presión*.
- Hebishy, E., Buffa, M., Guamis, B., Blasco-Moreno, A., Trujillo, A. J. (2015). Physical and oxidative stability of whey protein oil-in-water emulsions produced by conventional and ultra high-pressure homogenization: Effects of pressure and protein concentration on emulsion characteristics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 32, 79–90.
- Hebishy, E., Buffa, M., Guamis, B., Trujillo, A. J. (2013). Stability of sub-micron oil-in-water emulsions produced by ultra high pressure homogenization and sodium caseinate as emulsifier. *Chemical Engineering Transactions*, 32, 1813–1818.
- Joubran, R. F., Cornell, D. G., Parris, N. (1993). Microemulsions of triglyceride and non-ionic surfactant - effect of temperature and aqueous phase composition. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 80(2–3), 153–160.
- Kabalnov. (1998). Coalescence in Emulsions. In B. P. Binks (Ed.), *Modern aspects of emulsion science* (pp. 202–229). Cambridge.

- Kaci, M., Arab-Tehrany, E., Desjardins, I., Banon-Desobry, S., Desobry, S. (2017). Emulsifier free emulsion: Comparative study between a new high frequency ultrasound process and standard emulsification processes. *Journal of Food Engineering*, 194(January 2019), 109–118.
- Lendínez, M. C. (2015). Estudio de emulsiones altamente concentradas de tipo W/O: relación entre tamaño de gota y propiedades. *TDX (Tesis Doctorals En Xarxa)*.
- Mahdi, S., He, Y., Bhandari, B. (2006). Nano-emulsion production by sonication and microfluidization - A comparison. *International Journal of Food Properties*, 9(3), 475–485.
- Martínez, M. (2014). *Formación y caracterización de emulsiones altamente concentradas de betún en agua*. 1 recurs electrònic (297).
- Mayta-Hanco, J., Trujillo, A.-J., Juan, B. (2020). La homogeneización a ultra-alta presión (UHPH): Efectos en la leche y aplicaciones en la fabricación de quesos. *Rev Inv Vet Perú*, 31(2), 1–14.
- McClements, D. J. (2005). Principles, Practicies, and Techniques. In *Food Emulsions* (Vol. 2).
- McClements, D. J. (2007). Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(7), 611–649.
- Mehling, T., Ingram, T., Storm, S., Bobe, U., Liu, F., Michel, M., Smirnova, I. (2013). Estimation of LPC/water partition coefficients using molecular modeling and micellar liquid chromatography. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 431, 105–113.
- Nguyen, N. H., Anema, S. G. (2010). Effect of ultrasonication on the properties of skim milk used in the formation of acid gels. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(4), 616–622.
- Patrignani, F., Lanciotti, R. (2016). Applications of high and ultra high pressure homogenization for food safety. *Frontiers in Microbiology*, 7(August), 1–13.
- Patrignani, F., Siroli, L., Serrazanetti, D. I., Gardini, F., Lanciotti, R. (2015). Innovative strategies based on the use of essential oils and their components to improve safety, shelf-life and quality of minimally processed fruits and vegetables. *Trends in Food Science and*

Technology, 46(2), 311–319.

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.

Pereda, J., Jaramillo, D. P., Quevedo, J. M., Ferragut, V., Guamis, B., Trujillo, A. J. (2008). Characterization of volatile compounds in ultra-high-pressure homogenized milk. *International Dairy Journal*, 18(8), 826–834.

Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., Trujillo, A. J. (2008). Effects of ultra-high-pressure homogenization treatment on the lipolysis and lipid oxidation of milk during refrigerated storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7125–7130.

Picart, L., Thiebaud, M., René, M., Guiraud, J. P., Cheftel, J. C., Dumay, E. (2006). Effects of high pressure homogenisation of raw bovine milk on alkaline phosphatase and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal treatments. *Journal of Dairy Research*, 73(4), 454–463.

Poliseli-Scopel, F. H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., Ferragut, V. (2013). Characteristics of soymilk pasteurized by ultra high pressure homogenization (UHPH). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20, 73–80.

Poliseli-Scopel, F. H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., Ferragut, V. (2014). Sterilization and aseptic packaging of soymilk treated by ultra high pressure homogenization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 22, 81–88.

Porras, O., González, G., Castellanos, A., Ballesteros, J., Pacheco, M. (2011). Efecto de la aplicación de ondas de ultrasonido sobre las propiedades fisicoquímicas, reológicas y microbiológicas de pulpa de mango (*Mangifera indica* L.) variedad común. *Alimentos Hoy*, 20(23), 52–77.

Robles Ozuna, L. ., Ochoa-Martínez, L. A. (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 13(2), 109–122.

Sajjadi, S., Zerfa, M., Brooks, B. W. (2002). Dynamic behaviour of drops in oil/water/oil dispersions. *Chemical Engineering Science*, 57(4), 663–675.

- Salager, J. L., Minana, M., Anderez, J. M., Grosso, J. L., Rojas, C. I., Layrisse, I. (1983). Surfactant-oil-water systems near the affinity inversion part II: Viscosity of emulsified systems. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 4(2), 161–173.
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J. P., Cheftel, J. C. (2003). High-pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, 13(6), 427–439.
- Valencia, D. C. (2015). Aplicación de la ultra alta presión de homogenización (UHPH) en la elaboración de licuados vegetales de almendra de alta calidad. *TDX (Tesis Doctorals En Xarxa)*, 162.
- Wilbey, R. A. (2011). Homogenization of Milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 1346–1349.
- Zhao, L., Wang, Y., Wang, S., Li, H., Huang, W., Liao, X. (2014). Inactivation of naturally occurring microbiota in cucumber juice by pressure treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 12–18.