

## Facultat de Veterinària Departament de Ciència Animal i dels Aliments

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

# ESTABILIDAD OXIDATIVA DE EMULSIONES O/W FORMULADAS CON MAZADA Y ACEITES VEGETALES OBTENIDAS POR DIFERENTES MÉTODOS DE HOMOGENEIZACIÓN

MARÍA CAROLINA VARELA ANDRÉS

#### Directores:

Dr. Antonio José Trujillo Mesa / Dra. Victoria Ferragut Pérez



Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 18 de noviembre de 2020

Declaro ser autor 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.

Bellaterra, 18 de noviembre de 2020.

Antonio José Trujillo Mesa y Victoria Ferragut Pérez, Catedráticos de Universidad en el Área de Tecnología de los Alimentos del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona,

#### **INFORMAN**

Que el trabajo titulado: "Estabilidad oxidativa de emulsiones O/W formuladas con mazada y aceites vegetales obtenidas por diferentes métodos de homogeneización" ha sido realizado bajo nuestra supervisión y tutela por MARÍA CAROLINA VARELA ANDRÉS dentro del módulo Trabajo Fin de Máster en Calidad de Alimentos de Origen Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Así mismo, se informa que este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Gobierno de España), a través del proyecto AGL2017-83331-R.

Bellaterra, 18 de noviembre de 2020.

#### **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo significa la culminación de un proceso de aprendizaje y desarrollo profesional. A lo largo del mismo he recibido la ayuda y confianza de muchas personas, sin las cuales no podría haber llevado a cabo este trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutores, Antonio José Trujillo Mesa y Victoria Ferragut Pérez por hacerme parte del proyecto y por su constante apoyo y enseñanzas.

Al ICN2 por facilitarme el uso de sus instalaciones, especialmente a Mary Cano que siempre estuvo disponible para guiarme y ayudarme en el uso de las herramientas.

A Belén Pérez por su amabilidad y excelente voluntad, imprescindibles para culminar este trabajo.

A Libni que ha estado constantemente a mi lado apoyándome como profesional y amiga.

Finalmente, a Fede por acompañarme durante todo el proceso y a mi familia por su sostén incondicional a pesar de la distancia.

#### LISTA DE ABREVIATURAS

AG Ácidos grasos

**ANOVA** Análisis de varianza

**a**<sub>w</sub> Actividad del agua

**CH** Homogeneización convencional

**EDTA** Ácido etilendiaminotetraacético

**HPLC** Cromatografía líquida de alta eficacia

M Molar

MFGM Membrana del glóbulo graso de la leche

MPa Megapascales

O/W Aceite en agua

O/W/O Aceite en agua en aceite

p/p Peso/Peso

**ppb** Partes por billón

p/v Peso/Volumen

**rpm** Revoluciones por minuto

**SEM** Microscopía electrónica de barrido

**TBA** Ácido tiobarbitúrico

TCA Ácido tricloracético

**UHPH** Homogeneización a ultra alta presión

v/v Volumen/Volumen

W/O/W Agua en aceite en agua

ω-3 Omega 3

**ω-6** Omega 6

#### TABLA DE CONTENIDO

R	ESUN	IEN.		1	
A	BSTR	ACT	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	2	
1	IN'	TRO	DUCCIÓN	3	
2	M	ATEI	RIALES Y MÉTODOS	7	
	2.1	Ma	teriales	7	
	2.2	For	mulación y producción de las emulsiones	8	
	2.2	2.1	Emulsiones líquidas	8	
	2.2	2.2	Emulsiones sólidas	8	
	2.3	Det	erminación de la actividad de agua de las emulsiones sólidas	9	
	2.4	Mic	croscopía electrónica de barrido (SEM) para la determinación de la morfología	de	
	las pa	las partículas de las emulsiones sólidas			
	2.5	Det	erminación de la oxidación lipídica de las emulsiones líquidas y sólidas	10	
	2.5	5.1	Oxidación primaria	10	
	2.5	5.2	Oxidación secundaria	10	
	2.6	Tra	tamiento estadístico	11	
3	RE	ESUL	TADOS Y DISCUSIÓN	11	
	3.1	Act	ividad de agua de las emulsiones sólidas	11	
	3.2	Mo	rfología de las partículas de las emulsiones sólidas	12	
	3.3	Eva	luación de la oxidación lipídica de las emulsiones	14	
	3.3	3.1	Emulsiones líquidas	14	
	3.3	3.2	Emulsiones sólidas	17	
4	CC	ONCI	LUSIONES	24	
5	DE	EED	ENCLAS RIBLIOCRÁFICAS	25	

#### **RESUMEN**

En este estudio se investigó la estabilidad oxidativa de dos grupos de emulsiones: las primeras, para ser utilizadas en forma líquida, y las segundas formuladas adecuadamente para su posterior secado. Las primeras fueron obtenidas por homogeneización convencional (CH) a 30 MPa y por homogeneización a ultra altas presiones (UHPH) a 100, 200 y 300 MPa, elaboradas con una mezcla (50:50) de aceites de chía (*Salvia hispánica* L.) y girasol (*Helianthus annuus* L.) (10%), y mazada (5 y 7%) como agente emulgente. En el segundo grupo de emulsiones (secas), además de la estabilidad oxidativa, se determinó la actividad de agua y la morfología de los productos en polvo, los cuales se obtuvieron por atomización a partir de emulsiones líquidas tratadas por CH a 30 MPa y por UHPH a 100 y 200 MPa, elaboradas con 10% de aceites en la misma proporción que las anteriores e incluyendo 30% de maltodextrina y cantidades variables de mazada (4, 5, 6 y 7%) como agente emulgente.

Los resultados mostraron que las emulsiones sólidas obtenidas a través del método de secado por atomización presentaron niveles de a<sub>w</sub> acordes a los de alimentos en polvo, con una morfología de microcápsulas con aspecto más o menos rugoso y presencia de algunas depresiones superficiales. También se constató que el tratamiento de secado tuvo efecto en los niveles de oxidación de las emulsiones. En cuanto a la estabilidad oxidativa, se observó que, tanto en las emulsiones sólidas como en las líquidas, el tiempo de almacenamiento a 50 °C y el porcentaje de mazada influyeron en los niveles de oxidación, en general aumentando con el paso del tiempo y disminuyendo conforme aumentó el porcentaje de mazada. Los diferentes métodos y presiones de homogeneización afectaron de forma diferente a la estabilidad oxidativa según se tratara de las emulsiones sólidas o líquidas. Las emulsiones sólidas presentaron mejor estabilidad oxidativa cuando se obtuvieron por UHPH a 100 MPa, y las emulsiones líquidas cuando se trataron por CH a 30 MPa y por UHPH a 200 MPa.

**Palabras clave:** emulsión O/W, mazada, homogeneización convencional, UHPH, secado por atomización, estabilidad oxidativa.

#### **ABSTRACT**

In this study, the oxidative stability of two groups of emulsions was investigated: the first, to be used in liquid form, and the second properly formulated for subsequent drying. The former were obtained by conventional homogenization (CH) at 30 MPa and by ultra-high pressure homogenization (UHPH) at 100, 200 and 300 MPa, made with a mixture (50:50) of chia (*Salvia hispánica* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) oils (10%), and buttermilk (5 and 7%) as emulsifying agent. In the second group of emulsions (dry), in addition to oxidative stability, the water activity and the morphology were determined on the powdered products, which were obtained from liquid emulsions treated with CH at 30 MPa and with UHPH at 100 and 200 MPa, made with 10% oils in the same proportion than the previous ones and including 30% of maltodextrin and variable amounts of buttermilk (4, 5, 6 and 7%) as emulsifying agent.

The results showed that the solid emulsions obtained through the spray drying method presented  $a_w$  levels consistent with those of powdered foods, with a morphology of microcapsules with a more or less rough appearance and the presence of some surface depressions. It was also found that the drying treatment had an effect on the oxidation levels of the emulsions. Regarding oxidative stability, it was observed that, both in solid and liquid emulsions, the storage time at 50 °C and the percentage of buttermilk influenced the oxidation levels, in general increasing over time and decreasing as the percentage of buttermilk increased. The different homogenization methods and pressures affected oxidative stability differently depending on whether they were solid or liquid emulsions. Solid emulsions showed better oxidative stability when obtained with UHPH at 100 MPa, and liquid emulsions when treated with CH at 30 MPa and with UHPH at 200 MPa.

**Keywords:** O/W emulsion, buttermilk, conventional homogenization, UHPH, spray drying, oxidative stability.

#### 1 INTRODUCCIÓN

El avance en el estudio de nuevas formulaciones para realizar emulsiones es importante ya que son numerosos los alimentos que, de manera natural o elaborados, se consideran total o parcialmente emulsiones. Además, son muchos los usos que se le pueden dar a las emulsiones, uno de ellos es como sistema de liberación de ingredientes con propiedades bioactivas (Velikov y Pelan 2008; McClements 2015).

Una emulsión es una dispersión de un líquido (fase dispersa) en una segunda fase líquida o fase continua. Estos dos líquidos son en principio inmiscibles entre ellos, pero mediante el uso de un emulsionante (también llamado emulgente) y un sistema de homogeneización, se forma una mezcla más o menos homogénea denominada emulsión (McClements 2005).

Las emulsiones se pueden clasificar según el tamaño de las gotas de la fase dispersa, que generalmente se encuentran entre 0,1 y 100 µm y se distinguen 3 grupos: macroemulsiones (1-100 µm), nanoemulsiones (20-500 nm) y microemulsiones (<100 nm) (Fernández Arteaga 2006). A su vez, dependiendo de cómo se distribuya la fase dispersa y la fase continua también se clasifican en sistemas simples como las emulsiones aceite en agua (O/W) o agua en aceite (W/O), y en sistemas múltiples como las emulsiones agua en aceite en agua (W/O/W) o aceite en agua en aceite (O/W/O) (McClements 2007; Kosegarten-Conde y Jiménez-Munguía 2012). Las emulsiones alimentarias son termodinámicamente inestables y por ello es imprescindible obtenerlas a partir de una formulación adecuada para lograr un producto que no sufra fenómenos de inestabilidad física como la floculación, coalescencia, cremado, etc. a lo largo del tiempo. Los emulgentes y los sistemas de emulsificación tienen un papel primordial para lograr que una emulsión sea estable (Dickinson 2010).

Los emulgentes son moléculas anfifílicas que reducen la tensión interfacial entre la fase apolar (oleosa) y la polar (acuosa) cuando se adsorben en la superficie de las gotas, formando una membrana protectora que previene que las gotas se acerquen lo suficiente como para que se vuelvan a unir. Los surfactantes de bajo peso molecular (tensioactivos, lípidos polares y glicolípidos) y las proteínas (Muñoz et al. 2007), son los emulgentes más utilizados en la industria alimentaria (O'Kennedy 2009).

Si bien los caseinatos y las proteínas del suero de la leche son los emulgentes más comúnmente empleados en las emulsiones O/W (O'Kennedy 2009), también hay que considerar productos muy prometedores fuera de las opciones convencionales. Este es el caso de la mazada que es el subproducto de la fabricación de la mantequilla (Guggisberg et al. 2012). Augustin et al (2015) demostraron que la mazada tiene mejores propiedades para microencapsular y liberar bioactivos como los ácidos ω-3 que la leche desnatada.

Durante la producción de la mantequilla se pierden, junto con la fase acuosa, las membranas de los glóbulos grasos que se agregaron para formar la mantequilla y el resto de materiales solubles presentes en la nata. Esta fase acuosa es el subproducto de la mantequería y se denomina mazada o suero de mantequería (Corredig et al. 2003).

La mazada es similar a la leche desnatada en diferentes aspectos. Por ejemplo, más del 80% de sus proteínas corresponden a las principales proteínas de la leche (caseínas y proteínas de suero). Sin embargo, su composición de grasa difiere mucho en cantidad y en composición con la de la leche desnatada. Esto es debido a la presencia de componentes derivados de la membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM) (He et al. 2017).

La MFGM se origina de las células epiteliales de la glándula mamaria para encapsular la grasa láctea. Está compuesta por lípidos (predominantemente polares), colesterol y proteínas específicas, y es responsable de darle valor funcional a la mazada (He et al. 2017; Lopez et al. 2019). La mayoría de estas proteínas son glicoproteínas y el 30% de los lípidos son fosfolípidos como la esfingomielina, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (Mather 2000), componentes a los que se atribuyen efectos beneficiosos para la salud como el poder reductor de la colesterolemia, la inhibición del crecimiento de células cancerosas, la mejora del desarrollo cerebral y la función cognitiva de los infantes, y propiedades antibacterianas y antivirales (Spitsberg 2005; He et al. 2017; Lopez et al. 2019). De esta forma, si se formula una emulsión con la mazada como agente emulgente para encapsular una fase dispersa con componentes bioactivos, se obtendrá un producto con innumerables ventajas para la salud humana.

En una emulsión O/W la fase dispersa está compuesta por aceite o grasa de origen vegetal o animal (McClements 2007). Existen tres tipos de ácidos grasos (monoinsaturados, poliinsaturados y saturados) y se considera que un aceite o grasa presenta beneficios para la salud humana cuando los ácidos grasos que contiene son mayormente de tipo insaturados. Dicha proporción, a pesar de la creencia popular, no está dada por el origen de la grasa (animal o vegetal). Los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados son los que inciden en un mejor desarrollo cerebral fetal del recién nacido, en la reducción de la concentración de triglicéridos en la sangre, en el control de algunas enfermedades como la diabetes mellitus y la obesidad, etc. (Rodríguez-Cruz et al. 2005). Existen aceites vegetales con una gran proporción de ácidos grasos insaturados, por ejemplo, el aceite de chía que presenta altos niveles de ácido  $\alpha$ -linolénico ( $\omega$ -3) (Capitani 2013) y el aceite de girasol que contiene 65% aproximadamente de ácido linoleico ( $\omega$ -6) (Guiotto 2014).

Si bien las emulsiones son buenos sistemas para la protección y liberación de componentes bioactivos, la contrapartida de formular emulsiones con aceites ricos en ácidos grasos

insaturados es que, según sus características, pueden ser susceptibles a la oxidación (Augustin et al. 2015; Julio et al. 2015).

La oxidación lipídica puede suceder por catálisis enzimática o no enzimática y se desarrolla en 3 etapas: iniciación, propagación y finalización. Durante estas etapas se forman productos como los hidroperóxidos, que son inodoros e insípidos y funcionan como marcadores de la oxidación primaria. A su vez, estos hidroperóxidos con el paso del tiempo se transforman en compuestos de oxidación secundaria con fuertes olores y sabores (p.e. malondialdehído) (Papastergiadis et al. 2012; Berton-Carabin et al. 2014).

La oxidación lipídica no solo altera la calidad sensorial (rancidez) y nutricional de la emulsión, sino que también produce reactivos tóxicos, por ejemplo, el malondialdehído, que hace que el alimento pueda ser peligroso para sus consumidores (Villière et al. 2007; Jacobsen 2016). Algunos de los factores que determinan la estabilidad oxidativa de una emulsión son: su composición y cantidad de los ingredientes que la forman (agua, emulgente y aceite), las condiciones de procesado (homogeneización), el tamaño y carga de la superficie de la partícula grasa (interfase), la presencia de antioxidantes y viscosidad de la emulsión (Hu et al. 2003; Waraho et al. 2011; Jacobsen 2016).

Kumar et al. (2020) estudiaron la estabilidad a la oxidación del aceite de lino (4 y 12%), fuente de ácidos grasos ω-3, encapsulado con sólidos de la mazada obteniendo emulsiones o/w por homogeneización convencional (17,5 y 3,5 MPa en primera y segunda etapa, respectivamente a 60 °C) física y oxidativamente estables, sobre todo cuando se utilizó la mazada de forma concentrada.

Conforme a lo que describen varios autores el secado es un excelente método de conservación de las emulsiones (Carneiro et al. 2013; Sarkar et al. 2016; Sanchez-Reinoso y Gutiérrez 2017). Con el secado de las emulsiones se logra aumentar la protección de los componentes bioactivos de las emulsiones (microencapsular) al mismo tiempo que se obtiene un producto más estable desde el punto de vista oxidativo y microbiológico. Además, el producto final obtenido tiene ventajas en cuanto al transporte, almacenamiento y manipulación en comparación a las emulsiones líquidas. El método de secado por atomización es la tecnología de secado más utilizada en el sector alimentario por su amplia disponibilidad en el mercado, versatilidad y bajo costo. Asimismo, esta tecnología es apta para secar componentes termosensibles como los ácidos grasos insaturados ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es corto (Gharsallaoui et al. 2007; Legako y Dunford 2010; Nedovic et al. 2011; Encina et al. 2016).

aspersión presentaron cápsulas con buen aspecto morfológico, una mejor estabilidad oxidativa que los aceites sin encapsular, y un producto en polvo con actividad de agua lo suficientemente baja como para poder conservarse durante largos periodos de tiempo.

Para secar emulsiones O/W se tienen que añadir a la formulación líquida, además del emulgente, otros constituyentes que formen parte de la pared de las partículas. La adición de estos componentes (p.e. maltodextrina), se hace para retardar la difusión de oxígeno y mejorar la estabilidad oxidativa del producto final en polvo (Ubbink y Krüger 2006). Zhang et al. (2020) evidenciaron con emulsiones secas, que cuando se encapsulan aceites ricos en ω-3 con mazada y combinaciones de mazada y maltodextrina se obtienen menores cantidades de productos de la oxidación en comparación con los aceites sin encapsular.

Según el tipo y las condiciones de emulsificación que se utilicen, las emulsiones producidas presentan diferentes comportamientos en cuanto a la oxidación. Existen diversas tecnologías capaces de formar una emulsión, siendo los sistemas de homogeneización que utilizan la presión los más utilizados en la industria alimentaria (Zamora y Guamis 2015). Existen tres tipos de homogeneizadores, los que funcionan a baja (≤50 MPa), a alta (50-150 MPa) y a ultra alta presión (UHPH, 150-400 MPa) (Trujillo et al. 2021). Las emulsiones en estos tipos de sistemas se forman gracias a que el fluido se somete a una gran fuerza (presión) que hace que se produzcan fenómenos de fricción, compresión, aceleramiento y cizallamiento que rompen las partículas de grasa (Dumay et al. 2013). La diferencia de presión en los homogeneizadores resulta en emulsiones con tamaños de partículas menores y mayor estabilidad física cuando se utiliza un sistema de alta o ultra alta presión (Hebishy et al. 2017).

Hebishy et al. (2015 y 2017) mostraron que emulsiones O/W elaboradas con aislados proteicos de origen lácteo (proteínas de suero lácteo y caseinato Na) utilizando un equipo de alta y ultra alta presión presentaron mayor estabilidad física y oxidativa que las emulsiones producidas con sistemas de homogeneización convencional (CH) a bajas presiones. Este fenómeno lo explicaron por el hecho de que las emulsiones tratadas a alta y ultra alta presión presentaron un tamaño de partícula mucho menor y un incremento de material proteico en la interfase aceiteagua creando una capa interfacial rígida y gruesa evitando que los metales de transición en la fase continua se acerquen a las gotas de aceite, lo que impide la oxidación de los lípidos durante el almacenamiento.

La hipótesis de este trabajo se basa en que es conocido que la UHPH tiene la capacidad de formar emulsiones significativamente más finas y estables que la CH y que tiene un alto potencial para crear buenas cubiertas de protección de las gotas dispersas donde se alojan componentes bioactivos, tales como aceites vegetales ω-3. Asimismo, la UHPH da lugar a una

capa de protección de las gotas con una estructura diferente a la obtenida de forma convencional, por lo que dicha estructuración puede conducir a sistemas de protección y liberación de componentes bioactivos con mejor funcionalidad como la protección frente a la oxidación y digestibilidad, facilitando así la liberación de componentes de interés.

Si bien existen trabajos que han estudiado la estabilidad oxidativa de emulsiones realizadas con mazada y aceites ricos en ácidos grasos insaturados, no existen trabajos dónde se investigue dicho aspecto en emulsiones obtenidas a altas y ultra altas presiones. De esta manera, el objetivo general de este trabajo ha sido evaluar la estabilidad oxidativa de emulsiones O/W en estado líquido y sólido, formuladas con mazada y diferentes tratamientos de homogeneización incluyendo la UHPH, a través de la cuantificación de los productos de la oxidación, tanto primarios como secundarios.

#### 2 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Materiales

La mazada en polvo (MAZADA 1%AD) se obtuvo de RENY PICOT-ILAS, S.A (Anleo-Navia, Asturias), quienes proporcionaron las siguientes especificaciones sobre su composición: Grasa 6-12%; Proteínas (N  $\times$  6,38): 28-34%; Humedad:  $\leq$  5,00%; Acidez:  $\leq$  0,16%; Cenizas: 7-8%; Inhibidores: ausentes; Aflatoxina M1:  $\leq$  0,05 ppb.

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

La maltodextrina (GLUCIDEX® 19) se obtuvo de ROQUETTE FRERES (Lestrem, Francia). Según las especificaciones de la ficha técnica el producto posee: Concentración maltodextrina ≥96%; pH ~ 4,7 a 50%; Densidad relativa ~ 0,5 kg/L; Solubilidad en agua ~ 600 g/L a 20 °C; Humedad ~ 4,2%; Tamaño de partícula ~ 100 μm.

#### 2.2 Formulación y producción de las emulsiones

#### 2.2.1 Emulsiones líquidas

Se prepararon 2 emulsiones del tipo O/W con cantidad variable de mazada (5 y 7%), ambas con un contenido fijo de una mezcla de aceites vegetales (10%, p/p) siendo la mezcla de aceite compuesta por 50% de aceite de girasol y 50% de aceite de chía. Para su elaboración se disolvió la mazada en sus diferentes concentraciones en agua destilada, usando un agitador STIRRER type BS (VELP Scientifica, Usmate, Italia) a 100 rpm durante 15 min. Posteriormente se almacenaron 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 15.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, las emulsiones finales se obtuvieron tratando las preemulsiones por homogeneización convencional (Homolab, modelo 2.20 Fbf, Parma, Italia) a 30 MPa y temperatura ambiente, y por homogeneización a alta y ultra presión utilizando un equipo UHPH-Ypsicon (modelo Ypsicon Advanced Technologies, S.L., Barcelona, España) empleando 3 presiones diferentes (100, 200 y 300 MPa). Según el porcentaje de mazada y el tratamiento de homogeneización recibido se obtuvieron 8 tipos de emulsiones líquidas que se denominaron de la siguiente manera: L5CH, L7CH, L5UH100, L7UH100, L5UH200, L7UH200, L5UH300 y L7UH300. Todas las emulsiones fueron elaboradas en 3 ocasiones de manera independiente.

#### 2.2.2 Emulsiones sólidas

Se prepararon 4 tipo de emulsiones O/W con 4, 5, 6 y 7% de mazada y el mismo contenido de aceite que el utilizado para las emulsiones líquidas (10%, p/p). La mazada se hidrató y almacenó de la misma manera que en las formulaciones líquidas. Las emulsiones que posteriormente fueron secadas contenían además en su formulación 30% de maltodextrina como segundo constituyente de la pared de las partículas. La maltodextrina se dispersó, por separado de la mazada, en agua destilada con un equipo electromecánico (Thermomix TM 21, Vorwerk España M.S.L., S.C., Madrid, España), operado a 600 rpm a temperatura ambiente durante 10 min. Esta dispersión se almacenó en refrigeración a 4 °C durante toda la noche para su completa hidratación, y se añadió a cada una de las soluciones de mazada antes de incorporar el aceite durante el proceso de preemulsión.

Las preemulsiones (o emulsiones gruesas) se prepararon por adición lenta de la fase oleosa a la fase acuosa previamente atemperadas a 40 °C utilizando un homogeneizador Ultraturrax operado a 15.000 rpm durante 5 min. Las emulsiones líquidas finales se obtuvieron con los mismos homogeneizadores antes descritos, en concreto por CH a 30 MPa y UHPH a 100 y 200 MPa.

Finalmente, las emulsiones líquidas fueron secadas por atomización utilizando un equipo Mini Spray-Dryer B-290 (Buchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza). Las muestras fueron previamente atemperadas a 25 °C y las condiciones de trabajo del secado fueron de 150 °C de temperatura de entrada, 80% de aspiración y 30% de flujo de alimentación. Para mejorar la conservación y disminuir posibles daños oxidativos, las muestras sólidas se recogieron en bolsas de aluminio que fueron termoselladas y almacenadas a –80 °C para su posterior análisis. También se almacenaron muestras de todas las emulsiones obtenidas antes de ser secadas (en estado líquido). De esta manera, según el porcentaje de mazada y el tratamiento de homogeneización recibido se obtuvieron 12 emulsiones, cada una en estado líquido (LM) y sólido (S), que se denominaron de la siguiente manera: LM4CH y S4CH, LM5CH y S5CH, LM6CH y S6CH, LM7CH y S7CH, LM4UH100 y S4UH100, LM5UH100 y S5UH100, LM6UH100 y S6UH100, LM7UH100 y S7UH100, LM4UH200 y S4UH200, LM5UH200 y S5UH200, LM6UH200 y S6UH200 y LM7UH200 y S7UH200. Todas las emulsiones fueron elaboradas en 2 ocasiones de manera independiente.

#### 2.3 Determinación de la actividad de agua de las emulsiones sólidas

La actividad del agua (a<sub>w</sub>) de las emulsiones sólidas se determinó una hora después de obtenerlas, a través del equipo Aqualab Serie 3 (Decagon Devices, Inc. Pullman, WA, EEUU). Para la medición se colocó una capa delgada de muestra, suficiente para cubrir el fondo del recipiente. Las muestras se midieron por duplicado a una temperatura de 25 °C.

### 2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM) para la determinación de la morfología de las partículas de las emulsiones sólidas

La morfología de las emulsiones sólidas se observó luego de secar las emulsiones mediante el uso del microscopio electrónico de barrido Quanta<sup>TM</sup> 650 FEG (FEI Company, Oregón, EEUU), con haz de aceleración de voltaje (HV) de 5 kV. Las muestras se prepararon fijando una pequeña cantidad de polvo en unos discos metálicos con cintas de carbono doble faz que luego se metalizaron con platino en una cámara de vacío Leica EM ACE600 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

#### 2.5 Determinación de la oxidación lipídica de las emulsiones líquidas y sólidas

Tanto las emulsiones líquidas como las sólidas fueron sometidas a condiciones de almacenamiento a 50 °C durante 15 y 31 días respectivamente para acelerar el proceso de oxidación.

#### 2.5.1 Oxidación primaria

Para la cuantificación de hidroperóxidos se utilizó el método propuesto por Hu et al. (2003). Las emulsiones sólidas (1 g) fueron reconstituidas en 10 mL de agua destilada antes de ser analizadas. Se tomaron, por triplicado, 300  $\mu$ L de muestra de cada emulsión (líquida o seca reconstituida) y se mezclaron con 1,5 mL de una solución de isooctano/2-propanol (3:1, v/v) en tubos de vidrio, y se agitaron en vórtex durante 30 s (10 s  $\times$  3). La fase orgánica de las mezclas se separó por centrifugación a 1000 rpm a 20-25 °C durante 2 min. Se añadieron 200  $\mu$ L de la fase orgánica a 2,8 mL de una solución de metanol/1-butanol (2:1, v/v). Después se añadieron, de forma ininterrumpida, 1  $\mu$ L de amonio tiocianato 3,97 M y 15  $\mu$ L de una solución de hierro preparada con 0,132 M BaCl<sub>2</sub> y 0,144 M FeSO<sub>4</sub>. Por último, los tubos de ensayo se agitaron en vórtex (10 s) y, transcurridos 20 min de espera, se midió la absorbancia de la solución en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm. Las concentraciones de hidroperóxidos se determinaron por medio de una curva patrón, realizada a partir del hidroperóxido de cumeno, en un intervalo de concentración de 0,002-2 mM.

#### 2.5.2 Oxidación secundaria

Para la cuantificación de malondialdehído se utilizó el método propuesto por Papastergiadis et al (2012) mediante cromatografía líquida (HPLC). Para la preparación de la muestra se tomaron 5 mL de cada emulsión (líquida o seca reconstituida) y se mezclaron con 15 mL de TCA al 7,5% (p/v) con 0,1% de EDTA y 0,1% de propil galato en tubos cónicos para centrífuga de 50 mL, y se agitaron horizontalmente durante 15 min. Posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm durante otros 15 min para después tomar por triplicado 1 mL del sobrenadante y añadirlos a tubos de vidrio (con tapa y rosca) junto con 3 mL de TBA 40 mM. Los tubos se llevaron a ebullición durante 40 min, para después atemperarse hasta temperatura ambiente, y se les añadieron 1 mL de metanol (pureza HPLC) a cada uno agitándose en vórtex (10 s). Cada muestra se dispuso en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min para evitar la presencia de precipitados. La separación y cuantificación de manoldialdehído se realizó en un equipo HPLC compuesto por un inyector automático (Waters 717 Plus, Milford, Massachusetts, EEUU), una bomba impulsora modelo 515 de Perkin Elmer (Waltham,

Massachusetts, EEUU) y un detector de fluorescencia serie 200 (Perkin Elmer). Alícuotas de  $20~\mu\text{L}$  de la muestra se inyectaron en una columna Agilent Pursuit 3~C18 ( $5~\mu\text{m}$ ,  $150\times4,6~\text{mm}$ ) con una temperatura de análisis de 40~°C. La fase móvil consistió en una solución tampón de  $KH_2PO_4$  50 mM, metanol, y acetonitrilo (72:17:11, v/v/v, pH 5.3) bombeada isocráticamente con un flujo de 0.8~mL/min. Las longitudes de onda de excitación y emisión fluorométricas se configuraron en 525~y~560~nm, respectivamente. Para cuantificar la cantidad de malondialdehído se realizó una curva patrón a partir de 1.1-3.3 tetraetoxipropano en un intervalo de concentración de  $0.25~\text{a}~25~\mu\text{M}$ . La cuantificación de picos se realizó con ayuda del software Turbochrom TC6 (Perkin Elmer).

#### 2.6 Tratamiento estadístico

Se realizó una estadística descriptiva calculando la media y la desviación estándar para todas las variables estudiadas. Los datos experimentales se analizaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y una prueba de Tukey para una significación estadística  $P \leq 0.05$ , utilizando el software de análisis estadístico R (versión 3.0.1).

#### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las emulsiones se organizaron y analizaron según su estado, encontrándose, por una parte, las emulsiones líquidas y por otra las secas. Las emulsiones líquidas fueron formuladas para ser incorporadas directamente tras su producción en los alimentos, y solo se analizó la estabilidad oxidativa, mientras que, en las emulsiones sólidas, formuladas para ser conservadas hasta su uso, también se determinó la a<sub>w</sub> y la morfología de los polvos obtenidos.

#### 3.1 Actividad de agua de las emulsiones sólidas

Al afectar la vida útil y las características organolépticas de los alimentos, la a<sub>w</sub> es un parámetro importante para evaluar la calidad e inocuidad de los mismos (Legako y Dunford 2010). La actividad de agua se determinó para las 12 emulsiones secas, y en coincidencia con lo encontrado por Legako y Dunford (2010) y Lehn et al. (2018), la actividad de agua de todas las emulsiones fue la propia de alimentos en polvo. Los valores obtenidos de a<sub>w</sub> para las diferentes emulsiones secas se situaron entre 0,118 y 0,266. Estos resultados confirman la gran aptitud que exhibe el secado por atomización para la conservación de las emulsiones. Es pertinente mencionar que no se encontró ningún efecto entre el porcentaje de mazada o el tratamiento de homogeneización con los valores de a<sub>w</sub>.

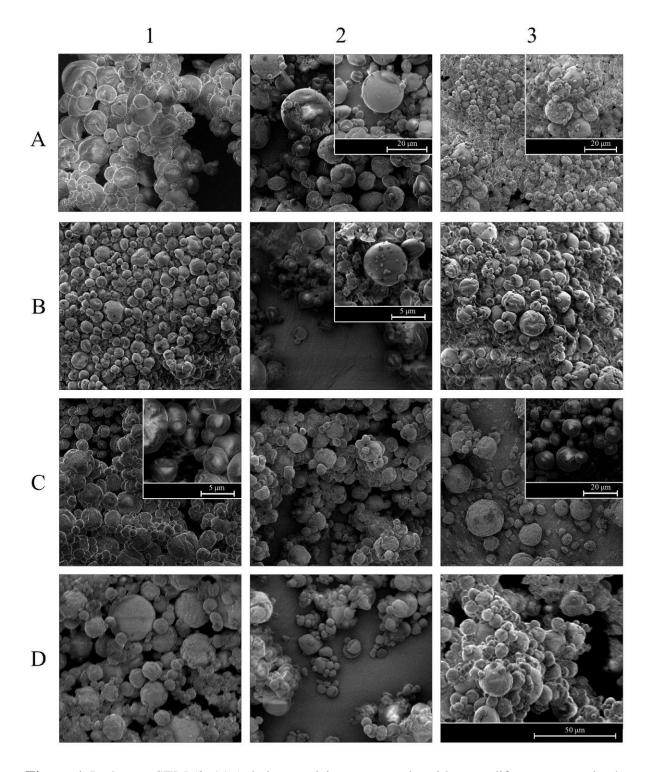
#### 3.2 Morfología de las partículas de las emulsiones sólidas

La estructura morfológica de las microcápsulas obtenidas se examinó por microscopía electrónica de barrido. Las imágenes SEM de los 12 tipos de emulsiones se ilustran en la Figura 1. Todas las imágenes evidenciaron microcápsulas de aspectos similares, tratándose siempre de partículas esféricas, sin fracturas aparentes y con superficies más o menos rugosas sin diferencias notorias entre los polvos con diferentes porcentajes de mazada o tratamientos de homogeneización.

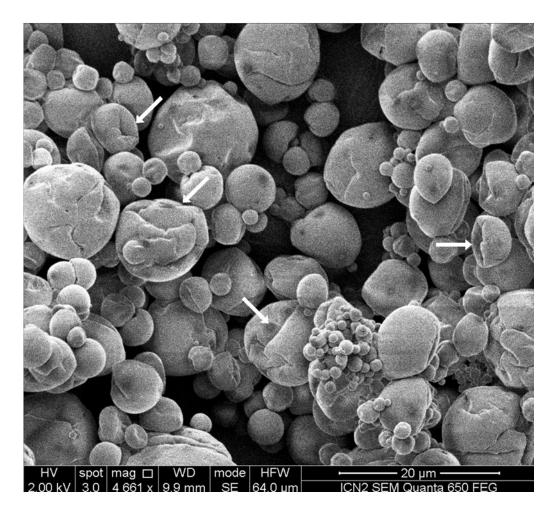
En todas las emulsiones se pudo apreciar heterogeneidad en los tamaños de partícula, distinguiéndose claramente al menos dos poblaciones de diferente tamaño. Esta variedad de tamaño también ha sido observada en diversos trabajos científicos y trata de una característica típica presentada por las partículas que han sido secadas por atomización (Carneiro et al. 2013; Melgosa et al. 2019).

En algunas microcápsulas se observaron depresiones y pliegues superficiales (Figura 2), esto se puede deber a la contracción brusca que sucede en las primeras etapas del secado. Las propiedades viscoelásticas de los emulgentes influyen en la aparición de estos pliegues (Botrel et al. 2014), pudiendo deberse en este estudio a la presencia de maltodextrina en la formulación de las emulsiones. Korma et al. (2019) observaron que las emulsiones formuladas con proteínas del suero lácteo y maltodextrina tenían mayor cantidad de abolladuras que las formuladas solamente con proteínas de suero.

Al igual que observó Zhang et al. (2020) en emulsiones secas obtenidas por homogeneización a 30 MPa (3 ciclos), formuladas con aceite de algas (13,3 y 20%), maltodextrina (13,3 y 17,7%) y mazada (diferentes concentraciones entre 8,87 y 26,7%) como agentes emulgentes, la integridad de las microcápsulas observada en las imágenes SEM de este estudio indican que la mazada tiene buenas propiedades para formar una película tal que proteja eficientemente las sustancias bioactivas.



**Figura 1.** Imágenes SEM (2691×) de las emulsiones secas obtenidas por diferentes tecnologías de homogeneización: convencional a 30 MPa (columna 1), UHPH a 100 MPa (columna 2) y a 200 MPa (columna 3), y con diferentes porcentajes de mazada (4, 5, 6 y 7% en filas A, B, C y D, respectivamente). Las imágenes superpuestas tienen un aumento de 6177× (A2), 4974× (A3), 9767× (B2), 20614× (C1) y 5267× (C3).



**Figura 2.** Imagen SEM de la emulsión L4UH200 indicando depresiones y pliegues presentes en algunas microcápsulas.

#### 3.3 Evaluación de la oxidación lipídica de las emulsiones

La oxidación de los lípidos es un aspecto importante a tener en cuenta a la hora de formular alimentos, sobre todo cuando son ricos en ácidos grasos altamente oxidables como los poliinsaturados. Mediante la determinación de marcadores de la oxidación primaria y secundaria se puede conocer el comportamiento de las emulsiones frente a la oxidación. De esta forma en este estudio se establecieron los niveles de hidroperóxidos y malondialdehído tanto en las emulsiones líquidas como en las que fueron secadas, utilizando un ensayo de oxidación forzada mediante almacenamiento en estufa a 50 °C durante un periodo de 14 y 31 días, para las emulsiones líquidas y sólidas, respectivamente.

#### 3.3.1 Emulsiones líquidas

En la Tabla 1 se pueden observar los valores obtenidos para hidroperóxidos en las emulsiones líquidas a lo largo del tiempo. Todas las emulsiones, sin importar el tratamiento de

homogeneización recibido ni su porcentaje de mazada, presentaron el mismo comportamiento oxidativo, aumentando los niveles de hidroperóxidos durante el tiempo de almacenamiento a 50 °C, siendo en general estas diferencias significativas entre los días.

En cuanto al porcentaje de mazada utilizada en la elaboración de las emulsiones, se puede observar que, generalmente, al aumentarlo, la concentración de hidroperóxidos disminuyó, sobre todo en los días 1 y 7 de almacenamiento. Sin embargo, a los 15 días de almacenamiento la disminución en hidroperóxidos por aumento de la concentración de mazada no fue evidente en todas las emulsiones ni significativa. Hay que tener en cuenta que posiblemente en este estadio de almacenamiento, las concentraciones de hidroperóxidos en las emulsiones pueden variar por transformación de estos en compuestos de oxidación secundaria, lo que haría variar de manera irregular su concentración en algún periodo de incubación de las emulsiones. Kumar et al. (2020) compararon emulsiones obtenidas con un homogeneizador de dos etapas (17,5 + 3,5 MPa), y formuladas con aceite de lino (4 y 12%) y diferentes concentraciones de mazada, y describieron el mismo efecto, siendo las emulsiones con mayor porcentaje de mazada las que presentaron menores índices de hidroperóxidos. Esto podría estar dado por dos razones: porque al aumentar la cantidad de mazada, la eficiencia de encapsulamiento mejora protegiendo el contenido lipídico frente agentes oxidantes, y porque hay componentes de la mazada como las proteínas y los fosfolípidos que poseen una actividad antioxidante significativa (Wong y Kitts 2003; Cui y Decker 2016).

En relación al efecto que tuvo la presión, se observó que en los días 7 y 15, las emulsiones obtenidas por homogeneización convencional a 30 MPa y por UHPH a 200 MPa, fueron las que exhibieron la menor concentración de hidroperóxidos, mientras que a día 1 de almacenamiento las emulsiones con mayor nivel de hidroperóxidos fueron aquellas obtenidas por UHPH a 100 y 200 MPa, en comparación a las obtenidas a 300 y por CH a 30 MPa.

La Tabla 2 muestra los valores obtenidos para malondialdehído en las emulsiones líquidas a lo largo del tiempo. Al igual que se observó en la oxidación primaria, conforme aumentó el tiempo de almacenamiento a 50 °C también aumentó significativamente o bien se mantuvo la concentración de malondialdehído en la mayoría de las emulsiones. Las únicas emulsiones que tuvieron un comportamiento diferente fueron aquellas tratadas a 300 MPa, disminuyendo significativamente los niveles de malondialdehído entre los días 7 y 15 de almacenamiento, posiblemente debido a una degradación o transformación de este compuesto de oxidación secundaria.

**Tabla 1.** Medias y desviaciones estándar de las concentraciones de hidroperóxidos (mM/kg aceite) obtenidas en las emulsiones líquidas con 5 y 7% de mazada (L5 y L7) elaboradas por homogeneización convencional a 30 MPa (CH) y UHPH a 100, 200 y 300 MPa (UH100, UH200 y UH300), durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

Tratamientos (MPa)	Emulsiones	Día 1	Día 7	Día 15
Convencional 30	L5CH	$0,25 \pm 0,04^{\text{ a,w}}$	$15,91 \pm 0,49^{b,y}$	$23,79 \pm 0,63^{c,wx}$
Convencional 30	L7CH	$0,20 \pm 0,05^{a,w}$	$3,36 \pm 1,25^{a,x}$	$17,76 \pm 4,90^{b,w}$
UHPH 100	L5UH100	$3,38 \pm 0,39^{a,z}$	$33,41 \pm 3,35$ b,z	$37,56 \pm 0,53^{b,x}$
<u> </u>	L7UH100	$1,73 \pm 0,16^{a,x}$	$17,32 \pm 5,51$ b,y	$37,29 \pm 0,16^{c,x}$
UHPH 200	L5UH200	$3,44 \pm 0,14^{a,z}$	$17,77 \pm 1,41$ b,y	$21,26 \pm 12,64$ b,wx
UHFH 200	L7UH200	$2,60 \pm 0,27$ a,y	$3,43 \pm 1,21^{a,x}$	$30,42 \pm 10,72^{b,wx}$
UHPH 300	L5UH300	$1,55 \pm 0,12^{a,x}$	$14,90 \pm 3,08^{b,y}$	$38,17 \pm 0,77^{c,x}$
OIII II 300	L7UH300	$0,75 \pm 0,46$ a,w	$21,08 \pm 2,88$ b,y	$37,40 \pm 0,78^{c,x}$

 $<sup>^{</sup>a\text{-c}}$  Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (P  $\leq$  0,05) de las concentraciones de hidroperóxidos de cada emulsión entre los diferentes días. Letras indican valores en sentido ascendente.

El porcentaje de mazada tuvo el mismo efecto que en la oxidación primaria, es decir disminuyeron los niveles de malondialdehído cuando aumentó el porcentaje de mazada en la emulsión, sobre todo es evidente en el día 7 de almacenamiento. Este efecto podría justificarse por el mismo motivo que se explicó en los hidroperóxidos, es decir la mejora en la eficiencia de encapsulado al aumentar la cantidad de mazada, que protegería el contenido lipídico frente a agentes oxidantes, y la presencia de componentes antioxidantes procedentes de la mazada como las proteínas y los fosfolípidos (Wong y Kitts 2003; Cui y Decker 2016).

En relación al efecto del sistema de homogeneización y la presión aplicados en la elaboración de las emulsiones, se observó que aquellas obtenidas por UHPH a 100 MPa tuvieron mayores índices de malondialdehído (~4 veces más a los 15 días de incubación) que las tratadas a 200 o 300 MPa, y estas últimas presentaron concentraciones similares y en general sin diferencias significativas con las tratadas por CH a 30 MPa a los 15 días de almacenamiento. Las diferencias observadas entre las emulsiones tratadas por UHPH a 100 y las tratadas a 200-300 MPa podrían explicarse por la obtención de emulsiones físicamente más estables al aumentar la presión ya que los tamaños de partícula alcanzados son menores (Hebishy et al. 2017). Por otro lado, y en general se ha descrito que la oxidación de lípidos es más rápida en emulsiones con pequeñas gotas (en este estudio las emulsiones obtenidas por UHPH), debido al área interfacial total más grande en comparación con las gotas más grandes obtenidas por otros métodos de emulsificación como la homogeneización convencional (emulsiones CH) (Lethuaut

 $<sup>^{\</sup>text{w-z}}$  Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $P \le 0,05$ ) de las concentraciones de hidroperóxidos entre tratamientos. Letras indican valores en sentido ascendente.

et al. 2002; Berton-Carabin et al. 2014). En el caso de las emulsiones obtenidas por UHPH a 200-300 MPa, parece que otros factores como la naturaleza y grosor de la interfase podrían intervenir de manera positiva en la protección frente a la oxidación del contenido lipídico de las partículas.

**Tabla 2.** Medias y desviaciones estándar de las concentraciones de malondialdehído (μM/kg aceite) obtenidas en las emulsiones líquidas con 5 y 7% de mazada (L5 y L7) elaboradas con homogeneización convencional a 30 MPa (CH) y UHPH a 100, 200 y 300 MPa (UH100, UH200 y UH300), durante 15 días de almacenamiento a 50 °C.

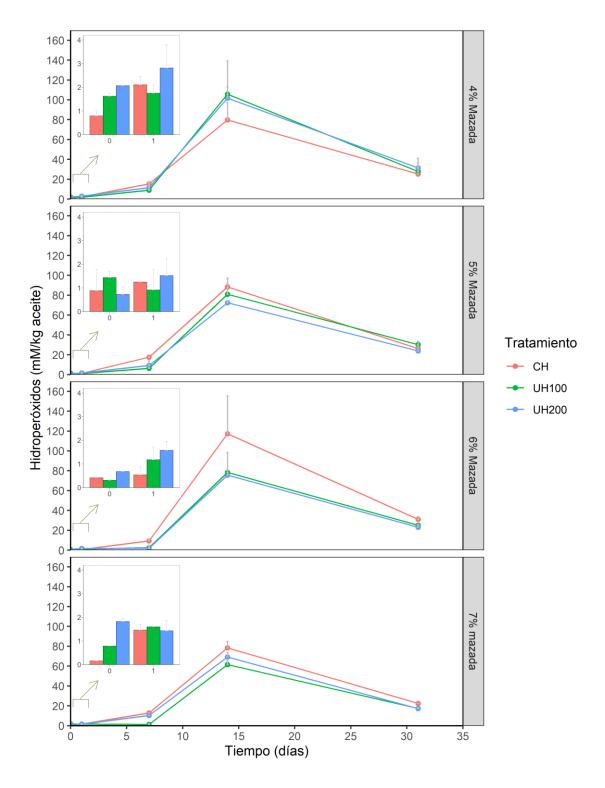
Tratamientos (MPa)	Emulsiones	Día 1	Día 7	Día 15
Convencional 30	L5CH	$3,33 \pm 0,18$ a,v	$46,72 \pm 2,99^{b,vw}$	$51,53 \pm 3,98$ b,y
Convencional 50	L7CH	$3,10 \pm 0,20^{a,v}$	$35,58 \pm 3,39^{b,v}$	$49,63 \pm 1,05^{c,xy}$
<b>UHPH 100</b>	L5UH100	$43,90 \pm 1,43^{a,z}$	$193,38 \pm 1,03^{b,z}$	$228,54 \pm 6,70^{c,z}$
UHFH 100	L7UH100	$25,50 \pm 0,46^{a,y}$	$114,79 \pm 2,46^{b,y}$	$203,38 \pm 11,14^{c,z}$
UHPH 200	L5UH200	$20,27 \pm 3,04^{a,x}$	$57,88 \pm 8,96^{b,w}$	$50,22 \pm 4,40^{b,xy}$
	L7UH200	$11,38 \pm 0,71^{a,w}$	$40,61 \pm 3,47^{b,v}$	$43,49 \pm 2,79^{b,xy}$
UHPH 300	L5UH300	$2,15 \pm 0,47^{a,v}$	$80,11 \pm 0,16^{c,x}$	$36,56 \pm 10,71^{b,xy}$
	L7UH300	$1,33 \pm 0,14^{a,v}$	$35,49 \pm 4,04^{c,v}$	$25,88 \pm 0,02^{b,x}$

a-c Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ( $P \le 0.05$ ) de las concentraciones de hidroperóxidos de cada emulsión entre los diferentes días. Letras indican valores en sentido ascendente. v-z Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $P \le 0.05$ ) de las concentraciones de hidroperóxidos entre tratamientos. Letras indican valores en sentido ascendente.

#### 3.3.2 Emulsiones sólidas

Todas las emulsiones secas se elaboraron dos veces de manera independiente, no permitiendo que los resultados fueran analizados de forma estadística ya que el número de datos obtenidos para cada emulsión fue muy bajo (n=2). De esta manera el estudio de los datos de oxidación de las emulsiones secas se basó en un análisis de tendencias a partir de las medias obtenidas en las 2 repeticiones, además, tal como lo explica Velasco et al. (2003, 2006), el estudio de la oxidación lipídica en aceites secos microencapsulados es muy difícil. Al tratarse de una matriz muy heterogénea cada partícula de aceite dentro de la misma emulsión puede encontrarse en diferente estadio oxidativo.

En las Figuras 3 y 4 se presentan los niveles de hidroperóxidos obtenidos en todas las emulsiones a lo largo del tiempo. Al examinar la forma de los gráficos obtenidos se puede advertir que todas las emulsiones, sin considerar el porcentaje de mazada ni el tratamiento de homogeneización aplicado, tuvieron un comportamiento similar a lo largo del tiempo.



**Figura 3.** Evolución en el contenido de hidroperóxidos en emulsiones con 4, 5, 6 y 7% de mazada, obtenidas por homogeneización convencional a 30 MPa (CH), y UHPH a 100 MPa (UH100) y 200 MPa (UH200), antes de ser secadas (día 0), después del secado (día 1), y durante 7, 14 y 31 días de almacenamiento a 50 °C.

La cinética de oxidación primaria se caracterizó por un sutil aumento en la concentración de hidroperóxidos entre los días 1 y 7, apareciendo después un pico en el día 14, y por último un notorio descenso hacia el día 31. Se podría decir que la evolución de las cantidades de hidroperóxidos observada es coherente con la cinética normal de desarrollo de la oxidación lipídica, en la que al comienzo aparece un período de latencia y luego uno de propagación o aumento exponencial de los productos de la oxidación (Frankel 2005). El descenso observado después del pico podría deberse a que en ese momento se estén formando productos de la oxidación secundaria, de los cuales los hidroperóxidos son sus precursores (Papastergiadis et al. 2012).

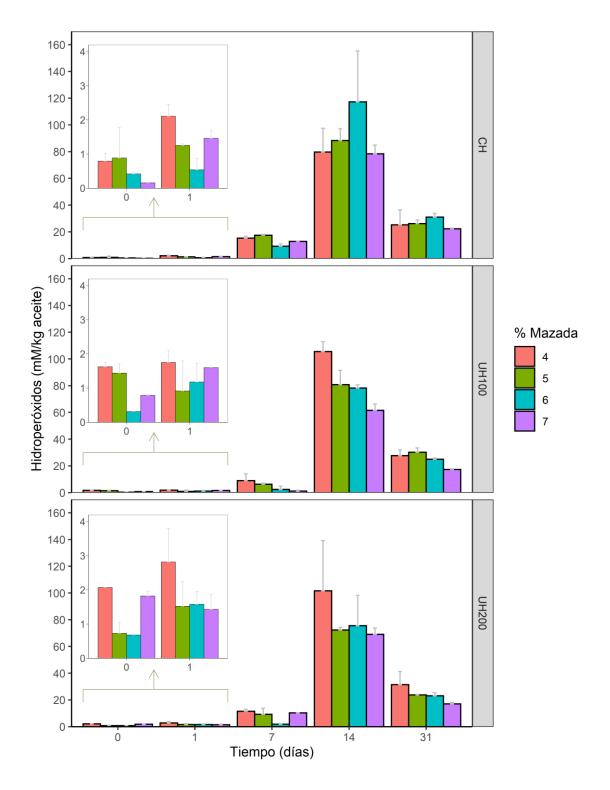
Profundizando en los picos de los gráficos (día 14), en la Figura 3 se puede observar que los niveles de hidroperóxidos en las emulsiones tratadas por UHPH a 100 y 200 MPa, fueron menores que en las tratadas por CH cuando el porcentaje de mazada fue  $\geq$  5%. Por el contrario, cuando el porcentaje de mazada fue 4% los resultados se invirtieron, presentando las emulsiones tratadas por CH menor concentración que las tratadas por UHPH. Este comportamiento podría deberse a que un 4% de mazada no es suficiente cantidad de emulgente como para cubrir la mayor superficie de partícula (interfase) que presentan las emulsiones tratadas por UHPH. Las emulsiones obtenidas por UHPH tienen mayor superficie de interfase que las de emulsiones CH ya que debido al aumento de la presión de homogeneización se producen gotas más pequeñas (Hebishy et al. 2017). De esta forma, cuando la cantidad de emulgente es baja se forma una película que no es lo suficientemente densa como para proteger a los aceites de la oxidación, permitiendo la difusión de oxígeno y prooxidantes hacia las gotas de aceite durante el almacenamiento (Sarkar et al. 2016). En cuanto a las mayores concentraciones de hidroperóxidos observadas en las emulsiones obtenidas por CH elaboradas con 5, 6 y 7% de mazada se podría explicar en base a un exceso de emulgente. Probablemente, la oxidación de las emulsiones secas formuladas con mazada no se originó solamente en el aceite de la fase dispersa, sino que también los compuestos de la mazada pudieron comportarse como prooxidantes, sobre todo si se encontraron en exceso (Berton-Carabin et al. 2014). La mazada contiene grandes cantidades de fosfolípidos que pueden tener efectos antioxidantes cuando recubren las gotas de aceite. Sin embargo, cuando forman parte de productos lácteos deshidratados también pueden comportarse como prooxidantes debido a la gran insaturación que presentan los fosfolípidos de la MFGM como la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina (Cui y Decker 2016).

En la Figura 4 se puede apreciar cómo, en general, las emulsiones tratadas por UHPH a 100 y a 200 MPa presentaron menores índices de hidroperóxidos cuanto mayor fue el porcentaje de

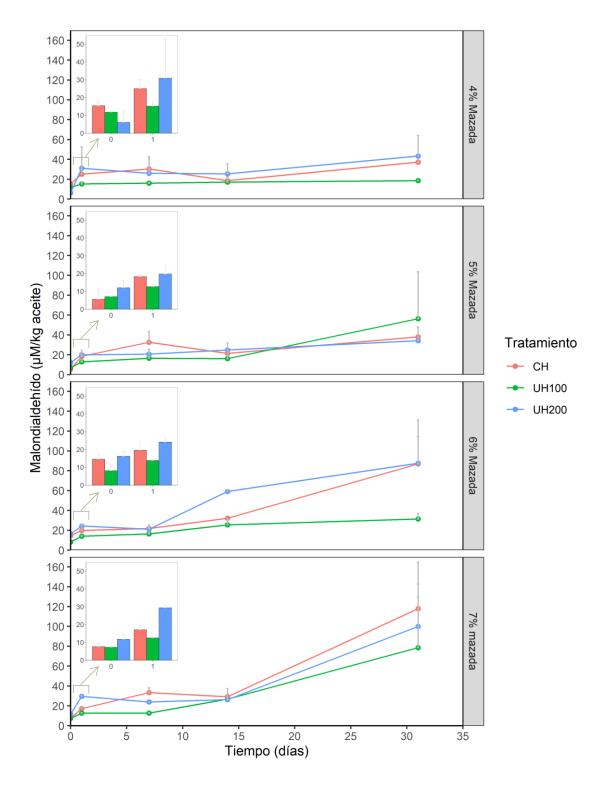
mazada en su formulación. Este efecto podría ser explicado en base a que un mayor contenido de mazada en la emulsión logra una mejor eficiencia de encapsulamiento. Zhang et al. (2020) obtuvieron los mismos resultados en emulsiones obtenidas por homogeneización a 30 MPa (3 ciclos), secadas por atomización y formuladas con diferentes concentraciones de mazada, maltodextrina y aceite de algas, encontrando que las formulaciones con mayor porcentaje de mazada presentaron los menores índices de hidroperóxidos, adjudicando esto a que cuando los porcentajes de mazada fueron menores la falta de emulgente resultó en menor eficiencia de encapsulamiento.

En las Figura 5 y 6 se presentan los niveles de malondialdehído obtenidos en todas las emulsiones a lo largo del tiempo. Las gráficas muestran bajos niveles de este indicador de oxidación secundaria produciéndose un moderado aumento de la concentración de malondialdehído en la mayoría de las emulsiones en el día 31. Este aumento en la concentración de malondialdehído coincide con el descenso de los hidroperóxidos antes mencionado, confirmando que al acercarse el día 31 de almacenamiento el estado de la oxidación sigue avanzando porque nos encontramos con mayores niveles de productos de la oxidación secundaria y menores de la primaria.

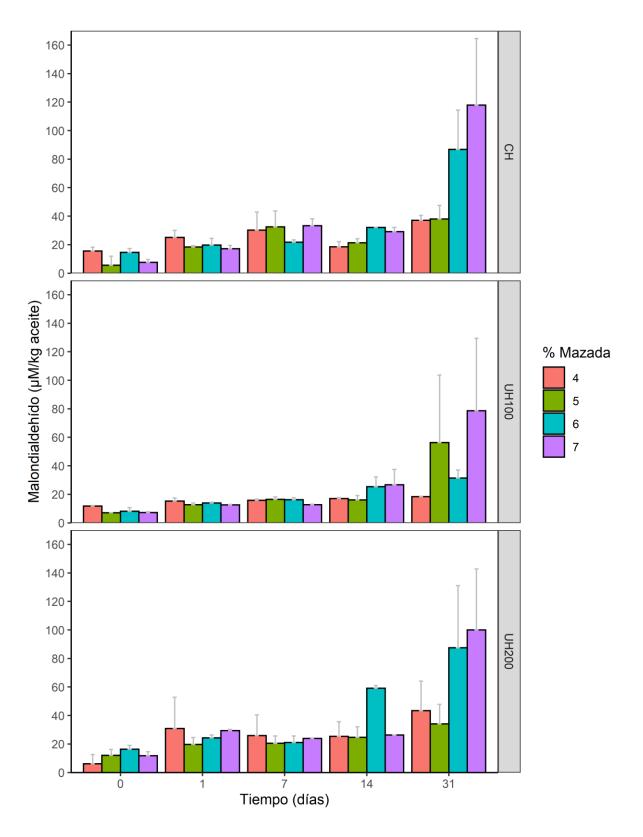
En la Figura 6 se puede observar que las emulsiones obtenidas por UHPH a 100 MPa generalmente fueron las que presentaron menores índices de malondialdehído durante todos los días, en comparación con las obtenidas por CH y por UHPH a 200 MPa. La diferencia en los valores de malondialdehído obtenidos en las emulsiones tratadas por UHPH a 100 MPa y por CH podría explicarse porque la tecnología UHPH produce emulsiones más estables y con tamaños de partícula menores que los obtenidos con la tecnología convencional. Si la cantidad de agentes encapsulantes (mazada y maltodextrina) es suficiente se formaría una interfase lo suficientemente densa como para proteger los lípidos de la oxidación. Por otro lado, los mayores niveles de malondialdehído observados cuando se aumentó la presión de 100 a 200 MPa en la tecnología UHPH podría explicarse por un sobreprocesamiento de la muestra, haciendo que a 200 MPa la energía producida a nivel de la válvula del homogeneizador haya sido tan alta que se hayan desnaturalizado los componentes de la mazada, disminuyendo su poder emulgente. Durante la homogeneización, y a nivel de la válvula, se alcanzan temperaturas elevadas debido a una transformación de la energía mecánica en térmica por los efectos de fricción, cizalla, etc que sufren las partículas, y que depende, entre otros, de la temperatura de entrada del fluido al homogeneizador y de la presión de homogeneización (Hayes et al. 2005; Hebishy et al. 2015).



**Figura 4.** Cambios en el contenido de hidroperóxidos en emulsiones obtenidas por homogeneización convencional a 30 MPa (CH), y UHPH a 100 MPa (UH100) y 200 MPa (UH200) con 4, 5, 6 y 7% de mazada, antes de ser secadas (día 0), después del secado (día 1), y durante 7, 14 y 31 días de almacenamiento a 50 °C.



**Figura 5.** Evolución en el contenido de malondialdehído en emulsiones con 4, 5, 6 y 7% de mazada, obtenidas por homogeneización convencional a 30 MPa (CH), y UHPH a 100 MPa (UH100) y 200 MPa (UH200), antes de ser secadas (día 0), después del secado (día 1), y durante 7, 14 y 31 días de almacenamiento a 50 °C.



**Figura 6**. Cambios en el contenido de malondialdehído en emulsiones obtenidas por homogeneización convencional a 30 MPa (CH), y UHPH a 100 MPa (UH100) y 200 MPa (UH200) con 4, 5, 6 y 7% de mazada, antes de ser secadas (día 0), después del secado (día 1), y durante 7, 14 y 31 días de almacenamiento a 50 °C.

En cuanto al efecto del secado en la oxidación, se puede observar, en todas las emulsiones, un aumento de los hidroperóxidos y de malondialdehído entre el día 0 (antes del secado) y el día 1 (después del secado), siendo más notoria la diferencia en la cuantificación de malondialdehído. Si bien en cada emulsión el aumento fue de diferente magnitud, estos resultados podrían indicar que el secado influyó sobre la oxidación de las emulsiones. El tiempo de exposición al calor durante el proceso de secado es corto, no obstante, este proceso fue realizado a una temperatura de 150 °C. Esta temperatura podría haber afectado el proceso de la oxidación catalizando las reacciones químicas de las vías radicales y no radicales de descomposición de los compuestos primarios y secundarios de la oxidación (Berton-Carabin et al. 2014). Sanchez-Reinoso y Gutiérrez (2017) también compararon el efecto del secado en el índice de hidroperóxidos entre aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en estado líquido y el mismo aceite, pero encapsulado y secado a 170 °C por atomización. Los aceites encapsulados y secados presentaron mayor concentración de hidroperóxidos, y los autores atribuyeron esta diferencia al proceso de secado.

#### 4 **CONCLUSIONES**

Teniendo en cuenta que la oxidación lipídica en las emulsiones O/W es un fenómeno complejo, ya que son muchos los factores que en ella inciden, en este estudio se concluye los siguientes puntos.

Tanto en las emulsiones líquidas como en las sólidas, al aumentar el porcentaje de mazada, en general, los niveles de los productos de la oxidación disminuyen, mostrando que la mazada tiene un buen desempeño como agente emulgente, capaz de situarse en la interfase aceite-agua y proteger a los aceites en cierto grado frente a la oxidación.

Las emulsiones líquidas obtenidas por UHPH a 200 y 300 MPa son, junto con las obtenidas por CH a 30 MPa, las que menores niveles de hidroperóxidos y malondialdehído presentan.

Con la formulación de emulsiones O/W utilizando una mezcla de aceites de chía y girasol, mazada y maltodextrina como agente emulgente y de pared respectivamente, obtenidas utilizando las tecnologías de CH y UHPH, y secado por atomización, se logran producir emulsiones en polvo ricas en ácidos grasos  $\omega$ -3 y 6 con una  $a_w$  típica de este tipo de producto, y una buena estabilidad oxidativa, sobre todo cuando se aplica un tratamiento de UHPH a 100 MPa.

En las emulsiones secas, cuando el porcentaje de mazada utilizada en su formulación supera el 4%, el aumento de la presión de homogeneización determina índices de hidroperóxidos

menores, mientras que, en todas las concentraciones de mazada estudiadas, las emulsiones tratadas por UHPH a 100 MPa presentan menores niveles de malondialdehído que las obtenidas por UHPH a 200 MPa y CH a 30 MPa.

Es pertinente mencionar que los resultados obtenidos para determinar la oxidación de las emulsiones secas evidencian la necesidad de continuar con los estudios para obtener un mayor respaldo estadístico.

#### 5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Augustin MA, Bhail S, Cheng LJ, Shen Z, Øiseth S, Sanguansri L. 2015. Use of whole buttermilk for microencapsulation of omega-3 oils. J Funct Foods. 19:859–867. doi:10.1016/j.jff.2014.02.014.

Berton-Carabin CC, Ropers MH, Genot C. 2014. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: involvement of the interfacial layer. Compr Rev Food Sci Food Saf. 13(5):945–977. doi:10.1111/1541-4337.12097.

Botrel DA, de Barros Fernandes RV, Borges SV, Yoshida MI. 2014. Influence of wall matrix systems on the properties of spray-dried microparticles containing fish oil. Food Res Int. 62:344–352. doi:10.1016/j.foodres.2014.02.003.

Capitani MI. 2013. Caracterización y funcionalidad de subproductos de chía (Salvia hispanica L .). Aplicación en tecnología de alimentos. Tesis doctoral. Departamento de Química. Universidad nacional de La Plata. Argentina. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/26984/Documento\_completo.pdf?sequence= 1

Carneiro HCF, Tonon R V., Grosso CRF, Hubinger MD. 2013. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. J Food Eng. 115(4):443–451. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.03.033.

Corredig M, Roesch RR, Dalgleish DG. 2003. Production of a novel ingredient from buttermilk. J Dairy Sci. 86(9):2744–2750. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73870-3.

Cui L, Decker EA. 2016. Phospholipids in foods: prooxidants or antioxidants? J Sci Food Agric. 96(1):18–31. doi:10.1002/jsfa.7320.

Dickinson E. 2010. Food emulsions and foams: Stabilization by particles. Curr Opin Colloid Interface Sci. 15(1–2):40–49. doi:10.1016/j.cocis.2009.11.001.

Dumay E, Chevalier-Lucia D, Picart-Palmade L, Benzaria A, Gràcia-Julià A, Blayo C. 2013. Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. Trends Food Sci Technol. 31(1):13–26. doi:10.1016/j.tifs.2012.03.005.

Encina C, Vergara C, Giménez B, Oyarzún-Ampuero F, Robert P. 2016. Conventional spraydrying and future trends for the microencapsulation of fish oil. Trends Food Sci Technol. 56:46–60. doi:10.1016/j.tifs.2016.07.014.

Fernández Arteaga A. 2006. Preparación, caracterización y estabilidad de emulsiones y microemulsiones O/W. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería química. Universidad de

Granada. España.

https://www.researchgate.net/profile/A\_Arteaga/publication/46590023\_Preparacion\_caracterizacion\_y\_estabilidad\_de\_emulsiones\_y\_microemulsiones\_OW/links/00b49525f98e7b9b1e000000.pdf

Frankel E. 2005. Lipid oxidation. 2<sup>nd</sup> edition. Bridg. Water. UK: The Oily Press Ltd.

Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. 2007. Applications of spraydrying in microencapsulation of food ingredients: An overview. Food Res Int. 40(9):1107–1121. doi:10.1016/j.foodres.2007.07.004.

Guggisberg D, Chollet M, Schreier K, Portmann R, Egger L. 2012. Effects of heat treatment of cream on the physical-chemical properties of model oil-in-buttermilk emulsions. Int Dairy J. 26(1):88–93. doi:10.1016/j.idairyj.2012.01.008.

Guiotto Estefania N. 2014. Aplicación de subproductos de chía (*Salvia hispanica* L.) y girasol (*Helianthus annuus* L.) en alimentos. Tesis doctoral. Departamento de Química Universidad nacional de La Plata. Argentina http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/34268/Documento\_completo.pdf?sequence= 3&isAllowed=y%0Ahttp://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/34268/Documento\_completo.pdf?sequence=3.

Hayes MG, Fox PF, Kelly AL. 2005. Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. J Dairy Res. 72(1):25–33. doi:10.1017/S0022029904000524.

He S, Tang H, Yi H, Xu W, Ma Y, Wang R. 2017. Properties of emulsions from milk fat globule membrane and its components. Int J Food Prop. 20(2):1342–1353. doi:10.1080/10942912.2017.1343348.

Hebishy E, Buffa M, Guamis B, Blasco-Moreno A, Trujillo AJ. 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. Innov Food Sci Emerg Technol. 32:79–90. doi:10.1016/j.ifset.2015.09.013.

Hebishy E, Buffa M, Juan B, Blasco-Moreno A, Trujillo AJ. 2017. Ultra high-pressure homogenized emulsions stabilized by sodium caseinate: Effects of protein concentration and pressure on emulsions structure and stability. Lwt. 76:57–66. doi:10.1016/j.lwt.2016.10.045.

Hu M, McClements DJ, Decker EA. 2003. Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate, and soy protein isolate. J Agric Food Chem. 51(6):1696–1700. doi:10.1021/jf020952j.

Jacobsen C. 2016. Oxidative Stability and Shelf Life of Food Emulsions. In: Oxidative stability and shelf life of foods containing oils and fats. Hu M, Jacobsen C. Academic Press, London, UK. p. 287–312. doi:10.1016/C2015-0-00077-6.

Julio LM, Ixtaina VY, Fernández MA, Sánchez RMT, Wagner JR, Nolasco SM, Tomás MC. 2015. Chia seed oil-in-water emulsions as potential delivery systems of  $\omega$ -3 fatty acids. J Food Eng. 162:48–55. doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.04.005.

Korma SA, Wei W, Ali AH, Abed SM, Zheng L, Jin Q, Wang X. 2019. Spray-dried novel structured lipids enriched with medium-and long-chain triacylglycerols encapsulated with different wall materials: Characterization and stability. Food Res Int. 116:538–547. doi:10.1016/j.foodres.2018.08.071.

Kosegarten-Conde CE, Jiménez-Munguía MT. 2012. Factores principales que intervienen en la

estabilidad de una emulsión doble. Temas Sel Ing Aliment. 6:1–18.

Kumar R, Sabikhi L, Rathod G, Chaudhary N. 2020. Storage studies of flaxseed oil encapsulated by buttermilk solids. Food Bioprocess Technol. 13(8):1392–1404. doi:10.1007/s11947-020-02482-1.

Legako J, Dunford NT. 2010. Effect of spray nozzle design on fish oil-whey protein microcapsule properties. J Food Sci. 75(6). doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01708.x.

Lehn DN, Esquerdo VM, Dahlem Júnior MA, Dall'Agnol W, dos Santos ACF, de Souza CFV, de Almeida Pinto LA. 2018. Microencapsulation of different oils rich in unsaturated fatty acids using dairy industry waste. J Clean Prod. 196:665–673. doi:10.1016/j.jclepro.2018.06.127.

Lethuaut L, Métro F, Genot C. 2002. Effect of droplet size on lipid oxidation rates of oil in water emulsion stabilized by protein. 79(5):425–430.

Lopez C, Cauty C, Guyomarc'h F. 2019. Unraveling the complexity of milk fat globules to tailor bioinspired emulsions providing health benefits: The key role played by the biological membrane. Eur J Lipid Sci Technol. 121(1):1–25. doi:10.1002/ejlt.201800201.

Mather IH. 2000. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. J Dairy Sci. 83(2):203–247. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)74870-3.

McClements DJ. 2005. Theoretical analysis of factors affecting the formation and stability of multilayered colloidal dispersions. Langmuir. 21:9777–9785. doi:10.1021/la0512603.

McClements DJ. 2007. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. Crit Rev Food Sci Nutr. 47(7):611–649. doi:10.1080/10408390701289292.

McClements DJ. 2015. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. Adv Colloid Interface Sci. 219:27–53. doi:10.1016/j.cis.2015.02.002.

Melgosa R, Benito-Román Ó, Sanz MT, de Paz E, Beltrán S. 2019. Omega–3 encapsulation by PGSS-drying and conventional drying methods. Particle characterization and oxidative stability. Food Chem. 270:138–148. doi:10.1016/j.foodchem.2018.07.082.

Muñoz J, Alfaro MDC, Zapata I. 2007. Avances en la formulación de emulsiones. Grasas y Aceites. 58(1):64–73. doi:10.3989/gya.2007.v58.i1.10.

Nedovic V, Kalusevic A, Manojlovic V, Levic S, Bugarski B. 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. Procedia Food Sci. 1:1806–1815. doi:10.1016/j.profoo.2011.09.265.

O'Kennedy BT. 2009. Dairy ingredients in non-dairy foods. In: Dairy-derived ingredients Food and nutraceutical uses. Corredig M. Woodhead Publishing Limited. Cambridge. p. 482–506.

Papastergiadis A, Mubiru E, Van Langenhove H, De Meulenaer B. 2012. Malondialdehyde measurement in oxidized foods: Evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) Test in various foods. J Agric Food Chem. 60(38):9589–9594. doi:10.1021/jf302451c.

Rodríguez-Cruz M, Tovar AR, del Prado M, Torres N. 2005. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. Rev Investig Clin. 57(3):457–472.

Sanchez-Reinoso Z, Gutiérrez LF. 2017. Effects of the emulsion composition on the physical

properties and oxidative stability of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil microcapsules produced by spray drying. Food Bioprocess Technol. 10(7):1354–1366. doi:10.1007/s11947-017-1906-3.

Sarkar A, Arfsten J, Golay PA, Acquistapace S, Heinrich E. 2016. Microstructure and long-term stability of spray dried emulsions with ultra-high oil content. Food Hydrocoll. 52:857–867. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.09.003.

Spitsberg VL. 2005. Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. J Dairy Sci. 88(7):2289–2294. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72906-4.

Trujillo AJ, Roig-Sagués AX, Juan B, Zamora A, Ferragut V. 2021. Ultrahigh-Pressure Homogenization in Dairy Processing: Effects on Quality and Functionality. Innov Food Process Technol. 3:315–336. doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.22998-3.

Ubbink J, Krüger J. 2006. Physical approaches for the delivery of active ingredients in foods. Trends Food Sci Technol. 17(5):244–254. doi:10.1016/j.tifs.2006.01.007.

Velasco J, Dobarganes C, Márquez-Ruiz G. 2003. Variables affecting lipid oxidation in dried microencapsulated oils. Grasas y Aceites. 54(3):304–314. doi:10.3989/gya.2003.v54.i3.246.

Velasco J, Marmesat S, Dobarganes C, Márquez-Ruiz G. 2006. Heterogeneous aspects of lipid oxidation in dried microencapsulated oils. J Agric Food Chem. 54(5):1722–1729. doi:10.1021/jf052313p.

Velikov KP, Pelan E. 2008. Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. R Soc Chem. 4:1964–1980. doi:10.1039/b800106e.

Villière A, Rousseau F, Brossard C, Genot C. 2007. Sensory evaluation of the odour of a sunflower oil emulsion throughout oxidation. Eur J Lipid Sci Technol. 109(1):38–48. doi:10.1002/ejlt.200600084.

Waraho T, Mc Clements DJ, Decker EA. 2011. Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. Trends Food Sci Technol. 22(1):3–13. doi:10.1016/j.tifs.2010.11.003.

Wong PYY, Kitts DD. 2003. Chemistry of buttermilk solid antioxidant activity. J Dairy Sci. 86(5):1541–1547. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73739-4.

Zamora A, Guamis B. 2015. Opportunities for Ultra-High-Pressure Homogenisation (UHPH) for the food industry. Food Eng Rev. 7(2):130–142. doi:10.1007/s12393-014-9097-4.

Zhang Y, Pang X, Zhang S, Liu L, Ma C, Lu J, Lyu J. 2020. Buttermilk as a wall material for microencapsulation of omega-3 oils by spray drying. Lwt. 127:109320. doi:10.1016/j.lwt.2020.109320.