



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERIA QUÍMICA
INSTITUTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencia y Tecnología de Alimentos

CO-ENCAPSULACIÓN DE ASTAXANTINA Y ACEITE DE CHÍA PARA LA
OBTENCIÓN DE UN NUTRACÉUTICO CON PROPIEDADES FUNCIONALES
MEJORADAS. ASPECTOS TECNOLÓGICOS

Lic. Carolina A. Acosta

Directora: Dra. Silvana A. Fioramonti

Co-directora: Dra. Ma. Virginia Castel

Miembros del jurado:

Dra. María Florencia Mazzobre

Dra. Patricia Risso

Dra. Paulina Mocchiutti

2025

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA) de la Facultad de Ingeniería Química (FIQ-UNL) por brindarme el espacio para desarrollar mis actividades de investigación. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme la beca doctoral que hizo posible la realización de este doctorado.

A mi directora, Silvana Fioramonti, por su generosidad al compartir su conocimiento, por sus aportes que enriquecieron profundamente este trabajo y, sobre todo, por haberme acompañado con afecto durante todo el proceso, tanto en el plano académico como en lo personal. Ha sido un ejemplo inspirador, no solo como profesional, sino también como ser humano.

A mi codirectora Virginia Castel, por sus valiosos aportes en la escritura de esta tesis.

A todo el grupo del Área de Estudios Físicoquímicos del ITA, especialmente a Carlos Carrara y Julia Spotti, por recibirme con tanta calidez en su equipo.

A mis compañeros de laboratorio Lau, JP, Caro, Pau y Meli, por los mates, las risas y el trabajo compartido. En especial, a Lau, Juan Pablo y Caro, grandes amigos que me regaló esta facultad, por su apoyo técnico y, sobre todo, por haber sido un soporte emocional fundamental, especialmente durante el último año. Todo fue más fácil gracias a ustedes.

A mis amigas de toda la vida: Anto, Ale, Flaca y Ludmi, por estar siempre presentes.

A mi familia mis papás y hermanos Joaquín y Mariano por su amor y compañía incondicional en todo lo que hago.

Y a Fabricio, mi compañero de vida, porque con su amor, paciencia y calma es un pilar fundamental en mi vida y mi refugio todos los días.

RESUMEN

RESUMEN

La creciente demanda de alimentos funcionales con propiedades saludables ha impulsado el desarrollo de ingredientes capaces de vehicular compuestos bioactivos en matrices alimentarias. Entre ellos, los ácidos grasos ω -3 y la astaxantina (ASX), un potente antioxidante, han demostrado efectos antiinflamatorios en diversos modelos experimentales. La combinación de ambos compuestos podría potenciar su actividad bioactiva en la prevención y/o tratamiento de trastornos asociados a procesos de inflamación crónica de bajo grado. Sin embargo, su alta susceptibilidad a factores ambientales plantea un desafío para desarrollar matrices protectoras que mantengan su estabilidad durante el almacenamiento.

El objetivo de este trabajo fue diseñar sistemas de co-encapsulación de aceite de chía y *Haematococcus pluvialis* (fuente de ASX), utilizando emulsiones multicapa, y obtener encapsulados sólidos mediante diferentes métodos de deshidratación. Inicialmente, se mezcló aceite de chía con distintas concentraciones de *H. pluvialis* para analizar la estabilidad de las mezclas a 25 °C y 40 °C, y seleccionar la concentración de ASX (3200 o 6400 ppm) a utilizar en los co-encapsulados.

Luego, se formularon emulsiones O/W de aceite de chía (sin alga) con distintas estructuras interfaciales: monocapa (MC), bicapa (BC) y tricapa (TC), empleando lecitina, quitosano, alginato y maltodextrina como materiales de pared. Las emulsiones MC se gelificaron con CaCl_2 y se liofilizaron, mientras que las BC y TC se secaron por aspersion. Se evaluó cómo el tipo de formulación y el método de secado afectaban la estabilidad oxidativa del aceite. Se caracterizaron las emulsiones (tamaño de gota, potencial zeta, estabilidad física, microscopía óptica, reología) y los encapsulados (microscopía SEM, eficiencia de encapsulación,

humedad, actividad de agua, dispersibilidad, solubilidad), junto con la evolución de compuestos primarios y secundarios de oxidación a 25 °C.

A partir de estos estudios, se eligieron dos formulaciones para co-encapsular 6400 ppm de ASX: (i) esferas gelificadas de emulsiones MC liofilizadas (L-MC/ASX) y (ii) polvos obtenidos por secado por aspersion de emulsiones BC (P-BC/ASX). Se caracterizaron y evaluaron a 25 °C y 40 °C.

Los sistemas L-MC/ASX presentaron una estructura muy porosa, con canales internos que favorecieron el deterioro oxidativo del aceite, incluso con la incorporación de ASX. En cambio, los sistemas P-BC/ASX mostraron buena estabilidad oxidativa (índice de peróxidos < 15 meq O₂/kg aceite) durante 6 meses a 25 °C, y retuvieron el 80 % del contenido inicial de ASX.

Se estima que una porción de 1,5 g del polvo funcional aportaría aproximadamente 2 mg de ASX y cerca del 35 % de la ingesta diaria recomendada de ácidos grasos ω-3. Este aporte confiere al desarrollo un alto potencial de aplicación como complemento nutracéutico, orientado a la prevención o modulación de procesos inflamatorios crónicos vinculados al desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles.

Palabras clave: Aceite de chía – Astaxantina – Co-encapsulación – *Haematococcus pluvialis* – Emulsiones multicapa – Estabilidad oxidativa

ABSTRACT

The increasing demand for functional foods with well-documented health benefits has stimulated the development of advanced delivery systems for bioactive compounds. Among these, omega-3 fatty acids (ω -3) are essential for cardiovascular and cognitive health. While astaxanthin (ASX), a powerful carotenoid with antioxidant activity, has been extensively studied due to its anti-inflammatory and protective effects in different experimental models, providing strong free radical scavenging capacity and modulation of inflammatory pathways. The combined incorporation of omega-3 and ASX is therefore expected to enhance bioactivity and may represent a promising strategy for the prevention and management of disorders associated with low-grade chronic inflammation. Nevertheless, both compounds are highly sensitive to environmental factors such as light, oxygen, and temperature, which make the design of protective matrices a critical challenge to ensure their stability during processing and storage.

The objective of this work was to develop co-encapsulation systems of chia oil and *Haematococcus pluvialis* extracts (a natural source of ASX). To this end, multilayer emulsions were employed to design the systems, and the solid capsules were obtained through different dehydration methods.

A preliminary study evaluated the stability of chia oil enriched with increasing concentrations of *H. pluvialis* at 25 °C and 40 °C, which enabled the selection of appropriate ASX levels (3200 and 6400 ppm) for subsequent encapsulation.

Oil-in-water (O/W) emulsions containing chia oil were then formulated with different interfacial architectures: monolayer (MC), bilayer (BC), and trilayer (TC), using lecithin,

chitosan, alginate, and maltodextrin as wall materials. MC emulsions were gelled with CaCl_2 and freeze-dried, whereas BC and TC emulsions were spray-dried. The influence of emulsion structure and drying techniques on the oxidative stability of chia oil was assessed. Emulsions were characterized in terms of droplet size, ζ -potential, physical stability, optical microscopy, and rheological behavior, while solid capsules were analyzed for surface morphology (SEM), encapsulation efficiency, moisture content, water activity, dispersibility, solubility, and the evolution of lipid oxidation markers at 25 °C.

From these studies, two systems were selected for co-encapsulation with 6400 ppm ASX: (i) freeze-dried gelled MC emulsions (L-MC/ASX) and (ii) spray-dried BC emulsions (P-BC/ASX). L-MC/ASX particles showed a highly porous structure with internal channels that facilitated lipid oxidation, even in the presence of ASX. Conversely, P-BC/ASX powders exhibited enhanced oxidative stability ($\text{PV} < 15 \text{ meq O}_2/\text{kg oil}$) for up to 6 months at 25 °C, retaining 80% of the initial ASX content.

Calculations indicated that 1.5 g of the functional powder would provide approximately 2 mg of ASX and about 35% of the recommended daily intake of ω -3 fatty acids. This contribution gives the development strong potential as a nutraceutical supplement aimed at preventing or modulating chronic inflammatory processes associated with the onset of non-communicable chronic diseases.

Keywords: chia oil – astaxanthin – co-encapsulation – *Haematococcus pluvialis* – multilayer emulsions – oxidative stability

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	0
1.1. Enfermedades crónicas no transmisibles.....	1
1.1.1. Procesos de inflamación crónica de bajo grado.....	2
1.2. Compuestos bioactivos con propiedades antiinflamatorias	3
1.2.1. Ácidos grasos Omega-3	3
1.2.2. Compuestos antioxidantes	6
1.2.3. Astaxantina	9
1.2.4. Aceite de chía	16
1.2.5. Oxidación lipídica.....	17
1.3. Microencapsulación.....	20
1.3.1. Emulsiones como tecnología de encapsulación de compuestos bioactivos	21
1.3.2. Emulsificantes y materiales de pared.....	22
1.3.3. Interacción entre polielectrolitos de carga opuesta en solución acuosa.....	28
1.3.4. Técnica capa sobre capa.....	30
1.3.5. Técnica de gelificación iónica	31
1.4. Tecnologías de deshidratación de emulsiones.....	32
1.4.1. Secado por aspersión	32
1.4.2. Secado al vacío	34
1.4.3. Liofilización	34
1.5. Aportes de este trabajo de investigación.....	35
2. OBJETIVOS	36
2.1. Objetivo general	37
2.2. Objetivos específicos	37
3. CAPITULO I: Comparación del efecto protector de la astaxantina frente a otros antioxidantes lipofílicos naturales	38
3.1. Materiales y Métodos.....	39
3.1.1. Materiales.....	39

3.1.2.	Mezclas líquidas de aceite de chía y antioxidantes.....	40
3.1.3.	Preparación de microcápsulas en polvo de aceite de chía y antioxidantes.	41
3.1.4.	Caracterización de las microcápsulas en polvo	42
3.1.5.	Análisis Estadístico.....	46
3.2.	Resultados y discusión.....	47
3.2.1.	Obtención de mezclas líquidas y en polvo de aceite de chía y antioxidantes. 47	
3.2.2.	Estabilidad oxidativa de aceite de chía y mezclas de diferentes antioxidantes 52	
3.2.3.	Estabilidad oxidativa de microcápsulas de aceite de chía y diferentes mezclas de antioxidantes.....	58
3.3.	Conclusiones preliminares.....	63
4.	CAPITULO II: Elección de la concentración de astaxantina	65
4.1.	Materiales y Métodos.....	66
4.1.1.	Materiales.....	66
4.1.2.	Composición de ácidos grasos del aceite de chía	67
4.1.3.	Determinación de la concentración de ASX en <i>Haematococcus pluvialis</i> ...	68
4.1.4.	Preparación de mezclas de aceite de chía y <i>Haematococcus pluvialis</i>	68
4.1.5.	Estabilidad oxidativa de las mezclas nutraceuticas durante el almacenamiento.....	69
4.1.6.	Cuantificación de ácido α -linolénico (ALA) durante el almacenamiento	71
4.1.7.	Determinación del porcentaje de retención de ASX	72
4.1.8.	Análisis estadístico.....	72
4.2.	Resultados y discusión.....	73
4.2.1.	Perfil de ácidos grasos del aceite de chía	73
4.2.2.	Estabilidad oxidativa de las mezclas durante el almacenamiento	74
4.2.3.	Retención de ASX en las mezclas almacenadas a diferentes temperaturas	78
4.2.4.	Preservación de ALA en las mezclas de aceite de chía y <i>H. pluvialis</i> almacenadas a 25°C	81
4.3.	Conclusiones preliminares.....	83

5. CAPITULO III: *Formulación y caracterización de emulsiones para encapsular aceite de chía* 85

5.1.	Materiales y Métodos.....	87
5.1.1.	Materiales.....	87
5.1.2.	Formulación de emulsiones para encapsular aceite de chía	87
5.1.3.	Caracterización de emulsiones para encapsular aceite de chía.....	90
5.1.4.	Análisis Estadístico.....	92
5.2.	Resultados y discusión.....	93
5.2.1.	Efecto de los materiales de pared sobre las características fisicoquímicas de las emulsiones	93
5.2.2.	Estabilidad de las emulsiones frente al cremado y a la coalescencia	100
5.2.3.	Efecto de los materiales de pared sobre las características reológicas de las emulsiones	103
5.3.	Conclusiones preliminares.....	111

6. CAPITULO IV: *Obtención y caracterización de encapsulados de aceite de chía* 112

6.1.	Materiales y métodos.....	113
6.1.1.	Materiales.....	113
6.1.2.	Deshidratación de emulsiones	114
6.1.3.	Caracterización de los encapsulados de aceite de chía	115
6.1.4.	Estabilidad oxidativa de los encapsulados	117
6.1.4.1.	Esferas liofilizadas (L-MC).....	118
6.1.4.2.	Polvos secados por aspersion (P-BC y P-TC).....	118
6.1.5.	Análisis estadístico.....	118
6.2.	Resultados y discusión.....	119
6.2.1.	Caracterización morfológica.....	119
6.2.2.	Características fisicoquímicas.....	124
6.2.3.	Estabilidad oxidativa de los encapsulados	131
6.3.	Conclusiones preliminares.....	136

7. CAPITULO V: Estabilidad de co-encapsulados de aceite de chía y astaxantina	137
7.1. Materiales y métodos.....	139
7.1.1. Materiales.....	139
7.1.1. Preparado de <i>Haematococcus pluvialis</i> y obtención de encapsulados	139
7.1.2. Caracterización de emulsiones con <i>H. pluvialis</i>	139
7.1.3. Caracterización de esferas de emulsiones monocapa gelificadas	140
7.1.4. Caracterización de los co-encapsulados con <i>H. pluvialis</i> deshidratados ...	142
7.1.5. Estabilidad oxidativa de los co-encapsulados durante el almacenamiento	143
7.1.6. Estabilidad de la astaxantina durante el almacenamiento	143
7.1.7. Análisis estadístico.....	143
7.2. Resultados y discusión.....	144
7.2.1. Efecto del agregado de <i>H. pluvialis</i> sobre la estabilidad de las emulsiones	144
7.2.2. Efecto del agregado de <i>H. pluvialis</i> sobre las propiedades reológicas de las emulsiones	146
7.2.3. Efecto del agregado de <i>H. pluvialis</i> sobre el comportamiento reológico y la textura de las esferas obtenidas por gelificación de las emulsiones MC	150
7.2.4. Efecto del agregado de <i>H. pluvialis</i> sobre la morfología y las características fisicoquímicas de los co-encapsulados.....	157
7.2.5. Estabilidad oxidativa de los co-encapsulados	163
7.3. Conclusiones preliminares.....	174
8. CONCLUSIONES GENERALES	175
8.1. Conclusiones generales	176
9. REFERENCIAS.....	178

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades crónicas no transmisibles

A nivel mundial, las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) representan una de las principales causas de muerte. Muchas de estas patologías pueden prevenirse mediante la reducción o el control de factores de riesgo comunes, entre los que se destacan los hábitos alimentarios inadecuados, el sedentarismo, el tabaquismo y el consumo de alcohol. Estos factores afectan la salud integral de la población, incrementando las tasas de morbilidad y mortalidad asociadas a estas enfermedades.

Las ECNT representan la principal causa de mortalidad a nivel mundial, siendo responsables de más del 70 % de las muertes globales. Según un reporte de la Organización Mundial de la Salud, provocan anualmente más de 41 millones de fallecimientos, de los cuales aproximadamente 17,9 millones se deben a enfermedades cardiovasculares, 9 millones a cáncer, 3,9 millones a afecciones respiratorias crónicas y 1,6 millones a diabetes. (Organización Mundial de la Salud, 2020).

Este tipo de enfermedades, están directamente vinculadas a la malnutrición por exceso, el consumo elevado de grasas animales, el aumento en la ingesta de sal, el sedentarismo y el uso de sustancias nocivas. Estas condiciones afectan negativamente el estado nutricional y funcional, comprometiendo especialmente la salud de adultos y personas mayores, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Sagñay Llinin & Ocaña Noriega, 2024).

1.1.1. Procesos de inflamación crónica de bajo grado

El avance de la edad se asocia a un aumento en la incidencia de ECNT, en parte debido al incremento del estrés oxidativo y de las respuestas inflamatorias. El estrés oxidativo, caracterizado por un exceso de radicales libres, daña los tejidos y activa mecanismos inflamatorios. A su vez, la inflamación —una respuesta inmediata del organismo ante patógenos, lesiones o radicales libres— puede intensificar el estrés oxidativo, generando un círculo vicioso que contribuye a la progresión de estas patologías. (Seyedsadjadi & Grant, 2020).

Se ha demostrado la existencia de varios fitoquímicos o compuestos bioactivos que pueden prevenir o reducir eficazmente la inflamación crónica, al mismo tiempo proporcionan importantes beneficios antioxidantes (Lu & Yen, 2015). Por ejemplo, la astaxantina (ASX) es un potente carotenoide, que puede encontrarse en algas, como *Haematococcus pluvialis*, levaduras, desechos de crustáceos, bacterias y ciertas plantas, y sus notables propiedades han sido bien documentadas (Martínez-Delgado et al., 2017a; Mota et al., 2022a). Actualmente, existe evidencia sustancial que respalda las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales de ASX en la salud humana (McCall et al., 2018; Park et al., 2010; Singh et al., 2020). Por otro lado, los aceites vegetales son ampliamente utilizados en los alimentos para mejorar su perfil nutricional (Bordón et al., 2023), particularmente aquellos que contienen ácidos grasos omega-3, ya que estos últimos también reducen la inflamación y contribuyen a prevenir enfermedades crónicas (Tortosa-Caparrós et al., 2017).

1.2. Compuestos bioactivos con propiedades antiinflamatorias

1.2.1. Ácidos grasos Omega-3

Los ácidos grasos omega-3 (ω -3) son considerados nutrientes esenciales, ya que participan en numerosos procesos fisiológicos fundamentales y el ser humano carece de las enzimas necesarias para sintetizarlos endógenamente, por lo que deben ser incorporados a través de la dieta. Una ingesta adecuada es fundamental para el funcionamiento normal de las membranas celulares, el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central, así como para el correcto desempeño de múltiples procesos metabólicos y bioquímicos del organismo (Barsky & Blesson, 2020; Geranpour et al., 2020).

El ácido α -linolénico (ALA) es uno de los principales ácidos grasos ω -3 de interés nutricional. Pertenece al grupo de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), ya que posee más de 18 átomos de carbono y presenta varios dobles enlaces en su estructura. Actúa como precursor de los ω -3 de cadena larga, como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (Brosolo et al., 2024). Las recomendaciones de ingesta diaria de ALA varían según la edad, el sexo y las condiciones fisiológicas. Por ejemplo, en adultos sanos, se sugiere un consumo aproximado de 1,6 g/día para hombres y 1,1 g/día para mujeres (Institute of Medicine, 2005).

El ALA posee reconocidas propiedades antiinflamatorias, aunque su eficacia está parcialmente condicionada por su conversión endógena en EPA y DHA, metabolitos con una

acción antiinflamatoria más directa y potente. Uno de los mecanismos a través de los cuales el ALA —o sus derivados— actúan es la activación del receptor GPR120 (FFAR4), presente en células inmunitarias como los macrófagos. Su estimulación reduce la expresión de citocinas inflamatorias como IL-1, IL-6 y proteína C reactiva, lo que contribuye a la modulación de la respuesta inflamatoria sistémica (Brosolo et al., 2024). Además, a partir del ALA se generan oxilipinas y mediadores pro-resolutivos como resolvinas, protectinas y maresinas, que intervienen en la resolución activa de la inflamación mediante efectos antioxidantes y vasoprotectores. Sin embargo, la conversión de ALA en EPA y DHA es limitada y variable entre individuos, lo cual puede afectar la magnitud de sus efectos antiinflamatorios (Fernández-Lázaro et al., 2024; Nassar et al., 2023). A pesar de estas limitaciones, el ALA sigue siendo relevante en el contexto nutricional por su capacidad para modular la inflamación de bajo grado, particularmente cuando se incorpora como parte de un patrón dietético saludable (Balachandar et al., 2023).

1.2.1.1. Desbalance omega-6/omega-3: implicancias estructurales, metabólicas y dietarias

Desde una perspectiva estructural, los ácidos grasos ω -3 se caracterizan por la presencia de un doble enlace en el tercer carbono a partir del extremo metilo de la cadena. El ALA (C18:3), por ejemplo, posee tres dobles enlaces y, mediante una serie de reacciones enzimáticas, puede ser elongado y desaturado para dar lugar a otros compuestos de la misma familia, como el EPA (C20:5) y el DHA (C22:6), tal como se ilustra en la Fig. 1.1.

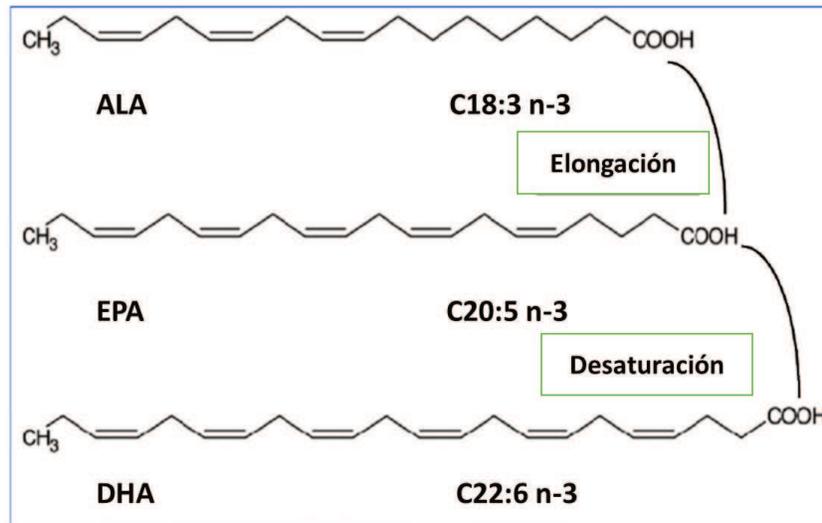


Figura 1.1. Estructura de los ácidos grasos poliinsaturados ω -3 y su formación a partir del ácido alfa-linolénico mediante elongación y desaturación. Adaptación Brosolo (2020)

Los patrones dietéticos occidentales se caracterizan por una elevada ingesta de ácidos grasos omega-6, otro tipo de AGPI esencial, siendo el ácido linoleico (AL) el representante más abundante de esta familia. Tanto el AL como el ALA comparten rutas metabólicas, reguladas por la enzima Δ -desaturasa. No obstante, esta enzima exhibe una mayor afinidad por el ALA, por lo que una ingesta adecuada de dicho precursor puede favorecer la síntesis de eicosanoides con propiedades antiinflamatorias. Se ha establecido una proporción dietética recomendada de ácidos grasos omega-6 y ω -3 en el rango de 1:1 a 5:1. Sin embargo, la predominancia de alimentos ricos en omega-6 y la ingesta insuficiente de omega-3 en la dieta contemporánea dificultan el logro de este equilibrio (Patel et al., 2022; Saini & Keum, 2018).

1.2.2. Compuestos antioxidantes

Los compuestos antioxidantes son sustancias capaces de prevenir o retardar la oxidación, un proceso que puede provocar el deterioro de los alimentos (rancidez, pardeamiento) y generar daño celular en organismos vivos, como la oxidación del ADN, lípidos o proteínas. En términos bioquímicos, se define como antioxidante a toda sustancia que, en bajas concentraciones respecto al sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente su oxidación (Atta et al., 2017; Griffiths et al., 2016).

1.2.2.1. Mecanismos de acción

Los antioxidantes actúan principalmente neutralizando radicales libres, moléculas inestables que originan reacciones en cadena. Esto puede lograrse mediante dos rutas principales:

- **Ruptura de cadena:** detienen la propagación de la oxidación estabilizando radicales libres ya formados. Ejemplos: β -caroteno, vitamina C, vitamina E.
- **Acción preventiva:** evitan la iniciación de la cadena oxidativa, eliminando radicales iniciadores o estabilizando metales de transición como hierro y cobre.

Adicionalmente, los antioxidantes pueden actuar como donadores de electrones (desde grupos hidroxilos o dobles enlaces), agentes quelantes, o inhibidores de oxígeno singlete y peróxidos (Atta et al., 2017; Brewer, 2011).

1.2.2.2. Clasificación de los antioxidantes

Los antioxidantes pueden clasificarse, según su origen, en naturales y sintéticos (Seyedsadjadi & Grant, 2020).

Los antioxidantes sintéticos son obtenidos por síntesis química, utilizados principalmente como aditivos en alimentos para prevenir la oxidación lipídica y prolongar la vida útil de los productos. Entre los más empleados se encuentran el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT), reconocidos por su eficacia como inhibidores de la peroxidación lipídica desde mediados del siglo XX. Otros ejemplos relevantes incluyen la tert-butilhidroquinona (TBHQ), los galatos (propil, octil y dodecil) y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), todos ellos utilizados como agentes antioxidantes o quelantes en alimentos, piensos y productos cosméticos (Gulcin, 2020). Aunque son eficaces a bajas concentraciones, diversos estudios advierten que su uso excesivo puede inducir efectos prooxidantes y plantear riesgos toxicológicos, razón por la cual su empleo está estrictamente regulado por organismos de seguridad alimentaria (Atta et al., 2017).

Por su parte, los antioxidantes naturales comprenden una amplia variedad de compuestos producidos por plantas, animales y microorganismos. Desde el punto de vista funcional, se dividen en enzimáticos y no enzimáticos. Los primeros corresponden a proteínas especializadas que catalizan la neutralización de especies reactivas del oxígeno (ROS); entre ellas se destacan la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, todas involucradas en la defensa antioxidante endógena (Krishnamurthy & Wadhvani, 2012).

En cambio, los antioxidantes no enzimáticos provienen en su mayoría de la dieta y actúan como donadores de electrones o átomos de hidrógeno, estabilizando radicales libres. Este grupo incluye compuestos bien conocidos como la vitamina C (ácido ascórbico), que actúa en medios acuosos y regenera la forma activa de la vitamina E (α -tocoferol), que protege las membranas celulares al interrumpir la peroxidación lipídica. Además, existe una amplia gama de compuestos fenólicos, como los flavonoides, con reconocida capacidad para eliminar radicales libres (Gulcin, 2020).

Dentro de este grupo, los carotenoides merecen especial atención por su alta eficacia antioxidante y su relevancia en aplicaciones funcionales. Se trata de pigmentos lipofílicos ampliamente distribuidos en frutas, verduras, algas y microorganismos, que actúan neutralizando oxígeno singlete y radicales libres mediante sus múltiples dobles enlaces conjugados. Compuestos como el β -caroteno, la luteína y el licopeno han sido asociados a efectos protectores frente a diversas enfermedades crónicas (Griffiths et al., 2016). Entre ellos, destaca la ASX, cuyo perfil antioxidante superior se debe a su estructura molecular, que le permite insertarse en las membranas celulares y ejercer una protección integral, tanto en la superficie como en el núcleo (Ambati et al., 2014).

Si bien los antioxidantes naturales se consideran seguros, su efectividad depende de factores como la estabilidad química, la biodisponibilidad y la dosis. Además, en determinadas condiciones pueden comportarse como prooxidantes, generando radicales libres a través de reacciones tipo Fenton (Griffiths et al., 2016; Seyedsadjadi & Grant, 2020). Por este motivo,

la selección del tipo y la concentración del antioxidante debe hacerse cuidadosamente, especialmente cuando se trata de alimentos funcionales o formulaciones suplementarias.

1.2.3. Astaxantina

1.2.3.1. Estructura química de la astaxantina

La ASX (Fig. 1.2.) es un carotenoide xantofílico perteneciente al grupo de los tetraterpenoides, compuestos caracterizados por una estructura de 40 átomos de carbono y la presencia de grupos oxigenados (Mota et al., 2022b). Su nombre químico es 3,3'-dihidroxi- β,β' -caroteno-4,4'-diona, con una fórmula molecular $C_{40}H_{52}O_4$ y una masa molar de 596.84 g/mol (Ambati et al., 2014; Mularczyk et al., 2020). La molécula posee grupos hidroxilo (-OH) y grupos cetona (C=O) en cada uno de los anillos terminales, mientras que su cadena central de polieno presenta enlaces dobles conjugados, los cuales son responsables de su coloración rojiza (Martínez-Delgado et al., 2017a).

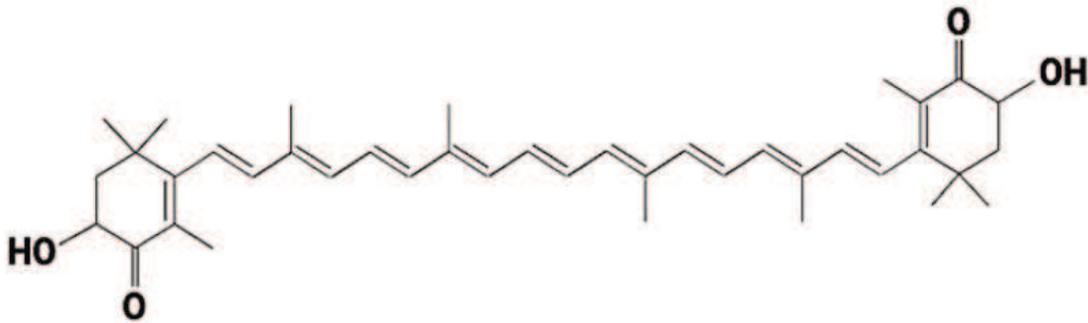


Figura 1.2. Estructura química de astaxantina (Galarza et al., 2023).

La actividad antioxidante de la ASX se atribuye no solo a la conjugación de sus dobles enlaces, sino también a su disposición singular dentro de la membrana celular. Esta particular ubicación le confiere la capacidad de neutralizar radicales libres tanto en el espacio comprendido entre la bicapa de fosfolípidos como en las superficies intra y extracelulares de la membrana (Zhao et al., 2019).

1.2.3.2. Fuentes principales de astaxantina

Las fuentes de ASX pueden clasificarse en naturales y sintéticas, cada una con características estructurales, funcionales y aplicaciones particulares (Ambati et al., 2014; Mota et al., 2022b).

Entre las fuentes naturales, las microalgas se destacan por su alta capacidad de biosíntesis de este carotenoide. *Haematococcus pluvialis* es reconocida como la fuente más rica y eficiente, ya que puede acumular hasta un 5% de ASX en peso seco bajo condiciones de estrés, como alta intensidad lumínica, deficiencia de nitrógeno o salinidad elevada (Ahmed et al., 2015). Esta microalga sintetiza principalmente el estereoisómero (3S, 3'S), y la mayor parte de la ASX que produce se encuentra en forma esterificada con ácidos grasos como oleico, palmítico, linoleico, esteárico y linolénico, lo que le confiere mayor estabilidad y funcionalidad antioxidante (Mularczyk et al., 2020). Durante la fase roja de su ciclo de vida, la ASX puede representar hasta el 99% del contenido total de carotenoides de la célula, acumulándose en

gotas lipídicas intracelulares (Ambati et al., 2014). Otras microalgas capaces de producir ASX, aunque en menor proporción, son *Chlorella zofingiensis* y *Chlorococcum* (Mota et al., 2022b). Las levaduras también representan una fuente viable, especialmente *Xanthophyllomyces dendrorhous*, que produce el estereoisómero (3R, 3'R) en su forma libre. Esta levadura ha sido utilizada principalmente en biotecnología para la obtención de ASX destinada a la industria alimentaria y de acuicultura. También se han identificado capacidades biosintéticas en otras levaduras como *Yarrowia lipolytica*, aunque con menores rendimientos (Ahmed et al., 2015; X. Li et al., 2020).

En el ámbito bacteriano, especies como *Paracoccus carotinifaciens*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Brevibacterium spp.* y *Bacillus circulans* han mostrado la capacidad de sintetizar ASX. No obstante, su aprovechamiento a nivel industrial aún está en desarrollo, debido a limitaciones en la productividad o en la escalabilidad de los procesos (Martínez-Delgado et al., 2017b; Mota et al., 2022b).

Algunas plantas superiores, como las del género *Adonis*, también contienen ASX, aunque su concentración es baja y su uso comercial es limitado (Ahmed et al., 2015).

En el reino animal, la ASX se encuentra ampliamente distribuida en especies marinas. El salmón y la trucha deben su coloración característica a este pigmento, que en estos peces se encuentra en forma libre, principalmente como el isómero (3S, 3'S). En el krill antártico (*Euphausia superba*), la ASX aparece mayoritariamente esterificada y en la forma (3R, 3'R), similar a lo observado en otras especies de crustáceos como camarones, cangrejos,

copépodos y langostas. La proporción entre formas libres, monoésteres y diésteres varía según la especie, el hábitat y la dieta (Ma et al., 2022a; Singh et al., 2020).

En contraste, la ASX sintética se obtiene mediante síntesis química a partir de precursores petroquímicos. Esta forma representa alrededor del 95% de la producción mundial y se comercializa principalmente para su uso en piensos para acuicultura, especialmente en salmónidos. La ASX sintética es una mezcla racémica de los isómeros (3S, 3'S), (3R, 3'S) y (3R, 3'R), en una proporción de 1:2:1 (Figura 1.3.), y se presenta exclusivamente en forma no esterificada. Sin embargo, su capacidad antioxidante es menor que la de las formas naturales, y no está aprobada para el consumo humano directo debido a preocupaciones relacionadas con residuos químicos derivados de su síntesis (Ahmed et al., 2015; X. Li et al., 2020; Mota et al., 2022b; Mularczyk et al., 2020).

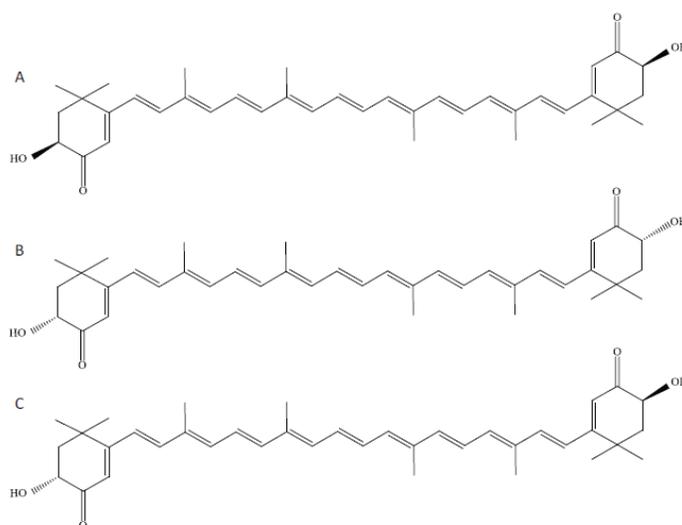


Figura 1.3. Estructura de los diferentes estereoisómeros de la molécula de ASX. 3S,3'S (A), 3R,3'R (B) y 3R,3'S (C).

En conjunto, las microalgas, como *Haematococcus pluvialis* continúan siendo las fuentes más prometedoras de ASX natural, tanto por su alta productividad como por la calidad del compuesto producido, lo que la posiciona como el estándar de referencia en aplicaciones nutricionales, cosméticas y farmacéuticas.

1.2.3.3. Estudios clínicos en humanos con astaxantina

Debido a sus propiedades excepcionales, la ASX ha captado la atención de numerosos investigadores en los últimos años. Su bioactividad ha sido objeto de extensos estudios, tanto en entornos controlados de laboratorio (*in vitro*) como en organismos vivos (*in vivo*), incluyendo ensayos en animales y humanos (Donoso et al., 2021). A continuación, se presenta una síntesis de los principales ensayos clínicos en humanos publicados en los últimos quince años que evaluaron los efectos de la ASX sobre diversos parámetros fisiológicos.

- Seguridad y biodisponibilidad: revisiones y metaanálisis recientes confirman la seguridad de la ASX en las dosis clínicamente evaluadas (Ma et al., 2022).
- Estrés oxidativo e inflamación: estudios recientes respaldan las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de la ASX. Un metaanálisis de Ma et al., (2022) mostró reducciones significativas en biomarcadores de estrés oxidativo e inflamación, como el malondialdehído, los isoprostanos y la interleucina-6, especialmente en personas con sobrepeso y diabetes tipo 2. Ensayos individuales complementan estos

hallazgos: Choi et al. (2011) reportaron mejoras en lípidos séricos; Petyaev et al., (2018) observaron una disminución en malondialdehído. Asimismo, Park et al. (2010) realizaron un estudio controlado en mujeres jóvenes sanas y reportaron que la dosis de 2 mg de ASX diaria promovió reducción significativa en los biomarcadores de daño oxidativo al ADN.

- Salud cardiovascular: diversos estudios han revelado efectos beneficiosos de la suplementación en el manejo de dislipidemias y diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). Yoshida et al. (2010) demostraron que dosis de 6 a 18 mg/día durante 12 semanas incrementaron significativamente el HDL y la adiponectina, además de reducir los triglicéridos en pacientes con dislipidemia leve. Por su parte, Chan et al. (2019) observaron en pacientes con DMT2 una atenuación de marcadores de inflamación y de riesgo trombótico tras 8 semanas de suplementación (6 o 12 mg/día).

Existen numerosos trabajos que han registrado buenos resultados de la utilización de ASX con fines médicos como, por ejemplo, en salud cognitiva y neuroprotección (Katagiri et al., 2012; Nakagawa et al., 2011), en salud ocular (Hashimoto et al., 2013; Sekikawa et al., 2023), beneficios en la piel (Ito et al., 2018; Tominaga et al., 2017; Yoon et al., 2014). Adicionalmente, Park et al. (2010) reportaron también un impacto positivo en la función inmunológica.

Por último, la ASX es un antioxidante con notable potencial antitumoral, demostrado tanto en estudios *in vitro* como en modelos animales. Su acción se basa en la reducción del estrés oxidativo, la protección del ADN, la modulación de la inflamación y el fortalecimiento de la

respuesta inmune. Su capacidad para integrarse en las membranas celulares la hace especialmente eficaz en la neutralización de radicales libres (Galarza et al., 2023).

En estudios *in vitro*, ha inhibido la proliferación y migración de células tumorales en cáncer de mama, promoviendo la apoptosis y deteniendo el ciclo celular (McCall et al., 2018).

En modelos animales, se ha observado que la ASX previene la carcinogénesis en colon, vejiga, cavidad oral y mama (Galarza et al., 2023). En ratones con cáncer de mama, su administración antes de la iniciación tumoral prolongó la latencia y redujo el crecimiento del tumor (Nakao et al., 2010).

La ASX natural, especialmente la derivada de *Haematococcus pluvialis* (isómero 3S, 3S'), es la más eficaz para aplicaciones humanas debido a su mayor biodisponibilidad (Mota et al., 2022).

Por todo lo mencionado, la ASX se presenta como un agente prometedor en la prevención y apoyo al tratamiento del cáncer, gracias a sus múltiples mecanismos de acción y los resultados positivos observados en investigaciones preclínicas. Siendo la *H. pluvialis* (Fig. 1.4.) una excelente alternativa de administración de este bioactivo.



Figura 1.4. Vista macroscópica de *H. pluvialis* deshidratada

1.2.4. Aceite de chía

La chía (*Salvia hispanica*), es una planta herbácea anual de la familia *Lamiaceae*, y sus semillas contienen entre un 32 y 39 % de aceite, con un 61–70 % de ALA, el mayor contenido de ω -3 conocido en fuentes vegetales (Bordón et al., 2019).

A pesar de su perfil lipídico altamente beneficioso, el aceite de chía presenta una baja estabilidad oxidativa y una vida útil limitada, especialmente cuando se obtiene por prensado. Esto se debe, en parte, a su limitada capacidad antioxidante, ya que la mayoría de los compuestos fenólicos presentes en la semilla son de naturaleza hidrofílica (Marineli et al., 2014). La exposición al aire, la luz o el calor de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en el aceite de chía favorece reacciones de oxidación que generan sabores desagradables, olores rancios, decoloración y otros signos de deterioro (Bodoira et al., 2017). Estas reacciones también producen especies reactivas de oxígeno capaces de dañar irreversiblemente

moléculas biológicas como el ADN, las proteínas y los lípidos, tal y como se detalló anteriormente. Por lo tanto, la oxidación lipídica afecta negativamente tanto la calidad de los alimentos como la salud humana, lo que resalta la necesidad de mejorar la estabilidad oxidativa de los productos lipídicos (Bordón et al., 2019).

1.2.5. Oxidación lipídica

Como se mencionó previamente, cuando los aceites ricos en AGPI son expuestos a ciertos factores medioambientales, se promueven reacciones de oxidación en cadena dando como resultado el deterioro del producto, debido a una palatabilidad deficiente y consecuentemente la pérdida de la calidad (McClements et al., 2007). Estos factores limitan su uso en alimentos, ya que podrían tener un efecto negativo en las características sensoriales (*off-flavors*) y nutricionales del producto final. La oxidación lipídica representa un desafío en la producción, transporte y almacenaje de alimentos enriquecidos con AGPI (Espinaco et al., 2023).

El proceso de oxidación lipídica comprende un conjunto de reacciones químicas complejas, y puede ser iniciado por diferentes mecanismos, entre los que destacan la acción de radicales libres, la presencia de metales de transición –que actúan como catalizadores– y la exposición a la luz ultravioleta. La presencia de varios dobles enlaces en la estructura de los AGPI es lo que los hace especialmente vulnerables a este tipo de reacciones (Shahidi & Zhong, 2010).

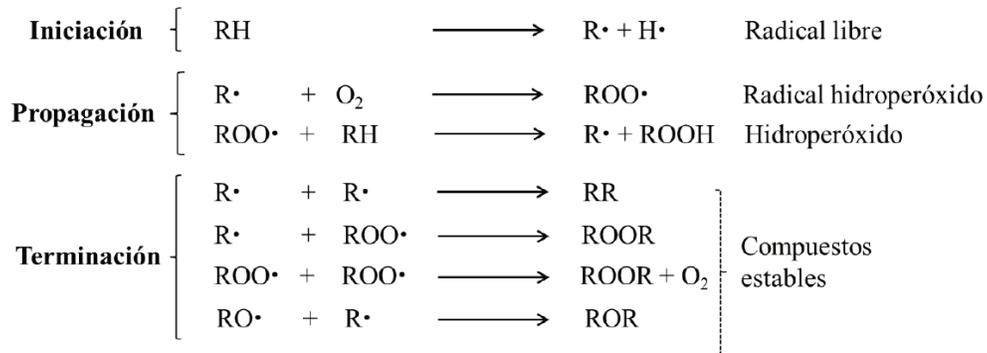


Figura 1.5. Etapas de la reacción de autooxidación lipídica.

La autooxidación es la forma más común de oxidación lipídica y consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Fig. 1.5). Comienza cuando un átomo de hidrógeno, ubicado junto a un doble enlace en un ácido graso (RH), es abstraído por acción de luz UV, calor o metales de transición, generando un radical alquilo (R•). Este reacciona con oxígeno formando un radical peroxilo (ROO•), que a su vez extrae un hidrógeno de otro ácido graso insaturado, produciendo un hidroperóxido (ROOH) y un nuevo radical alquilo, perpetuando la cadena (Laguerre et al., 2020). La reacción finaliza cuando dos radicales se combinan entre sí (Endale et al., 2023).

Cabe destacar que, durante la primera etapa de oxidación de los lípidos, se forman “compuestos primarios de oxidación” llamados hidroperóxidos, cuya concentración va aumentando gradualmente a medida que transcurre el tiempo, hasta alcanzar un máximo (Fig. 1.6.).

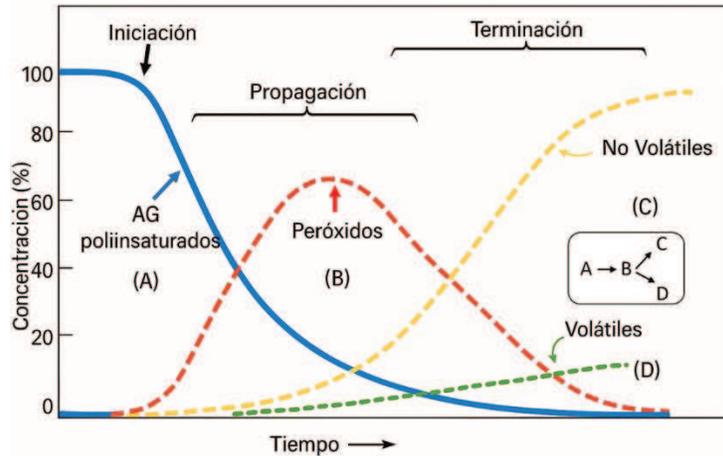


Figura 1.6. Autooxidación hipotética de un lípido poliinsaturado en función del tiempo
(Adaptado de Sampels, 2013).

Estos compuestos primarios se detectan mediante la reacción del índice de peróxidos (IP). Luego, la concentración de hidroperóxidos comienza a disminuir, ya que éstos se degradan para dar lugar a los llamados “compuestos secundarios” de la reacción oxidativa (aldehídos, cetonas, hidrocarburos), los cuales son los responsables de los aromas y sabores desagradables desarrollados en los alimentos rancios (Mansouri, 2020). Estos compuestos secundarios son los que se detectan mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Dado lo expuesto, resulta fundamental proteger los ácidos grasos insaturados frente a la oxidación, ya que ésta no solo compromete su valor nutricional, sino que también puede generar compuestos potencialmente nocivos. Para mitigar estos efectos, es clave aplicar estrategias tecnológicas y desarrollar ingredientes funcionales que mejoren la estabilidad de los alimentos que los contienen.

1.3. Microencapsulación

Como se señaló previamente, tanto los ácidos grasos ω -3 como la ASX son compuestos sensibles a la degradación cuando se exponen a factores ambientales como el oxígeno, la luz, la humedad y el calor. Esta vulnerabilidad es compartida por la mayoría de los compuestos bioactivos de naturaleza lipofílica y representa uno de los principales obstáculos para su incorporación en matrices alimentarias.

Durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos, estos compuestos suelen estar expuestos a condiciones adversas que comprometen su estabilidad y pueden dar lugar a la formación alteraciones organolépticas desfavorables. Además, al atravesar el tracto gastrointestinal, pueden sufrir transformaciones estructurales que afecten tanto su estabilidad como su bioactividad. A esto se suma su escasa solubilidad en agua, lo cual dificulta su incorporación en productos alimenticios de base acuosa (Alu'datt et al., 2022; Đorđević et al., 2015).

Ante este panorama, la encapsulación surge como una herramienta eficaz, ya que permite mejorar la solubilidad de los compuestos bioactivos lipofílicos y protegerlos frente a condiciones ambientales adversas. Este proceso consiste en recubrir un material central — ya sea líquido, sólido o gaseoso— con una matriz de recubrimiento que lo aísla del entorno (Zabot et al., 2022). En el caso de aplicaciones alimentarias, el núcleo suele estar constituido por el compuesto bioactivo, mientras que los materiales de pared están formados, en

general, por polímeros de grado alimentario, principalmente proteínas y/o polisacáridos (Alu'datt et al., 2022).

Existen diversas técnicas para encapsular compuestos bioactivos en alimentos, como el secado por aspersion, la liofilización, la coacervación compleja y la gelificación iónica. La elección del método y del material de pared —generalmente proteínas, carbohidratos o lípidos de grado alimenticio— depende del compuesto y su aplicación. Ambos factores influyen en la estabilidad, bioactividad y biodisponibilidad del bioactivo encapsulado (Alu'datt et al., 2022).

1.3.1. Emulsiones como tecnología de encapsulación de compuestos bioactivos

Las emulsiones son uno de los sistemas más utilizados para encapsular compuestos bioactivos lipofílicos. Consisten en la mezcla de dos líquidos inmiscibles —generalmente aceite y agua— donde uno se dispersa en forma de pequeñas gotas (fase dispersa) dentro del otro (fase continua). Los dos tipos principales son: (i) emulsiones aceite en agua (O/W, por sus siglas en inglés *oil-in-water*), en las que las gotas de aceite se dispersan en una fase acuosa continua; y (ii) emulsiones agua en aceite (W/O, por *water-in-oil*), donde las gotas de agua se dispersan en una fase continua oleosa (Chung & McClements, 2015).

Entre los sistemas más utilizados para la encapsulación de compuestos bioactivos lipofílicos se encuentran las emulsiones multicapas y las partículas de hidrogel rellenas, ya que ofrecen

ventajas significativas en términos de protección, liberación controlada y estabilidad del compuesto encapsulado.

En este trabajo, se exploraron dos alternativas: (i) emulsiones multicapas que están formadas por pequeñas gotas de aceite dispersas en un medio acuoso, cada una de las cuales está rodeada por una pared compuesta por un agente emulsificante y una o varias capas sucesivas de biopolímeros. Y, (ii) partículas de hidrogel rellenas, las cuales consisten en gotas de aceite atrapadas dentro de una matriz de hidrogel —formada generalmente por proteínas y/o polisacáridos— que se dispersa en una fase acuosa (L. Zhang et al., 2019). Ambos sistemas serán abordados en mayor profundidad en los apartados siguientes.

1.3.2. Emulsificantes y materiales de pared

1.3.2.1. Lecitinas

La inmiscibilidad de los líquidos que componen las emulsiones, las hace un sistema termodinámicamente inestable, por lo que es imprescindible la incorporación de emulsionantes: compuestos que se posicionan en la interfase y reducen la tensión superficial entre ambas fases (Rayees et al., 2024).

Actualmente, la industria alimentaria busca reemplazar los emulsionantes sintéticos por alternativas de origen natural. Entre los agentes emulsionantes naturales más utilizados para la producción de emulsiones alimentarias se encuentran los fosfolípidos, las proteínas y los polisacáridos. Los fosfolípidos (Fig. 1.7.), moléculas anfifílicas capaces de adsorberse en la

interfaz aceite-agua, son ampliamente valorados por su funcionalidad emulsificante (Julio et al., 2018).

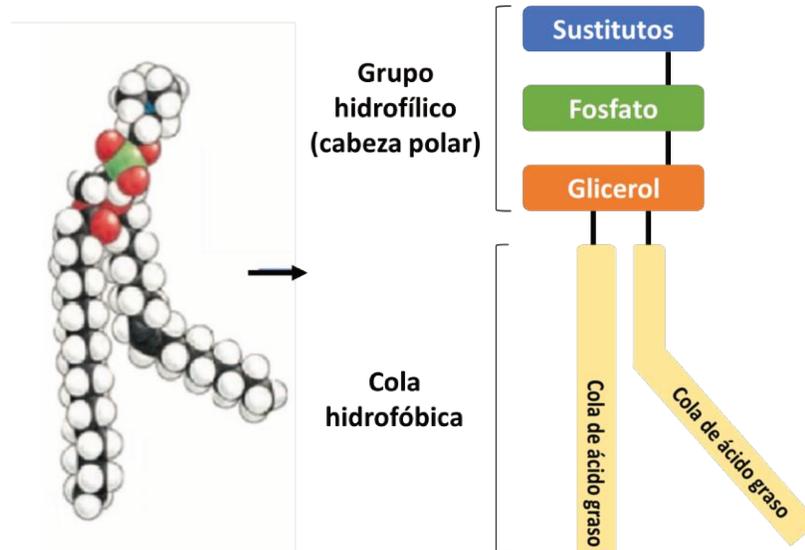


Figura 1.7. Estructura química de fosfolípidos que componen las lecitinas. Adaptado de (Thy et al., 2025).

En este contexto, una excelente alternativa de fosfolípido natural con propiedades emulsionantes es la lecitina, la más utilizada es la de soja (LS). Está compuesta principalmente por fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), con una cabeza polar hidrofílica y dos colas hidrofóbicas de ácidos grasos saturados o insaturados. Esta estructura le permite actuar como un potente emulsionante, que facilitan la mezcla homogénea de ingredientes hidrofílicos e hidrofóbicos. La proporción y tipo de ácidos grasos de la fase oleosa influyen en

la estabilidad y fluidez de las bicapas, siendo las insaturaciones clave para mejorar la emulsificación y permeabilidad, mientras que los ácidos grasos saturados aportan rigidez y estabilidad (Moran-Valero et al., 2017; Thy et al., 2025; M. Wang et al., 2021).

Según Ogawa et al. (2004) el grupo fosfato aniónico presente en la lecitina posee un valor de pKa cercano a 1,5. Esto implica que, a medida que el pH disminuye, la ionización de estos grupos se reduce. En consecuencia, la cantidad de grupos cargados negativamente en las moléculas de lecitina disminuye a pH más bajos. Contrariamente, a pHs más cercanos a la neutralidad, la lecitina tendrá mayor densidad de carga negativa.

1.3.2.2. Quitosano

Además de la lecitina, el quitosano (CHT) representa otro biopolímero de gran interés por sus funcionalidades complementarias en formulaciones alimentarias y farmacéuticas. Este polímero natural ha cobrado relevancia gracias a sus destacadas propiedades fisicoquímicas y biológicas (Jiménez-Gómez & Cecilia, 2020). Es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa, se obtiene mediante un proceso de desacetilación alcalina de la quitina (Fig. 1.8.) La cual proviene principalmente del exoesqueleto de crustáceos y e ciertos hongos (Khutoryanskiy, 2014). El grado de desacetilación, idealmente superior al 85 %, junto con su peso molecular, determina muchas de sus funcionalidades (F. Zhang et al., 2021).

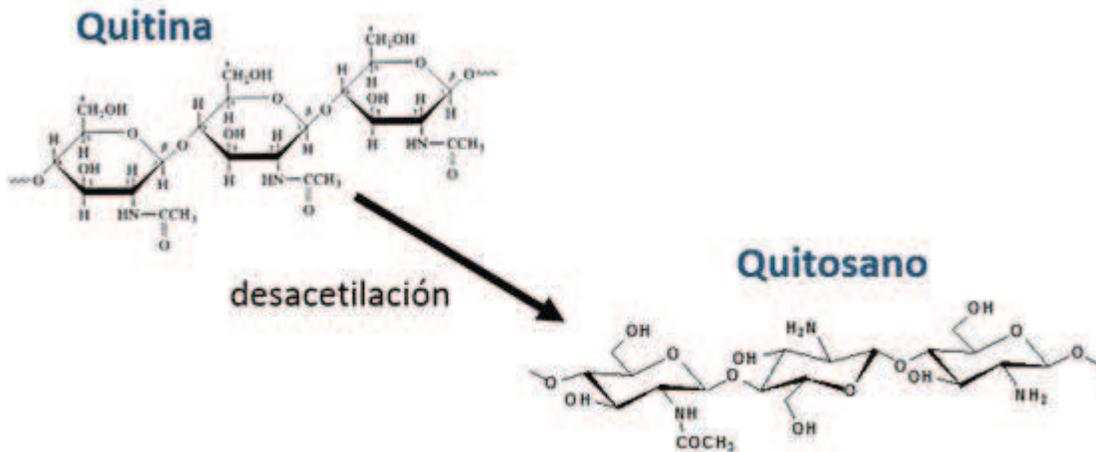


Figura 1.8. Quitosano, polímero obtenido por desacetilación de la quitina

Desde el punto de vista fisicoquímico, el CHT es una base débil con un pKa entre 6,3 – 6,5. Como se muestra en la Fig. 1.9., es soluble en medios ácidos ($\text{pH} < 6$), donde los grupos amino se protonan, volviéndose un polielectrolito catiónico; por encima de ese pH, se desprotona y precipita (Klinkesorn & McClements, 2009). Posee alta viscosidad, capacidad para formar enlaces de hidrógeno y para adsorberse en interfaces, reduciendo la tensión interfacial. Además, puede formar complejos con iones metálicos, actuar como floculante y procesarse en diversas formas físicas (películas, geles, nanopartículas, entre otros), lo que amplía su versatilidad (Jiménez-Gómez & Cecilia, 2020).

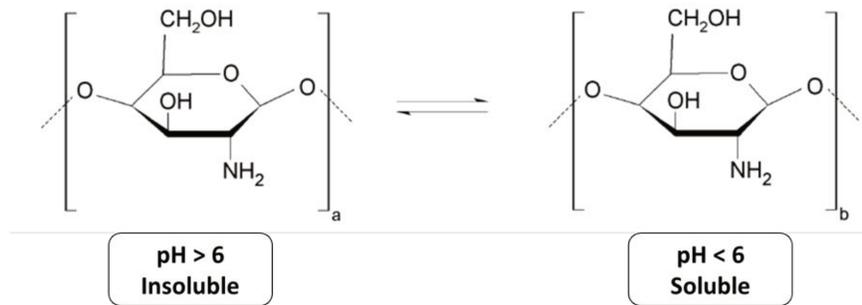


Figura 1.9. Estructura química del CHT en función del pH: insoluble ($\text{pH} > 6$) y soluble ($\text{pH} < 6$). Adaptado de Jiménez-Gómez & Cecilia, (2020)

1.3.2.3. Alginatos

El alginato (ALG) es un polisacárido aniónico ampliamente utilizado como material de pared en sistemas de encapsulación, gracias a su capacidad para formar películas, geles y redes poliméricas. Su versatilidad lo convierte en un ingrediente clave en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Shi et al., 2023).

El ALG es un polisacárido natural extraído de algas marinas pardas, constituido por unidades repetidas de ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G), enlazadas por uniones glucosídicas. Estas unidades se organizan en bloques de homopolímeros (M-M o G-G) y heteropolímeros (M-G), cuya proporción varía según la especie de alga de origen. Esta composición estructural influye de manera determinante en las propiedades fisicoquímicas y funcionales del biopolímero (Bennacef et al., 2021; D. Li et al., 2021).

La gelificación del ALG en presencia de iones Ca^{2+} , se da principalmente a través de sus unidades G. Para entender cómo se forma este gel, se utiliza un modelo conocido como “caja de huevos” (Cao et al., 2020). El cual involucra tres pasos:

1. **Primer contacto:** los iones Ca^{2+} se unen a unidades individuales de G en una cadena de ALG, formando uniones simples llamadas *monocomplejos*.
2. **Formación del gel:** los iones de calcio conectan varias cadenas de ALG al unirse a bloques de G que están cerca unos de otros. Esta unión entre cadenas forma una estructura ordenada y fuerte, parecida a cómo los huevos se colocan en una caja — de ahí el nombre “caja de huevos” (Fig. 1.10.).
3. **Estructura más grande:** luego, estas cadenas entrecruzadas pueden seguir uniéndose lateralmente, creando una red tridimensional más amplia y resistente, es decir, el gel final.

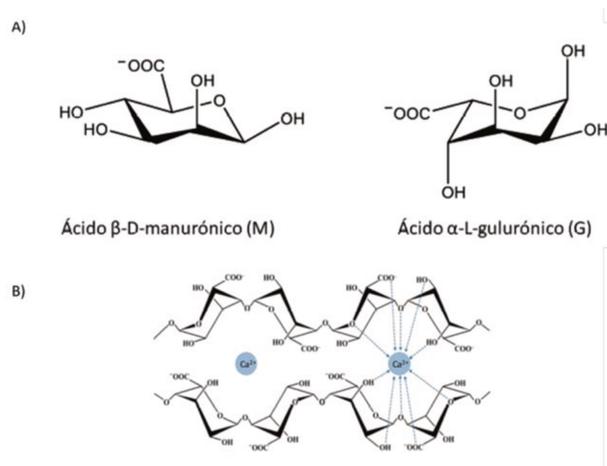


Figura 1.10. A) Estructuras químicas de las unidades M y G. B) Interacción entre el alginato y los iones Ca^{2+} , conforme al modelo de caja de huevos (Martău et al., 2019).

En esta red, los iones Ca^{2+} funcionan como *puentes* que unen las diferentes cadenas de ALG, dando lugar a un hidrogel estable.

El ALG es un polisacárido aniónico cuya carga negativa proviene de sus grupos carboxilo. Su pK_a es de aproximadamente 3,5, lo que implica que, a este valor de pH, la mitad de los grupos carboxílicos están en su forma protonada (neutra) y la otra mitad en su forma desprotonada (negativa) (Shi et al., 2023). Esta carga varía según el pH del medio debido a la protonación o desprotonación de dichos grupos.

Además, su alta densidad de carga permite que el ALG sea efectivo a bajas concentraciones, lo que lo convierte en un polímero útil para estabilizar emulsiones y formar geles en sistemas alimentarios y farmacéuticos (Shi et al., 2023).

1.3.3. Interacción entre polielectrolitos de carga opuesta en solución acuosa

Cuando se mezcla un conjunto de macromoléculas en solución, pueden establecerse entre ellas interacciones de carácter sinérgico o antagónico, capaces de modificar sus propiedades funcionales. Comprender el origen y la naturaleza de estas interacciones resulta fundamental para el diseño de nuevas estructuras en matrices alimentarias.

La magnitud de las interacciones en un sistema determinado depende tanto del tipo de macromolécula involucrada (peso molecular, densidad de carga en función del pH,

flexibilidad, hidrofobicidad), como de la composición del medio circundante (pH, fuerza iónica) y de factores externos, como la temperatura (McClements, 2006).

Cuando dos macromoléculas coexisten en solución, pueden manifestarse fenómenos de interacción de distinta naturaleza. Estas interacciones pueden ser segregativas, cuando las macromoléculas se repelen y generan una incompatibilidad termodinámica, o asociativas, cuando se atraen y forman complejos (Weinbreck, 2004).

En el caso de interacciones atractivas —frecuentemente electrostáticas, cuando las macromoléculas presentan densidades de carga opuestas—, dependiendo de la concentración relativa de los componentes y del pH, pueden originarse complejos solubles o producirse una separación de fases asociativa. Este último fenómeno, conocido como coacervación compleja, fue descrito por Bungenberg de Jong en 1949 y se caracteriza por la formación de dos fases: una inferior, enriquecida en complejos, y otra superior, constituida principalmente por solvente (Weinbreck, 2004).

Por el contrario, cuando predominan interacciones repulsivas —por ejemplo, en sistemas donde las macromoléculas presentan grupos con la misma carga eléctrica—, el comportamiento puede variar según la concentración. En soluciones diluidas, las macromoléculas pueden permanecer cosolubles, ya que la entropía de mezclado predomina y el sistema se mantiene como una única fase homogénea. Sin embargo, al aumentar la concentración, el sistema puede volverse inestable y experimentar una separación de fases segregativa, resultado de la incompatibilidad termodinámica. En este escenario, la repulsión

estérica conduce a la formación de una mezcla bifásica compuesta por fases enriquecidas en cada uno de los componentes (Weinbreck, 2004).

1.3.4. Técnica capa sobre capa

Las emulsiones del tipo aceite en agua (O/W) presentan una alta susceptibilidad a la inestabilidad física y química cuando se someten a condiciones ambientales adversas, como variaciones de temperatura (calor, refrigeración o congelación), procesos de secado, o cambios en el pH y fuerza iónica. Esta vulnerabilidad se debe a que las gotas de aceite están recubiertas únicamente por una delgada capa de biopolímeros, lo que limita su capacidad de resistencia frente a estos factores (Guzey & McClements, 2006). Una estrategia efectiva para mejorar la estabilidad de estas emulsiones es la utilización de la técnica de deposición electrostática capa por capa (Layer-by-Layer, LBL). Esta técnica consiste en la adsorción secuencial de polielectrolitos con cargas opuestas sobre la superficie de las partículas lipídicas, aprovechando la atracción electrostática para formar capas estables que mejoran la protección y estabilidad de la emulsión (Copado et al., 2021).

La capa inicial de una emulsión multicapa puede estar constituida por emulsificantes, como las lecitinas y las capas externas, por lo general, se forman con biopolímeros de carga opuesta, como el CHT (Julio et al., 2018).

El pH afecta la ionización de los polímeros, influyendo directamente en la formación de capas y en el potencial zeta de las emulsiones. Por ello, es fundamental seleccionar un pH óptimo

que prevenga la aglomeración de las gotas y garantice la estabilidad del sistema (Fioramonti et al., 2019).

1.3.5. Técnica de gelificación iónica

La gelificación iónica es una técnica ampliamente utilizada para la inmovilización y encapsulación de compuesto bioactivos dentro de matrices poliméricas. Este proceso aprovecha la capacidad de ciertos biopolímeros, como el ALG, para formar estructuras tridimensionales estables mediante su interacción con iones metálicos divalentes, como el calcio (Ca^{2+}), lo que da lugar a la formación de un gel ordenado y resistente (Blandino et al., 1999; L. Li et al., 2019). Estos geles, conocidos como hidrogeles, se caracterizan por su alta capacidad de retención de agua, debido a la naturaleza hidrofílica de las cadenas poliméricas entrecruzadas (Abaee et al., 2017). Al formar una red semisólida, los hidrogeles no solo estabilizan emulsiones al inmovilizar las gotas lipídicas, sino que también actúan como sistemas protectores de compuestos bioactivos frente a condiciones externas adversas. Además, permiten una liberación controlada de dichos compuestos en función de estímulos específicos como cambios de temperatura o pH (Farjami & Madadlou, 2019).

La obtención de partículas de hidrogel con núcleo activo suele realizarse mediante la formación de una emulsión, seguida por la gelificación del polímero, cuyo mecanismo depende del material empleado. Un método ampliamente utilizado es la inyección o

extrusión de una solución polimérica con compuestos bioactivos emulsionados en un medio gelificante compatible con el polímero (Z. Zhang et al., 2015).

Por su simplicidad operativa y versatilidad, esta metodología se ha establecido como una plataforma prometedora para diseñar sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos.

1.4. Tecnologías de deshidratación de emulsiones

1.4.1. Secado por aspersión

El secado por aspersión es una técnica ampliamente utilizada para la microencapsulación de aceites, que consiste en transformar una emulsión líquida en un polvo seco mediante la pulverización en una cámara calentada (Rahim et al., 2022). En la Fig. 1.11. se muestra un esquema del secador por aspersión utilizado para llevar a cabo esta técnica.

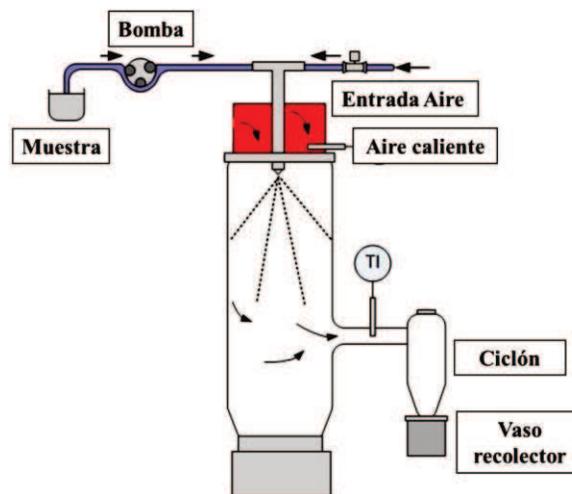


Figura 1.11. Esquema de un secador spray.

En este proceso, se formula una emulsión que vehiculiza el aceite de interés, la cual es posteriormente atomizada, permitiendo la rápida evaporación del agua. Como resultado, el aceite queda encapsulado en una matriz sólida que protege sus componentes bioactivos de la oxidación y otros factores ambientales (Kandasamy & Naveen, 2022). El secado por aspersión es una técnica ampliamente utilizada en la industria alimentaria debido a su bajo costo, flexibilidad y facilidad de escalado industrial. Permite transformar líquidos en polvo en un solo paso, lo que simplifica la producción y reduce los costos asociados al transporte y almacenamiento, gracias a la mayor estabilidad del producto final (Kandasamy & Naveen, 2022). En el caso de los aceites, esta transformación no solo mejora su estabilidad y vida útil, sino que también facilita su manipulación y su incorporación en productos alimenticios, al aumentar su solubilidad y dispersabilidad (Pu et al., 2011). Además, el proceso posibilita la valorización de subproductos al generar ingredientes de alto valor agregado, y permite un control preciso sobre características físicas del polvo, como el tamaño y la morfología (Kandasamy & Naveen, 2022; Pu et al., 2011; Rahim et al., 2022).

Aunque presenta algunas limitaciones, como pérdidas por acumulación de polvo en el equipo o posible degradación térmica, su eficiencia y versatilidad lo convierten en una herramienta clave para la encapsulación de aceites en diversas aplicaciones (Kandasamy & Naveen, 2022).

1.4.2. Secado al vacío

El secado al vacío es una tecnología ampliamente utilizada en las industrias farmacéutica, química, alimentaria y biotecnológica para deshidratar materiales sensibles al calor. Este proceso se basa en la evaporación del agua a bajas presiones, lo que permite reducir significativamente la temperatura de secado. El calor se transfiere de forma indirecta, ya sea por contacto con superficies metálicas o por radiación, lo que evita daños térmicos en productos delicados (Bazyma y Kutovoy, 2005).

Entre sus principales ventajas, el secado al vacío permite preservar compuestos termosensibles y prevenir la oxidación. Comparado con el secado atmosférico, ofrece un secado más rápido y eficiente debido a la reducción del punto de ebullición y una mayor diferencia térmica entre el medio de calentamiento y el producto (Akdaş & Başlar, 2015). Es por esto que, el secado al vacío representa una alternativa eficiente para conservar la integridad de compuestos termosensibles.

1.4.3. Liofilización

La liofilización es una técnica ampliamente utilizada para encapsular compuestos sensibles, basada en la deshidratación por sublimación de muestras previamente congeladas (Fioramonti et al., 2015). Al eliminar el agua directamente del estado sólido al gaseoso, preserva la integridad de sustancias termosensibles. A diferencia de otros métodos, evita la exposición a altas temperaturas, lo que la hace especialmente adecuada para la

microencapsulación de compuestos bioactivos. Los productos obtenidos son fácilmente reconstituibles y, al requerir pocas etapas, el proceso se considera relativamente simple. Sin embargo, su principal desventaja es el alto costo (Pudziuelyte et al., 2020).

1.5. Aportes de este trabajo de investigación

Teniendo en cuenta el creciente aumento de las enfermedades crónicas no transmisibles y su estrecha relación con procesos de inflamación crónica de bajo grado, este trabajo propone el diseño de un ingrediente funcional innovador y de grado alimenticio, a partir de la co-encapsulación de aceite de chía (fuente vegetal rica en ácidos grasos ω -3) y la microalga *Haematococcus pluviialis* (fuente natural de ASX, uno de los antioxidantes más potentes que se conocen).

Ambos componentes, estudiados previamente por separado, han demostrado propiedades antiinflamatorias en diversos modelos experimentales. Si bien existen suplementos comerciales de aceite de chía (por ejemplo, Chíacaps) o de ASX (en polvo o en cápsulas), no se han desarrollado hasta la fecha productos que combinen estos compuestos en una misma formulación para potenciar sus efectos beneficiosos sobre la inflamación, a partir de fuentes 100% naturales y sostenibles.

Actualmente, el consumo masivo y muchas veces indiscriminado de antiinflamatorios no esteroides (AINE), como ibuprofeno, diclofenaco o naproxeno, conlleva efectos adversos

significativos, especialmente a nivel gastrointestinal y renal. Este escenario pone de manifiesto la necesidad de alternativas naturales y seguras que contribuyan a la prevención y el manejo de la inflamación crónica, sin los riesgos asociados a los fármacos convencionales. En este contexto, este trabajo propone obtener un ingrediente nutracéutico versátil y fácilmente manipulable, que pueda consumirse como un snack o incorporarse en polvo a una amplia variedad de alimentos (ensaladas, batidos, yogures, jugos, etc.), facilitando su adopción cotidiana.

Para ello, se desarrollará una tecnología de emulsiones multicapa - mediante la técnica de deposición electrostática capa sobre capa - con tres formulaciones diferentes (monocapa, bicapa y tricapa), empleando LS, CHT, ALG y maltodextrina (MDX) como materiales de pared. Se evaluarán dos tipos de estructuras para los co-encapsulados: (i) esferas gelificadas y deshidratadas obtenidas a partir de la gelificación iónica entre ALG y calcio de las emulsiones monocapa (MC), y (ii) microcápsulas en polvo producidas mediante secado spray de emulsiones bicapa (BC) y tricapa (TC).

Además, se estudiará la estabilidad oxidativa del aceite co-encapsulado bajo distintas condiciones de almacenamiento, para garantizar la conservación de sus propiedades funcionales durante la vida útil.

En bibliografía prácticamente no se han encontrado trabajos sobre la co-encapsulación de aceite de chía y de ASX para producir un ingrediente funcional deshidratado. Espinaco et al. (2023) es uno de los pocos estudios publicados donde encapsularon aceite de chía y ASX en

esferas gelificadas de ALG de calcio. Sin embargo, una de las limitaciones que tuvieron fue que, a los 10 días de almacenamiento a 25°C, el aceite encapsulado superó el índice de peróxidos sugerido por el Codex Alimentarius para aceites prensados en frío (15 meq O₂/kg aceite).

Por todo lo expuesto, esta propuesta constituye un enfoque novedoso para el diseño de ingredientes funcionales basados en fuentes naturales, con propiedades antiinflamatorias. Sus resultados podrían contribuir al desarrollo de nuevas formulaciones más seguras y estables, con potencial aplicación en la industria alimentaria y nutracéutica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Diseñar sistemas para co-encapsular aceite de chía y astaxantina, utilizando la tecnología de emulsiones para obtener encapsulados sólidos y evaluar su estabilidad durante el almacenamiento.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar la astaxantina como antioxidante en comparación con otros antioxidantes naturales.
- Determinar la concentración de astaxantina para co-encapsular con el aceite de chía.
- Diseñar y caracterizar distintos tipos de emulsiones para encapsular el aceite de chía.
- Obtener encapsulados de aceite de chía en estado sólido por deshidratación de emulsiones y caracterizarlas.
- Seleccionar el mejor sistema de encapsulación para co-encapsular aceite de chía y astaxantina.
- Evaluar la estabilidad de los co-encapsulados de aceite de chía y astaxantina en el tiempo y a distintas temperaturas.

3. CAPITULO I:

*Comparación del efecto protector
de la astaxantina frente a otros
antioxidantes lipofílicos naturales*

3. CAPÍTULO I: COMPARACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE LA ASTAXANTINA FRENTE A OTROS ANTIOXIDANTES LIPOFÍLICOS NATURALES

En este capítulo, se llevaron a cabo los ensayos necesarios para comparar el efecto protector de la astaxantina frente a otros antioxidantes lipofílicos de origen natural. Para ello, se utilizaron productos comerciales actualmente disponibles en el mercado como fuentes de antioxidantes naturales. Se prepararon mezclas de aceite de chía con las fuentes de antioxidantes comerciales seleccionadas y se realizó un estudio de estabilidad oxidativa durante dos meses a las mezclas de aceite/antioxidantes (i) sin encapsular, y (ii) encapsuladas con proteínas del lactosuero, pectinas y MDX. El objetivo de este estudio preliminar fue comparar el comportamiento de los distintos antioxidantes en aceite libre o encapsulados por secado por aspersión, utilizando materiales de pared ya estudiados previamente en el grupo de trabajo.

3.1. Materiales y Métodos

3.1.1. Materiales

El aceite de chía comercial fue provisto por SDA S.A. (Buenos Aires, Argentina). Las fuentes de antioxidantes naturales comerciales que se utilizaron fueron:

- DL- α -tocoferol al 98% de BASF, como fuente de vitamina E (VE).
- Polvo de algas marinas (*Haematococcus pluvialis*) de grado alimenticio (Prescribed for Life, China) como fuente de astaxantina (ASX), que declara en rótulo 5 % ASX.
- Comprimidos sólidos en tableta como suplementos dietarios de β -caroteno (BC) (Laboratorio Del Bel SRL, Argentina), que declaran en rótulo 5,6 % de BC como

antioxidante principal, junto a otros excipientes como almidón modificado, celulosa microcristalina, estearato de magnesio, dióxido de silicio. Otros componentes minoritarios (< 2%) incluyen semillas de *Bixa Orellana* y extracto de tomate.

Para la formulación de los encapsulados se utilizaron los siguientes materiales de pared:

- Aislado de proteína de suero lácteo (WPI) provisto por Davisco Food International, Inc. Su composición centesimal en base seca fue: 0,4 % de grasa, 2,0 % de cenizas y menos del 0,5 % de lactosa, y 97,9 % proteínas en base seca.
- Pectina cítrica de alto metoxilo (PAM) donada por Gelfix SA (Buenos Aires, Argentina).
- MDX DE 15 suministrada por Productos de Maíz SA (Buenos Aires, Argentina).

Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

3.1.2. Mezclas líquidas de aceite de chía y antioxidantes

Cada mezcla se preparó mediante agitación magnética de aceite de chía (AC) y el correspondiente antioxidante, de acuerdo a la composición presentada en la Tabla 3.1. La concentración de ASX se eligió teniendo en cuenta un estudio de Park et al. (2010), donde se observó que la suplementación de la dieta con 2 mg/día de ASX mejoró la respuesta inmune y promovió una disminución en biomarcadores de inflamación y daño oxidativo al ADN, en mujeres jóvenes sanas. Esta dosis correspondería a 1 g de mezcla de aceite de chía con 2000 ppm de ASX por día. Por su parte, la concentración de BC se seleccionó considerando que la actividad antioxidante sería 10 veces menor que la de ASX (Ambati et al., 2014), por eso se adicionó en una mayor concentración a la mezcla. Finalmente, la concentración de VE es la

que se agrega comúnmente al aceite de chía comercial en Argentina para promocionarlo como un suplemento dietario. Una vez preparadas las mezclas de AC y antioxidantes, se dividieron en crioviales cubiertos de aluminio y se almacenaron en la oscuridad a 4°C y 25°C, durante 8 semanas.

Tabla 3.1. Concentración de antioxidantes (ppm) en mezclas con aceite de chía

SISTEMA	Vitamina E	Astaxantina	β-caroteno
A (Control)	-	-	-
A/VE	2000	-	-
A/ASX	-	2000	-
A/BC	-	-	20000
A/ASX-VE	2000	2000	-
A/BC-VE	2000	-	20000

3.1.3. Preparación de microcápsulas en polvo de aceite de chía y antioxidantes

Primeramente, se prepararon dispersiones acuosas de WPI, PAM y MDX a pH 7 y se almacenaron a 4°C hasta el otro día. Luego, se obtuvieron emulsiones mezclando 10% de aceite de chía (adicionado o no con antioxidantes, según los sistemas listados en la Tabla 3.1.) con 90% de fase acuosa conteniendo los biopolímeros anteriormente preparados, utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax T-25 (IKA) durante 2 min a 12000 rpm. Para reducir el tamaño de las gotas, las emulsiones se sometieron a un paso de sonicación utilizando una sonda de 20 kHz (Mod. VC-505) con una punta de 13 mm de diámetro (Sonics & Materials) en modo pulsos (1 s ON, 1 s OFF) a una amplitud de 40 % durante 4,5 min, utilizando un baño de hielo y agitación magnética. Una vez obtenidas las emulsiones, se ajustó el pH a 5 con HCl

1 N mientras se agitaba. Este valor de pH se seleccionó teniendo en cuenta trabajos previos (Fioramonti et al., 2019). La composición final de las emulsiones (en % p/p) fue la siguiente: 10 % de aceite, 1 % de WPI, 22,5 % de MDX, 0,3% de PAM y pH 5.

Posteriormente, las emulsiones se deshidrataron por secado por aspersion para obtener las microcápsulas en polvo, en un secador Yamato ADL311S (China) equipado con una boquilla estándar de 0,406 mm. Las condiciones de secado por aspersion se seleccionaron de acuerdo con trabajos previos (Fioramonti et al., 2019): caudal de alimentación de emulsión: 3 ml min⁻¹, caudal de aire de secado: 0,04 m³ min⁻¹, presión de aire de atomización: 0,15 MPa, temperatura de entrada: 170 °C, temperatura de salida: 85 – 95 °C. Una vez obtenidas las microcápsulas en polvo se almacenaron en recipientes herméticos y al resguardo de la luz a 4°C y 25°C, respectivamente durante 8 semanas.

Las microcápsulas se identificarán con el prefijo “M”, acompañado de la designación correspondiente a su composición antioxidante, en concordancia con la nomenclatura empleada para las mezclas sin encapsular: M (control), M/VE, M/ASX, M/BC, M/ASX-VE y M/BC-VE.

3.1.4. Caracterización de las microcápsulas en polvo

3.1.4.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología y la microestructura de las microcápsulas se observó por microscopía electrónica de barrido (Zeiss crossbeam 350, Alemania) a voltajes de aceleración de 1 kV con aumentos de 1000X.

3.1.4.2. Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación del aceite de chía dentro de las microcápsulas se evaluó según (Fioramonti et al., 2019). Para ello, se determinó el aceite extraíble o aceite libre (AL), mezclando 2 g de microcápsulas en polvo con 15 ml de éter de petróleo. Luego de mezclarlos muy suavemente durante 2 min, el sobrenadante se pasó a través de un papel de filtro (MUNKTEL 00R), y se recuperó en un balón de destilación. Finalmente, el éter de petróleo se evaporó en un evaporador rotatorio a 40°C, y el extracto libre de solvente se secó en estufa a 105°C, hasta pesada constante. El contenido de aceite libre se determinó por gravimetría. Por otro lado, para el aceite total (AT) se consideró el de aceite de chía pesado para formular las microcápsulas ya que, al no ser un compuesto volátil, no se evaporaría durante el secado spray. Finalmente, se calculó la eficiencia de encapsulación según la siguiente fórmula:

$$EE (\%) = \frac{A_T(\text{g}/100 \text{ g polvo}) - A_L(\text{g}/100 \text{ g polvo})}{A_T(\text{g}/100 \text{ g polvo})} \times 100 \quad [\text{Ec. 3.1.}]$$

3.1.4.3. Estabilidad oxidativa de las mezclas de aceite de chía y antioxidantes

La estabilidad oxidativa de las mezclas de AC y antioxidantes (tanto líquidas como en polvo) durante el almacenamiento a 4 y 25°C se examinó midiendo los productos de oxidación primaria y secundaria, mediante la determinación del índice de peróxidos y de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, respectivamente.

a) Índice de peróxidos (IP)

Los hidroperóxidos se cuantificaron mediante el método oficial de la AOAC (2000) con algunas modificaciones. Brevemente, se mezclaron 0,5 g de muestra con 5 ml de ácido acético/cloroformo (3:2 v/v) y 1 ml de solución saturada de ioduro de potasio. Después de incubar durante 5 min en la oscuridad, se añadieron 10 ml de agua destilada y 1 ml de solución de almidón al 0,5 % (p/v). Finalmente, cada muestra se tituló con tiosulfato de sodio 0,01 N. Además, se preparó un blanco de muestra con agua destilada y su volumen de titulación se restó a todas las muestras. El valor de IP se calculó mediante la ecuación:

$$IP \left(\frac{\text{meq O}_2}{\text{kg aceite}} \right) = \frac{S \times 0.01 \times 1000}{A} \quad [\text{Ec. 3.2.}]$$

donde S es el volumen de titulación de la muestra (ml), 0,01 es la normalidad de la solución de tiosulfato de sodio y A es la masa de la muestra (g).

En el caso de las mezclas líquidas de aceite y antioxidantes, se tomó directamente una alícuota de estos sistemas almacenados a distintas temperaturas. Mientras que, para el ingrediente en polvo obtenido por secado por aspersión, primero se reconstituyó la emulsión agregando agua destilada. La emulsión reconstituida se extrajo con el doble de volumen de una mezcla de isooctano:isopropanol (3:2), y luego se centrifugó durante 15 minutos a 3400 g para promover la separación de fases. De esta manera, el aceite quedó contenido en la fase superior de isooctano, la cual se utilizó para realizar los ensayos de oxidación.

b) Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Los productos de oxidación secundaria se determinaron según Fioramonti et al. (2017), con modificaciones. Se mezcló 1 ml de muestra con 2 ml de solución de reactivo TBA (15% p/v ácido tricloroacético, 0,375% p/v ácido tiobarbitúrico, 0,25 M ácido clorhídrico, 0,06% hidroxitolueno butilado—BHT), luego se incubó (90°C, 15 min), se centrifugó (6000 g, 10 min) y se midió la absorbancia a 532 nm de la fase acuosa. Para determinar la concentración de TBARS, se preparó una curva de calibrado utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP). Y se expresó el valor en mmol MDA/Kg aceite, según la siguiente ecuación:

$$\text{TBARS} \left(\frac{\text{mmol MDA}}{\text{kg de aceite}} \right) = \frac{(\text{Abs}_M - \text{Abs}_B) \times 2 \times 1000}{m \times A} \quad [\text{Ec. 3.3.}]$$

donde Abs_M y Abs_B corresponden a las absorbancias de la muestra y el blanco a 532nm respectivamente, m es la pendiente de la curva de calibrado (71396,66 ml/mmol MDA), el valor numérico 2 tiene en cuenta los ml del volumen de reacción, A es la masa de aceite en gramos contenida en la muestra y el factor 1000 es para expresar el resultado en kg de aceite. En este caso, se realizó una dilución al cuarto de las mezclas líquidas de aceite y antioxidantes en cloroformo y luego, se tomó una alícuota de 1 ml de la dilución para analizar cada muestra. En cambio, para el ingrediente en polvo, la muestra destinada al análisis de TBARS se obtuvo de la fase superior de isooctano, correspondiente a la extracción de la emulsión reconstituida.

3.1.5. Análisis Estadístico

Cada experimento se realizó con su correspondiente réplica (dos repeticiones). Todos los ensayos se realizaron al menos por duplicado. A partir de estas mediciones se calcularon las medias y las desviaciones estándar. Las diferencias entre medias se determinaron aplicando el análisis de la varianza mediante la prueba LSD, a un nivel de significancia de $p < 0,05$. Cuando no se cumplió el supuesto de homogeneidad de la varianza, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis a $p < 0,05$ y gráficos de caja para identificar diferencias significativas.

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. Obtención de mezclas líquidas y en polvo de aceite de chía y antioxidantes.

La Figura 3.1. muestra la apariencia visual de las diferentes mezclas de aceite de chía (AC) y antioxidantes preparadas para evaluar la estabilidad oxidativa. El color amarillo natural del AC cambió cuando se mezcló con suplementos de BC (naranja) o ASX (rojo), mientras que la adición de VE no afectó el color.



Figura 3.1. Fotografía de las mezclas de aceite de chía y fuentes comerciales de antioxidantes: vitamina E (VE), β -caroteno (BC) y astaxantina (ASX).

Por su parte, en la Figura 3.2. se presenta el aspecto de las mezclas de aceite de chía y antioxidantes en polvo, tanto a nivel macroscópico (Fig. 3.2.A) como microscópico (Fig. 3.2.B, C, D, E). Como se puede ver el secado por aspersión dio como resultado polvos finos, sin aglomerados ni aspecto aceitoso, que además se rehidrataron fácilmente al agregar agua para reconstituir las emulsiones. Los polvos de los sistemas M (Control) y M/VE presentaron un color blanco a amarillo claro, mientras que los sistemas M/BC y M/ASX mostraron

tonalidades naranjas y violeta claro, respectivamente, revelando así la presencia de pigmentos naturales propios de los carotenoides.

En las Figuras 3.2.B–E se observa la superficie y estructura de las microcápsulas formuladas con distintas fuentes comerciales de antioxidantes, analizadas mediante microscopía SEM. Se identifican partículas de forma esférica, con tamaños que varían entre 1 y 10 μm , siendo esta distribución típica del proceso de secado por aspersión (Alcântara et al., 2019).

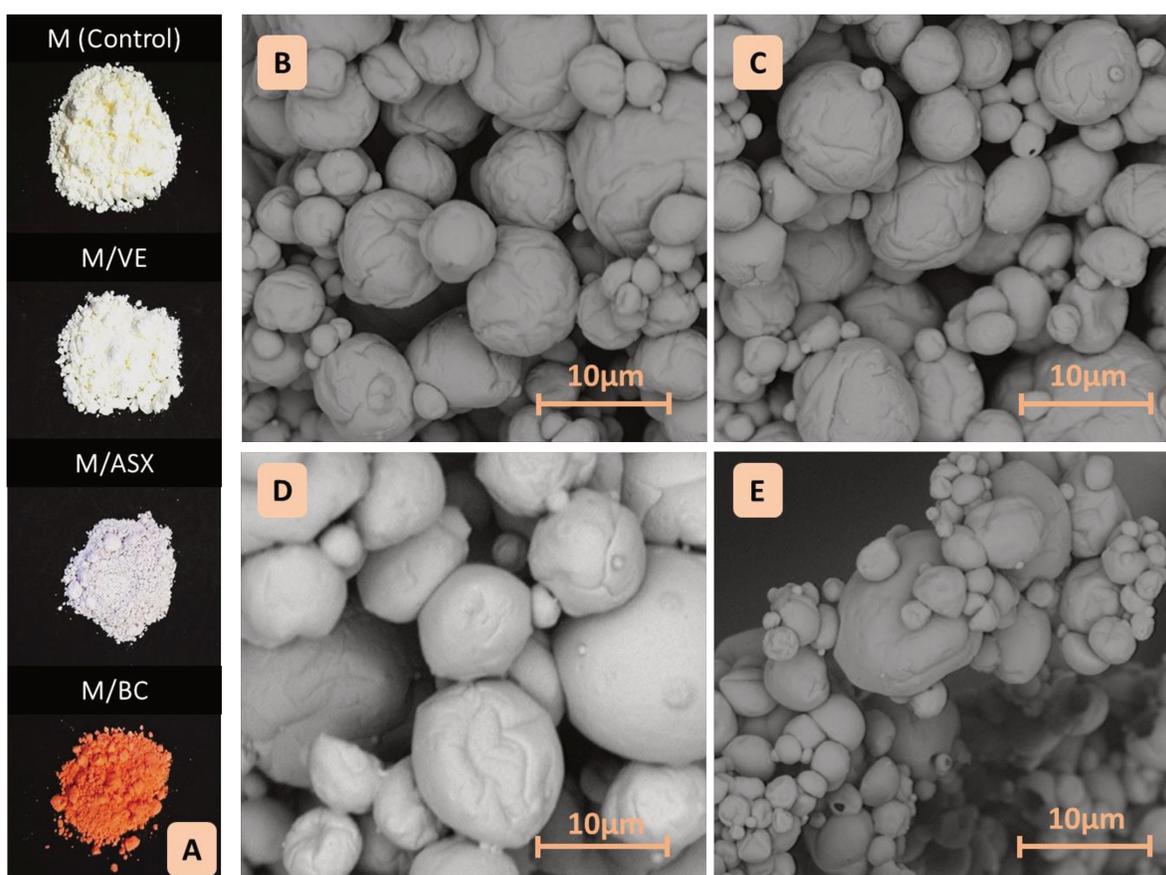


Figura 3.2. Aspecto visual de los polvos microencapsulados (A). Microscopía electrónica de barrido (SEM): M (control) (B), M/VE (C), M/BC (D) y M/ASX (E)

Las microcápsulas M/BC parecen presentar una mayor proporción de partículas de mayor tamaño (Fig. 3.2.D) en comparación con las M/ASX (Fig. 3.2.E). En general, todas las microcápsulas mostraron una cubierta protectora lisa y continua, con algunas arrugas, pero sin grietas ni fisuras aparentes, lo que parecería una estructura física externa resistente. Estas estructuras esféricas son consistentes con las reportadas por otros autores que han utilizado MDX como material de pared principal en microcápsulas obtenidas por secado por aspersión (Aberkane et al., 2014; Jiménez-Martín et al., 2015). Además, Gharsallaoui et al. (2012) señalaron que la presencia de azúcares de bajo peso molecular en la MDX podría actuar como plastificante, lo que ayudaría a prevenir la contracción desigual de la superficie durante el secado y favorecería la formación de microcápsulas esféricas con superficies lisas. Este efecto sería beneficioso, ya que las micropartículas generadas sin daños aparentes conservarían mejor los compuestos bioactivos en su núcleo, protegiéndolos frente a reacciones de oxidación (Corrêa-Filho et al., 2019). Tanto las M/VE-BC, como las M/VE-ASX presentaron una apariencia estructural similar a la de los polvos M/BC y M/ASX, respectivamente, es por eso que no se agregaron a la Fig. 3.2.

Además, se determinó la eficiencia de encapsulación del aceite de chía en cada una de las microcápsulas evaluadas. Estos resultados se muestran en la Tabla 3.2., junto con los datos de aceite libre (AL), aceite total (AT) y sólidos totales (ST). Los ST corresponden al contenido de material no volátil presente en las emulsiones antes de la deshidratación por secado spray. Tanto los ST como el AT corresponden a valores teóricos y fueron calculados para cada sistema, asumiendo que el aceite de chía y los demás componentes agregados a la

formulación de las emulsiones no son volátiles. Por lo tanto, se espera que no se evaporen durante el secado por aspersión.

Tabla 3.2. *Sólidos totales (ST), aceite total (AT), aceite libre (AL) y eficiencia de encapsulación (EE) de las microcápsulas (MC) en polvo de aceite de chía y antioxidantes.*

Formulación	M (Control)	M/VE	M/BC	M/ASX
ST (g/100g emulsión)	33,70	33,70	36,92	36,93
AT (g/100g polvo)	29,67	29,67	30,66	27,07
AL (g/100g polvo)	14,26 ± 1,19 ^a	14,41 ± 1,41 ^a	10,01 ± 1,49 ^b	9,69 ± 0,55 ^b
EE (%)	51,94 ± 4,02 ^a	51,43 ± 4,75 ^a	67,35 ± 4,86 ^b	63,48 ± 2,00 ^b

Las letras diferentes indican las diferencias significativas entre los sistemas ($p < 0.05$), de acuerdo al test LSD.

En primer lugar, la EE de los sistemas M (Control) y M/VE fue cercana al 50 %, y no se observaron diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, la EE aumentó significativamente en los sistemas M/ASX y M/BC, que presentaron valores superiores al 60 %. Esto concuerda con los valores más bajos de AL observados en estos polvos, en comparación con los sistemas M (Control) y M/VE. Esta EE más alta podría atribuirse a la cantidad ligeramente mayor de ST en las emulsiones formuladas con ASX y BC, ya que se agregaron como parte de una matriz sólida que los contiene en su interior (algas en polvo y comprimidos sólidos de BC pulverizados). Esto concuerda con lo propuesto por Gharsallaoui et al. (2007), quienes indicaron que una mayor concentración de ST en las emulsiones puede aumentar la EE, ya que estos sólidos se integran en la pared de las microcápsulas durante el

secado, actuando como matriz de soporte y protegiendo al aceite que se encuentra en el núcleo.

Si bien se esperaban valores de EE de aceite más altos, otros autores también han informado eficiencias de encapsulación similares. Jiménez-Martín et al. (2015) usaron lecitina, CHT y MDX como material de pared para encapsular aceite de pescado y reportaron eficiencias de encapsulación en un rango entre 45-62%, a pesar de tener un menor contenido de aceite total en los polvos obtenidos luego del secado spray ($\cong 10\%$). Por su parte, Ramakrishnan et al. (2013) también encapsularon aceite de pescado utilizando proteínas del lactosuero y MDX, y reportaron EE entre 50-60% en microcápsulas en polvo conteniendo 20% de aceite. En nuestro caso, se lograron obtener EE ligeramente superiores en microcápsulas en polvo con un mayor contenido de aceite, cercano al 30%.

Se suele considerar que maximizar la EE en la microencapsulación de aceites ayudaría a minimizar la oxidación de los lípidos. Sin embargo, la estabilidad oxidativa de los aceites en polvo obtenidos por secado por aspersión no siempre se correlaciona con el contenido de aceite libre o superficial en las microcápsulas (Aberkane et al., 2014; Tolve et al., 2018). Tolve et al. (2018) encapsularon aceite de soja rico en fitoesteroles con proteínas del lactosuero, CHT e inulina, y obtuvieron EE superiores al 80%. No obstante, se observaron valores elevados del índice de peróxidos en las microcápsulas en polvo al salir del secador por atomización ($IP > 30 \text{ meq O}_2/\text{kg de aceite}$). Del mismo modo, Aberkane et al. (2014) obtuvieron valores de EE superiores al 75% al encapsular aceites enriquecidos en DHA utilizando proteínas de arveja y MDX, pero los polvos presentaron valores de IP igualmente altos ($> 20 \text{ meq O}_2/\text{kg de aceite}$). Por lo tanto, es fundamental monitorear el nivel de

oxidación de los aceites encapsulados, incluso cuando el proceso de secado por aspersión permite alcanzar altas eficiencias de encapsulación.

3.2.2. Estabilidad oxidativa de aceite de chía y mezclas de diferentes antioxidantes

El índice de peróxidos (IP) es un parámetro que se determina con frecuencia y se utiliza para controlar la rancidez en los aceites vegetales comestibles (Echegaray et al., 2022; Mariod et al., 2017). El Codex Alimentarius (2001) ha sugerido niveles máximos de este parámetro para evaluar la calidad de los aceites vegetales obtenidos por prensado en frío (IP < 15 meq O₂/kg de aceite). Además, dado que la formación de peróxidos se incrementa rápidamente en las etapas iniciales de las reacciones de oxidación, y posteriormente disminuye con el transcurso del tiempo, es recomendable complementar la prueba de IP con el análisis de TBARS. Esta combinación permite detectar, en simultáneo, productos de oxidación secundaria y proporciona una visión más integral del estado oxidativo del sistema.

La Figura 3.3. muestra la evolución de compuestos primarios (Fig. 3.3.A y 3.3.B) y secundarios de oxidación (Fig. 3.3.C y 3.3.D) de las mezclas líquidas de aceite de chía y antioxidantes durante 8 semanas de almacenamiento a 4°C (Figura 3.3.A) y 25°C (Figura 3.3.B).

Cuando los sistemas se almacenaron a 4°C, los valores de IP se mantuvieron estables y muy bajos después de 8 semanas de almacenamiento (Fig. 3.3.A). La misma tendencia se observó para TBARS (Fig. 3.3.C), con valores inferiores a 0,2 mmol MDA/kg de aceite, lo cual indica un deterioro oxidativo mínimo. Además, el análisis estadístico mostró que, a las 8 semanas de almacenamiento, el AC mezclado con una sola fuente de antioxidantes (BC, ASX o VE) mostró valores de IP significativamente menores ($p < 0,05$) que el control (sin antioxidantes). Cuando se combinaron las fuentes comerciales de antioxidantes, la mezcla A/ASX-VE exhibió el mismo

IP que el control sin antioxidantes, pero la mezcla de A/BC-VE mostró un IP significativamente mayor ($p < 0,05$) que la anterior.

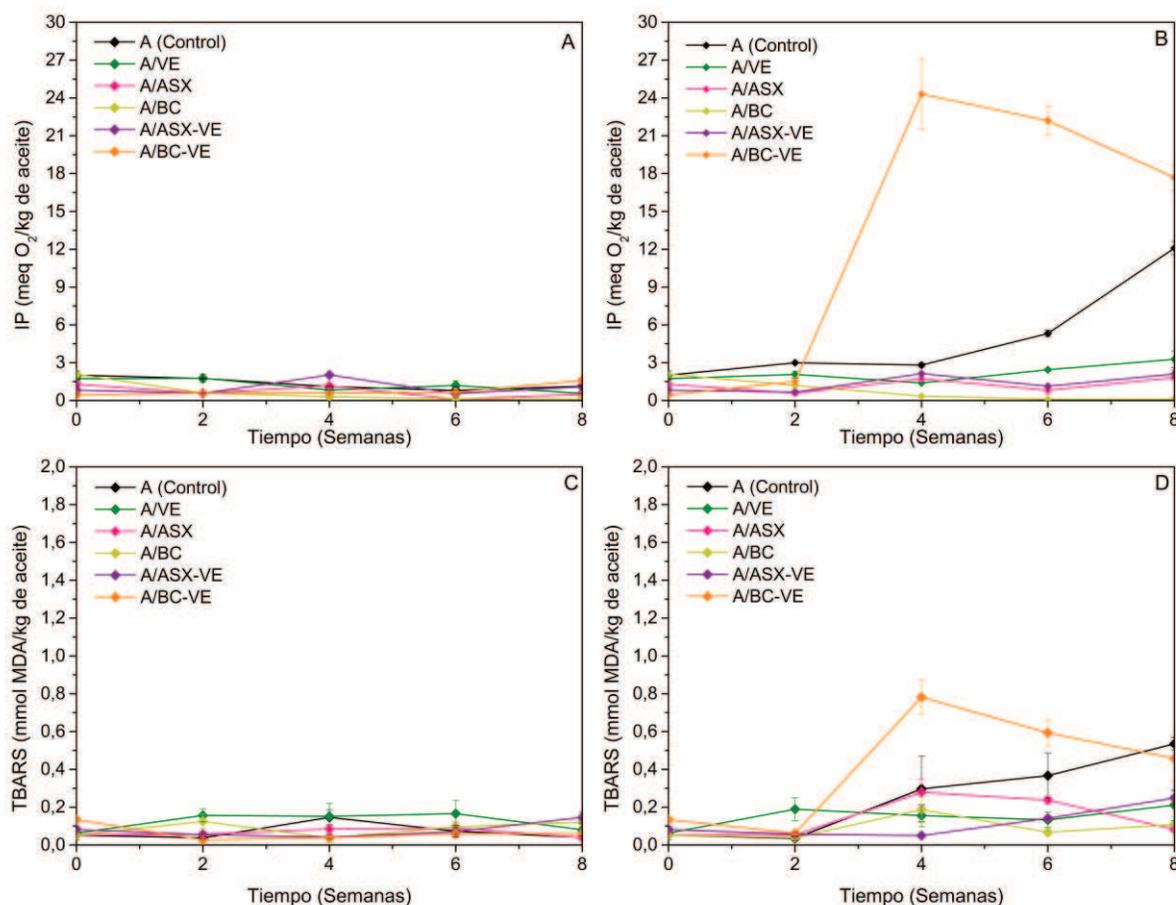


Figura 3.3. Evolución del IP (A, B) y TBARS (C, D) de las mezclas líquidas de aceite de chía y antioxidantes durante el almacenamiento a 4°C (A, C) y 25°C (B,D).

Vale la pena señalar que, aunque se encontraron diferencias significativas entre las distintas mezclas almacenadas a 4°C, el efecto no fue relevante ya que todos los sistemas mantuvieron valores de IP muy bajos ($IP < 2$ meq O₂/kg aceite). Esto sugeriría que la temperatura fue el factor más importante para la estabilidad oxidativa del aceite durante el almacenamiento, independientemente de los antioxidantes utilizados.

Por otro lado, cuando el aceite de chía sin antioxidantes se almacenó a 25°C, se observó un período de inducción de 4 semanas, donde el IP permaneció casi constante (Figura 3.3.B). Después de este período, ocurrió un aumento repentino en el IP, alcanzando valores de 12 meq O₂/kg de aceite a las 8 semanas de almacenamiento. El periodo de inducción está generalmente relacionado con la etapa inicial de oxidación lipídica donde los niveles de peróxido permanecen bajos (Escalona-García et al., 2016; Espinaco et al., 2021). La siguiente etapa, donde el IP comienza a aumentar, puede ser atribuida a la fase de propagación de hidroperóxidos (Farhoosh, 2021).

Según Fortuna Clara et al. (2020), el aceite de chía contiene antioxidantes naturales como carotenoides (5 ppm), polifenoles (140 ppm) y tocoferoles (103 ppm), pero la concentración de estos compuestos pareció ser insuficiente para proteger al aceite durante el almacenamiento a 25°C (Figura 3.3.B y 3.3.D). Sin embargo, cuando el AC se mezcló con una única fuente comercial de antioxidantes (VE, BC o ASX), se observó una mejora en la estabilidad oxidativa de las mezclas, ya que el IP no superó los 3 meq O₂/kg de aceite al final del experimento, siendo la mezcla A/BC la que mostró el IP más bajo, seguida de A/ASX y finalmente A/VE (Fig. 3.3.B).

Por otro lado, cuando se mezclaron las fuentes comerciales de antioxidantes, sorprendentemente, el sistema A/BC-VE mostró un efecto marcado y significativo prooxidante ($p < 0,05$) ya que, después de 4 semanas de almacenamiento, el IP excedió el límite sugerido por el Codex Alimentarius (2001) (>15 meq O₂/kg de aceite). Esto demuestra que se debe tener precaución al mezclar antioxidantes cuando se intenta promover una mejor estabilidad oxidativa en diferentes matrices alimentarias. Este efecto prooxidante

podría relacionarse con interacciones antagónicas entre el BC y la VE, dentro del rango de concentración utilizado en este estudio.

Algunos estudios, han reportado que el β -caroteno en altas concentraciones puede producir efectos prooxidantes (Rietjens et al., 2002; L. Zhang et al., 2019). Sin embargo, la mezcla A/BC no mostró valores altos de IP ni de TBARS, a pesar de contener 20000 ppm de BC (Fig. 3.3.B y 3.3.D). Esta situación cambió con la adición de VE, lo que provocó un efecto prooxidante y un aumento de los parámetros de oxidación.

El aumento de la temperatura podría haber acelerado la velocidad de las reacciones entre los componentes presentes en la formulación comercial de β -caroteno y α -tocoferol, promoviendo así la formación de hidroperóxidos de acuerdo con la cinética de Arrhenius (Escalona-García et al., 2016). Se sabe que las temperaturas elevadas tienden a acelerar la fase inicial de la oxidación lipídica (periodo de inducción), la cual, una vez iniciada, conduce a un aumento exponencial en la generación de radicales libres.

Por otra parte, el agregado de VE a las mezclas A/ASX (A/ASX-VE), no produjo un efecto prooxidante a 25 °C pero tampoco brindó una mejor protección, ya que no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores de IP de estos sistemas luego de 8 semanas de almacenamiento (Figura 3.3.B).

Del análisis general de la Figura 3.3.B, se puede observar que la adición de una sola fuente comercial de antioxidantes naturales fue suficiente para proteger al aceite de chía de la oxidación durante el almacenamiento a temperatura ambiente (25°C). Además, en las mezclas de A/ASX, la concentración de antioxidantes fue 10 veces menor que en los sistemas

A/BC, lo cual resulta interesante desde el punto de vista económico, ya que estas mezclas también mantuvieron un IP bajo (< 2 meqO₂/kg de aceite).

Cuando se analizó la evolución de los compuestos secundarios de oxidación (Fig. 3.3.C y 3.3.D), se observó una tendencia similar a la de IP. Si bien a 4 °C se observaron algunas fluctuaciones, los valores de TBARS fueron realmente bajos ($< 0,2$ mmol MDA/kg de aceite) para todos los sistemas. A pesar de que no existen valores de referencia estandarizados para TBARS, se consideran bajos los valores menores a 1 mmol MDA/kg de aceite (Fioramonti et al., 2019). Por otro lado, en las últimas semanas de almacenamiento a 25 °C, tanto en el aceite control como en la mezcla A/BC-VE se observaron valores de TBARS significativamente mayores ($\cong 0,5$ mmol MDA/kg de aceite) que el resto de los sistemas. Esta misma tendencia (en los mismos sistemas y mismos tiempos) fue observada en IP (Figura 3.3.B).

Espinaco et al. (2021) también estudiaron la estabilidad oxidativa de mezclas de aceite de chía con (i) ASX (400 ppm), y (ii) ASX + α -tocoferol (α T) (400 + 100 ppm) durante su almacenamiento a 25°C por 35 días (5 semanas). En contraste, informaron valores de IP más altos que los hallados en este trabajo. Las mezclas con ASX alcanzaron un IP de 20 meq O₂/kg de aceite, mientras que las que contenían ASX+ α T llegaron a un IP cercano a 70 meq O₂/kg de aceite, excediendo ambas el límite de IP recomendado por el Codex Alimentarius, incluso en un período de almacenamiento más corto. Las diferencias en los datos reportados podrían estar relacionadas con la utilización de concentraciones más bajas de antioxidantes en las mezclas con aceite de chía, ya que utilizaron concentraciones de ASX 5 veces menores y concentraciones de α T 20 veces menores que las utilizadas en esta tesis. Otro factor a tener en cuenta es que el aceite de chía a tiempo inicial estaba más oxidado (IP = 10 meq O₂/kg de

aceite). Estos resultados evidencian la importancia de seleccionar la dosis adecuada de antioxidantes para promover la estabilidad oxidativa de un sistema, así también como tener en cuenta el tipo de antioxidantes que se utilizan cuando se incorporan en mezclas de manera combinada. Además, es crucial mantener lo más bajo posible el IP inicial del aceite de chía, ya que una vez que se inicia la peroxidación lipídica, la formación de radicales libres aumenta exponencialmente, lo que promueve tasas de oxidación más altas durante el almacenamiento (Damodaran et al., 2017).

Otros autores han realizado estudios similares combinando AC con antioxidantes alternativos para mejorar su estabilidad oxidativa. Por ejemplo, Bodoira et al. (2017) utilizaron antioxidantes naturales (8000 ppm de extracto de romero, 200 ppm de tocoferoles) y sintéticos (200 ppm de palmitato de ascorbilo, 200 ppm de terbutilhidroquinona), para estudiar la estabilidad oxidativa del aceite de chía a 25°C, y al cabo de 8 semanas de almacenamiento todas las mezclas mostraron un IP inferior a 5 meq O₂/kg de aceite, similar a lo obtenido en esta tesis para los sistemas con un único antioxidante adicionado. Por otra parte, Ixtaina et al. (2012) también evaluaron la estabilidad oxidativa de mezclas de aceite de chía y antioxidantes (té verde, extracto de romero, palmitato de ascorbilo) en diferentes concentraciones (500 y 2500 ppm). Al cabo de 8 semanas de almacenamiento a 20°C, obtuvieron un IP para el aceite de chía sin adición de antioxidantes similar al observado en la Fig. 3.3.B (\cong 10 meq O₂/kg de aceite). Sin embargo, al mezclar AC con antioxidantes naturales (té verde o extracto de romero), el IP de las mezclas después de 8 semanas de almacenamiento a 20°C fue ligeramente más alto (entre 5 y 10 meq O₂/kg de aceite) que los observados en la Fig. 3.3.B para mezclas de A/ASX y A/BC (IP < 3 meq O₂/kg de aceite). No

obstante, cuando utilizaron palmitato de ascorbilo, el IP de la mezcla con aceite de chía se mantuvo por debajo de 3 meq O₂/kg de aceite. Sin embargo, cabe destacar que el palmitato de ascorbilo es un antioxidante sintético.

3.2.3. Estabilidad oxidativa de microcápsulas de aceite de chía y diferentes mezclas de antioxidantes

Tras realizar los análisis de estabilidad oxidativa en las mezclas líquidas de aceite con antioxidantes, se evaluó si la tendencia observada se mantenía en las mezclas de aceite microencapsuladas, obtenidas mediante secado por aspersión. De este modo, se analizó la influencia del proceso de secado y de las altas temperaturas sobre la oxidación del aceite de chía. En la Fig. 3.4. se muestran los resultados de IP y TBARS en el tiempo inicial (a la salida del secador spray) y final de almacenamiento (8 semanas), a ambas temperaturas, para cada uno de los sistemas microencapsulados.

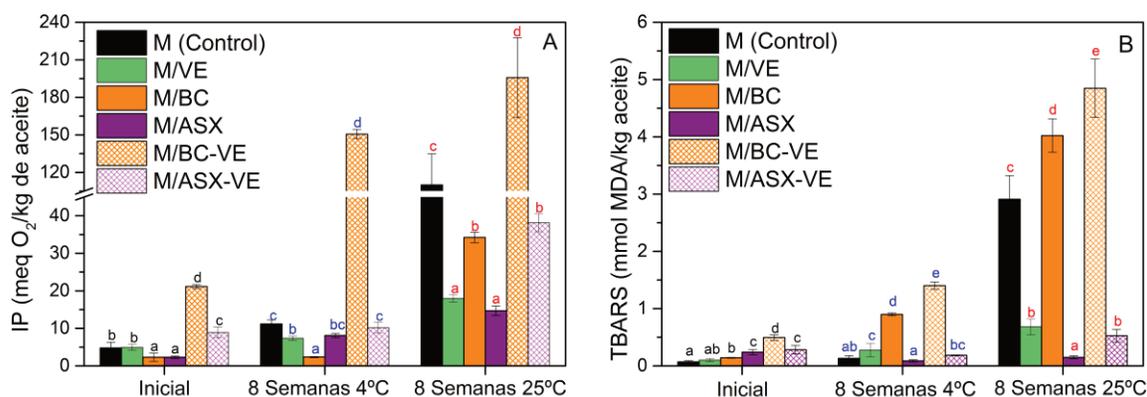


Figura 3.4. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre los valores de índice de IP (A) y TBARS (B) de las microcápsulas de aceite de chía y diferentes antioxidantes.

En la Fig. 3.4.A todas las microcápsulas formuladas con un único antioxidante mostraron un IP bajo a tiempo inicial (inmediatamente después del secado por aspersión). Las

formulaciones M/BC y M/ASX promovieron significativamente una mejor protección del AC contra la oxidación durante el secado por aspersión, mientras que M/VE mostró un IP similar al sistema control (sin antioxidantes añadidos). Puede notarse también que los sistemas M/BC y M/ASX presentaron (Fig. 3.4.A), a la salida del secador, niveles de IP similares a los observados por sus correspondientes mezclas líquidas al final del almacenamiento a 4°C y 25°C (Fig. 3.3.A y 3.3.B).

Por otro lado, en las microcápsulas que contenían una combinación de fuentes de antioxidantes (M/BC-VE y M/ASX-VE) se observó un efecto prooxidante, ya que a tiempo inicial presentaron valores de IP significativamente superiores a los sistemas con una sola fuente de antioxidantes (M/VE, M/BC y M/ASX). Por un lado, el sistema M/ASX-VE exhibió un IP de $8,88 \pm 1,42$ meq O₂/kg de aceite, mientras que las MC/BC-VE excedieron el límite recomendado inmediatamente después del secado por aspersión ($21,16 \pm 0,51$ meq O₂/kg de aceite).

Al mantener las microcápsulas a 4°C durante 8 semanas, el IP aumentó ligeramente para los sistemas control, M/VE y M/ASX, mientras que para los sistemas M/BC y M/ASX-VE, no se observaron cambios con respecto a sus valores iniciales. Cabe destacar que si bien el sistema M/ASX-VE presentó un valor inicial significativamente superior con respecto a los sistemas con un único antioxidante, este valor se mantuvo durante las 8 semanas a 4 °C y en este punto no se evidenciaron grandes diferencias con respecto a los otros sistemas. En cambio, las M/BC-VE, mostraron un marcado aumento en el IP, alcanzando valores mayores a 150 meq O₂/kg de aceite. Esto fue consistente con el alto valor de IP observado a la salida del secado por aspersión, ya que como se mencionó en la sección anterior, una vez que se inicia

la peroxidación lipídica, se producen radicales libres y se inicia una reacción en cadena que aumenta exponencialmente la tasa de oxidación a medida que se propaga (Damodaran et al., 2017). Por ello, es importante mantener los valores de IP lo más bajos posibles desde el comienzo del almacenamiento.

En este punto cabe destacar que con excepción de M/BC-VE, los valores de IP para todas las microcápsulas refrigeradas fueron menores a 10 meq O₂/kg de aceite y no superaron el límite sugerido por el Codex Alimentarius.

Sin embargo, cuando las microcápsulas se almacenaron a 25°C (Figura 3.4.A), se observó que la mayoría superó el límite de IP recomendado a las 8 semanas. Las microcápsulas control y M/BC-VE mostraron los valores de IP más altos, 120 y 190 meq O₂/kg de aceite, respectivamente, lo que indicaría un gran deterioro oxidativo. Al igual que para 4 °C el sistema que presentó los valores mayores fue el M/BE-VE, lo que demuestra una vez más el efecto prooxidante de esta mezcla. Para todas las demás formulaciones, el deterioro oxidativo fue menor, ya que las microcápsulas M/VE, M/BC, M/ASX y M/ASX-VE presentaron un IP < 40 meq O₂/kg de aceite.

Aunque durante el almacenamiento a 4 °C, M/BC fue la formulación que mejor protegió al aceite de chía, esta tendencia no fue la misma a 25 °C, ya que las microcápsulas alcanzaron un IP mayor al permitido para aceites prensados en frío (\approx 35 meq O₂/kg aceite). El sistema M/VE presentó un IP ligeramente superior al límite recomendado (18 meq O₂/kg de aceite), mientras que el sistema M/ASX fue el único que no superó este umbral, promoviendo así la mejor protección antioxidante al aceite de chía en estas condiciones. No obstante, esta protección no se observó en los sistemas M/ASX-VE, ya que la adición de VE promovió un

aumento del IP hasta 40 meq O₂/kg de aceite, evidenciando el efecto prooxidante ejercido al combinar estas fuentes de antioxidantes.

Una tendencia similar se observó al analizar los productos de oxidación secundaria (Figura 3.4.B). Todos los sistemas presentaron valores bajos de TBARS en el momento inicial, lo que indica una descomposición de hidroperóxidos relativamente baja. Después de 8 semanas a 4°C, la única formulación que superó los valores del umbral adoptado para TBARS (1 mmol MDA/kg de aceite) fue M/BC-VE, siendo esto consistente con el IP observado para este sistema.

Al almacenar las microcápsulas a 25°C, las que presentaron los valores más altos de TBARS fueron las mismas que mostraron el IP más alto a 25°C (control, M/BC y M/BC-VE), lo que confirma el avance del deterioro oxidativo de estas muestras bajo estas condiciones. Es interesante notar que la formulación M/ASX-VE fue la única que no siguió la misma tendencia con respecto a IP. Para TBARS exhibió valores bajos (menos de 1 mmol MDA/kg de aceite), mientras que para IP presentó un valor alto (40 meq O₂/kg de aceite). Este sistema se podría comparar con M/BC, ya que a 25°C tuvieron valores similares de IP, pero en TBARS, M/BC presenta un alto valor de compuestos secundarios de oxidación (por encima de 4 mmol MDA/kg de aceite), mientras que M/ASX-VE, como ya se mencionó quedó por debajo del límite sugerido. Esto podría ser indicativo de una mayor protección antioxidante del AC cuando la ASX está presente en la formulación de microcápsulas.

Una vez más, los sistemas con una única fuente de antioxidantes ofrecieron una mayor protección al aceite de chía encapsulado. Además, la temperatura resultó ser el principal factor que afectó la formación de hidroperóxidos, ya que incluso las microcápsulas sin

antioxidantes mostraron baja oxidación a 4 °C. No obstante, a 25 °C, la adición de antioxidantes parece haber jugado un papel fundamental contra el deterioro oxidativo.

Estudios similares también han observado un efecto prooxidante frente a la combinación de distintos antioxidantes para la microencapsulación de aceites. Bordón et al. (2022) observaron este efecto al encapsular mezclas de aceite de chía y aceite de germen de trigo (AGT, 80:20). Los carotenoides del AGT (licopeno, luteína y β -caroteno) potenciaron la oxidación al combinarse con tocoferoles del aceite de chía, alcanzando un IP de 20 meq O₂/kg de aceite tras el secado por aspersión, y 80 meq O₂/kg de aceite tras 60 días a 20 °C.

En un trabajo reciente realizado por Ixtaina et al. (2023) evaluaron la estabilidad oxidativa del aceite de chía microencapsulado con distintos antioxidantes (extracto de romero [ER], mezcla de ER y extracto de manzanilla, y palmitato de acetilo) a 25 °C durante 60 días. El palmitato de acetilo fue el más eficaz (IP < 10 meq O₂/kg de aceite), mientras que ER y su mezcla con manzanilla solo resultaron efectivos a altas concentraciones (10000 mg/kg), con IP de 15 y 20 meq O₂/kg de aceite, respectivamente.

Cabe destacar que los resultados de esta tesis muestran valores de IP similares tras 8 semanas, empleando concentraciones mucho menores de ASX y tocoferoles (VE) (2000 mg/kg). Aunque el palmitato de acetilo resultó el antioxidante más eficiente según Ixtaina et al. (2023), cabe señalar que se trata de un compuesto sintético.

3.3. Conclusiones preliminares

Se prepararon mezclas líquidas de aceite de chía enriquecidas con antioxidantes utilizando fuentes comerciales de antioxidantes naturales comestibles (vitamina E, β -caroteno y ASX) solos o en combinación. Todos los sistemas se mantuvieron estables y presentaron valores de IP muy bajos (< 3 meq O_2 /kg de aceite) después de 8 semanas de almacenamiento a $4^\circ C$, lo que sugiere que la temperatura fue el factor más importante para mantener la estabilidad oxidativa, independientemente de los antioxidantes utilizados. Sin embargo, a temperaturas más altas ($25^\circ C$), los antioxidantes jugaron un papel fundamental contra el deterioro oxidativo del aceite de chía, siendo las fuentes comerciales de BC y ASX las mejores opciones para preservar la calidad de este aceite, ya que después de 8 semanas de almacenamiento mostraron valores de IP < 2 meq O_2 /kg de aceite. Aunque, la combinación de las fuentes de antioxidantes de BC y VE resultó en un marcado efecto prooxidante en el aceite de chía.

Por otra parte, se obtuvieron co-encapsulados en polvo de aceite de chía y antioxidantes mediante el secado por aspersion de emulsiones doble capa. Como era de esperarse, el proceso de secado aumentó los niveles iniciales de peróxidos en las microcápsulas, a diferencia de lo observado para las mezclas líquidas de aceite de chía y antioxidantes. En las microcápsulas en polvo, la combinación de β -caroteno y vitamina E promovió el mismo efecto prooxidante que el observado para las muestras líquidas de aceite de chía. Durante el almacenamiento de las microcápsulas a $4^\circ C$, los valores de IP se mantuvieron bajos independientemente del tipo de antioxidante agregado. Sin embargo, al almacenar los mismos polvos a temperaturas más altas ($25^\circ C$), los antioxidantes jugaron un papel fundamental contra el deterioro oxidativo, siendo el sistema M/ASX el único que no superó

el límite de IP recomendado por Codex Alimentarius (15 meq O₂/kg de aceite), incluso después de 8 semanas de almacenamiento.

Las microcápsulas formuladas con combinaciones de fuentes comerciales de antioxidantes también mostraron un efecto prooxidante en comparación con los polvos elaborados con una sola fuente antioxidante. Por lo tanto, es fundamental ser cauteloso al incorporar mezclas de antioxidantes en los aceites, ya que, en algunos casos, su combinación puede resultar perjudicial. Al formular estas mezclas, tanto la dosis como el tipo de antioxidantes son factores clave a considerar.

Por último, es interesante mencionar que, aunque los sistemas sin encapsular mostraron una mejor estabilidad oxidativa en el tiempo en comparación con los microencapsulados, el proceso de formulación y secado por aspersion facilita la vehiculización de los compuestos bioactivos para su incorporación en otros alimentos. Por lo que el proceso de microencapsulación se hace indispensable. En este contexto, la ASX parece ser la mejor opción para continuar con el desarrollo tecnológico de ingredientes funcionales.

4. CAPITULO II:

Elección de la concentración de astaxantina

4. CAPÍTULO II: ELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ASTAXANTINA

En el capítulo anterior se utilizó una concentración de 2000 ppm de ASX en el aceite de chía, considerando que el consumo de 1 g de la mezcla de aceite y polvo de *Haematococcus pluvialis* permitiría alcanzar la dosis diaria de 2 mg de ASX evaluada por Park et al. (2010). Sin embargo, dado que la proporción de aceite en las microcápsulas en polvo es de aproximadamente un 25%, para alcanzar los 2 mg diarios de ASX sería necesario consumir 4 g de microcápsulas. Esta cantidad resultó ser un poco elevada para su incorporación práctica en un alimento. Por este motivo, se pensó en reducir la cantidad a 2,5 g de microcápsulas en polvo, manteniendo el objetivo de alcanzar la misma dosis de ASX.

Teniendo en cuenta esta consideración para rediseñar la formulación del ingrediente funcional, en el presente capítulo se llevaron a cabo ensayos necesarios para determinar la concentración óptima de ASX a incorporar en mezclas de aceite de chía y *Haematococcus pluvialis*. Esta debería ser suficiente para proteger al aceite de la oxidación durante el almacenamiento a distintas temperaturas (25°C y 40°C) y, al mismo tiempo, preservar la cantidad necesaria de ASX para continuar con la formulación del ingrediente funcional en polvo.

4.1. Materiales y Métodos

4.1.1. Materiales

Se trabajó con aceite de chía comercial provisto por SDA S.A. (Buenos Aires, Argentina). Como fuente de ASX se utilizó polvo de algas marinas de calidad alimentaria comercial (*Haematococcus pluvialis*) de Prescribed for Life. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

4.1.2. Composición de ácidos grasos del aceite de chía

La composición de ácidos grasos del aceite de chía (AG) se determinó mediante cromatografía gaseosa, siguiendo el método descrito por Masson et al. (2015), con algunas modificaciones. Una alícuota de la muestra de aceite (70 mg) fue disuelta en 3 ml de hexano. La derivatización de los AG a ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se realizó usando una solución de hidróxido de potasio en metanol (2N) (Sain et al., 2023). Los FAMEs se cuantificaron utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2014 (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón) equipado con una columna capilar CP-Sil 88 (100 m, 0,25 mm de diámetro interior, Varian, Lake Forrest, CA) y un detector de ionización de llama (GC-FID). El volumen de inyección fue de 1 μ l con una relación de split de 1:100. Se utilizó H₂ como gas carrier a una velocidad de flujo en la columna de 1 ml/min, además fue empleado N₂ como gas suplementario de arrastre (make up) a 25 ml/min.

La temperatura de la columna se mantuvo a 100°C durante 3 min tras la inyección. Posteriormente, se incrementó a una velocidad de 3°C/min hasta alcanzar los 140°C, luego a 0,5°C/min hasta 170°C, y finalmente a 5°C/min hasta llegar a 220°C. Esta última temperatura se mantuvo durante 40 min.

Los FAMEs se identificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención relativos (calculados respecto al ácido esteárico, 18:0) con los de estándares comerciales, utilizando el software GC Solution Postrun (Versión 2.30 00 SU6) de Shimadzu. Se empleó el GLC-463 Reference Standard, que contiene una mezcla de 52 FAMEs con una pureza superior al 99%, adquirido a Nu-Chek Prep, Inc. Todos los disolventes y reactivos utilizados para la

cuantificación de ácidos grasos fueron de grado cromatográfico, y los demás productos químicos empleados fueron al menos de grado de la American Chemical Society (ACS).

Los resultados finales se expresaron en gramos de ácidos grasos por 100 gramos de ácidos grasos (g FA/100 g FAs).

4.1.3. Determinación de la concentración de ASX en *Haematococcus pluvialis*

Se aplicó una técnica espectrofotométrica basada en el método descrito por Liu et al., (2011), con algunas modificaciones. Brevemente, se tomó una alícuota de 10 mg, que se sometió a digestión ácida con 2 ml de HCl 4N a 70 °C durante 10 min. Luego, se centrifugó a 13000 rpm para recuperar el pellet, el cual se resuspendió en 5 ml de una mezcla de etilacetato-etanol (1:1). A partir del extracto obtenido, se realizaron las diluciones necesarias para la medición. Finalmente, se llevó a cabo un barrido espectrofotométrico en el rango de 400 a 550 nm, y la concentración de ASX se determinó a partir del valor de la derivada de este barrido a 432 nm, utilizando una curva de calibración construida con un patrón de ASX (Sigma-Aldrich).

4.1.4. Preparación de mezclas de aceite de chía y *Haematococcus pluvialis*

Las mezclas se prepararon agitando vigorosamente aceite de chía y polvo de *Haematococcus pluvialis* en un agitador vórtex durante 1 min, en las proporciones necesarias para alcanzar las concentraciones de ASX que se muestran en la Tabla 4.1., teniendo en cuenta la concentración de ASX determinada previamente en el polvo de algas.

Tabla 4.1. Composición de las mezclas de aceite de chía y *Haematococcus pluvialis*

Formulaciones	Concentración de ASX (ppm)
A (Control)	-
A-3200	3200
A-6400	6400

Tal y como se mencionó anteriormente, las concentraciones de ASX para mezclar con el aceite se eligieron con el objetivo de alcanzar una dosis diaria de 2 mg ASX (Park et al., 2010), contenida en 2,5 g del ingrediente funcional final (co-encapsulado en estado sólido). Por ello, se preparó una mezcla con aceite y *Hematococcus pluvialis* con 3200 ppm de ASX, considerando que, si las microcápsulas secadas por aspersion van a contener un 25%, de aceite, se obtendrían 2 mg ASX en 2,5 g del producto final en polvo. Asimismo, se consideró la posible degradación de la ASX durante el almacenamiento, por lo que se preparó otro sistema duplicando la dosis del antioxidante (6400 ppm) para evaluar su comportamiento durante el almacenamiento. Las mezclas nutracéuticas líquidas se almacenaron a 25 y 40 °C por un periodo de 3 meses.

4.1.5. Estabilidad oxidativa de las mezclas nutracéuticas durante el almacenamiento

La estabilidad oxidativa de las mezclas de aceite de chía y *H. pluvialis* se evaluó cada dos semanas (durante 3 meses), midiendo los productos de oxidación primaria y secundaria, mediante la determinación del índice de peróxidos (IP) y de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), respectivamente.

4.1.5.1. Índice de peróxidos (IP)

En este caso, se utilizó una técnica espectrofotométrica que requiere una cantidad significativamente menor de muestra, permitiendo reducir costos de reactivos. El procedimiento se basó en la metodología descrita por Fioramonti et al. (2019). Inicialmente, una alícuota de muestra se diluyó en cloroformo de acuerdo con el nivel de oxidación estimado. Se añadieron 0,2 ml de muestra a tubos de ensayo cubiertos y tapados, conteniendo 2,8 ml de una mezcla cloroformo:metanol (7:3 v/v) y 15 μ l de NH_4SCN 3,94 M. La reacción se inició añadiendo 15 μ l de solución de Fe (II), preparada mezclando volúmenes iguales de BaCl_2 0,131 M y FeSO_4 0,144 M en solución ácida. Luego de un tiempo de incubación de 10 min, se registró la absorbancia a 500 nm. El valor de IP se reportó como miliequivalentes (meq) de oxígeno por kilogramo de aceite, y se calculó a partir de una curva de calibración preparada previamente con hidroperóxido de cumeno (CHP) en un rango de concentraciones entre 0 y 0,66 mM ($R^2 = 0,99$). La ecuación que se utilizó fue la siguiente:

$$\text{IP} \left(\frac{\text{meq O}_2}{\text{kg de aceite}} \right) = \frac{(A_M - A_b)}{m \times P_M} \times 2 \quad [\text{Ec. 4.1}]$$

donde A_M es la absorbancia de la muestra, A_b es la absorbancia del blanco de reactivo, m es la pendiente de la curva de calibración de CHP, P_M es el peso de la muestra en gramos y 2 es el factor de corrección para convertir mmol a meq de oxígeno activo (valencia = 2 para O_2).

4.1.5.2. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Los compuestos de oxidación secundaria se midieron según Fioramonti et al. (2017), como se explicó en el capítulo anterior (inciso 3.1.4.3.b). Se mezcló 1 ml de muestra con 2 ml de

solución de reactivo TBA, luego se incubó (90°C, 15 min), se centrifugó (6000 g, 10 min) y se midió la absorbancia de la fase acuosa a 532 nm.

4.1.6. Cuantificación de ácido α -linolénico (ALA) durante el almacenamiento

El contenido de ALA se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC). En primer lugar, los AG se convirtieron a FAME, siguiendo el método reportado por Vélez et al. (2021), con algunas modificaciones. Una alícuota de 30 mg de muestra se colocó en un tubo de vidrio con 2 ml de NaOH (1 N en metanol), la mezcla se calentó en un baño de agua a 100°C durante 15 min. Después de enfriar, se realizó la metilación utilizando 2 ml de BF₃-MeOH (14%) a 50°C durante 30 min con agitación intermitente. Los FAME se extrajeron con hexano, después de agregar 1 ml de solución saturada de NaCl, y la fase de hexano se evaporó bajo una corriente de nitrógeno. Luego se agregó acetonitrilo para resuspender los FAME y la solución resultante se inyectó en el cromatógrafo. La curva de calibración se realizó con el mismo método aplicado a un patrón de ALA (Sigma-Aldrich Corp.) en el rango de concentraciones de 8-224 mg/l ($R^2 = 0,9892$). Los FAME se midieron mediante RP-HPLC utilizando un cromatógrafo Perkin Elmer equipado con una bomba (Serie 2000), un detector UV/Vis (785A) y una interfaz (NCl 900). Se empleó una columna C18 (ODS) Symmetry300™ (Waters Corp., EE. UU.) con dimensiones de 250 mm de longitud, 4,6 mm de diámetro interno, tamaño de partícula de 5 μ m y tamaño de poro de 30 nm. Las condiciones experimentales de RP-HPLC se establecieron de acuerdo con Sponton et al. (2017). Se aplicó un gradiente lineal de acetonitrilo y agua (7:3) (fase A) a acetonitrilo (fase B) durante 15 min, luego se mantuvo 100% de acetonitrilo durante 10 min. Se agregó una solución de ácido acético (0,12 % v/v) a ambas fases móviles. La detección de FAME se

realizó a 196 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de conservación de ALA (%) y se calcularon de la siguiente manera:

$$ALA (\%) = \frac{(ALA_F)}{ALA_i} \times 100 \% \quad [\text{Ec. 4.2.}]$$

donde ALA_F es la concentración de ALA medida en cada muestra y ALA_i es la concentración inicial de ALA en el aceite de chía.

4.1.7. Determinación del porcentaje de retención de ASX

Se midió la concentración de ASX en las mezclas de aceite de chía y *H. pluvialis* cada 2 semanas, a través de la metodología descrita en el punto 4.1.3. Los resultados para cada muestra se expresaron en relación a la concentración inicial de ASX agregada a cada sistema, según la siguiente ecuación:

$$ASX (\%) = \frac{(ASX_F)}{ASX_i} \times 100 \% \quad [\text{Ec. 4.3.}]$$

donde ASX_F es la concentración de ASX medida en cada muestra y ASX_i es la concentración inicial de ASX incorporada a cada sistema.

4.1.8. Análisis estadístico

Todas las muestras fueron preparadas con sus réplicas y las determinaciones analíticas se realizaron al menos por duplicado. Las diferencias entre medias se analizaron utilizando el software R con la interfaz RStudio, empleando análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación múltiple HSD de Tukey a un nivel de significancia de $p < 0,05$.

4.2. Resultados y discusión

4.2.1. Perfil de ácidos grasos del aceite de chía

En la Tabla 4.2. se muestra el perfil de ácidos grasos (AG) del aceite de chía analizado por GC-FID y los porcentajes de cada tipo de AG. Como se puede observar, ALA fue el AG predominante (67,5%), seguido del ácido linoleico (17,6%), con una relación ω -6/ ω -3 de 0,26 y con AG insaturados alrededor del 90%. Este perfil es similar a los reportados en otros estudios, donde la proporción de ALA oscila entre el 54,2% y el 64,2% (Ayerza & Coates, 2004; Gañan et al., 2020; Ixtaina et al., 2012; Martínez et al., 2015).

Tabla 4.2. Composición de los AG en el aceite de chía, determinados como FAME por GC-FID

Tipo de ácido graso	AG (%) \pm SD
Ac. palmítico (16:0)	5,52 \pm 0,53
Ac. esteárico (18:0)	2,72 \pm 0,01
Ac. eicosanoico (20:0)	0,18 \pm 0,01
Ac. oleico (9c-18:1)	5,39 \pm 0,05
Ac. cis-vaccénico (11c-18:1)	0,51 \pm 0,01
Ac. linoleico (9c, 12c-18:2) (ω -6)	17,61 \pm 0,01
Ac. γ -linoleico (6c, 9c, 12c-18:3) (ω -6)	0,06 \pm 0,02
Ac. α -linolénico (9c, 12c, 15c-18:3) (ω -3)	67,53 \pm 0,21
Total AG saturados	8,91 \pm 0,18
Total AG monoinsaturados	5,90 \pm 0,06
Total AG poliinsaturados (cis)	85,20 \pm 0,23
Total AG trans	ND
Total omega-6	17,67 \pm 0,04
Total omega-3	67,53 \pm 0,21
Relación Omega-6/Omega-3	0,26 \pm 0,01

Los valores representan el promedio \pm desviación estándar de las réplicas.
ND: no detectable

Desde el punto de vista nutricional, es interesante destacar el contenido de PUFA del aceite de chía, que representó el 85% de la composición total de AG. Este tipo de AG se ha relacionado con un menor riesgo de incidencia de enfermedades cardiovasculares y accidentes cerebrovasculares. Según algunos autores (Dinicolantonio et al., 2021; Simopoulos, 2016), la dieta actual presenta una relación desequilibrada entre los ácidos grasos omega-6 y omega-3 ($\omega_6:\omega_3$), a favor de los PUFA omega-6, lo que podría predisponer a respuestas inflamatorias suprafisiológicas y perpetuar una inflamación crónica de bajo grado. Este cambio en las dietas occidentales se atribuyó a la agroindustria y la agricultura moderna que promovieron un consumo excesivo de ácido linoleico (ω_6), principalmente de aceites de semillas (maíz, soja, cártamo). Aunque las proporciones $\omega_6:\omega_3$ entre 1:1 y 5:1 se consideran saludables, la dieta occidental típica ahora proporciona una relación de aproximadamente 20:1 (Simopoulos, 2016). Ante este desequilibrio, el aceite de chía se convertiría en una excelente fuente para el diseño de mezclas nutracéuticas y/o ingredientes funcionales que ayuden a restablecer ese equilibrio, debido a que aporta una relación omega-6/omega-3 de 0,26 (Tabla 4.2.), que correspondería a proporciones de $\omega_6:\omega_3$ entre 1:3 y 1:4 (Bordón et al., 2019; Ixtaina et al., 2011; Mohamed Basuny et al., 2020; Silveira Coelho & de las Mercedes Salas-Mellado, 2014; Zare et al., 2024).

4.2.2. Estabilidad oxidativa de las mezclas durante el almacenamiento

La Fig. 4.1. muestra la apariencia macroscópica del alga en polvo utilizada como fuente de ASX y de las mezclas nutracéuticas de aceite de chía con las concentraciones de ASX estudiadas. Como se puede observar, la adición de *Haematococcus pluvialis* que contiene ASX imparte un color rojo oscuro a las mezclas.

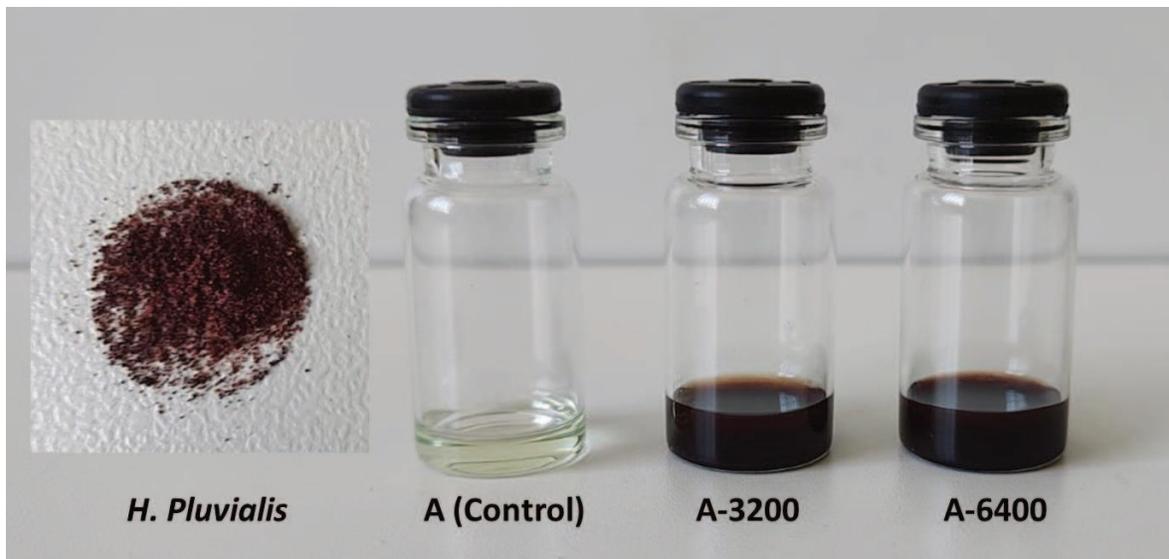


Figura 4.1. Aspecto del polvo de *H. pluvialis* y de las mezclas de aceite de chía con diferentes concentraciones de ASX: muestra sin ASX -A (Control)- y muestras con 3200 ppm (A-3200) y 6400 ppm (A-6400) de ASX.

Dado que el IP es un parámetro que se sigue utilizando a nivel mundial para evaluar la calidad de los aceites comestibles, se ha determinado en las mezclas de manera complementaria con el ensayo de TBARS. De este modo, se cuantifican los compuestos primarios y secundarios de oxidación, y se logra una evaluación más completa de la calidad del producto y su grado general de oxidación (Sampels, 2013).

El IP de todos los sistemas aumentó gradualmente durante el almacenamiento a diferentes temperaturas (Fig. 4.2.A y C), lo cual era esperable ya que el aceite de chía contiene altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados (Tabla 4.2.).

Cuando se almacenó a 25 °C, el IP del A (Control) permaneció por debajo del límite permitido por Codex Alimentarius, (2001) por 4 semanas ($< 15 \text{ meq O}_2/\text{kg}$ de aceite), pero luego superó este umbral, alcanzando un IP mayor a $100 \text{ meq O}_2/\text{kg}$ de aceite al final del experimento.

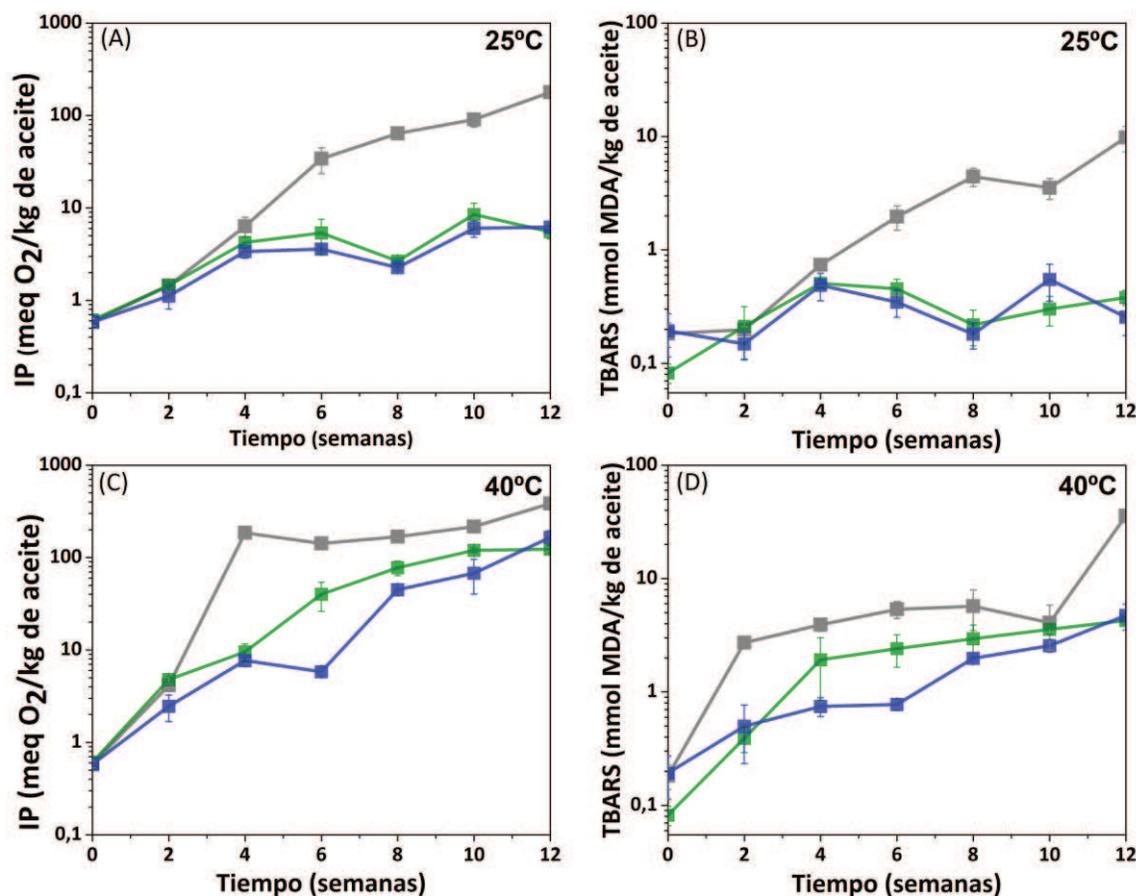


Figura 4.2. Efecto de la concentración de ASX sobre IP y TBARS de mezclas de AC y ASX en distintas concentraciones: A (-■-) AC sin ASX agregada como control, A-3200 (-■-) y A-6400 (-■-) AC adicionadas con 3200 y 6400 ppm ASX respectivamente, almacenados a 25 °C (A, B) y 40 °C (C, D).

Sin embargo, al agregar ASX al aceite, el IP se mantuvo por debajo de 15 meq O₂/kg de aceite durante los 3 meses de almacenamiento, lo que demostró el poder antioxidante de la ASX. Además, no se observaron diferencias significativas entre las dos concentraciones de ASX estudiadas.

Por otro lado, al aumentar la temperatura de almacenamiento a 40 °C, el IP del A (Control) permaneció por debajo del umbral sugerido durante sólo 2 semanas (Fig. 4.2.C). Con la adición de ASX, este período de tiempo se extendió a 4 semanas para A-3200 y a 6 semanas

para A-6400. Es interesante notar que, a las 6 semanas de almacenamiento a 40°C, mientras que el control sin ASX reportó un IP cercano a 100 meq O₂/kg de aceite y el sistema A-3200 un IP > 40 meq O₂/kg de aceite, la mezcla de A-6400 solo alcanzó los 7 meq O₂/kg de aceite. Tal y como se observa en la Fig. 4.2.C, hasta las 10 semanas de almacenamiento, la mayor concentración de ASX proporcionó una mejor protección al aceite almacenado a 40°C, neutralizando efectivamente la reacción de los hidroperóxidos durante un período prolongado. Por lo tanto, la variación de concentración de ASX no tuvo un efecto significativo en el IP de las mezclas a 25 °C (Fig. 4.2.A), pero sí cuando se almacenaron las muestras a 40 °C (Fig. 4.2.C).

Al revisar la literatura, se encontró que Espinaco et al. (2021) trabajaron con mezclas de aceite de chía y ASX, pero utilizando una dosis de ASX menor (400 ppm). En ese trabajo, se observó un efecto prooxidante de la ASX durante el almacenamiento a 25 y 45 °C, ya que las mezclas que contenían el antioxidante exhibieron un IP más alto que el control sin agregado de ASX. Además, las mezclas A-ASX alcanzaron un IP superior a 15 meq O₂/kg de aceite después de sólo 2 semanas de almacenamiento a 25°C. Las diferencias observadas, en comparación con este estudio, podrían atribuirse al elevado IP presentado por el AC al inicio de sus experimentos (aproximadamente 8 meq O₂/kg de aceite), lo que resalta la importancia de utilizar aceites de alta calidad, con un IP bajo, idealmente entre 1-2 meq O₂/kg de aceite. En el capítulo anterior de esta tesis, en la Fig. 3.3.B, se observó que el agregado de 2000 ppm de ASX al aceite de chía reportó un IP inferior a 3 meq O₂/kg de aceite después de 8 semanas de almacenamiento a 25°C, similar a los valores que se muestran en la Figura 4.2.A. Esto

sugiere que, si bien el aumento de la concentración de ASX mejora la estabilidad de oxidación del aceite, su rendimiento antioxidante no es directamente proporcional a la concentración. Las mediciones de TBARS (Fig. 4.2.B y D) fueron consistentes con los resultados de IP, ya que siguieron la misma tendencia. Esto indicaría que las mezclas se encuentran en la etapa inicial del deterioro oxidativo de las mezclas (Sampels, 2013). Además, se observó que todos los sistemas con valores de IP por debajo de 15 meq O₂/kg de aceite (Fig. 4.2.A y C) mostraron TBARS < 1 mmol MDA/kg de aceite. Aunque no existen valores de referencia para estimar la calidad del aceite a partir de TBARS, como ya se ha mencionado previamente, los valores que permanecen por debajo de 1 mmol MDA/kg de aceite se consideran un punto de referencia aceptable (Fioramonti et al., 2019).

4.2.3. Retención de ASX en las mezclas almacenadas a diferentes temperaturas

La Fig. 4.3. muestra el porcentaje de retención de ASX durante el almacenamiento de las mezclas de aceite de chía y *H. pluvialis* (A-3200, A-6400) a distintas temperaturas. También se evaluó una muestra de control de polvo de *H. pluvialis* sin mezclar con aceite de chía (C-ASX).

En primer lugar, se observa que en el polvo de *H. pluvialis* sin aceite (C-ASX) la concentración de ASX disminuyó ligeramente, aunque se mantuvo bastante estable con una retención de aproximadamente el 90 % después de 12 semanas de almacenamiento. No se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes temperaturas.

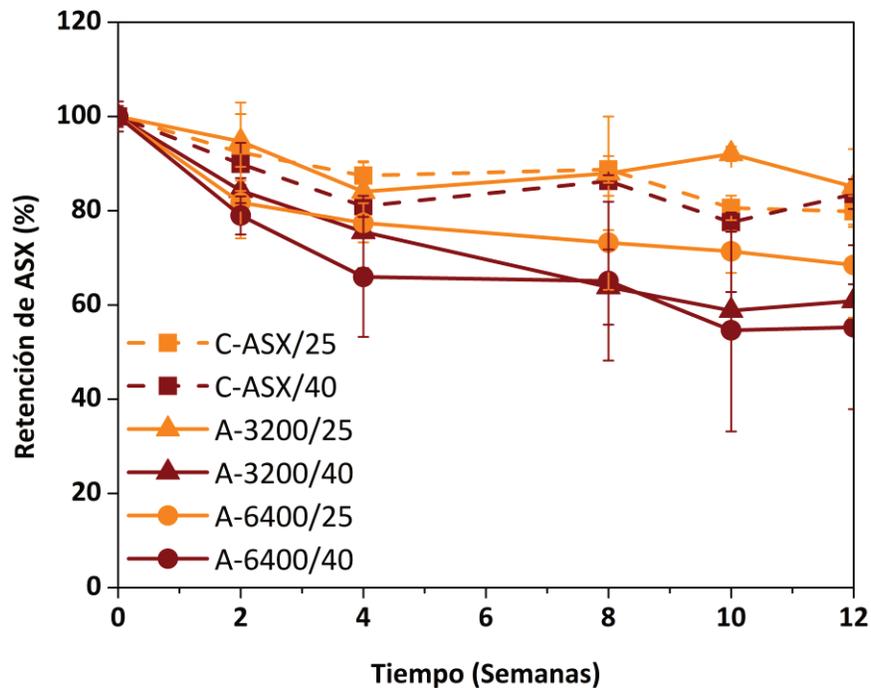


Figura 4.3. Estabilidad de ASX en mezclas de aceite de chía y *H. puvialis* durante el almacenamiento a 25°C y 40°C, expresada como porcentaje de retención de ASX, en relación con la concentración inicial de ASX (A-3200 y A-6400). Se utilizó polvo de *H. puvialis* sin mezclar con aceite como control (C-ASX).

Cuando el alga en polvo se mezcló con el aceite de chía, la temperatura de almacenamiento más elevada (40 °C) promovió una menor retención de ASX, lo que fue consistente con el IP más alto observado para las mezclas almacenadas a 40 °C. Esta observación sugiere que, en contacto con el aceite de chía, la ASX puede haberse degradado para proteger el aceite. Miao et al. (2013) observaron un comportamiento similar cuando mezclaron ASX con aceite de germen de maíz.

Además, en las mezclas de aceite de chía y *H. puvialis* almacenadas a 40 °C, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las dos concentraciones de ASX

estudiadas, alcanzando una retención de alrededor del 55 % después de 12 semanas de almacenamiento. Sin embargo, cuando las mezclas se almacenaron a 25°C, los sistemas con la dosis más baja (A-3200) retuvieron el 85 % de la ASX inicial, mientras que los de dosis más alta (A-6400) retuvieron el 70 % al cumplirse los 3 meses. En este caso, la retención de ASX no fue proporcional a la concentración inicial de antioxidante, ya que las dosis más altas alcanzaron valores más bajos de retención de ASX. A pesar de esto, 0,45 g de la mezcla más concentrada en ASX (A-6400/25) serían suficientes para cubrir la ingesta diaria de 2 mg de ASX propuesta por Park et al. (2010), mientras que se requerirían 0,75 g de la mezcla A-3200/25 para alcanzar la misma dosis. Esto convierte a la mezcla A-6400 en una alternativa más adecuada para el diseño de un suplemento nutracéutico conteniendo aceite de chía y ASX.

Similarmente, Espinaco et al. (2021) informaron una retención del 75 % de ASX en formulaciones de aceite de chía y ASX (400 ppm) a temperatura ambiente (25°C) después de 5 semanas de almacenamiento. No obstante, tras la incubación de las mezclas a 45 °C, la ASX resultó indetectable después de 2 semanas. La discrepancia observada respecto a los resultados de este estudio podría atribuirse a las diferentes dosis de ASX utilizadas.

Asimismo, Rao et al. (2007) utilizaron ASX como antioxidante en ocho aceites comestibles diferentes (palma, sésamo, maní, salvado de arroz, mostaza, oliva, girasol y coco) a una concentración de 1000 ppm. Casi todas las muestras, después del almacenamiento a temperatura ambiente durante 3 meses, mostraron una retención de ASX superior al 80 %, excepto el aceite de oliva que exhibió una retención de ASX del 70 %. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos aceites tienen un perfil de ácidos grasos con menores

proporciones de PUFAs que el aceite de chía siendo, por tanto, menos propensos a la oxidación, por lo que posiblemente requieren menos cantidades de ASX para su conservación.

4.2.4. Preservación de ALA en las mezclas de aceite de chía y *H. pluvialis* almacenadas a 25°C

El contenido de ALA (Fig. 4.4.), que es un ácido graso de fácil oxidación y el componente mayoritario en el aceite de chía (67,5%), se cuantificó en los sistemas que mantuvieron los valores de IP por debajo del valor sugerido por el Codex Alimentarius (15 meq O₂/Kg aceite). Estos sistemas fueron las mezclas de aceite de chía y *H. pluvialis* almacenadas a 25°C (Fig. 4.2.A), utilizando como control el aceite de chía almacenado en las mismas condiciones, pero sin agregado del antioxidante.

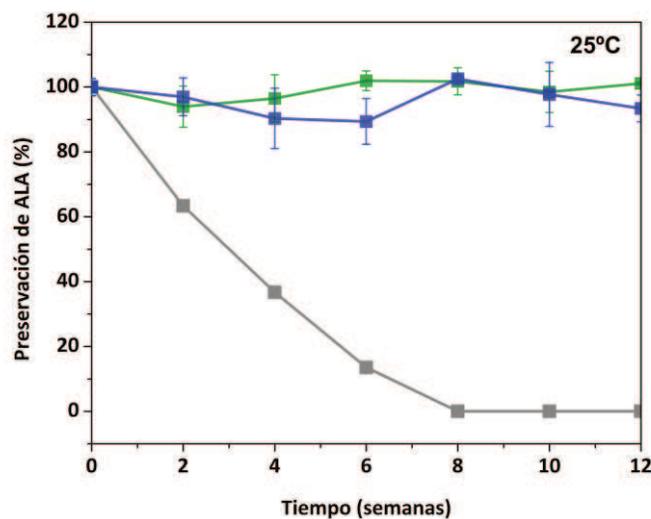


Figura 4.4. Preservación de ALA por 3 meses a 25°C en mezclas A-ASX en diferentes concentraciones: A-3200 (-■-) y A-6400 (-■-). Se utilizó aceite de chía como control (-■-)

Como se puede observar, en la Fig. 4.4., el aceite sin ASX exhibió una disminución gradual en la concentración de ALA durante el almacenamiento, alcanzando valores inferiores al 20 % del contenido inicial transcurridas 6 semanas. Esto fue consistente con el alto valor de IP > 30 meq O₂/kg de aceite observado para este control luego de 6 semanas de almacenamiento a 25 °C (Fig. 4.2.A).

Sin embargo, la adición de ASX en ambas dosis demostró su efectividad en la preservación de la concentración inicial de ALA, ya que no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de este ácido graso luego de 3 meses de almacenamiento.

Espinaco et al. (2021) reportaron una tendencia similar para la mezcla de aceite de chía con ASX (400 ppm) almacenada a 25°C. Sin embargo, estos autores no observaron diferencias en el contenido de ALA con respecto al control de aceite sin ASX, ya que el aceite no mostró una disminución significativa de ALA al final del experimento. Esto último podría estar relacionado con el hecho de que su estudio se realizó durante solo 5 semanas de almacenamiento y los sistemas no alcanzaron un IP superior a 20 meq O₂/kg de aceite en ese momento.

Estos resultados son prometedores ya que demuestran que la incorporación de *H. pluvialis* rica en ASX, ejerció un efecto protector frente a la oxidación de los ácidos grasos ω -3 presentes en el aceite de chía durante el almacenamiento a 25°C.

4.3. Conclusiones preliminares

En este capítulo se estudió el impacto de la adición de *H. pluvialis* al aceite de chía para alcanzar diferentes concentraciones de ASX (3200 o 6400 ppm), con el objetivo de monitorear la conservación de los componentes bioactivos (AG ω -3 y ASX) durante los 3 meses de almacenamiento, a dos temperaturas: 25 y 40 °C.

La estabilidad oxidativa de las mezclas fue más susceptible a las variaciones de temperatura que a las distintas concentraciones de ASX evaluadas.

A 40 °C, el aceite de chía superó el umbral de IP sugerido (15 meq O₂/kg de aceite) transcurridas 2 semanas. La adición de *H. pluvialis* retrasó la superación de este límite, alcanzándose a las 4 y a las 6 semanas para 3200 ppm y 6400 ppm de ASX, respectivamente. Sin embargo, ambas mezclas superaron ampliamente el umbral de IP al final del almacenamiento (IP > 100 meq O₂/kg de aceite), y el contenido de ASX se redujo casi a la mitad.

Por su parte, a 25 °C, el aceite de chía también superó el umbral de IP, aunque recién a las 4 semanas de almacenamiento. Sorprendentemente, la adición de *H. pluvialis* en ambas concentraciones de ASX preservó la estabilidad oxidativa de las mezclas durante los 3 meses, ya que mostraron valores de IP < 10 meq O₂/kg de aceite. Esto permitió también conservar el contenido inicial de ALA del aceite durante todo el almacenamiento, lo que no fue posible sin el agregado de *H. pluvialis*.

Por otro lado, si bien se observó a 25 °C que la retención de ASX fue mayor en las mezclas que contenían 3200 ppm (85 %) en comparación con aquellas que contenían 6400 ppm (70 %), se decidió optar por la dosis más alta para continuar con los experimentos. Esta decisión

se basó en que, aunque la retención porcentual es menor, la cantidad absoluta de ASX es mayor, lo cual es beneficioso si se busca maximizar la carga de ASX en las microcápsulas.

Además, considerando que la temperatura tiene un impacto significativo en la degradación de la ASX y que, para obtener los encapsulados en estado sólido, las emulsiones deben someterse a procesos de deshidratación, utilizar una concentración inicial más alta puede compensar las pérdidas durante el proceso y mantenerla en niveles aceptables durante el almacenamiento.

Los resultados de este capítulo también constituyen una base para el desarrollo de suplementos nutracéuticos naturales destinados a complementar el abordaje de enfermedades que involucren inflamación crónica en su sintomatología. En este sentido, sería posible administrar dosis diarias de 2 mg de ASX con solo unas gotas de la mezcla de aceite de chía y *H. pluvialis*, fácilmente incorporables a cualquier alimento en el momento del consumo.

5. CAPITULO III: *Formulación y
caracterización de emulsiones para
encapsular aceite de chía*

5. CAPÍTULO III: FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EMULSIONES PARA ENCAPSULAR ACEITE DE CHÍA

En este capítulo se diseñaron distintas emulsiones como etapa inicial en el proceso de encapsulación del aceite de chía, con diferentes niveles de complejidad en la estructura de la membrana interfacial y en los materiales de pared empleados: emulsiones MC, BC y TC. Para ello, se empleó lecitina como emulsionante, CHT y ALG como componentes de las capas más externas que rodean a las gotas de aceite, y MDX como material de relleno, para aumentar el contenido de sólidos.

Los materiales de pared seleccionados para formar las membranas interfaciales difieren de los del Capítulo I, ya que en esta etapa se optó por utilizar un emulsionante más económico y ampliamente utilizado en la industria alimentaria (lecitinas). Además, considerando la carga negativa aportada por los grupos fosfato presentes en las lecitinas, se seleccionaron los otros dos biopolímeros de manera que aportaran cargas opuestas, favoreciendo la formación de las capas interfaciales mediante interacciones electrostáticas atractivas: (i) CHT, con cargas positivas por la presencia de grupos amino y (ii) ALG, con cargas negativas por la presencia de grupos carboxilo en su estructura.

Las emulsiones se caracterizaron según sus propiedades fisicoquímicas y reológicas, con el fin de evaluar su estabilidad y confirmar la formación de las distintas capas en la interfase de las gotas de aceite. El análisis de la estructura de estas emulsiones es fundamental, ya que constituyen el paso previo a la etapa de deshidratación, necesaria para obtener las cápsulas en estado sólido.

5.1. Materiales y Métodos

5.1.1. Materiales

El aceite de chía fue provisto por SDA S.A. (Buenos Aires, Argentina). La LS se adquirió en Gelfix (Buenos Aires, Argentina). El ALG de grado alimenticio fue provisto por Foodchem Andina (Colombia). El CHT fue provisto por Eastar Holding Group Dong Chen Co. Ltd. (PM: $63,97 \pm 2,31$ kDa; grado de desacetilación: 93 %). La MDX (DE 15) fue comprada de Productos de Maíz SA. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

5.1.2. Formulación de emulsiones para encapsular aceite de chía

En la Tabla 5.1. se presentan las concentraciones de los distintos componentes utilizados para la preparación de las emulsiones, y en la Fig. 5.1. se muestra una representación esquemática de la estructura de los tres tipos de emulsiones diseñadas para encapsular el aceite de chía.

Tabla 5.1. Composición de emulsiones para encapsular aceite de chía (AC) (% p/p)

Tipo de emulsión	Fase oleosa		Fase acuosa			pH
	AC	LS	CHT	ALG	MDX	
MC	10	2	-	0,6	25	5,6
BC	10	2	0,3	-	25	4,3
TC	10	2	0,15	0,15	25	4,4

AC: Aceite de chía, LS: Lecitina de Soja, CHT: quitosano, ALG: Alginato, MDX: Maltodextrina

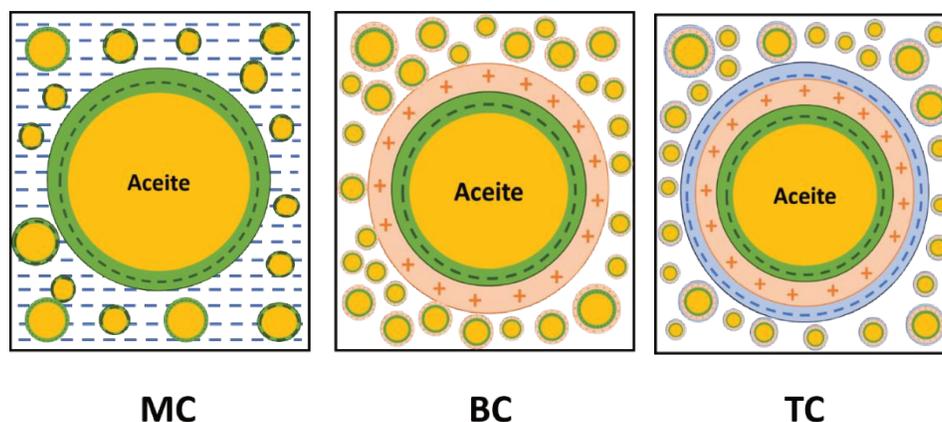


Figura 5.1. Representación gráfica de las emulsiones monocapa (MC), bicapa (BC) y tricapa (TC) para encapsular aceite de chía (●). Los biopolímeros están representados por diferentes colores: ● Lecitina de soja, ● CHT y ● alginato

En todas las formulaciones se mantuvo constante la proporción de fase oleosa y acuosa en 1:9, se utilizó LS como emulsionante y MDX como material de relleno. Estos dos biopolímeros son ampliamente utilizados en la industria alimentaria por su bajo costo y su versatilidad para estabilizar sistemas coloidales (Ogawa et al., 2004). La concentración de lecitina se eligió en función de la proporción de aceite, de modo que se mantuviera una relación 1:5 (Klinkesorn et al., 2006).

La concentración de CHT para la formación de la segunda capa interfacial (0.3%) se seleccionó en relación a la concentración de lecitina, de acuerdo con trabajos previos reportados en la bibliografía (Klinkesorn et al., 2005).

Para formar la TC interfacial con ALG, se decidió mantener constante la concentración total de biopolímeros en 0.3%. Por ello, se optó por trabajar con 0.15% de CHT y 0.15% de ALG (Tabla 5.1.).

Cabe aclarar que las emulsiones BC y TC fueron diseñadas para ser deshidratadas posteriormente mediante secado por aspersion (Capítulo IV). Sin embargo, la emulsión MC,

fue formulada para ser goteada en una solución de CaCl_2 a fin de obtener esferas gelificadas de ALG-calcio, las cuales serán deshidratadas por liofilización (Capítulo IV). Por esta razón, se utilizó una solución de ALG más concentrada (0.6%) (Tabla 5.1.), con el objetivo de mejorar la estructura de este tipo de cápsulas.

Para la preparación de las emulsiones se eligió un pH cercano a 4, con el fin de favorecer las distintas interacciones electrostáticas necesarias para la formación de las capas interfaciales alrededor de las gotas de aceite. En estas condiciones, la lecitina presenta carga negativa debido a sus grupos fosfato, el CHT adquiere carga positiva por la protonación de los grupos amino (Jiménez-Gómez & Cecilia, 2020), y el ALG posee carga negativa como resultado de la ionización de los grupos carboxilo (Avendaño-Romero et al., 2013) (Figura 5.1).

La preparación de todas las soluciones acuosas se realizó utilizando agua destilada a la cual se le agregó azida sódica al 0.02% para evitar el desarrollo microbiano. Una vez preparadas, se conservaron a 4 °C overnight para promover la hidratación completa de los biopolímeros. El CHT fue dispersado en una solución de ácido acético al 0.5% p/p, con agitación durante 30 min. La MDX y el ALG se dispersaron juntos en agua destilada con agitación magnética y 70 °C durante 40 min, hasta disolución completa. También se prepararon disoluciones dispersando sólo MDX en agua con agitación magnética hasta disolución completa, para la formulación de los sistemas BC.

Las emulsiones se prepararon mediante la mezcla de la fase oleosa y la fase acuosa utilizando un homogeneizador Ultraturrax 25N-18G (IKA, Alemania) a 12000 rpm durante 4 min. El tamaño de gota se redujo mediante un proceso adicional con un procesador ultrasónico Mod. VC-505 (Sonics & Materials, EE.UU.) en modo de pulsos (1 s ON, 1 s OFF) a una amplitud del

40 % durante 4,5 min, en un baño de hielo y bajo agitación magnética. Todas las emulsiones se realizaron por duplicado y fueron evaluadas inmediatamente luego de ser preparadas según las técnicas que se detallan a continuación.

5.1.3. Caracterización de emulsiones para encapsular aceite de chía

5.1.3.1. Distribución de tamaño de gota

Se determinaron las distribuciones de tamaños de gota por dispersión de luz dinámica (DLS) en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra) provisto con una fuente de luz láser He-Ne (632.8 nm). Las mediciones se realizaron a un ángulo fijo de 173° con un rango de medición entre 0,6- 6000 nm (Fioramonti et al., 2019) y se utilizó el índice de refracción del aceite de chía a 25 °C: 1,4761. Las emulsiones fueron previamente diluidas 1/70 en agua ultrapura. Por cada muestra se realizaron al menos 5 mediciones.

5.1.3.2. Potencial Z

Para determinar la estabilidad coloidal de las emulsiones, se realizaron mediciones de potencial zeta a 25 °C y a un ángulo fijo de 173°, utilizando el mismo equipo del apartado anterior (Zeta Sizer Nano ZS) (Fioramonti et al., 2019). La emulsión fue previamente diluida 1/70 en agua ultrapura y luego fue inyectada en la cubeta para medición de movilidad electroforética, a partir de la cual el equipo calcula el potencial zeta. Las mediciones se realizaron por quintuplicado.

5.1.3.3. Microscopía óptica

Las emulsiones se observaron mediante microscopía óptica (Leica Microsystems, Alemania) con un microscopio provisto de cámara fotográfica. Para la observación, se colocó una gota

de la emulsión recién preparada, diluida en una proporción 1:2 con agua destilada, entre un portaobjetos y un cubreobjetos. Las muestras se examinaron a un aumento de 40×, seleccionando distintos campos visuales y fotografiando los más representativos (Fioramonti et al., 2019).

5.1.3.4. Estabilidad de las emulsiones frente al cremado

La estabilidad de las emulsiones frente al cremado se determinó de acuerdo a Ferreira et al. (2010). Para ello se colocaron 10 ml de emulsión en tubos graduados y se determinó la altura de la fase suero (H_s) a las 24 h. El índice de cremado (IC) se calculó como el cociente entre H_s y la altura total (H_T) de la emulsión según:

$$IC (\%) = \left(\frac{H_s}{H_T} \right) \times 100 \quad [\text{Ec. 5.1}]$$

5.1.3.5. Estabilidad de las emulsiones frente a la coalescencia

El porcentaje de coalescencia de las emulsiones se determinó mediante la técnica descrita por Santiago et al. (2005), con modificaciones. Se tomaron alícuotas de las emulsiones preparadas y se centrifugaron a 15000 g a 25 °C durante 15 min (Capp CR1512, Dinamarca). En la parte superior se observó si hubo liberación de aceite luego de la centrifugación y, en ese caso, se determinó la cantidad de aceite liberado por pesada. El porcentaje de coalescencia se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Coalescencia } (\%) = \left(\frac{m_1}{m_2} \right) \times 100 \quad [\text{Ec. 5.2.}]$$

donde m_1 es la masa de aceite liberado luego de la centrifugación, y m_2 es la masa de aceite total (aceite adicionado a la emulsión).

5.1.3.6. Caracterización reológica de emulsiones

Se realizaron ensayos rotacionales utilizando un reómetro (Haake Mars 40, Alemania) con una geometría cono (1°) - plato de 35 mm de diámetro, con un gap de 0,053 mm. Se registraron los valores de viscosidad aparente variando la velocidad de corte ($\dot{\gamma}$) de 0,1 a 300 s⁻¹. Las determinaciones se realizaron por duplicado a 25 °C. Los datos obtenidos se ajustaron al modelo de la ley de potencia, mediante la siguiente ecuación:

$$\tau = k (\dot{\gamma})^n \quad [\text{Ec. 5.3.}]$$

donde τ es el esfuerzo de corte (Pa), k es el índice de consistencia (Pa.s), $\dot{\gamma}$ es la velocidad de corte (s⁻¹), y n es el índice de comportamiento del flujo (adimensional).

Además, se realizaron ensayos oscilatorios utilizando la misma geometría y gap, registrando la evolución de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') en función de la frecuencia, en un rango comprendido entre los 0,5-100 Hz, a 25 °C y una deformación constante de 1 %. Esta deformación se determinó previamente, mediante barridos de amplitud que permitieron determinar que la misma estaba dentro del rango viscoelástico lineal (RVL). Todas las mediciones se realizaron al menos por duplicado.

5.1.4. Análisis Estadístico

Cada experimento se realizó con su correspondiente réplica (dos repeticiones). Todos los ensayos se realizaron al menos por duplicado. A partir de estas mediciones se calcularon promedios y las desviaciones estándar. Las diferencias entre medias se determinaron aplicando el análisis de la varianza mediante la prueba HSD a un nivel de significación $p < 0,05$. Cuando no se cumplió el supuesto de homogeneidad de varianza, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis a $p < 0,05$ y gráficos de caja para identificar diferencias significativas.

5.2. Resultados y discusión

5.2.1. Efecto de los materiales de pared sobre las características fisicoquímicas de las emulsiones

En la Fig. 5.2. se presentan los valores de potencial zeta medidos para las diferentes emulsiones. En primer lugar, se observa que las emulsiones MC presentaron valores de potencial zeta en torno a -60 mV, lo cual sería consistente con la presencia de los grupos fosfato de las lecitinas estructuradas en la interfase aceite-agua. El pKa reportado para los grupos fosfato de las lecitinas es cercano a 1,5 (Ogawa et al., 2004), por lo tanto, al valor de pH de las emulsiones MC (pH = 5,6), se encontrarían desprotonados, aportando cargas negativas.

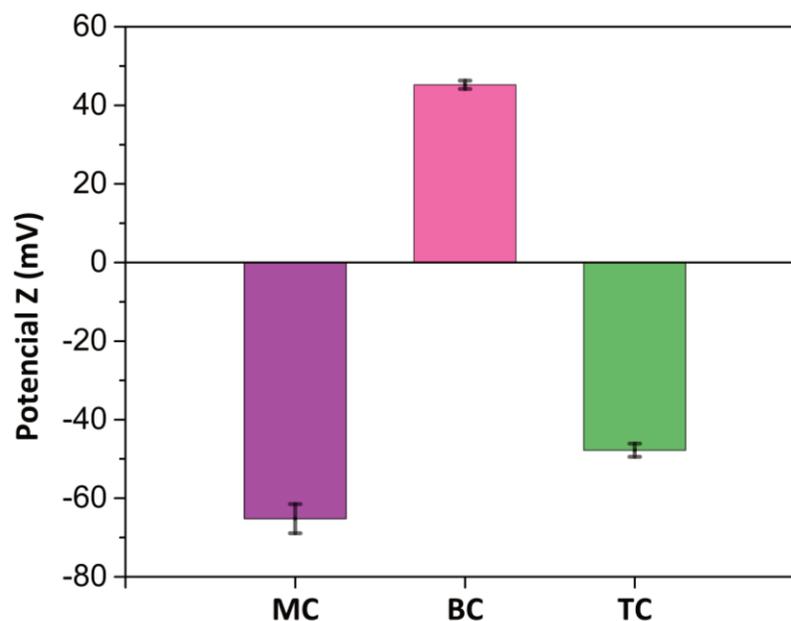


Figura 5.2. Potencial Z de emulsiones monocapa (MC), bicapa (BC) y tricapa (TC)

Estos resultados coinciden con lo reportado en otros estudios disponibles en la bibliografía. Östbring et al. (2021) estudiaron la influencia del pH sobre el potencial zeta de emulsiones O/W estabilizadas con lecitina y observaron valores cercanos a -60 mV en un rango de pH entre 5 y 6. Por su parte, Julio et al. (2018) también trabajaron con emulsiones MC de aceite de chía utilizando diferentes tipos de lecitina, y reportaron valores de potencial zeta cercanos a -36 mV, dependiendo del tipo de lecitina empleada. Sin embargo, en este último caso, las emulsiones se midieron a pH 3, por lo que el potencial Z fue menos negativo debido a las condiciones más ácidas del entorno.

Por su parte, la formulación BC presentó un valor positivo de potencial zeta ($45,2 \pm 1,1$ mV) al pH de formación de la emulsión (pH = 4,3), lo que evidencia la adsorción de moléculas de CHT en la interfase, mediante interacciones electrostáticas con la lecitina estructurada en la superficie de las gotas de aceite. Esta carga positiva se atribuye a la presencia de grupos amino protonados en la estructura del CHT. Julio et al. (2018) reportaron valores de potencial zeta ligeramente más altos para las emulsiones aceite en agua estabilizadas con lecitina, CHT y MDX, en un rango entre 47-55 mV. Esta diferencia podría atribuirse a una mayor densidad de cargas positivas en las moléculas de CHT a pH 3, que fue el pH en el que midieron las emulsiones.

Es importante resaltar también que todos los sistemas presentaron valores absolutos de potencial zeta superiores a 30 mV, lo que generalmente se asocia con una mayor estabilidad coloidal, debido a una repulsión electrostática suficiente entre las gotas para prevenir la agregación (Wang et al., 2011; Bhattacharjee et al., 2016).

Otros autores, como Sepeidnameh et al. (2024), también utilizaron la tecnología de emulsiones capa sobre capa para encapsular aceite de uva, empleando gelatina (pl: 4,2), CHT y goma de semilla de albahaca (cargada negativamente en un rango de pH 4 a 10) como materiales de recubrimiento, y evaluaron sus propiedades a pH 5. En su estudio, observaron que el potencial zeta de las gotas recubiertas únicamente con gelatina (a pH 5) era negativo (-13,06 mV), pero se volvió positivo (25,6 mV) al formar una emulsión secundaria con la adición de CHT. Finalmente, al agregar la goma para formar la TC interfacial, el potencial zeta retornó a valores negativos, alcanzando -30,8 mV. Estos resultados muestran un comportamiento similar al observado en este trabajo, donde también se evidenció una alternancia en el potencial superficial de las gotas de emulsión según la naturaleza de los materiales depositados en cada capa.

En la Fig. 5.3. se muestran las micrográficas de las emulsiones. Cabe aclarar que las emulsiones MC debieron prepararse mediante un único paso de homogeneización con Ultraturrax, ya que, al someterlas a un posterior tratamiento de sonicación, se percibió un fuerte olor a rancio al finalizar el proceso, lo cual no ocurrió en los otros dos sistemas estudiados (BC y TC). En los tres tipos de emulsiones se observó la presencia de flóculos de gotas. Por un lado, tanto en los sistemas MC como BC se observan cadenas de gotas completamente floculadas, mientras que en el sistema TC el grado de floculación es menor y los agregados coexisten con la presencia de gotas individuales. La formación de estos agregados podría explicarse por la presencia de biopolímeros no adsorbidos a la interfase aceite-agua, que permanecen en la fase acuosa de las emulsiones y podrían haber favorecido el fenómeno de floculación por depleción (McClements, 2004a).

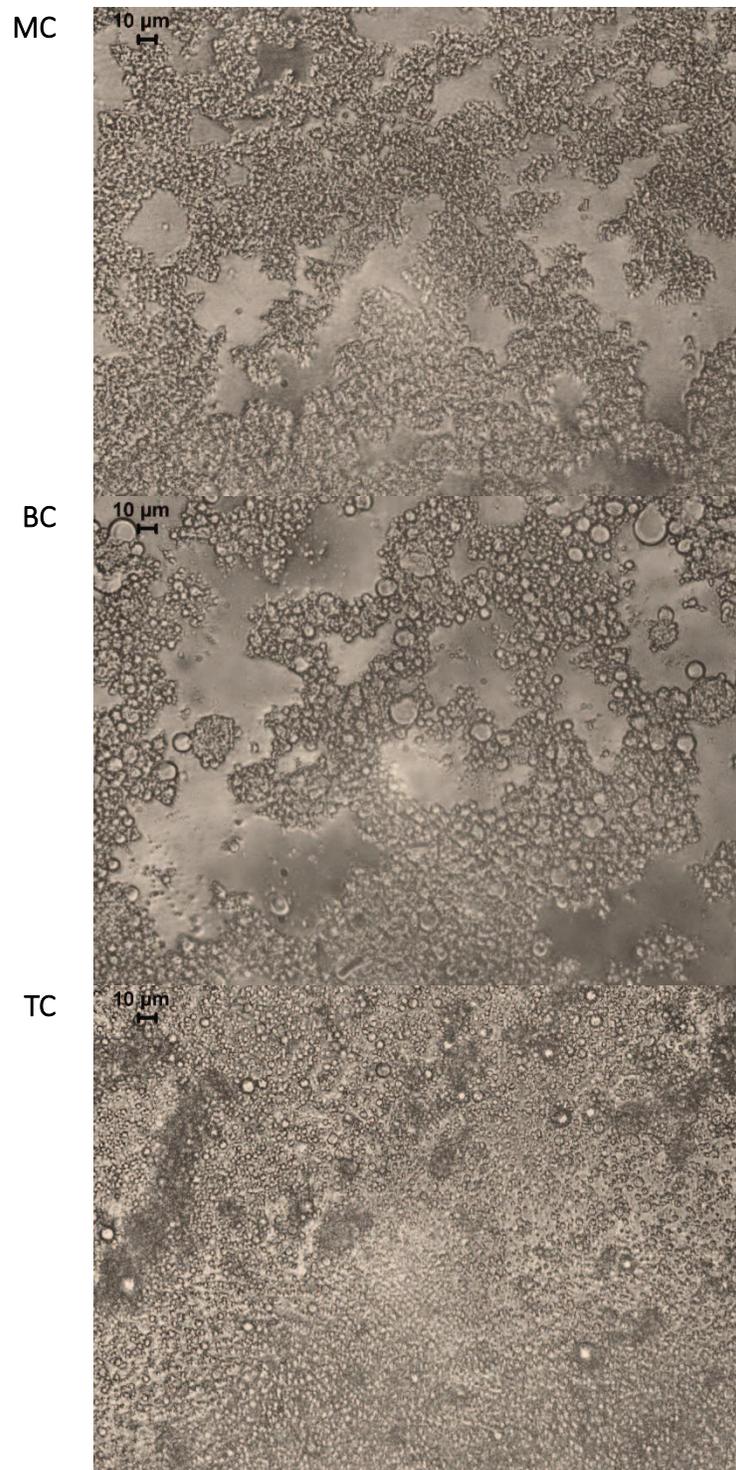


Figura 5.3. Micrografías ópticas de emulsiones (40X, barra de escala 10 µm)

Varios autores sugieren que la presencia de polímeros no adsorbidos a la membrana interfacial promueve un aumento de las fuerzas de atracción entre las gotas, mediante un proceso osmótico asociado a la exclusión del polímero de la región comprendida entre dos gotas muy próximas entre sí (Guzey & McClements, 2006; Radford & Dickinson, 2004).

En el caso de las emulsiones MC, este fenómeno se vería más favorecido por la mayor concentración de ALG en solución (Tabla 5.1.), que no se adsorbería a la interfase de las gotas recubiertas por lecitina, ya que, al pH de la emulsión MC (pH = 5,6), ambos polímeros presentarían cargas negativas en su estructura.

En las emulsiones BC se observó la presencia de flóculos de mayor tamaño que en los sistemas TC. Si bien los resultados de potencial zeta (Fig. 5.2.) indicaban una posible estabilidad coloidal atribuida a las fuerzas electrostáticas repulsivas entre las gotas, al parecer predominó el fenómeno de floculación debido al exceso de biopolímeros no adsorbidos a la interfase aceite-agua. Esto pone de manifiesto que el comportamiento global de una emulsión frente a la estabilidad depende de la suma de potenciales de interacción atractivos y repulsivos que existen entre las gotas (McClements, 2004).

En la Fig. 5.4. se muestran las distribuciones de tamaños de gota en intensidad y en número obtenidas para las distintas emulsiones. La distribución por intensidad refleja la contribución relativa de diferentes tamaños de gota a la intensidad de la luz dispersada (Fig. 5.4.A), que es proporcional a la sexta potencia del diámetro (d^6) de las gotas. Como las gotas más grandes dispersan mucha más luz que las más pequeñas, la presencia de gotas grandes podría “apantallar” la dispersión de luz de las pequeñas, generando un sesgo en la interpretación de los resultados obtenidos por DLS.

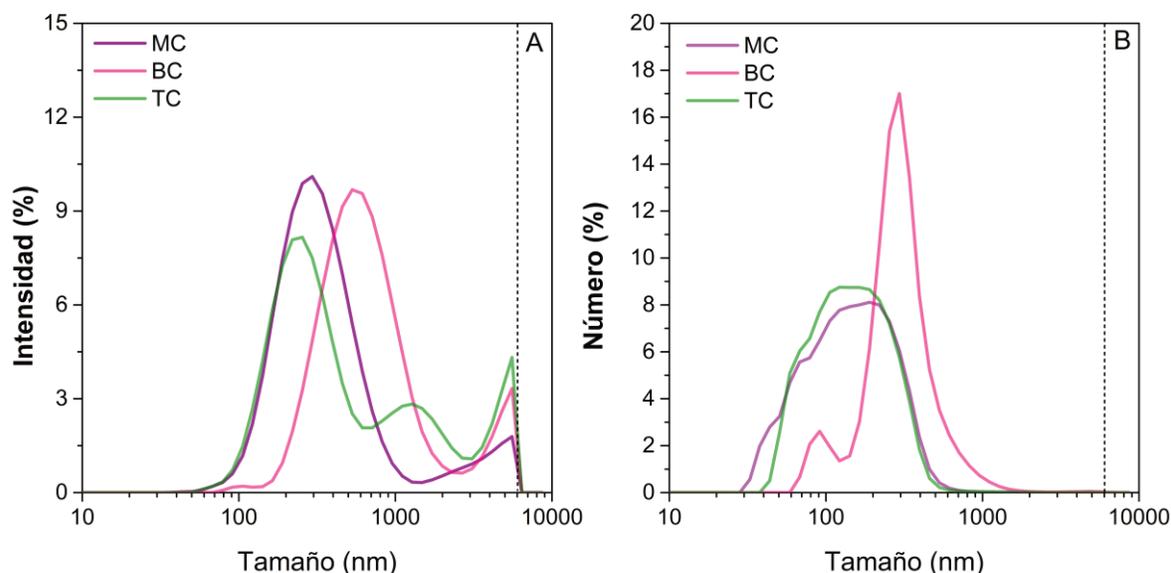


Figura 5.4. Distribución de tamaños de gota en función de la intensidad de luz dispersada (A) y del número de gotas (B) de las emulsiones monocapa (MC), bicapa (BC) y tricapa (TC) de aceite de chía. La línea punteada representa el límite de medición del equipo.

Por este motivo, también se muestra la distribución en función de la fracción numérica de gotas con ese tamaño (Fig. 5.4.B), donde la dispersión de luz es directamente proporcional al diámetro de las partículas (d^1) (Arzeni, 2014). No obstante, debe tenerse en cuenta que esta última distribución se obtiene mediante una transformación matemática de los datos. Por lo tanto, esta conversión podría amplificar el error inherente a la técnica de medición por DLS. Aun así, esta representación resulta útil para comparar la importancia relativa de las distintas poblaciones de gotas dentro de cada sistema.

Como puede observarse en la Fig. 5.4.A, todas las emulsiones presentaron un perfil polidisperso, con poblaciones mayoritarias de gotas con diámetros inferiores a 1000 nm. Tanto la formulación MC como la BC presentaron una distribución monomodal de tamaños de gota con picos alrededor de 300 y 500 nm, respectivamente. Por su parte, las emulsiones

TC mostraron una distribución bimodal con una población principal alrededor de 300 nm y otra población más pequeña alrededor de los 1500 nm. Es importante tener en cuenta dos consideraciones para la correcta interpretación de los resultados. La primera es que el límite de detección del equipo utilizado es de 6000 nm, por lo que las gotas de tamaños mayores no pueden ser cuantificadas. La segunda es que, la técnica para medir distribuciones de tamaños de gota por DLS implicó realizar una dilución previa de los sistemas (1/70) para lograr entrar en el rango de medición del equipo. Y esto podría haber revertido la presencia de flóculos formados por la desestabilización por depleción, ya que se habría diluido también la concentración de los polímeros en la fase continua.

En la distribución en número (Fig. 5.4.B) se observa la misma tendencia: las emulsiones MC y TC presentaron una fracción de tamaños de gota menores que las emulsiones BC. Mientras que los sistemas MC y TC mostraron una distribución monomodal más polidispersa, con un pico alrededor de 100 nm, en las emulsiones BC se lograron distinguir dos poblaciones: una principal alrededor de 300 nm y otro pico menor, cercano a los 90 nm, que no se evidenciaba en la Fig. 5.4.A.

Sepeidnameh et al., (2024) también intentaron evaluar las diferencias en los tamaños de gota de emulsiones multicapa en función del número de capas depositadas alrededor de la gota de aceite en cada formulación, e informaron un incremento progresivo del tamaño promedio de las gotas a medida que se añadían capas. En su estudio, la emulsión MC presentó el menor tamaño de gota (2,04 μm), seguida por la BC (2,29 μm) y la TC, que alcanzó el mayor valor (8,89 μm). Sin embargo, las distribuciones de tamaños de gota para cada una de sus emulsiones – que fueron medidos por difracción láser (*Static Light Scattering*) y no por DLS –

fueron muy polidispersas. Por lo tanto, no sería muy adecuado comparar sólo el tamaño promedio de gotas para evaluar la variación luego del agregado de cada capa interfacial. En nuestro trabajo, el tamaño de gota de las emulsiones no mostró una relación directa con el número de capas alrededor de la interfase aceite-agua. Sin embargo, cabe destacar que, en general, todas las formulaciones estudiadas mostraron tamaños de gota significativamente menores que los reportados por Sepeidnameh et al. (2024) con valores en el orden de los nanómetros.

Por otra parte, Mundo et al. (2021) formularon emulsiones multicapa utilizando saponinas (emulsionante), un polipéptido catiónico y pectina/carragenina mediante el método de deposición electrostática capa sobre capa. En este estudio reportaron tamaños promedio para las emulsiones MC de 0,24 μm , para las BC de 0,40 μm , y para las TC alrededor de 0,47 μm , a pH 4. Estos resultados son más comparables con los obtenidos en esta tesis, ya que se encuentran en el mismo orden de tamaños de gota.

5.2.2. Estabilidad de las emulsiones frente al cremado y a la coalescencia

Las emulsiones son sistemas que, desde el punto de vista termodinámico, tienden a la inestabilidad debido a la interacción poco favorable entre fases inmiscibles y a las diferencias de densidad entre ellas, lo cual con el tiempo conduce a la separación de fases (McClements, 2004). Esta inestabilidad suele estar asociada a varios mecanismos físicos, entre los que se incluyen: i) la coalescencia, donde las gotas se fusionan formando gotas de mayor tamaño; ii) la floculación, que implica la agrupación de gotas sin fusión, dando lugar a agregados de mayor tamaño; y iii) el cremado, que ocurre cuando las gotas de aceite ascienden debido a

su menor densidad en comparación con la fase acuosa, generando una separación de fases visible (Domian et al., 2015).

En la Fig. 5.5. se observa el aspecto visual de las emulsiones MC, BC y TC, justo después de su preparación y luego de 24 h de almacenamiento. De acuerdo con lo observado, ninguna de las formulaciones evidenció signos de separación de fases por cremado.

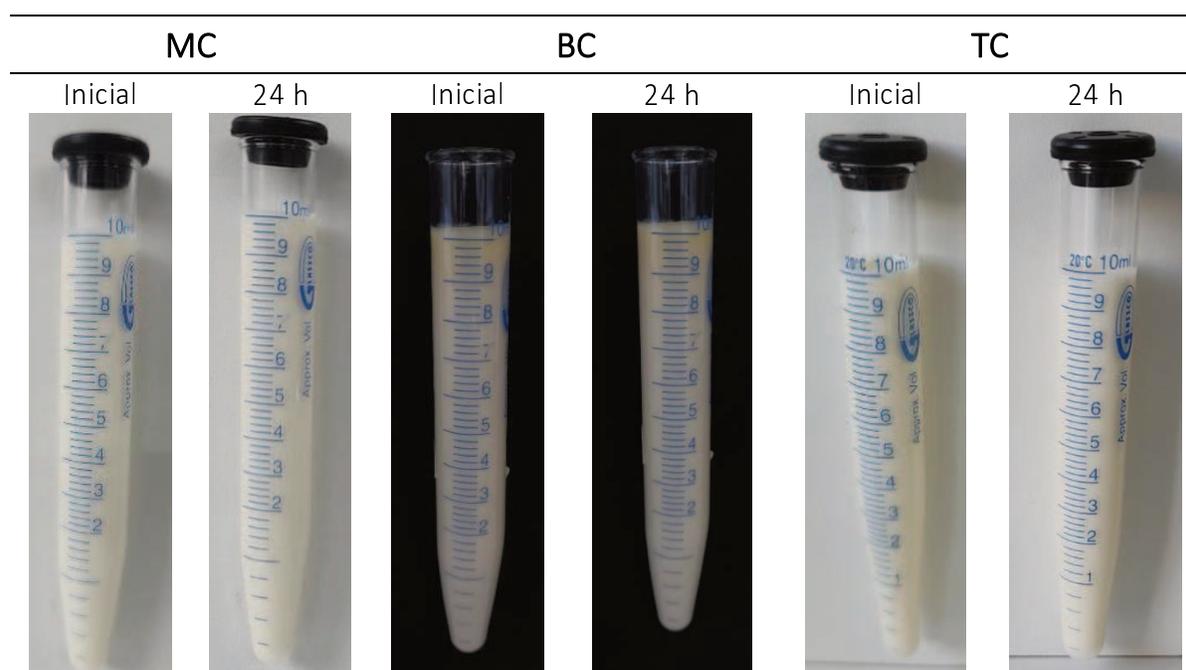


Figura 5.5. Evaluación visual de la estabilidad de emulsiones MC, BC y TC frente al cremado a tiempo inicial y a las 24 h de almacenamiento a temperatura ambiente.

Mundo et al. (2021), también observaron un comportamiento similar cuando evaluaron la estabilidad frente al cremado de emulsiones MC, BC y TC ya que todas se mantuvieron estables luego de 24 h de almacenamiento a temperatura ambiente, a valores de pH superiores a 4. Sin embargo, estos autores formularon emulsiones con una composición final diferente, ya que utilizaron 1% de aceite, 0.08% de biopolímeros en fase acuosa y no

agregaron MDX para aumentar el contenido de sólidos. En nuestros sistemas, la mayor concentración de polímeros agregados a la fase acuosa y la mayor proporción de aceite de la emulsión podría haber aumentado la viscosidad de la fase continua, retardando el fenómeno de desestabilización por cremado.

Los ensayos de desestabilización frente al cremado se realizaron sólo por 24 h, ya que el propósito era secar la emulsión (BC y TC) o gotearla en CaCl_2 (MC) al poco tiempo de haberla obtenido.

Además, se realizó un ensayo de coalescencia, en el cual las emulsiones fueron sometidas a centrifugación para inducir una desestabilización acelerada y evaluar si se producía liberación de aceite por coalescencia. En la Fig. 5.6. se muestran las imágenes de los tubos Eppendorf luego del centrifugado (15000 g, 15 min), donde se comprobó que no hubo coalescencia ni liberación de aceite en ninguna de las emulsiones formuladas.

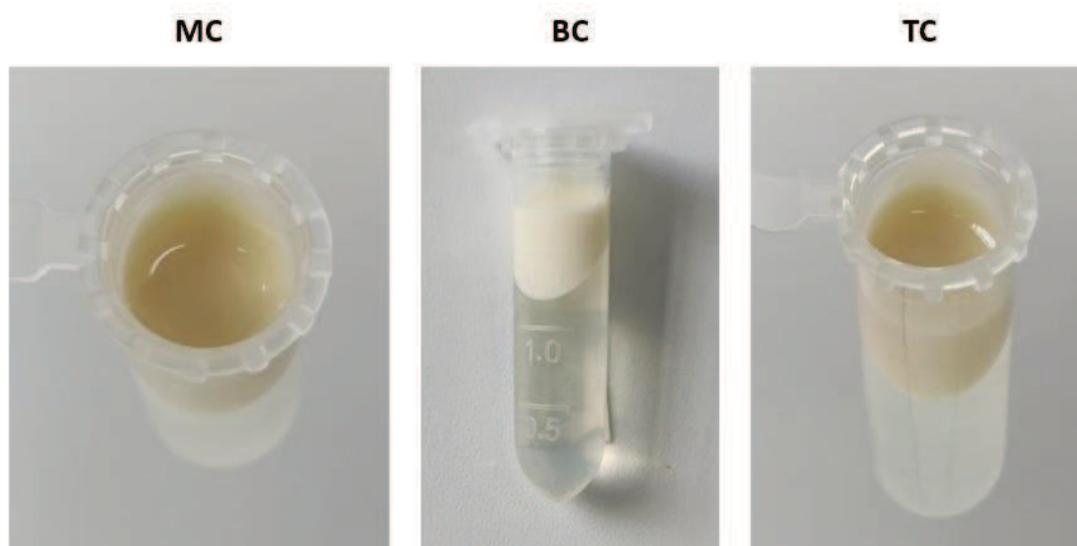


Figura 5.6. Tubos eppendorf conteniendo emulsiones luego del ensayo de coalescencia (centrifugación 15000 g, 15 min)

Estos resultados indican que las membranas interfaciales en todos los sistemas fueron lo suficientemente viscoelásticas como para permanecer intactas tras el proceso de desestabilización acelerada.

5.2.3. Efecto de los materiales de pared sobre las características reológicas de las emulsiones

El comportamiento reológico de las emulsiones formuladas se evaluó mediante ensayos rotacionales y las curvas de flujo obtenidas (Fig. 5.7.) se ajustaron al modelo de la ley de potencia para obtener los parámetros reológicos correspondientes: índice de consistencia (k) e índice de comportamiento de flujo (n), que se muestran en la Tabla 5.2.

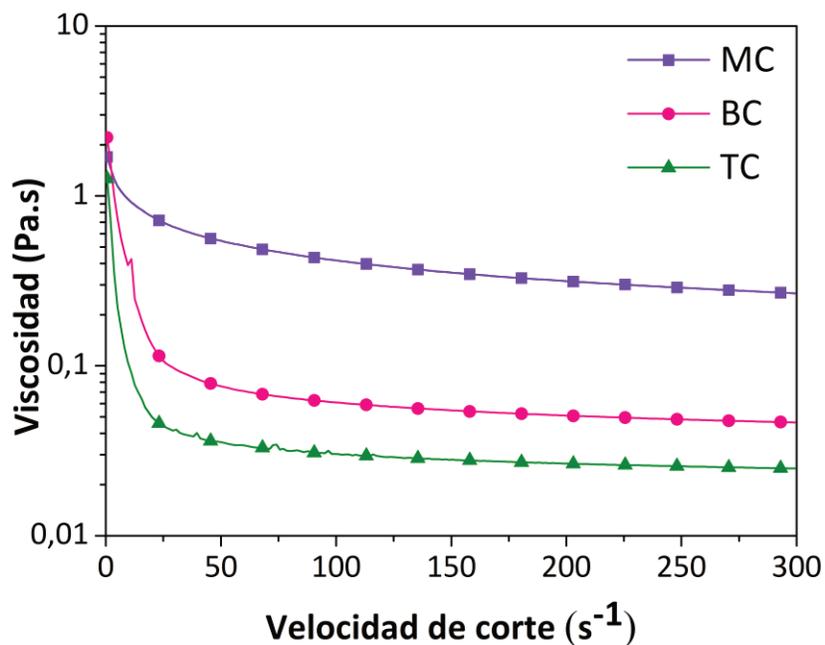


Figura 5.7. Curvas de flujo para los tres tipos de emulsiones estudiadas: monocapa (MC), bicapa (BC) y tricapa (TC).

El parámetro n proporciona información acerca del tipo de fluido y de cómo se comporta al someterlo a distintos esfuerzos de corte. Si n es menor a 1, el fluido tiene un comportamiento pseudoplástico, es decir, su viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de corte. Si n es igual a 1, indicaría un comportamiento newtoniano, donde la viscosidad se mantiene constante frente al aumento de la velocidad de corte. Finalmente, si n es mayor a 1, el fluido tiene un comportamiento dilatante, en el cual la viscosidad aumenta con la velocidad de corte aplicada.

En cuanto a k , representa una medida de la consistencia del fluido: a mayor valor de k , mayor es la consistencia o resistencia al flujo.

Tal como se observa en la Fig. 5.7., todas las emulsiones presentaron un comportamiento pseudoplástico, caracterizado por valores de $n < 1$ (Tabla 5.2.) y una disminución de la viscosidad con el aumento de la velocidad de corte.

Tabla 5.2. *Parámetros del modelo de la ley de potencia (n y k) para las emulsiones monocapa (MC), bicapa (BC) y tricapa (TC)*

SISTEMA	n	k (Pa.s)
MC	$0,59 \pm 0,01^a$	$2,61 \pm 0,06^c$
BC	$0,72 \pm 0,01^b$	$0,23 \pm 0,03^b$
TC	$0,79 \pm 0,03^b$	$0,08 \pm 0,01^a$

Letras distintas indican diferencias significativas en la misma columna según test HSD ($p < 0,05$).

Las emulsiones MC presentaron el mayor valor de k (Tabla 5.2.), y una mayor viscosidad a lo largo de todo el rango de velocidades de corte (Fig. 5.7.). Esto era un resultado esperable, ya que este sistema contenía una mayor concentración de biopolímeros en la fase continua (0.6% ALG, Tabla 5.1.). Además, en las micrográficas presentadas anteriormente (Fig. 5.3.) se observó que estas emulsiones se encontraban completamente floculadas, y los flóculos de gran tamaño podrían haber ofrecido una mayor resistencia al flujo.

Por su parte, las emulsiones BC presentaron un valor de k mayor que las emulsiones TC (Tabla 5.2.), lo que también se reflejó en los mayores valores de viscosidad mostrados en las curvas de flujo de la Fig. 5.7. Estos resultados también serían consistentes con la estructura interna de estas emulsiones observada en las micrográficas de la Fig. 5.3. donde las emulsiones BC presentaron flóculos de mayor tamaño que las emulsiones TC.

Si bien los sistemas BC y TC fueron formulados con la misma concentración total de biopolímeros en solución (Tabla 5.1.) la incorporación de ALG en reemplazo de una parte de CHT en las emulsiones TC podría haber influido en la disminución de la viscosidad de la fase continua. En general, los alginatos comerciales presentan valores de pesos moleculares en el rango de 10^3 - 10^4 g/mol, mientras que las macromoléculas de CHT los tienen entre 10^4 - 10^6 g/mol (da Costa et al., 2017). Además, es importante tener en cuenta la estructura más o menos desplegada de estos dos biopolímeros al pH en el que fueron preparadas las emulsiones (pH = 4,3). En estas condiciones ácidas, las moléculas de CHT con alto grado de desacetilación, se comportan como un polielectrolito catiónico que contiene una mayor cantidad de grupos amino (NH_3^+) en su forma protonada, lo que hace que la estructura molecular se vuelva más extendida y rígida como resultado de la repulsión electrostática (da

Costa et al., 2017). Esto podría aportar mayor viscosidad a la fase continua de las emulsiones BC. Sin embargo, la incorporación de un polielectrolito con cargas negativas (ALG) en los sistemas TC podría provocar un apantallamiento de las cargas y una reducción de la repulsión electrostática mediante la formación de complejos CHT-ALG. Esto daría lugar a conformaciones moleculares más compactas o menos extendidas, disminuyendo así la viscosidad de la fase acuosa (da Costa et al., 2017).

Otros autores han estudiado el comportamiento reológico de la formulación secuencial de emulsiones multicapa. En este sentido, Sepeidnameh et al. (2024), realizaron medidas de viscosidad a una velocidad de corte determinada (12 rpm) a emulsiones de aceite de uva con distintas formulaciones: MC (50% aceite, 5% gelatina), BC (40% aceite, 0,7% gelatina y 0.5% CHT) y TC (33% aceite, 0,5% gelatina, 0,4% CHT, 0,18% goma de semilla de albahaca). Observaron que las emulsiones BC presentaron los mayores valores de viscosidad en relación a las MC y TC, y lo atribuyeron a la mayor concentración de CHT en la fase acuosa de estas emulsiones, que aportaría mayor viscosidad en comparación con la gelatina y la goma de semilla de albahaca.

Por otra parte, Julio et al. (2018) también reportaron un aumento en la viscosidad en emulsiones de aceite de chía estabilizadas con lecitina, cuando agregaron CHT para formar una segunda capa interfacial.

Estos resultados muestran que las propiedades reológicas de las emulsiones están más influenciadas por la composición de la fase continua y la naturaleza, concentración y combinación de los biopolímeros en la fase acuosa, que de las diferentes capas formadas alrededor de la interfase O/W.

Los resultados de los ensayos oscilatorios de las emulsiones se presentan en la Fig. 5.8., donde se muestra la evolución de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') en función de la frecuencia para los tres sistemas, a una deformación constante de 1 %, ubicada dentro del rango viscoelástico lineal determinado en ensayos previos.

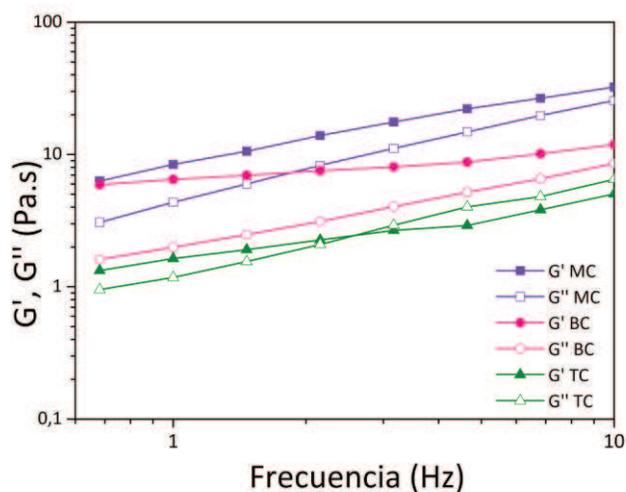


Figura 5.8. Barridos de frecuencia realizado a deformación constante (1%) y a 25°C, de las emulsiones: monocapa (MC), bicapa (BC) y tricapa (TC).

En los sistemas MC y BC se observó que el módulo elástico (G') superó al módulo viscoso (G'') en todo el rango de frecuencias evaluado, lo que indica un comportamiento predominantemente elástico, característico de los materiales estructurados. Esto sugiere que las emulsiones presentan cierto grado de organización interna con capacidad de almacenar energía elástica durante la deformación, una característica típica de geles débiles.

Entre los sistemas evaluados, la emulsión MC presentó los valores más altos de G' y G'' , lo que indicaría una mayor rigidez y cohesión estructural en estas emulsiones en el rango de frecuencias evaluado. Esta respuesta viscoelástica puede atribuirse a su formulación (Tabla

5.1.), ya que este sistema contenía una mayor proporción de ALG (0,6 % p/p), lo que habría favorecido la formación de una red más consistente y estable durante el análisis. El ALG es conocido por su capacidad para formar redes tridimensionales por asociación intermolecular, especialmente en presencia de sistemas polielectrolíticos, lo que favorecería la estructuración del medio continuo y, por consiguiente, una mayor resistencia mecánica frente a la deformación (Avendaño-Romero et al., 2013).

Por su parte, el sistema BC, que incluía CHT al 0,3 % p/p como segundo componente de la capa interfacial, mostró valores intermedios de G' y G'' . Esta menor rigidez observada en estas emulsiones podría deberse al carácter catiónico del CHT que, si bien favorece la estabilización electrostática de las gotas mediante interacciones con la capa de lecitina, no contribuye en la misma medida a la formación de redes estructuradas en el medio continuo como el ALG. Es importante recordar que tanto las emulsiones MC como BC presentaron estructuras mayoritariamente floculadas en las micrografías de la Fig. 5.3. Estas cadenas de flóculos de gran tamaño podrían haber contribuido al comportamiento elástico dominante observado en estos sistemas.

En el caso de las emulsiones TC, formuladas con ALG y CHT en concentraciones más reducidas (0,15 % p/p cada uno), se registró un comportamiento viscoelástico inicialmente dominado por la elasticidad ($G' > G''$), hasta alcanzar una frecuencia de 2,5 Hz, donde se produjo el cruce de módulos. A partir de allí, G'' prevaleció sobre G' , indicando una transición hacia un comportamiento más fluido en altas frecuencias, probablemente debido a la ruptura de los flóculos más pequeños observados en las micrografías de las emulsiones TC (Fig. 5.3.)

Estos resultados son consistentes con el comportamiento observado en los ensayos rotacionales (Figura 5.7.), donde se registraron valores decrecientes del índice de consistencia (k) en el orden $MC > BC > TC$. Esta tendencia refuerza la hipótesis de que la mayor proporción de ALG en el sistema MC confiere una mayor resistencia estructural frente a la deformación, tanto en condiciones de flujo como bajo deformaciones oscilatorias. Asimismo, el comportamiento de flujo pseudoplástico observado en los tres sistemas (valores de $n < 1$) es coherente con la estructura viscoelástica que se evidencia en el barrido de frecuencia, ya que los sistemas estructurados internamente tienden a reorganizarse bajo esfuerzo, lo que se traduce en una reducción de la viscosidad con el incremento de la velocidad de corte.

Diversos estudios han demostrado cómo cada componente influye en las propiedades reológicas de las emulsiones que integran. Por ejemplo, Zhang et al. (2021) evaluaron las propiedades reológicas de emulsiones estabilizadas con complejos CHT/caseína, variando la concentración de CHT (0,1 – 3 mg/ml), el pH y otras condiciones experimentales. Estos autores concluyeron que dichas propiedades fueron influenciadas principalmente por la presencia y concentración del CHT, cuyas características reológicas predominaban sobre las de la caseína. Además, Shi et al. (2023), reportaron que las emulsiones multicapa elaboradas con ALG presentaban una viscosidad aparente superior a las de aquellas formuladas con otros polisacáridos polianiónicos, desempeñando un doble papel como agente estabilizante y espesante.

En resumen, el análisis reológico realizado en este estudio evidenció, en línea con lo reportado en bibliografía, que tanto la composición de la fase acuosa como las interacciones

entre los biopolímeros que la constituyen, influyen significativamente en el grado de estructuración y en las propiedades viscoelásticas de las emulsiones. En este contexto, los polisacáridos demostraron tener un papel clave en la generación de redes tridimensionales que determinan la respuesta mecánica del sistema.

5.3. Conclusiones preliminares

Se lograron obtener emulsiones MC, BC y TC utilizando la deposición electrostática de distintos biopolímeros (lecitina, CHT y ALG) sobre la superficie de las gotas de aceite. En todos los sistemas se alcanzaron tamaños de gota mayoritariamente $< 1 \mu\text{m}$, y todas las emulsiones fueron estables frente al cremado, ya que no se observó una separación de fases luego de 24 h de almacenamiento a temperatura ambiente. En las emulsiones MC y BC se observó la formación de flóculos de gran tamaño, mientras que en las emulsiones TC el grado de floculación por depleción fue menor. Sin embargo, las membranas interfaciales en todas las formulaciones fueron resistentes a los ensayos de desestabilización acelerada por centrifugación, ya que en ninguna emulsión se observó liberación de aceite. Esto demuestra las buenas propiedades viscoelásticas de los sistemas para encapsular aceite de chía.

Finalmente, los ensayos reológicos demostraron que las emulsiones MC fueron mucho más viscosas que las emulsiones BC y TC, debido a la mayor concentración de ALG utilizada en su formulación. Como estas emulsiones fueron diseñadas para ser goteadas en una solución de CaCl_2 con el objetivo de obtener esferas gelificadas de alginato-calcio, era necesario que presentaran una viscosidad superior a la de aquellas destinadas a ser deshidratadas por secado por aspersion. Esto va a permitir mejorar la estructura de los geles formados durante el proceso de goteo, evitando que la gota de emulsión pierda la forma esférica al caer en la solución de CaCl_2 .

6. CAPITULO IV: *Obtención y
caracterización de encapsulados de
aceite de chía*

6. CAPÍTULO IV: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ENCAPSULADOS DE ACEITE DE CHÍA

En este capítulo se llevó a cabo la deshidratación de las emulsiones formuladas en el capítulo anterior, para obtener los encapsulados de aceite de chía. El objetivo fue evaluar la influencia de las distintas estructuras diseñadas sobre la protección del aceite de chía frente al deterioro oxidativo. Las emulsiones MC se gotearon en una solución de calcio para obtener esferas gelificadas que luego fueron deshidratadas por secado en estufa de vacío o liofilización. Por otro lado, las emulsiones BC y TC se deshidrataron por secado por aspersion para obtener encapsulados en polvo. Se evaluaron las características fisicoquímicas de los encapsulados obtenidos, y en base a los resultados, se seleccionó la técnica más adecuada para continuar con la co-encapsulación de AC y ASX.

6.1. Materiales y métodos

6.1.1. Materiales

El aceite de chía fue provisto por SDA S.A. (Buenos Aires, Argentina). La LS se adquirió en Gelfix (Buenos Aires, Argentina). El ALG de grado alimenticio fue provisto por Foodchem Andina (Colombia). El CHT fue provisto por Eastar Holding Group Dong Chen Co. Ltd. (PM: $63,97 \pm 2,31$ kDa; grado de desacetilación: 93 %). La MDX (DE 15) fue comprada de Productos de Maíz SA. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

6.1.2. Deshidratación de emulsiones

Las emulsiones MC, BC y TC obtenidas en el Capítulo anterior, se deshidrataron aplicando diferentes técnicas, con el fin de obtener los encapsulados de aceite de chía en estado sólido.

6.1.2.1. Secado de emulsiones monocapa

Las emulsiones MC fueron diseñadas para ser goteadas en una solución de calcio, con el objetivo de obtener esferas gelificadas. La posterior deshidratación de estas esferas permitiría obtener estructuras similares a la quinoa inflada o popeada, con el fin de desarrollar un producto tipo snack. Para ello, la emulsión MC fue goteada en una solución de CaCl_2 al 4 % p/p mediante una bureta de 50 ml (0,5 ml/min), con el fin de inducir la gelificación iónica promovida por la presencia de ALG en la formulación. Las esferas obtenidas se dejaron madurar en la solución de calcio durante 30 min, se lavaron 2 veces con agua destilada, y luego deshidrataron mediante dos técnicas diferentes. Por un lado, se sometieron a un proceso de secado en una estufa de vacío (Científica Central Jacobo Rapoport S.A.) en las siguientes condiciones: 40 °C y 70 mm Hg durante 3,5 h. Las esferas obtenidas se nombraron como S-MC.

Por otro lado, las esferas hidratadas se sometieron a un proceso de liofilización (Loyeau et al., 2021). Para ello, fueron congeladas en un freezer a -80 °C durante 24 h y, posteriormente, liofilizadas en un equipo CHRIST (Alpha 1-4 LD Plus, Alemania) durante 22 h (Presión: 0,0010 mBar, Temperatura: -55 °C). Las esferas obtenidas mediante esta metodología se denominaron L-MC.

6.1.2.2. Secado de emulsiones bicapa y tricapa

Las emulsiones BC y TC fueron secadas por aspersion en un equipo Yamato ADL311S (China). Para ello, se utilizaron las siguientes condiciones operativas: $T_{inlet} = 150 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{outlet} = 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, caudal de aire = $0,15 \text{ m}^3/\text{min}$, caudal de líquido = $3 \text{ ml}/\text{min}$ (Fioramonti et al., 2019). Los polvos obtenidos se nombraron como: P-BC y P-TC, según la formulación de emulsión utilizada para obtenerlos.

6.1.3. Caracterización de los encapsulados de aceite de chía

Una vez obtenidos los encapsulados en estado sólido se caracterizaron mediante las técnicas que se describen a continuación.

6.1.3.1. Eficiencia de encapsulación

Se pesaron 2 g de encapsulados, se agregaron 15 ml de éter de petróleo, y se realizó una extracción agitando suavemente durante 2 min, y luego dejando en reposo 5 min más. Posteriormente, el sobrenadante se pasó a través de un papel de filtro (MUNKTEL 00R), y se recuperó en un balón de destilación. Finalmente, el éter de petróleo se evaporó a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en un evaporador rotatorio (BÜCHI R-124), y el extracto libre de solvente se evaporó en estufa a $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta pesada constante. El aceite remanente determinado por gravimetría se consideró como el aceite superficial no encapsulado. La eficiencia de encapsulación se calculó relacionando el aceite superficial con la cantidad de aceite inicial agregada en las formulaciones (Fioramonti et al., 2017), según la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{\text{g de aceite superficial}}{\text{g de fase oleosa total inicial}} \times 100 \quad [\text{Ec. 6.1.}]$$

Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

6.1.3.2. Determinación del contenido de humedad y actividad de agua

El contenido de humedad se determinó por gravimetría. Para ello se pesaron 1,5 g de muestra y se colocaron en una estufa de vacío a 60 °C, hasta pesada constante. El porcentaje de humedad se calculó por diferencia de pesada (Carneiro et al., 2013). La actividad de agua se midió en un equipo Aqualab Systems (Washington, EEUU) a temperatura ambiente (25 °C).

Todas las medidas se realizaron por triplicado.

6.1.3.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología y microestructura de los encapsulados fue evaluada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, *Scanning Electron Microscope*) utilizando un equipo Phenom World Pro X. Las muestras se observaron en diferentes aumentos (1000×, 3000× y 6000×). En el caso de las esferas obtenidas por gelificación en calcio, se analizaron tanto superficies externas intactas como secciones transversales obtenidas mediante corte con bisturí, a fin de examinar la morfología superficial y la estructura interna.

6.1.3.4. Dispersabilidad

La dispersabilidad se determinó sólo en los encapsulados en polvo obtenidos por secado por aspersion (formulaciones P-BC y P-TC). Para ello, se utilizó la técnica descrita por Miranda-Linares et al. (2020). Se colocaron 5 ml de agua destilada a temperatura ambiente (25 °C) en un vaso de precipitados de vidrio de 25 ml. A continuación, se agregaron 0,5 g de muestra y se agitó vigorosamente con una espátula durante 15 s. La dispersión obtenida se filtró utilizando malla de filtrado de plástico con poro de 210 µm, y posteriormente se transfirieron

2 ml del filtrado a una cápsula de aluminio previamente tarada. La muestra se secó en estufa a 105 °C durante 4 h y se calculó la dispersabilidad mediante la ecuación:

$$D (\%) = \frac{(w+a) \times \%ST}{a \times \frac{100-b}{100}} \quad [\text{Ec. 6.2.}]$$

donde: w = peso del agua utilizada para dispesar (g), a = cantidad de polvo utilizada (g), b = contenido de humedad en el polvo y %ST = porcentaje de materia seca de la dispersión filtrada.

6.1.3.5. Solubilidad

La solubilidad sólo se determinó en los encapsulados en polvo obtenidos por secado por aspersión, y se midió utilizando el método descrito por Campelo et al. (2018). Brevemente, se disolvieron 0,5 g de polvo en 5 ml de agua destilada a temperatura ambiente, agitando vigorosamente la mezcla durante 5 min en vortex. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 3300 rpm durante 15 min. Se tomó una alícuota de 2 ml del sobrenadante, la cual se transfirió a una cápsula de aluminio previamente tarada y se secó en estufa a 105 °C hasta alcanzar peso constante. La solubilidad (%) se determinó como el porcentaje de residuo seco en el sobrenadante respecto a la cantidad inicial de polvo empleada.

6.1.4. Estabilidad oxidativa de los encapsulados

Los encapsulados se almacenaron en recipientes herméticos al resguardo de la luz, y se estudió su estabilidad oxidativa durante el almacenamiento a 25 °C por 4 meses. La estabilidad oxidativa se evaluó cuantificando los productos primarios y secundarios de la oxidación mediante las técnicas de índice de peróxidos y TBARS, descritas en el capítulo II (Secciones 4.1.5.1 y 4.1.5.2). Para ello, se analizó la oxidación inicial en los encapsulados

(semana 0), y posteriormente, se retiraron del almacenamiento muestras de cada sistema en distintos tiempos: 2, 4, 8, 12, y 16 semanas. El aceite contenido en cada muestra fue extraído para su análisis aplicando técnicas específicas, seleccionadas según las características de cada sistema:

6.1.4.1. Esferas liofilizadas (L-MC)

Se pesó 1 g de encapsulados, que se molieron en un tubo de ensayo con espátula de acero. Se adicionaron 3,6 ml de hexano y se agitó durante 1 min en vortex. Posteriormente, se centrifugó a 3400 g durante 15 min y se utilizó el extracto obtenido para hacer tanto las medidas de IP como las de TBARS.

6.1.4.2. Polvos secados por aspersión (P-BC y P-TC)

A partir del polvo de cada muestra, se reconstituyeron 3 ml de emulsión utilizando agua destilada. Posteriormente, se realizó una extracción lipídica empleando una solución extractora de hexano-isopropanol (3:2, v/v). Tras la agitación en vórtex durante 1 min, las muestras se centrifugaron durante 15 min a 3400 rpm, y se utilizó la fase orgánica superior (hexano) para las determinaciones de oxidación.

6.1.5. Análisis estadístico

Todas las muestras fueron preparadas con sus réplicas y las determinaciones analíticas se realizaron al menos por duplicado. Las diferencias entre medias se analizaron utilizando el software R con la interfaz RStudio, empleando análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación múltiple HSD de Tukey a un nivel de significancia de $p < 0,05$.

6.2. Resultados y discusión

6.2.1. Caracterización morfológica

La Fig. 6.1. muestra los encapsulados de aceite de chía obtenidos mediante gelificación iónica, por goteo de la formulación MC en la solución de CaCl_2 . Mediante esta técnica pudieron obtenerse partículas gelificadas con forma esférica (Fig. 6.1.A) con diámetros en el orden de los mm ($\cong 3$ mm). Luego del secado en estufa de vacío, las esferas sufrieron un colapso estructural, lo que provocó la pérdida de su morfología esférica y también la liberación del aceite encapsulado, tal y como puede observarse en la Fig. 6.1.B. En contraste, las esferas liofilizadas conservaron su integridad estructural, así como su forma y tamaño, con un diámetro promedio de $3,13 \pm 0,20$ mm, sin presentar diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al diámetro promedio registrado antes del secado ($3,15 \pm 0,28$ mm).

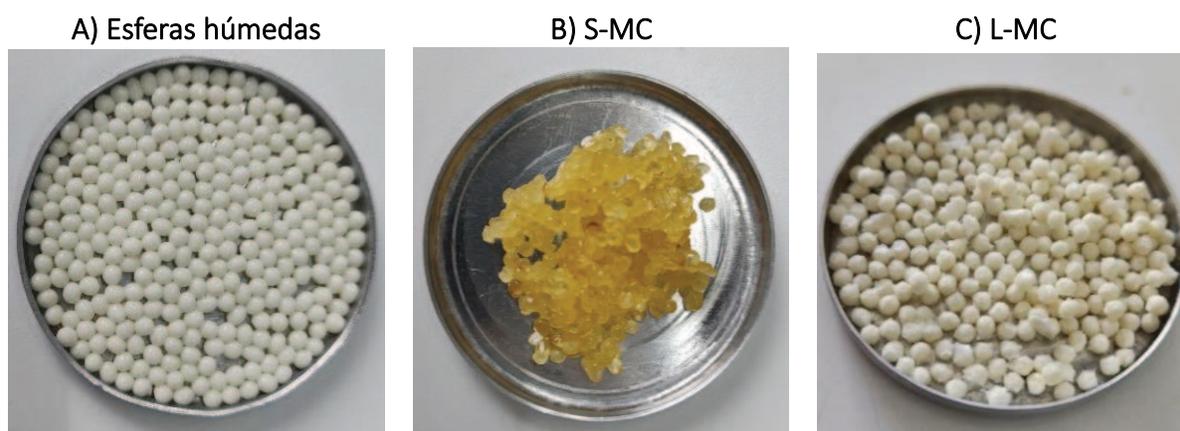


Figura 6.1. Vista macroscópica de esferas obtenidas por gelificación iónica: (A) antes de la deshidratación, (B) secadas en estufa de vacío, y (C) liofilizadas

Es probable que la elevada temperatura (40°C) empleada durante el secado en estufa de vacío haya influido directamente en el colapso de la estructura de los encapsulados. Teniendo

en cuenta el contenido de sólidos de las emulsiones MC formuladas en el capítulo anterior (Tabla 5.1., Cap. III), las esferas húmedas debieron contener al menos un 60 % de agua. Es bien sabido que el agua actúa como plastificante en matrices amorfas de polímeros, promoviendo un aumento en la movilidad de las cadenas y, en consecuencia, una disminución de la temperatura de transición vítrea (T_g). En estas condiciones, la T_g de la MDX (componente mayoritario en los encapsulados) se encontraría muy por debajo de los 40 °C, lo que habría favorecido el colapso estructural de las esferas durante el secado en las condiciones de vacío (Descamps et al., 2013).

Por otro lado, el paso de congelamiento de las esferas húmedas previo a la liofilización, junto con las condiciones de baja temperatura en el liofilizador (-55 °C), habrían permitido que el proceso ocurriera por debajo de la T_g de la MDX (Descamps et al., 2013), permitiendo la conservación de la estructura de las esferas durante la deshidratación.

A partir de estos resultados, se decidió continuar el estudio solo con las esferas liofilizadas (L-MC).

Asimismo, en la Fig. 6.2. se presenta la apariencia macroscópica de los polvos de aceite de chía encapsulado obtenidos por secado por aspersión (P-BC y P-TC). Puede observarse que ambos presentaron un color blanquecino, sin apariencia aceitosa. Aunque a simple vista parecían aglomerados, al tacto las partículas se separaban con facilidad, lo que sugiere una baja cohesión entre ellas. Este comportamiento da como resultado una textura fina, similar a la del talco.



Figura 6.2. Apariencia macroscópica de los encapsulados de aceite de chía en polvo obtenidos mediante secado por aspersión de emulsiones bicapa (P-BC) y tricapa (P-TC).

La microestructura de los encapsulados se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), y las micrografías se muestran en la Fig. 6.3. En las imágenes se pueden observar morfologías bien diferenciadas entre los sistemas obtenidos por liofilización (L-MC) y por secado por aspersión (P-BC y P-TC), relacionadas principalmente a la técnica de secado utilizada y a la composición de cada formulación.

En la primera columna de la Fig. 6.3., se observa la estructura interna y superficial de las esferas liofilizadas (L-MC). Se evidencia la formación de una red tridimensional altamente porosa, con superficie irregular, paredes internas laminares y numerosos canales en el interior. Este tipo de morfología también fue reportada por (Premjit et al., 2024), cuando obtuvieron esferas gelificadas y liofilizadas de ALG y calcio para la encapsulación de microorganismos probióticos.

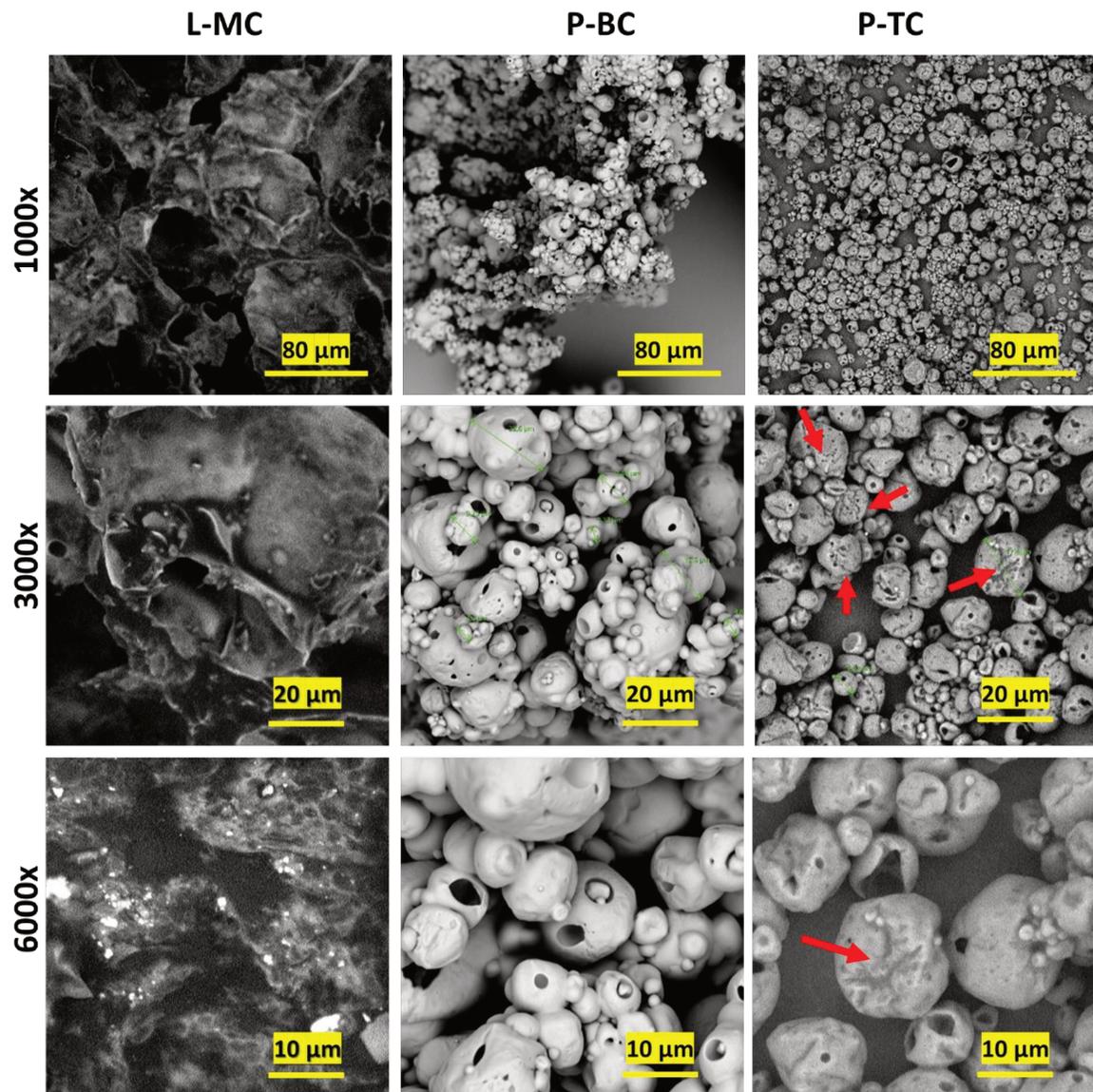


Figura 6.3. Micrografías de los encapsulados de aceite de chía obtenidas por microscopía electrónica de barrido en distintas magnificaciones. Liofilizados de esferas gelificadas de emulsiones monocapa (L-MC); polvos obtenidos por secado por aspersión de emulsiones bicapa (P-BC) y tricapa (P-TC).

Cuando la emulsión que contiene ALG se hace gotear sobre una solución de CaCl_2 , primero se forma un gel sobre la superficie de la gota, luego los iones Ca^{2+} difunden hacia el interior de la partícula promoviendo la formación de una red tridimensional conocida como “caja de huevo” mediante interacciones con los grupos carboxilo cargados negativamente del ALG (Ki

et al., 2013; Premjit et al., 2024; Wani et al., 2023). Esta estructura gelificada retiene agua en su interior, la cual se congela y es posteriormente sublimada durante la liofilización, dando lugar a una morfología porosa como la observada en la Fig. 6.3. (L-MC).

A diferencia de las estructuras obtenidas por Premjit et al. (2024) que encapsularon probióticos utilizando únicamente ALG/carragenina y calcio, las esferas L-MC presentan un mayor contenido de sólidos en su interior, dado que el principal componente de estas emulsiones fue la MDX (Tabla 5.1., Cap III).

Los encapsulados obtenidos mediante secado por aspersion (P-BC y P-TC) presentaron partículas con una morfología predominantemente esférica con la presencia de cavidades superficiales. La formación de estas hendiduras o poros se ha relacionado con la rápida evaporación del agua y la contracción de membrana polimérica al inicio del secado (Francisco et al., 2022). Diversos autores han sugerido que la formación de estos poros podría estar asociada a fenómenos de cavitación durante el secado por aspersion (Both et al., 2020; Eijkelboom et al., 2023; Meng et al., 2014), los cuales generarían una contracción no uniforme del material durante las etapas finales del proceso de secado (Klinkesorn et al., 2006). Este tipo de fenómenos se vería particularmente favorecido en partículas de tamaño pequeño (entre 5 – 20 μm), ya que, en estas condiciones, la transferencia de calor y masa es más eficiente, lo que provoca una evaporación más rápida. Esta rápida eliminación del agua puede producir tensiones internas, favorecer la cavitación y dar lugar a la formación de huecos o poros en la superficie de las partículas. En consecuencia, las elevadas velocidades de secado asociadas a las gotas más pequeñas explicarían su mayor propensión a desarrollar estas morfologías porosas (Both et al., 2020).

Además, se observaron algunas diferencias entre las partículas de los sistemas P-BC y P-TC. Los encapsulados del sistema P-BC presentaron superficies relativamente más lisas y uniformes, con una marcada tendencia a formar aglomerados de microesferas. En cambio, las partículas del sistema P-TC exhibieron superficies más irregulares y con una mayor cantidad de poros y pliegues, aunque con una distribución de tamaños más homogénea y diámetros menores en comparación con las de P-BC. Esta diferencia en el tamaño de partículas podría atribuirse a la menor viscosidad observada en la emulsión TC (Capítulo III, Tabla 5.2.), lo que, según (Kandasamy & Naveen, 2022), favorecería la formación de gotas más pequeñas durante el proceso de atomización, dando lugar a partículas de menor tamaño tras el secado por aspersión. Además, en el sistema P-TC predominaron partículas individuales, menos propensas a la aglomeración, lo cual fue consistente con la menor presencia de flóculos y la mayor proporción de gotas individuales observadas en las micrografías de las emulsiones TC del Capítulo III (Fig. 5.3.). En contraste, la mayor aglomeración de las partículas en los sistemas P-BC se correlacionaría con los flóculos de gran tamaño observados en las micrografías de las emulsiones BC (Cap. III, Fig. 5.3.).

6.2.2. Características fisicoquímicas

En la Tabla 6.1. se presentan los distintos parámetros fisicoquímicos determinados en los encapsulados de aceite de chía obtenidos.

Tabla 6.1. Valores de humedad (H), actividad de agua (a_w), eficiencia de encapsulación (EE), dispersabilidad (D) y solubilidad (S) de los encapsulados obtenidos por liofilización (L-MC) o secado por aspersion (P-BC y P-TC).

Encapsulado	H (%)	a_w	S (%)	D (%)	EE (%)
L-MC	$0,59 \pm 0,02^a$	$0,35 \pm 0,01^c$	NR	NR	ND
P-BC	$1,86 \pm 0,15^c$	$0,30 \pm 0,02^b$	$64,94 \pm 0,48^a$	$67,75 \pm 1,88^b$	$61,35 \pm 6,95^b$
P-TC	$1,54 \pm 0,17^b$	$0,25 \pm 0,01^a$	$70,74 \pm 0,31^b$	$62,01 \pm 2,70^a$	$32,57 \pm 0,89^a$

Letras diferentes en el superíndice indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza según test HSD. NR = No realizado. ND = No detectable

El agua es un componente fundamental en los alimentos y un factor determinante para su conservación y seguridad. El contenido de humedad de productos en polvo es un parámetro crítico de calidad, ya que influye directamente en su estabilidad durante el almacenamiento. Se considera que valores de humedad inferiores al 4% son adecuados para minimizar el riesgo de deterioro microbiano (da Silva Júnior et al., 2023; Zhang et al., 2022). Tal y como se observa en la Tabla 6.1., todos los encapsulados presentaron contenidos de humedad menores al 2%, lo que se considera aceptable para productos de este tipo (Copado et al., 2021). Las esferas liofilizadas de aceite de chía presentaron valores de humedad significativamente menores que los polvos secados por aspersion, y esto podría haber estado relacionado con la estructura más porosa observada en las micrografías SEM de estas cápsulas (Fig. 6.3.), lo que podría haber facilitado la sublimación de las moléculas de agua durante el proceso de liofilización. Una comparación similar puede realizarse entre los sistemas P-BC y P-TC, donde los polvos P-TC presentaron un menor contenido de humedad,

probablemente debido a su estructura más porosa en relación a P-BC (Fig. 6.3.), la cual habría favorecido la evaporación del agua durante el secado por aspersión.

Por otra parte, la actividad de agua (a_w), representa la fracción de agua que está disponible, desde el punto de vista termodinámico, en un alimento o material para participar en reacciones químicas o favorecer el crecimiento microbiano. Se expresa como un valor entre 0 y 1, y se define como la relación entre la presión de vapor del agua en el alimento y la del agua pura a la misma temperatura. Los valores obtenidos para los encapsulados estuvieron entre 0,25 y 0,35, lo que se considera aceptable para controlar la oxidación lipídica ($a_w > 0,2$), el desarrollo microbiano y las reacciones enzimáticas ($a_w < 0,7$) (Fioramonti et al., 2019). Los encapsulados L-MC fueron los que presentaron valores significativamente mayores de a_w . Esto podría estar relacionado con el mayor contenido de ALG presente en estos sistemas (Tabla 5.1., Cap. III). Es bien sabido que los polisacáridos pueden interactuar con las moléculas de agua a través de sus grupos hidroxilo o carboxilo, mediante la formación de puentes de hidrógeno (Hou & Wu, 2019).

Existen varios modelos que describen esta interacción, en los que las moléculas de agua se disponen en distintas capas alrededor de los biopolímeros. Uno de ellos propone, desde un enfoque conceptual, la existencia de dos tipos de estructuras con propiedades distintas: una capa de moléculas de agua más fuertemente ligadas, que recubre los grupos funcionales de los polisacáridos, y una capa adyacente de moléculas de agua más débilmente ligadas, ubicada lo suficientemente lejos como para recuperar las propiedades del agua en estado libre (Agles & Bourg, 2024). Esta última capa podría ser la responsable de contribuir a la presión de vapor de agua en los encapsulados para medir el a_w .

Por otro lado, en los sistemas P-TC el a_w fue menor que en los sistemas P-BC. Este comportamiento podría estar relacionado con el desplazamiento de algunas moléculas de agua previamente unidas a los grupos carboxilo del ALG debido a una mayor interacción electrostática con los grupos amino presentes en las moléculas de CHT, lo que podría haber reducido el valor de a_w .

La solubilidad y las dispersabilidad en agua son otros de los parámetros de calidad que se evalúan para productos en polvo, ya que reflejan su capacidad de reconstituirse de forma rápida y completa, (Jafari et al., 2017; Syll et al., 2013). En general, se considera que los polvos tienen alta solubilidad cuando reportan valores de $S\% > 80\%$ (Campelo et al., 2018).

Los valores de solubilidad y dispersabilidad se calcularon sólo para los encapsulados en polvo obtenidos por secado spray (P-BC y P-TC) y los resultados se muestran en la Tabla 6.1.

Los polvos P-TC fueron más solubles que los polvos P-BC, y esto podría estar relacionado con la mayor porosidad observada en las microestructuras de los encapsulados P-TC (Fig. 6.3.), la cual favorecería la capacidad de rehidratación de estos polvos (Barbosa et al., 2015).

Puede notarse también que los valores de solubilidad reportados fueron inferiores al 80%. A pesar de que la MDX era el componente principal en ambos encapsulados, la presencia de CHT podría haber contribuido a disminuir la solubilidad, ya que en las condiciones en las que se llevaron a cabo los ensayos ($pH > 5$), el CHT comienza a volverse menos soluble por la desprotonación progresiva de sus grupos amino (Ramanery et al., 2013). Tal y como puede observarse, la formulación que contenía una mayor proporción de CHT fue también la menos soluble (P-BC).

Kanwal et al., (2024) utilizaron emulsiones 10% aceite 15% CHT y 15% MDX para microencapsular aceite de pescado mediante secado por aspersión, y reportaron valores de solubilidad cercanos al 50% de los polvos obtenidos. En este caso, los menores valores de solubilidad reportados por estos autores podrían estar relacionados con la mayor proporción de CHT presente en los polvos, que fueron reconstituidos en agua destilada para los ensayos de solubilidad.

Por su parte, (Marques et al., 2021) también obtuvieron encapsulados de aceite esencial de tomillo mediante secado por aspersión, a partir de emulsiones con 10 % de aceite, 14 % de WPI, 14 % de MDX y 2 % de CHT. Reportaron valores de solubilidad de los polvos obtenidos del orden del 65 %, en un rango similar los presentados en la Tabla 6.1. Asimismo, en este trabajo publicado también se observó que la adición de CHT a la formulación producía una ligera disminución en la solubilidad de los polvos.

En cuanto a la dispersabilidad, se observó un comportamiento opuesto: los polvos P-BC fueron más dispersables que los P-TC. Esto podría estar relacionado con las partículas de menor tamaño observadas en las micrografías SEM de los sistemas P-TC (Fig. 6.3.), ya que una mayor área superficial por unidad de masa disminuiría la capacidad de humectación del polvo, lo cual se asocia directamente con su dispersabilidad (Syll et al., 2013). Por su parte, Miranda-Linares et al. (2020) encapsularon aceites esenciales y α -tocoferol mediante secado por aspersión, utilizando sistemas nano y microparticulados de ALG-pectina. En su estudio, reportaron valores de dispersabilidad entre 56,3 - 69,5 % para los polvos nanoparticulados (400-600 nm) y entre 64,1 – 82,9% para los microparticulados (150 – 300 μ m). Los autores

atribuyeron la menor dispersabilidad de las partículas de menor tamaño a su mayor tensión superficial, lo que dificulta su humectación.

Finalmente, se evaluó la eficiencia de encapsulación para cada sistema. En el caso de la formulación L-MC, la EE no pudo ser determinada debido a limitaciones de la técnica utilizada para realizar la extracción del aceite. Generalmente, en polvos obtenidos por secado por aspersion, se realiza una primera extracción con un solvente (éter de petróleo o hexano) para determinar por gravimetría el aceite denominado *superficial, libre o no encapsulado*. Y la EE se calcula relacionando el porcentaje de ese aceite *extraíble* con el aceite total de las cápsulas. En particular, la elevada porosidad observada en la microestructura de los sistemas L-MC (Fig. 6.3.), permitió que el disolvente utilizado para la extracción del aceite accediera fácilmente al interior de las partículas, solubilizando y extrayendo la totalidad del compuesto de interés. Por este motivo, no pudo informarse un resultado de EE, lo que no implica necesariamente una ausencia de encapsulación o retención del aceite de chía (AC), sino más bien una limitación metodológica asociada a la morfología del material de partida. Es importante señalar que las esferas obtenidas tras la liofilización no presentaron indicios de exudación lipídica; por el contrario, se observaron secas y con una textura crujiente, lo cual sugiere una incorporación efectiva del AC en el interior de la matriz.

En los polvos obtenidos mediante secado por aspersion, la formulación TC (P-TC) mostró un valor de EE (32,57%) significativamente más bajo que la formulación P-BC (61,35%).

Este resultado podría estar relacionado con la mayor cantidad de poros y pliegues observados en las micrograffas SEM de los sistemas P-TC (Fig. 6.3.), los cuales habrían favorecido la extracción de una mayor cantidad de aceite durante el tratamiento con éter de petróleo. Por

otro lado, la aglomeración de partículas observada en la microestructura de los polvos P-BC (Fig. 6.3.) podría haber actuado como una barrera, en la que las partículas externas protegen a las internas, contribuyendo así a una mayor eficacia en la protección del núcleo encapsulado (Alves et al., 2017), lo que se reflejaría en los mayores valores de EE observados (Tabla 6.1.).

Tal como se mencionó en el Capítulo I, si bien se esperaban valores de EE más elevados, otros autores que utilizaron lecitina y CHT para encapsular aceites han obtenido eficiencias similares ($\approx 60\%$) (Jiménez-Martín et al., 2015). No obstante, estos resultados deben complementarse con estudios de estabilidad oxidativa del aceite encapsulado durante el almacenamiento, a fin de evaluar con mayor precisión el nivel de protección que brinda cada estructura formulada.

En contraste, Copado et al. (2022) también encapsularon aceite de chía mediante la formulación de emulsiones TC por la técnica de deposición electrostática empleando lecitina, CHT y mucílago para formar la membrana interfacial, y MDX para aumentar el contenido de sólidos. Tras el secado por aspersión de las emulsiones, reportaron eficiencias de encapsulación cercanas al 98%. Sin embargo, el contenido final de aceite en sus polvos fue del 19%, mientras que, en los polvos obtenidos en esta tesis, se buscó aumentar la cantidad de aceite en los polvos hasta aproximadamente un 28%, con el objetivo de incrementar la proporción del componente bioactivo. Esta discrepancia en los valores de EE podría estar relacionada no sólo con la mayor cantidad de aceite incorporada, sino también la naturaleza y compatibilidad de los materiales de pared empleados, así como a las condiciones de procesamiento aplicadas.

6.2.3. Estabilidad oxidativa de los encapsulados

Finalmente, se evaluó la estabilidad oxidativa del aceite de chía encapsulado en las distintas formulaciones durante el almacenamiento a 25 °C, con el objetivo de analizar la influencia de las estructuras sobre la protección efectiva del compuesto bioactivo frente a la oxidación. En la Fig. 6.4. se muestra la evolución de los compuestos primarios y secundarios de oxidación, mediante la determinación del IP (Fig. 6.4.A) y de TBARS (Fig. 6.4.B), respectivamente.

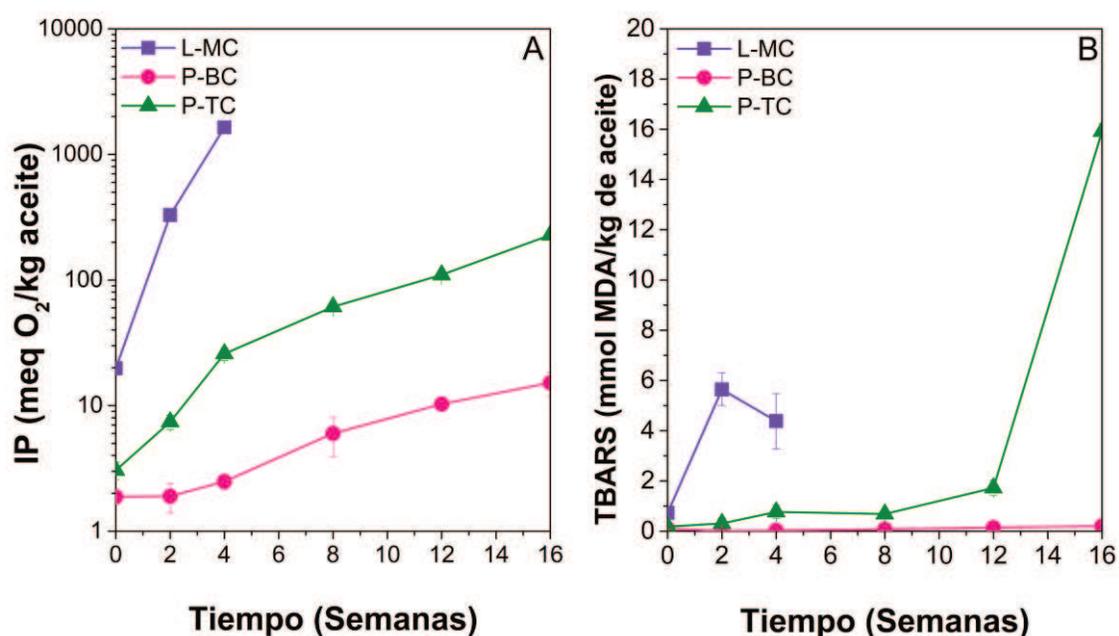


Figura 6.4. Estabilidad oxidativa a 25 °C de los encapsulados de aceite de chía: -■- esferas liofilizadas (L-MC), -●- polvos bicapa (P-BC), y -▲- polvos tricapa (P-TC). Se muestran los valores del Índice de Peróxidos (A) y de TBARS (B).

Es importante destacar que en todos los casos se inició el proceso de preparación de los encapsulados a partir de un aceite de chía con un IP inferior a 1,5 meq O₂/kg de aceite. Además, se volvió a determinar el IP del aceite inmediatamente después del proceso de

emulsificación y se verificó que el procedimiento no aumentó significativamente este indicador.

En la Fig. 6.4.A puede verse que el IP de los encapsulados L-MC presentó valores elevados ($\cong 20$ meq O_2 /kg aceite) ya al inicio del almacenamiento, lo que promovió un crecimiento exponencial de la oxidación, alcanzando valores superiores a 1000 meq O_2 /kg aceite a las 4 semanas. Es por eso que la determinación de IP y TBARS fue discontinuada al mes de almacenamiento porque el aceite ya se encontraba completamente oxidado.

Esta tendencia se relaciona con la estructura altamente porosa de las esferas liofilizadas observada en las micrografías SEM (Fig. 6.3.), la cual presentaría numerosos canales abiertos hacia el interior de la cápsula, facilitando el ingreso de oxígeno y, en consecuencia, acelerando la degradación oxidativa del aceite.

Por su parte, los encapsulados en polvo mostraron valores iniciales de IP significativamente menores (P-BC: 2 meq O_2 /kg de aceite y P-TC: 3 meq O_2 /kg de aceite).

El IP de ambos encapsulados fue incrementándose con el transcurso del tiempo; sin embargo, los sistemas P-BC no superaron el límite sugerido por CODEX tras 4 meses de almacenamiento a 25°C. Por el contrario, los sistemas P-TC mostraron valores de IP más elevados en todos los tiempos evaluados en comparación con los P-BC, superando el umbral de 15 meq O_2 /kg aceite a los 2 meses de almacenamiento.

Estos resultados son consistentes con la morfología previamente descrita para estos sistemas, ya que en las micrografías SEM (Fig. 6.3.) se observó una mayor porosidad superficial en los polvos P-TC, lo que podría haber facilitado el ingreso de oxígeno hacia el interior de las cápsulas durante el almacenamiento.

La evolución de los valores de TBARS (Fig. 6.4.B) mostró un comportamiento acorde con los valores de IP observados para cada sistema. Las esferas liofilizadas L-MC alcanzaron valores de TBARS cercanos a 6 mmol MDA/kg aceite ya a las 2 semanas de almacenamiento, mientras que en los sistemas P-TC los compuestos secundarios de oxidación comenzaron a incrementarse más rápidamente a partir del segundo mes (semana 8), momento en el que el IP superó el umbral sugerido.

Por su parte, los polvos P-BC mantuvieron valores de TBARS < 1mmol MDA/kg aceite durante los 4 meses de almacenamiento, lo que es consistente con los bajos niveles de IP observados para estos sistemas.

Ixtaina et al. (2023) encapsularon aceite de chía utilizando caseinato de sodio y lactosa como materiales de pared, y obtuvieron polvos por secado por aspersión con un contenido de 33% de aceite, y una elevada eficiencia de encapsulación (98%). Cuando se almacenaron a 25 °C, estos sistemas mostraron un IP cercano a 15 meq O₂/kg de aceite al mes, y llegó hasta 70 meq O₂/kg de aceite a los 2 meses. Las micrografías SEM mostraron también una superficie porosa en el interior de los encapsulados que obtuvieron. Estos resultados son similares a los observados en la Fig. 6.4.A para los polvos P-TC, lo que resalta la importancia de lograr una cobertura continua y no porosa alrededor de las gotas de aceite para favorecer su conservación. En otro trabajo realizado por Copado et al. (2021) se diseñaron emulsiones BC y TC para encapsular aceite de chía con lecitina, CHT, mucílago de chía y MDX, que luego se secaron por aspersión. En este caso, para todos los sistemas obtuvieron valores de IP por debajo de 10 meq O₂/kg de aceite después de 90 días de almacenamiento a 25 °C, con valores significativamente menores para los sistemas TC. Estos encapsulados contenían una menor

proporción de aceite en el polvo (19%), lo que podría haber favorecido una mejor protección al tener una mayor cantidad relativa de material de pared. Sin embargo, los menores valores de IP alcanzados podrían estar relacionados también con la forma de obtención de las emulsiones multicapa, que se realizó de manera secuencial: primero se preparó una emulsión primaria con aceite y lecitina, luego se agregó CHT para formar una segunda capa, seguido del mucílago de chía para la tercera capa y, finalmente, se incorporó la MDX para aumentar el contenido de sólidos. Este procedimiento podría haber favorecido una disposición más ordenada de los biopolímeros alrededor de la interfase aceite-agua, dando lugar a la formación de una cubierta protectora más compacta y menos permeable al oxígeno.

En nuestro caso, las emulsiones TC que dieron origen a los polvos P-TC se obtuvieron en un solo paso, mediante la mezcla simultánea de las fases oleosa (aceite + lecitina) y acuosa (CHT, ALG, MDX). Teniendo en cuenta que, durante el proceso de homogeneización, el CHT y el ALG podrían haber formado complejos electrostáticos entre ellos de mayor tamaño entre sí, es posible que, al migrar a la interfase aceite-agua para estabilizarla, se hayan dispuesto de una manera más desordenada, por el impedimento estérico de los complejos CHT-ALG. Esto podría haber resultado en la formación de una superficie más porosa tras el secado por aspersion.

Zhou et al. (2024) utilizaron también un método de homogeneización en un solo paso para obtener emulsiones ternarias para encapsular aceites con alto contenido de ω -3, combinando α -lactalbúmina, proteínas de soja y polisacáridos (goma gelana, pululanos, MDX), que luego fueron secadas por aspersion. Al almacenar los encapsulados en polvo a

25°C luego de 20 días, obtuvieron valores de IP similares a los observados en la Fig. 6.4.A para los sistemas P-TC ($\cong 28$ meq O₂/kg aceite).

Estos resultados muestran que, si bien el número de capas alrededor de la gota de aceite puede influir en la estabilidad oxidativa de los sistemas encapsulados, no existe una relación lineal o directa entre la cantidad de capas y una mayor protección frente a la oxidación. La efectividad de la encapsulación depende en gran medida de la naturaleza, la compatibilidad y la proporción de los materiales de pared utilizados, de su capacidad para formar matrices poliméricas cohesivas, así también como del proceso de obtención de las emulsiones que, tras el secado por aspersión, dan lugar a los encapsulados en polvo.

6.3. Conclusiones preliminares

Los encapsulados de aceite de chía obtenidos por gelificación iónica de las emulsiones MC y posterior liofilización (L-MC) presentaron estructuras altamente porosas que, si bien fueron capaces de retener el aceite en su interior sin mostrar una apariencia aceitosa, no lograron protegerlo frente a la degradación oxidativa, ya que se registraron valores de IP muy elevados al inicio del almacenamiento a 25°C.

Por otro lado, los encapsulados obtenidos por secado por aspersión (P-BC y P-TC) presentaron estructuras más compactas, aunque también se evidenció la presencia de poros superficiales, en mayor cantidad en los polvos P-TC. Esta mayor porosidad observada en los sistemas P-TC tuvo como consecuencia una menor estabilidad oxidativa del aceite durante el almacenamiento a 25°C, ya que a los 2 meses superó el límite de IP sugerido por el Codex Alimentarius (15 meq O₂/kg aceite). Por su parte, los encapsulados P-BC mantuvieron valores de IP por debajo de este umbral hasta el final del almacenamiento (4 meses).

Por este motivo, se seleccionó el sistema P-BC como el más adecuado para continuar con el diseño del ingrediente funcional, mediante la incorporación de ASX a la formulación a través de *Haematococcus pluvialis*.

7. CAPITULO V: *Estabilidad de co-
encapsulados de aceite de chía y
astaxantina*

7. CAPÍTULO V: ESTABILIDAD DE ENCAPSULADOS DE ACEITE DE CHÍA Y ASTAXANTINA

Los resultados de los Capítulos III y IV demostraron que el sistema de emulsiones BC secadas por aspersión (P-BC) fue el más eficaz para encapsular aceite de chía y protegerlo de la degradación oxidativa durante el almacenamiento. Sin embargo, a pesar de que las esferas liofilizadas (L-MC) no resultaron ser una buena estructura de vehiculización del aceite, debido a los elevados valores de IP observados durante el almacenamiento, se decidió evaluar si con el agregado de ASX (a través de la incorporación de *H. pluvialis*) esta situación podía mejorarse. Esto se fundamentó en que, en el Capítulo II, se observó una marcada diferencia del aceite de chía almacenado durante 3 meses a 25°C sin ASX (IP > 100 meq O₂/Kg aceite) y con ASX (IP < 10 meq O₂/Kg aceite). En este capítulo, se estudió el impacto del agregado de *H. pluvialis* sobre la estabilidad del aceite de chía encapsulado mediante las formulaciones P-BC (emulsiones BC secadas por aspersión) y L-MC (emulsiones MC gelificadas y liofilizadas). Asimismo, se evaluó la influencia del agregado del alga sobre la estructura de las emulsiones y de los encapsulados deshidratados.

7.1. Materiales y métodos

7.1.1. Materiales

El aceite de chía fue provisto por SDA S.A. (Buenos Aires, Argentina). La LS se adquirió en Gelfix (Buenos Aires, Argentina). El ALG de grado alimenticio fue provisto por Foodchem Andina (Colombia). El CHT fue provisto por Eastar Holding Group Dong Chen Co. Ltd. (PM: $63,97 \pm 2,31$ kDa; grado de desacetilación: 93 %). La MDX (DE 15) fue comprada de Productos de Maíz SA. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

7.1.1. Preparado de *Haematococcus pluvialis* y obtención de encapsulados

Las emulsiones MC y BC fueron preparadas siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo III (Sección 5.1.2.), con la única modificación de incorporar en el aceite la cantidad necesaria de *Haematococcus pluvialis* para alcanzar una concentración final de 6400 ppm de ASX. Las emulsiones BC fueron deshidratadas mediante secado por aspersion, mientras que las emulsiones MC se gotearon en una solución de CaCl_2 para obtener esferas gelificadas que luego congelaron y se deshidrataron por liofilización, según los métodos detallados en el Capítulo IV (Sección 6.1.2.1.). Los co-encapsulados obtenidos se denominaron y P-BC/ASX y L-MC/ASX y, respectivamente.

7.1.2. Caracterización de emulsiones con *H. pluvialis*

Las emulsiones MC y BC se caracterizaron utilizando los métodos descriptos en el Capítulo III, con el objetivo de evaluar si la incorporación del alga generaba modificaciones respecto de las propiedades estudiadas en ese capítulo. Se realizaron determinaciones de potencial Z

(Sección 5.1.3.2.), índice de cremado (Sección 5.1.3.4.), coalescencia (Sección 5.1.3.5), así también como la caracterización reológica mediante ensayos rotacionales y oscilatorios (Sección 5.1.3.6).

7.1.3. Caracterización de esferas de emulsiones monocapa gelificadas

7.1.3.1. Tamaño de las esferas

Se determinó el diámetro de las esferas gelificadas obtenidas por goteo de las emulsiones MC en CaCl_2 , antes y después del proceso de liofilización, utilizando un micrómetro digital (IP65 Digital Outside Micrometers, ASIMETO). Se realizaron 20 mediciones sobre unidades individuales.

7.1.3.2. Análisis reológico de esferas gelificadas húmedas

Las esferas de emulsiones MC gelificadas (con y sin ASX), se evaluaron siguiendo la metodología descrita por Radosavljević et al. (2020), con algunas modificaciones. Los ensayos reológicos oscilatorios se realizaron en un equipo Haake Mars 40 (Alemania) utilizando una geometría de plato-plato, con un espacio (gap) de 1 mm, el cual fue adaptado mediante la incorporación de una lámina de superficie rugosa para evitar el deslizamiento de la muestra durante las mediciones (Figura 7.1.). Los barridos de frecuencia se efectuaron en un rango de 0,5 a 100 Hz, registrándose la evolución de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') en función de la frecuencia, con el objetivo de caracterizar el comportamiento viscoelástico de las esferas. Las mediciones se realizaron a una deformación controlada del 1 %, seleccionada sobre la base de barridos de amplitud preliminares, que permitieron determinar el rango viscoelástico lineal (RVL) de la muestra.

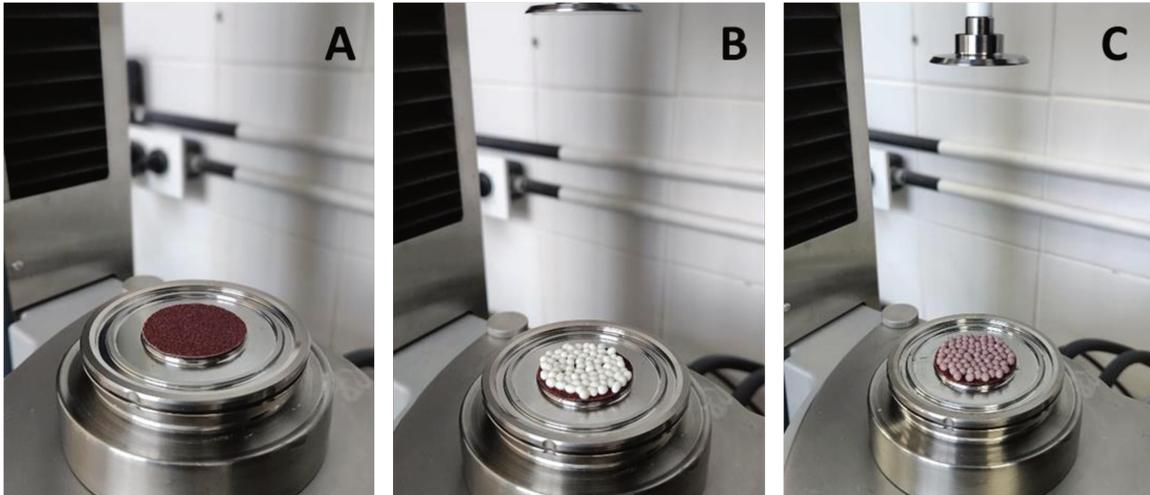


Figura 7.1. Disposición de las muestras sobre el reómetro Haake Mars 40 para la realización de ensayos reológicos. (A) Superficie del plato adaptada con una lija, (B) esferas gelificadas sin ASX, (C) esferas gelificadas con ASX.

7.1.3.3. Análisis de perfil de textura

El análisis de perfil de textura (TPA) se realizó tanto a las esferas gelificadas antes de la liofilización (ES-MC y ES-MC/ASX) como a las liofilizadas (L-MC y L-MC/ASX), según la metodología descrita por Espinaco et al., (2023), con algunas modificaciones. El TPA se realizó en una máquina universal de ensayos Instron (Norwood, USA). Para ello se utilizó una celda de carga de 1000 N y un disco de teflón de 50 mm de diámetro. Las esferas se colocaron en un plato inferior de manera tal que formaban una capa de 3 mm de alto. Se realizaron dos ciclos de compresión a un nivel de deformación del 50 %. Se utilizó una fuerza de contacto de 0,02 N, una velocidad de 0,2 mm/s y un tiempo de espera entre el primer y el segundo ciclo de 5 s. Los ensayos se realizaron por triplicado (Giménez et al., 2023).

A partir de los datos de fuerza de compresión vs. Tiempo se obtuvieron los siguientes parámetros:

- Dureza: fuerza máxima en el primer ciclo de compresión
- Elasticidad: cociente entre el tiempo de la segunda compresión y el tiempo de la primera compresión (D_2/D_1).
- Cohesividad: relación del área positiva del segundo ciclo de compresión sobre el área positiva del primer ciclo (A_2/A_1).
- Masticabilidad: producto de la dureza, la cohesividad y la elasticidad.

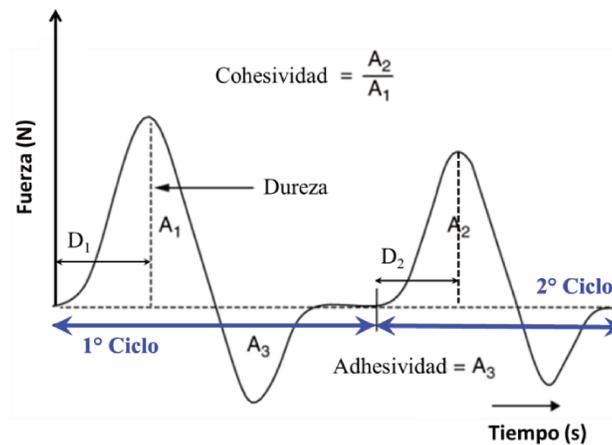


Figura 7.2. Curva de Análisis de Perfil de Textura típica. A_1 , A_2 y A_3 : áreas de los picos. D_1 y D_2 : distancias en el eje x.

7.1.4. Caracterización de los co-encapsulados con *H. pluvialis* deshidratados

Los co-encapsulados P-BC/ASX y L-MC/ASX se caracterizaron utilizando los métodos descritos en el Capítulo IV. Se les realizaron determinaciones de eficiencia de encapsulación (Sección 6.1.3.1.), humedad y a_w (Sección 6.1.3.2.), y microscopía SEM (Sección 6.1.3.3.).

Además, a los co-encapsulados en polvo P-BC/ASX se les determinó el porcentaje de dispersabilidad (Sección 6.1.3.4.) y solubilidad (Sección 6.1.3.5.) en agua.

7.1.5. Estabilidad oxidativa de los co-encapsulados durante el almacenamiento

La estabilidad oxidativa del aceite en los co-encapsulados se evaluó midiendo los productos de oxidación primarios y secundarios, mediante la determinación del IP y TBARS como se detalló anteriormente en el Capítulo IV (Sección 6.1.4). En este caso, se almacenaron las muestras en humedad relativa controlada a 70 %, mediante solución saturada de NaCl y a dos temperaturas a 25 °C y 40 °C.

7.1.6. Estabilidad de la astaxantina durante el almacenamiento

En los polvos P-BC/ASX se cuantificó periódicamente la concentración de ASX durante el almacenamiento a 25 °C por un periodo de 6 meses. Para cada análisis, se pesó una cantidad equivalente de P-BC/ASX que correspondiera a 10 mg de polvo de *H. pluvialis*, lo cual representó 0,2648 g de muestra. A continuación, se procedió a la determinación del contenido de ASX según la metodología descrita en el Capítulo II, Sección 4.1.7.

7.1.7. Análisis estadístico

Al igual que en los capítulos anteriores, todas las muestras fueron preparadas con sus réplicas y las determinaciones analíticas se realizaron al menos por duplicado. Las diferencias entre medias se analizaron mediante t test. Con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

7.2. Resultados y discusión

7.2.1. Efecto del agregado de *H. pluvialis* sobre la estabilidad de las emulsiones

La Fig. 7.3. muestra el potencial zeta de las emulsiones MC y BC con y sin la adición de *H. pluvialis*. A diferencia del capítulo anterior, en el cual se comparaban distintos sistemas de encapsulación, en este capítulo el análisis se centró en evaluar el impacto específico de la incorporación de *H. pluvialis* sobre cada sistema de encapsulación en particular.

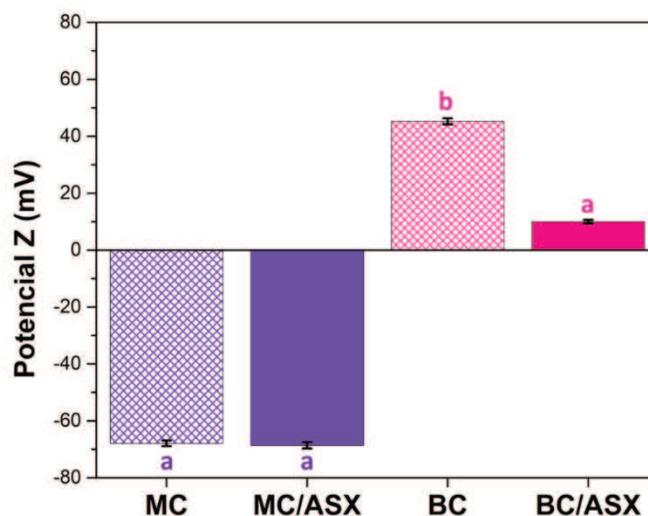


Figura 7.3. Potencial Z de las emulsiones monocapa y bicapa con la incorporación de *H. pluvialis* (MC/ASX y BC/ASX) en comparación con sus análogos sin el alga (MC y BC).

Puede observarse que la adición del alga a las emulsiones MC no modificó el potencial zeta. En cambio, en las emulsiones BC se produjo un cambio significativo, con una disminución de 45 mV a 10 mV (Fig. 7.3.). Este comportamiento sugiere que el alga, debido a la complejidad de su estructura superficial, podría contener grupos funcionales con carga negativa. Estos

grupos no habrían afectado la interfase de las gotas recubiertas únicamente con lecitina en las emulsiones MC, pero sí habrían interactuado con los grupos amino cargados positivamente del CHT presente en la membrana interfacial de las emulsiones BC, reduciendo así la magnitud positiva del potencial zeta como resultado de estas interacciones.

En concordancia con nuestros resultados, (Vieira et al., 2021) observaron un comportamiento similar en sus estudios sobre la adición de *H. pluvialis* a nanocápsulas de ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) formuladas con Tween 80 y lecitina. A medida que aumentaba la cantidad de *H. pluvialis* en la formulación, se incrementaba el valor negativo del potencial zeta, lo que respalda la interpretación planteada previamente.

Asimismo, se evaluó la estabilidad física de las emulsiones frente a la desestabilización por cremado y coalescencia, y los resultados se presentan en la Fig. 7.4. Tal y como puede verse, las emulsiones fueron estables al cremado y no se observó liberación de aceite durante los ensayos de coalescencia en ninguno de los dos sistemas (Figura 7.4.). Por lo tanto, la incorporación del alga no modificó la estabilidad física de las emulsiones formuladas, ni la resistencia de las membranas interfaciales para proteger al aceite cuando las emulsiones se sometieron a un proceso de desestabilización acelerada.

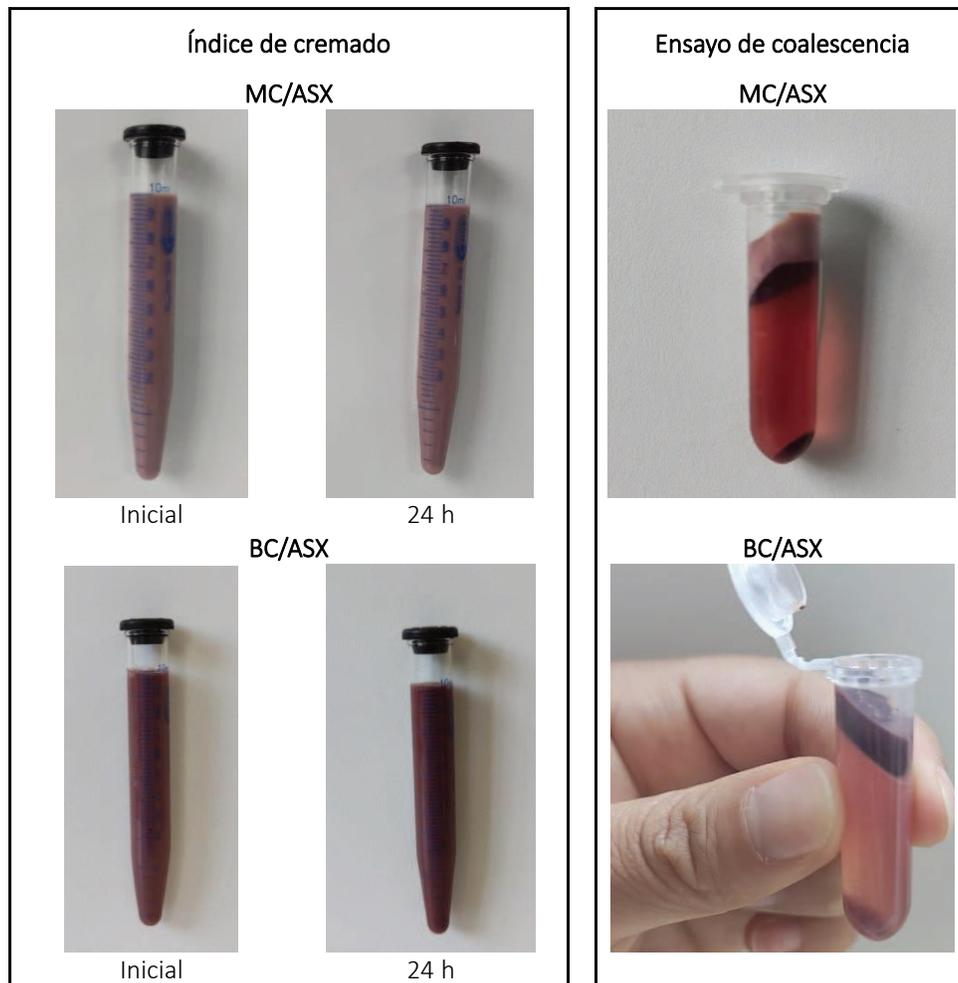


Figura 7.4. Fotografías representativas de los ensayos de estabilidad física realizados en emulsiones monocapa (MC) y bicapa (BC) formuladas con *H. pluvialis*. Las fotos de los ensayos de coalescencia corresponden a las emulsiones centrifugadas (15000 g, 15 min).

7.2.2. Efecto del agregado de *H. pluvialis* sobre las propiedades reológicas de las emulsiones

El comportamiento reológico de las emulsiones se evaluó mediante ensayos rotacionales, a partir de los cuales se obtuvieron curvas de flujo (Fig. 7.5.), que se ajustaron al modelo de la ley de potencia para obtener los parámetros k (índice de consistencia) y n (índice de comportamiento de flujo) presentados en las Tablas 7.1 (sistema MC) y 7.2 (sistema BC).

Con el objetivo de analizar el efecto de la incorporación de *H. pluviialis*, se compararon las curvas de flujo de las emulsiones formuladas con y sin alga. Visualmente, las curvas mostraron un comportamiento muy similar a sus respectivos controles, lo que sugiere una respuesta reológica prácticamente idéntica. No obstante, el análisis estadístico de los parámetros n y k reveló diferencias significativas entre los sistemas ($p < 0,05$) cuando se adicionó el alga. En ambas emulsiones MC y BC, se observó un aumento en el índice de consistencia (k) y una disminución en el índice de comportamiento de flujo (n) con el agregado del alga, reflejando una mayor viscosidad aparente y un carácter pseudoplástico más marcado (Tablas 7.2. y 7.3.).

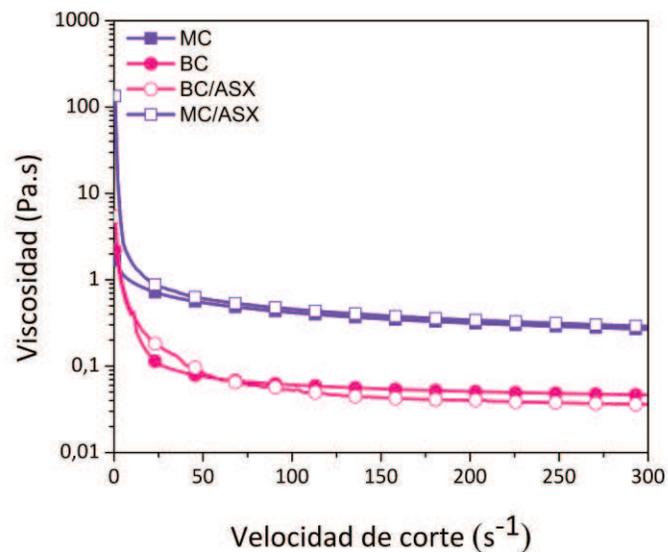


Figura 7.5. Curvas de flujo para los sistemas MC y BC, con y sin agregado de ASX.

Tabla 7.1. Parámetros del modelo de la ley de potencia (n y k) para las emulsiones monocapa

Sistema	n	k (Pa.s)
MC	$0,60 \pm 0,01^b$	$2,61 \pm 0,05^a$
MC/ASX	$0,57 \pm 0,01^a$	$3,42 \pm 0,15^b$

Los datos se expresan como los promedios \pm el error estándar ($n = 3$). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0,05$), t test.

Estos resultados tienen sentido si se considera que la incorporación del alga aportó un mayor contenido de sólidos a las emulsiones, lo que habría influido directamente en el aumento observado del índice de consistencia (k) y en la disminución del parámetro n . Un valor de n más alejado de 1, refleja un mayor carácter pseudoplástico. En el caso de las emulsiones BC/ASX esta reducción de n fue más marcada con respecto a las emulsiones BC, lo que sugeriría una red interna más estructurada, que ofrece mayor resistencia al flujo a bajas velocidades de corte, pero que se desorganiza más fácilmente al aumentar el esfuerzo aplicado (Fig. 7.5.).

Tabla 7.2. Parámetros del modelo de la ley de potencia (n y k) para las emulsiones bicapa

Sistema	n	k (Pa.s)
BC	$0,72 \pm 0,01^b$	$0,23 \pm 0,02^a$
BC/ASX	$0,48 \pm 0,03^a$	$0,53 \pm 0,02^b$

Los datos se expresan como los promedios \pm el error estándar ($n = 3$). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0,05$), t test.

Este comportamiento puede estar asociado con los menores valores de potencial Z (10 mV) observados para estos sistemas cuando se incorporó el alga (Fig. 7.1.).

En este sentido, las interacciones entre los componentes del alga y los grupos NH_3^+ del CHT podría no sólo haber disminuido el potencial superficial de las gotas de emulsión en la interfase, sino también dar lugar conformaciones más compactas o menos extendidas de las moléculas de CHT, debido a la menor repulsión electrostática. Este efecto podría haber influido en la viscosidad de la fase acuosa a elevadas velocidades de corte (Da Costa et al., 2017).

La Figura 28 muestra los resultados de los ensayos oscilatorios de las emulsiones MC (Fig. 7.6. A) y BC (Fig. 7.6. B), con y sin incorporación de *H. pluvialis*, a través de barridos de frecuencia.

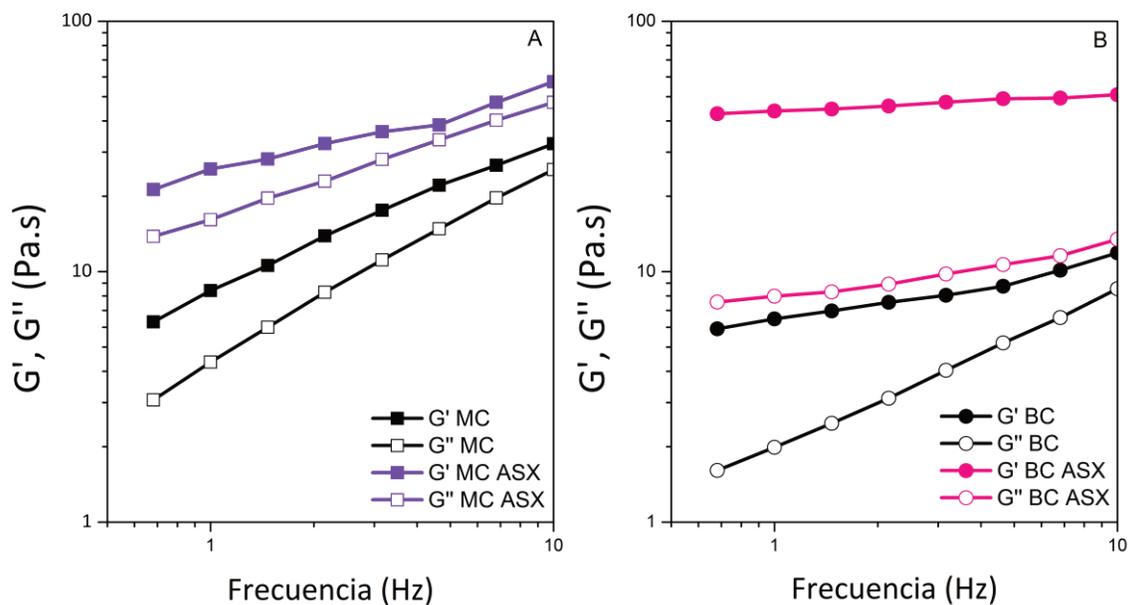


Figura 7.6. Barridos de frecuencia de las emulsiones monocapa (A) y bicapa (B) para los sistemas con agregado de *H. pluvialis* (MC/ASX y BC/ASX) y sus análogos sin adición de alga (MC y BC).

En ambos sistemas se observó que la incorporación del alga produjo un incremento tanto en el módulo elástico (G') como en el viscoso (G'') en todo el rango de frecuencias evaluado, lo que indicaría una mayor rigidez y cohesión estructural, posiblemente atribuido a la presencia de sólidos adicionales provenientes del alga. Este aumento en ambos módulos relacionados a la incorporación del alga, fue más marcado para las emulsiones BC que para las MC. Esto resulta coherente si se considera que, en las emulsiones MC, la mayor concentración de biopolímeros en solución (0,6 % de ALG), favorecía la formación de una red más consistente y estable durante el análisis. En este caso, el aporte de sólidos contribuyó a aumentar el carácter elástico, pero no en gran medida. En cambio, en las emulsiones BC, dado que la concentración de biopolímeros en fase acuosa era menor (0,3 % de CHT), el agregado de sólidos promovió un aumento mucho más significativo en el comportamiento elástico de estas emulsiones. Este efecto probablemente se debería a las interacciones electrostáticas entre las moléculas de CHT y los grupos funcionales presentes en la superficie del alga (Fig. 7.5.), que habrían generado una red de flóculos entre las gotas más estructurada y una mayor resistencia mecánica a la deformación (G. Zhang et al., 2024).

7.2.3. Efecto del agregado de *H. pluvialis* sobre el comportamiento reológico y la textura de las esferas obtenidas por gelificación de las emulsiones MC

En la Figura 7.7. se muestra la apariencia visual de las esferas obtenidas por gelificación de las emulsiones MC, con o sin el agregado del alga, en sus versiones húmeda y liofilizada.

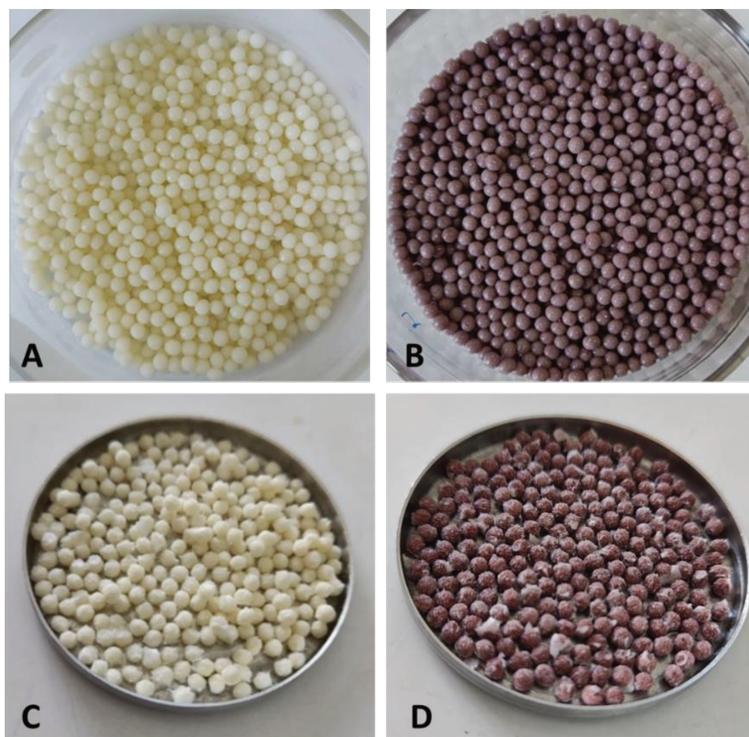


Figura 7.7. Esferas obtenidas por gelificación iónica de emulsiones monocapa sin el agregado de *H. pluvialis* (A, C), con agregado de alga (B, D), en estado húmedo (A, B) y liofilizadas (C, D).

Además, en la Tabla 7.3., se presentan los tamaños promedio de las esferas medidos para cada uno de estos sistemas.

Tabla 7.3. Tamaño de esferas obtenidas por gelificación iónica de emulsión monocapa, con (L-MC/ASX) y sin (L-MC) agregado de *H. pluvialis*, antes y después de la liofilización.

Formulación	L-MC	L-MC/ASX
Tamaño esferas húmedas (mm)	3,207 ± 0,027 ^a	3,257 ± 0,008 ^a
Tamaño esferas liofilizadas (mm)	3,128 ± 0,042 ^a	3,088 ± 0,014 ^a

Los datos se expresan como los promedios ± el error estándar (n = 3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (p < 0,05), t test.

Como puede observarse, se obtuvieron esferas gelificadas húmedas de tamaños bastante homogéneos, con una superficie lisa y brillante, y un color púrpura característico en aquellas en las que se incorporó el alga a las emulsiones.

El agregado del alga no modificó el tamaño de las esferas gelificadas obtenidas al gotear las emulsiones en la solución de CaCl_2 , ya que no se observaron diferencias significativas en este parámetro en relación con las esferas sin *H. pluvialis* (Tabla 7.3.). Tampoco el proceso de liofilización alteró significativamente el tamaño (Tabla 7.3.) ni la forma de las esferas (Fig. 7.7. C, D) luego de la deshidratación.

7.2.3.1. Comportamiento reológico de esferas gelificadas

A las esferas húmedas con y sin *H. pluvialis*, se les realizaron ensayos oscilatorios de deformación y se registraron los módulos elástico (G') y viscoso (G'') en barridos de frecuencia, que se muestran en la Fig. 7.8.

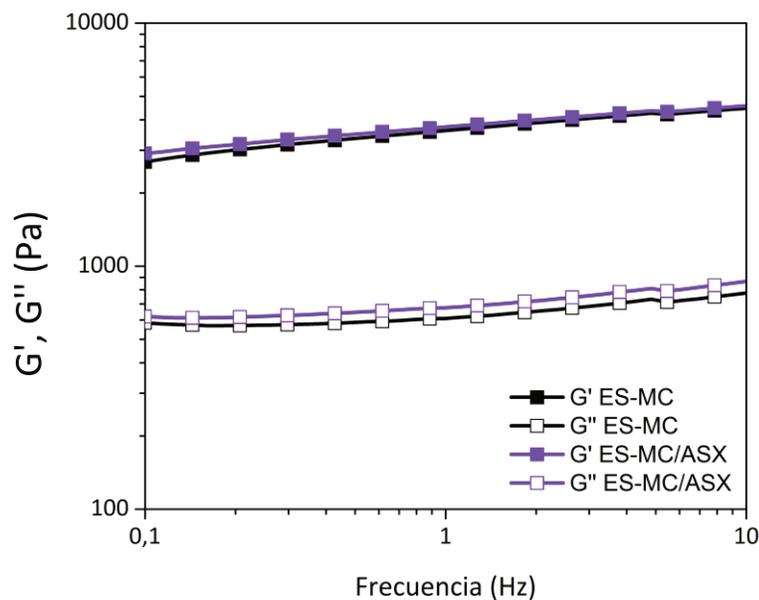


Figura 7.8. Barridos de frecuencia de las esferas monocapa para el sistema con agregado de *H. pluvialis* (ES-MC/ASX) en comparación con su análogo sin adicionar (ES-MC)

Tal y como se observa, para ambos sistemas, el módulo elástico (G') fue muy superior al módulo viscoso (G'') a lo largo de todo el rango de frecuencias analizado, lo que indica un comportamiento típico de geles estructurados, y era esperable para este tipo de formulaciones con carácter más sólido que las emulsiones que le dieron lugar. A diferencia de lo observado en el comportamiento reológico de las emulsiones, la incorporación de *H. pluvialis* no parece haber generado cambios sustanciales en los valores absolutos de G' y G'' , ya que las curvas correspondientes a ES-MC y ES-MC/ASX presentan gran coincidencia en cada frecuencia analizada. Esto sugiere que, la adición del alga no alteró significativamente la red estructural del gel formado, en relación a su resistencia a la deformación.

Otros investigadores, como (Radosavljević et al., 2020), también utilizaron este método para evaluar el comportamiento de esferas gelificadas en calcio, a base de ALG (1% ALG) y alcohol polivinílico (5% PVA), destinadas a encapsular una cepa específica de *Lactobacillus rhamnosus*. En el análisis reológico realizado, los autores reportaron un comportamiento dominado por la componente elástica (G'), aunque alcanzando valores mucho mayores, en el rango de 30-50 kPa, debido a que sus emulsiones contenían una mayor cantidad de biopolímeros en fase acuosa y se utilizó una mayor concentración de Ca^{2+} para la gelificación de las emulsiones (2% $CaCl_2$).

7.2.3.2. Análisis de Perfil de Textura (TPA) de esferas húmedas y liofilizadas

El análisis de perfil de textura (TPA) es el método instrumental comúnmente utilizado para medir la textura de alimentos. En el ensayo TPA, un émbolo comprime de forma uniaxial y durante dos veces consecutivas la muestra para simular el movimiento de la mandíbula durante la masticación. El TPA es un buen procedimiento instrumental para medir y

cuantificar parámetros relacionados con la textura (dureza, elasticidad, cohesividad, masticabilidad), que se relacionan a su vez con variables como la tasa de deformación aplicada y la composición del producto (Torres et al., 2015)

En este apartado se evaluó la influencia del agregado de *H. pluvialis* sobre el perfil de textura de las esferas formuladas antes (ES-MC y ES-MC/ASX) y después de la liofilización (L-MC y L-MC/ASX). De este modo, fue posible analizar el impacto del alga sobre la matriz gelificada, así como el efecto del proceso de deshidratación sobre las propiedades mecánicas de las esferas. En la Figura 7.9. se muestran los perfiles de TPA correspondientes a las esferas gelificadas húmedas (Fig.7.9. A) y liofilizadas (Fig. 7.9. B), mientras que en las tablas siguientes se listan los parámetros de textura obtenidos a partir de estas curvas para las esferas húmedas (Tabla 7.4.A) y esferas liofilizadas (Tabla 7.4.B).

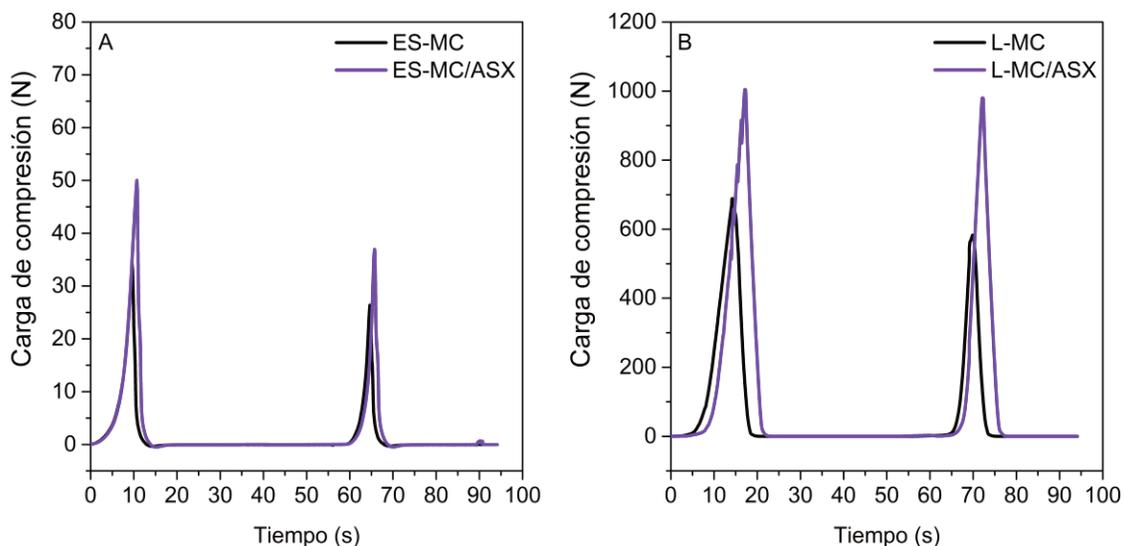


Figura 7.9. Perfiles de TPA correspondientes a las esferas gelificadas de emulsiones monocapa antes del proceso de liofilización (A) y después del proceso de liofilización (B). Los sistemas ES-MC y L-MC son aquellos a los que no se agregó *H. pluvialis*, por lo tanto, no contienen ASX.

En ambas gráficas, se observa un aumento de la altura del pico de la primera compresión (fuerza máxima) al incorporar el alga, tanto en las esferas húmedas como secas, lo que indica un incremento en la dureza (Tabla 7.4.A) asociado a la incorporación de *H. pluvialis*. Asimismo, este parámetro se incrementa de forma notable tras el proceso de liofilización (Tabla 7.4.B).

Tabla 7.4.A Parámetros de textura de las esferas húmedas obtenidos a partir de los ensayos de TPA.

Parámetro	ES-MC	ES-MC/ASX
Dureza (N)	37,08 ± 2,08 ^a	52,47 ± 1,54 ^b
Elasticidad	0,67 ± 0,10 ^a	0,71 ± 0,07 ^a
Cohesividad	0,53 ± 0,01 ^b	0,47 ± 0,01 ^a
Resiliencia	0,31 ± 0,05 ^a	0,25 ± 0,04 ^a
Masticabilidad (N)	13,20 ± 0,77 ^a	17,49 ± 1,65 ^b

Los datos se expresan como los promedios ± el error estándar (n = 3). Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa (p < 0,05), t test. ES-MC: esferas húmedas de emulsiones monocapa; ES-MC/ASX: esferas húmedas de emulsiones monocapa con *H. pluvialis*.

Tabla 7.4.B Parámetros de textura de las esferas liofilizadas obtenidos a partir de los ensayos de TPA.

Parámetro	L-MC	L-MC/ASX
Dureza (N)	754,36 ± 7,15 ^a	1021,28 ± 16,87 ^b
Elasticidad	0,88 ± 0,03 ^b	0,66 ± 0,05 ^a
Cohesividad	0,52 ± 0,01 ^a	0,69 ± 0,01 ^b
Resiliencia	0,29 ± 0,01 ^a	0,44 ± 0,01 ^b
Masticabilidad (N)	344,36 ± 8,65 ^a	465,29 ± 23,69 ^b

Los datos se expresan como los promedios ± el error estándar (n = 3). Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa (p < 0,05), t test. L-MC: esferas liofilizadas de emulsiones monocapa; LC-MC/ASX: esferas liofilizadas de emulsiones monocapa con *H. pluvialis*.

Este efecto podría atribuirse a la incorporación del alga en los sistemas, con el consecuente aumento del contenido de sólidos, lo que fortalecería la estructura del gel y la haría más resistente a la deformación (Vieira et al., 2021). Además, la liofilización provocó un incremento de al menos 20 veces en la dureza de las muestras, lo que, junto con el mayor contenido de sólidos totales aportado por el alga, favorece la formación de una matriz más densa y resistente en las esferas liofilizadas.

En cuanto a los demás parámetros, se observó que el agregado del alga, promovió una disminución en la cohesividad en las esferas húmedas, pero un incremento en las esferas liofilizadas. El aporte de un mayor contenido de sólidos, podría interrumpir el ordenamiento de la red gelificada de las moléculas de ALG y los iones calcio en las esferas húmedas, haciéndola menos cohesiva. Sin embargo, al eliminar el agua, el alga aumentaría la interacción con las moléculas de la estructura remanente, promoviendo así una mayor cohesividad a la matriz, capaz de soportar deformaciones sin desintegrarse.

El alga también aumentó la masticabilidad de las esferas tanto húmedas como liofilizadas, y esto es consistente con el incremento de la dureza para ambos sistemas.

No se hallaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la elasticidad y la resiliencia de las esferas húmedas luego del agregado de *H. pluvialis*. Sin embargo, luego de la liofilización, las L-MC/ASX mostraron una elasticidad significativamente menor ($p < 0,05$) a la del control (L-MC) lo que podría asociarse a una mayor fragilidad estructural inducida por el proceso de deshidratación en presencia de sólidos adicionales.

La resiliencia se refiere a la capacidad del material para recuperar su forma original inmediatamente después de ser sometido a una fuerza. Los sistemas L-MC/ASX mostraron

un aumento significativo en la resiliencia respecto de los sistemas L-MC, lo que sugeriría más una matriz reforzada, capaz de conservar mejor su integridad estructural al ser sometida a una deformación.

Si bien no se encontraron antecedentes bibliográficos que reporten ensayos similares en matrices comparables a las evaluadas en este estudio, desde una perspectiva sensorial y cualitativa, se observó que los co-encapsulados presentaban al tacto una textura crocante, similar a la de un cereal tipo *quinoa pop*. Este aspecto podría constituir un atributo sensorial positivo y atractivo para los potenciales consumidores.

7.2.4. Efecto del agregado de *H. pluvialis* sobre la morfología y las características fisicoquímicas de los co-encapsulados

En la Fig. 7.10. se muestran la apariencia macroscópica de las dos formulaciones de co-encapsulados de aceite de chía y ASX.

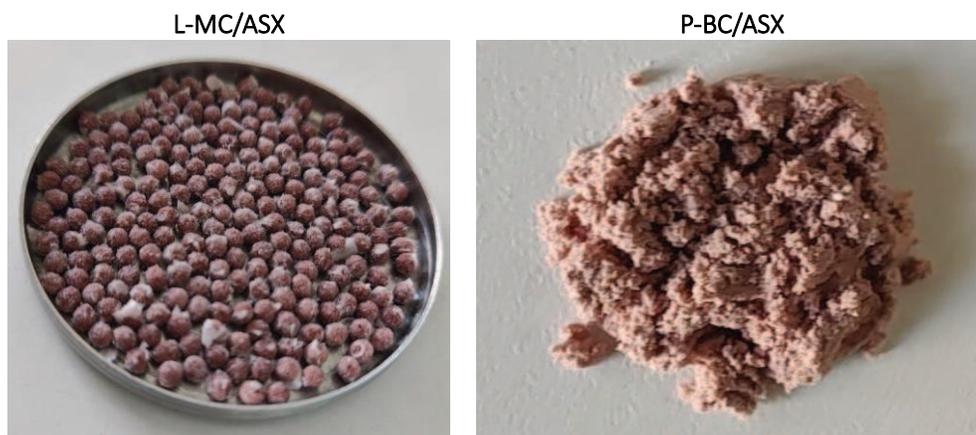


Figura 7.10. Vista macroscópica de los co-encapsulados conteniendo ASX, a través de la incorporación de *H. pluvialis*.

L-MC/ASX: Emulsiones monocapa gelificadas y liofilizadas; *P-BC/ASX*: emulsiones bicapa secadas por aspersion.

No presentaron diferencias notables con respecto a sus formulaciones análogas sin la incorporación de *H. pluvialis*, salvo por las variaciones en la coloración, atribuibles a la presencia del alga.

La microestructura de los sistemas co-encapsulados fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido, y las micrografías se presentan en la Figura 7.11.

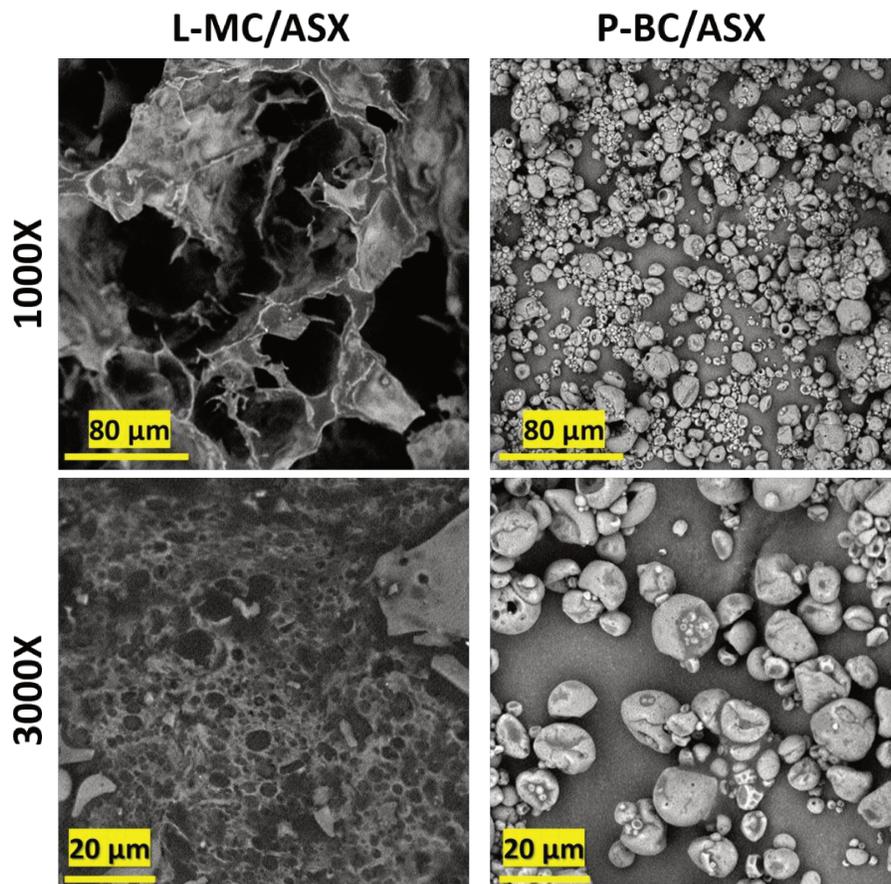


Figura 7.11. Microscopía electrónica de barrido de co-encapsulados de aceite de chía y ASX.
 LC-MC/ASX: esferas gelificadas y liofilizadas; P-BC/ASX: polvos secados por aspersión

En el caso de las muestras liofilizadas (L-MC/ASX), las partículas presentaron una estructura altamente porosa, con canales abiertos hacia el interior de la estructura, muy similar a la observada en el Capítulo IV para los sistemas sin *H. pluvialis* y característica del proceso de

deshidratación por sublimación. Por otro lado, en las formulaciones secadas por aspersión (P-BC/ASX), se observaron partículas con formas predominantemente esféricas, una alta polidispersidad de tamaños, con superficies rugosas con algunas hendiduras o concavidades típicas de las partículas secadas por aspersión. Sin embargo, a diferencia de las micrografías SEM obtenidas para estos sistemas en el capítulo anterior (Fig. 7.11.), hubo una menor aglomeración de las partículas y también se observó una menor cantidad de poros en su superficie. Probablemente, el incremento de sólidos, a través de la incorporación del alga, habría promovido la formación de estructuras más compactas y con menos cantidad de poros. Este tipo de microestructura puede tener implicancias importantes en términos de estabilidad, protección del núcleo y comportamiento funcional del sistema encapsulado. Adicionalmente, en la Figura 7.12. se presenta una micrografía en un aumento de 500X de un corte transversal de una esfera L-MC/ASX. Allí se puede ver con claridad la disposición radial interna de la matriz liofilizada, así como la estructura en "caja de huevo" (*egg-box*) característica de la gelificación iónica del ALG en presencia de calcio, que le confiere integridad mecánica a la red polimérica (Wani et al., 2023).

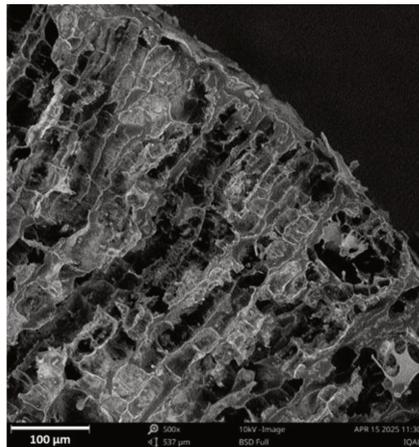


Figura 7.12. Microscopía electrónica de barrido de un corte transversal de una esfera L-MC/ASX.

En las Tablas 7.5.A y B se presentan los distintos parámetros fisicoquímicos determinados en los co-encapsulados de aceite de chía con ASX.

Tabla 7.5.A Valores de humedad (H), actividad de agua (a_w), solubilidad (S %) dispersabilidad (D %) y eficiencia de encapsulación (EE) de los co-encapsulados liofilizados

Formulación	H%	a_w	EE %
L-MC	0,59 ± 0,02 ^a	0,35 ± 0,01 ^b	ND
L-MC/ASX	0,69 ± 0,09 ^a	0,13 ± 0,01 ^a	ND

Los datos se expresan como los promedios ± el error estándar (n = 3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (p < 0,05), t test. ND = No detectable. L-MC: esferas gelificadas de emulsiones monocapa liofilizadas; L-MC/ASX: esferas liofilizadas de emulsiones monocapa con ASX.

La incorporación de *H. pluvialis* no modificó la humedad de las esferas liofilizadas, que se mantuvo por debajo del 1%. En cambio, incrementó levemente la humedad de los polvos secados por aspersión, que aumentó de un 1,86% a un 2,21%.

Tabla 7.5.B Valores de humedad (H), actividad de agua (a_w), solubilidad (S %) dispersabilidad (D %) y eficiencia de encapsulación (EE) de los co-encapsulados secados por aspersión

Formulación	H%	a_w	S %	D%	EE %
P-BC	1,86 ± 0,15 ^a	0,30 ± 0,02 ^a	64,94 ± 0,48 ^a	67,75 ± 1,98 ^a	61,35 ± 6,95 ^b
P-BC/ASX	2,21 ± 0,03 ^b	0,50 ± 0,01 ^b	65,40 ± 0,44 ^a	64,03 ± 5,84 ^a	48,80 ± 6,22 ^a

Los datos se expresan como los promedios ± el error estándar (n = 3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (p < 0,05), t test. ND = No detectable. P-BC: polvos de emulsiones bicapa secados por spray; P-BC/ASX: polvos de emulsiones bicapa secados por spray con ASX.

En relación a la actividad de agua, la incorporación de *H. pluvialis* tuvo efectos opuestos según la formulación y el método de secado aplicado. En las esferas gelificadas y liofilizadas, la adición del alga produjo una disminución significativa de la a_w . Como en los sistemas liofilizados la cantidad de agua residual después de la deshidratación en frío es muy baja, es posible que el alga haya interactuado con algunas moléculas de agua, según los grupos funcionales presentes en su membrana, y promovido una menor disponibilidad de esa agua en la matriz.

En cambio, en los encapsulados BC secados por aspersión, la misma proporción de alga resultó en un aumento del a_w (Tabla 7.5.B). Hay que tener en cuenta que este proceso de deshidratación comprende un mecanismo diferente al de la liofilización. Probablemente, la incorporación de sólidos a través del agregado del alga, podría haber dificultado en cierta medida la evaporación rápida del agua durante el proceso de atomización de las gotas, con el consecuente aumento del a_w . Esto es consistente con el pequeño aumento de los valores de humedad observados para estos polvos.

Por otra parte, en los encapsulados en polvo se evaluaron los parámetros de dispersabilidad y solubilidad, y no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) tras la incorporación de *H. pluvialis*.

No obstante, al analizar la eficiencia de encapsulación, se registró una disminución significativa en la formulación con el alga ya que pasó de un 61% a un 49%. Sin embargo, este resultado podría estar influenciado por una interferencia metodológica en la técnica de extracción del aceite no encapsulado, ya que durante el procedimiento es posible que los compuestos liposolubles presentes en *H. pluvialis* hayan sido co-extraídos junto con el aceite.

Esto se observó en la coloración roja del aceite remanente en el balón de extracción luego de la evaporación del solvente de extracción en el rotavapor. Siendo una técnica gravimétrica la que se utilizó para calcular la eficiencia de encapsulación, esta situación podría haber sobreestimado el contenido de aceite no encapsulado y, en consecuencia, disminuir el valor final de la eficiencia de encapsulación. Algunos estudios en bibliografía han determinado un compuesto lipídico entre el 37-45% en base seca para *Haematococcus pluvialis* que se destina para producir y comercializar ASX (Damiani et al., 2010; Gencer & Turan, 2025). Por otro lado, la disminución en la EE también podría haber estado relacionada con modificaciones en la membrana interfacial debidas a las interacciones electrostáticas entre el alga y las moléculas de CHT, tal como se observó en la variación del potencial zeta de las emulsiones BC (Fig. 7.3). Teniendo en cuenta que el alga y el CHT se agregaron en una proporción aproximada de 5:1 en la emulsión, la interacción del biopolímero con el alga (Vieira et al., 2021) podría haber limitado, por restricciones estéricas, la correcta disposición del CHT en la interfase O/W estabilizada por la lecitina. Esto podría haber alterado la organización de la membrana interfacial y favorecido una mayor extracción de aceite durante el tratamiento de los polvos con éter de petróleo para la determinación de “aceite libre”.

A pesar del aparente bajo valor de EE obtenido para los polvos P-BC/ASX, es necesario evaluar la estabilidad oxidativa del aceite encapsulado en este tipo de sistemas. Si bien se busca minimizar la cantidad de aceite superficial, no existe una relación directa entre la EE y la estabilidad oxidativa de los compuestos encapsulados. De hecho, un estudio realizado por (Linke et al., 2020) sobre microencapsulación de aceite de pescado encontró que la mayor contribución a la oxidación de los compuestos bioactivos no provenía del aceite no

encapsulado, sino de la eficacia de la estructura formada por los materiales de pared para impedir el paso de oxígeno hacia el interior de las cápsulas y así reducir la oxidación.

7.2.5. Estabilidad oxidativa de los co-encapsulados

Como se explicó al inicio de este capítulo, y en función de los resultados obtenidos en el Capítulo II, donde se evidenció una mejora significativa en la estabilidad oxidativa del aceite de chía mediante la incorporación de *H. pluvialis*, se decidió evaluar si este efecto antioxidante se replicaba en los sistemas encapsulados desarrollados.

Según los resultados del Capítulo IV, la formulación más eficiente para proteger el aceite de chía fueron las emulsiones BC secadas por aspersión (P-BC).

Sin embargo, a pesar de que las esferas liofilizadas (L-MC) no resultaron ser una buena estructura de vehiculización del aceite, debido a los elevados valores de IP observados durante el almacenamiento, se decidió evaluar si con el agregado de ASX (a través de la incorporación de *H. pluvialis*) podía mejorar esta situación. Además, este tipo de estructura seguía siendo de interés para desarrollar un snack que pudiera vehiculizar aceite de chía y ASX con una textura similar a la quinoa-pop.

La Figura 7.13. muestra la evolución del índice de peróxidos (IP) durante el almacenamiento a 25 °C, en las formulaciones L-MC/ASX y P-BC/ASX, en comparación con sus respectivos controles sin incorporación del alga. Tal como se observa, la incorporación de *H. pluvialis* produjo una mejora significativa ($p < 0,05$) en la formulación liofilizada L-MC/ASX, reduciendo el nivel de oxidación en comparación con su control (LC-MC). No obstante, esta mejora no fue suficiente para mantener el IP dentro de los límites aceptables, ya que, a las dos semanas, el IP en L-MC/ASX alcanzó un valor de 240 meq O₂/kg de aceite, superando ampliamente el

valor sugerido por el Codex Alimentarius (2001) para aceites obtenidos por prensado en frío ($< 15 \text{ meq O}_2/\text{kg}$ de aceite). En comparación, el control sin *H. pluvialis* mostró un valor aún mayor ($329 \text{ meq O}_2/\text{kg}$ de aceite), lo que confirma el efecto protector del alga, aunque insuficiente para esta formulación bajo las condiciones de almacenamiento evaluadas.

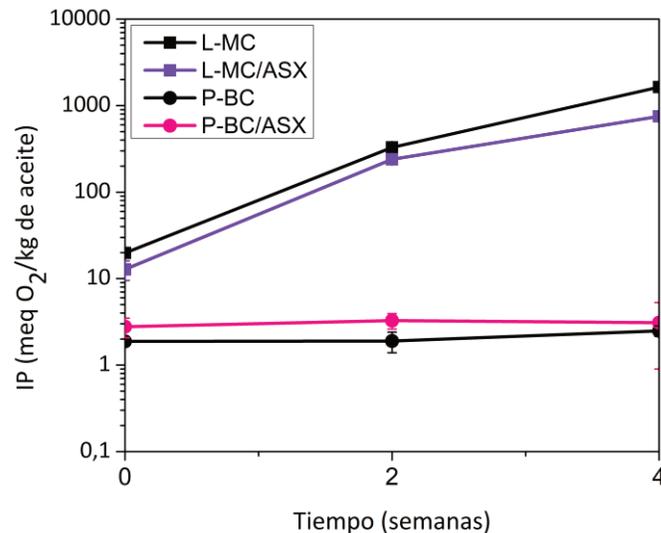


Figura 7.13. Índice de peróxidos de co-encapsulados (-■- L-MC/ASX y -●- P-BC/ASX) almacenados a 25°C y 70 % HR, en comparación con sus análogos sin agregado de alga (-■- L-MC, -●- P-BC)

Estos resultados podrían estar relacionados con la estructura altamente porosa observada en las micrografías SEM de estos encapsulados (Fig. 7.11. y 7.12.). Si bien en el Capítulo II se evidenció una marcada diferencia entre el aceite de chía almacenado durante 3 meses a 25°C sin ASX ($\text{IP} > 100 \text{ meq O}_2/\text{kg}$ de aceite) y con ASX ($\text{IP} < 10 \text{ meq O}_2/\text{kg}$ de aceite), al incorporarlo en la estructura de la esfera liofilizada, habría quedado más expuesto a la interacción con el oxígeno. La formación de la emulsión MC con lecitina, habría incrementado el área superficial del aceite en la esfera gelificada. Además, los canales de aire hacia el interior de la esfera ya

líoofilizada habrían facilitado la difusión del oxígeno. El agregado del alga no fue suficiente para evitar el deterioro oxidativo del aceite y, en este caso, la estructura de encapsulación ejerció el mayor impacto sobre la estabilidad (Linke et al., 2020).

Por otro lado, los sistemas L-MC/ASX habían mostrado valores de $a_w < 0,2$ (Tabla 7.5.A). La mayoría de las reacciones químicas y el crecimiento microbiano se ven reducidos considerablemente cuando se disminuye a_w . Sin embargo, la reacción de oxidación de los lípidos insaturados tiene un comportamiento particular con respecto a esta tendencia. En este caso, la velocidad de reacción aumenta a valores de a_w muy bajos (menores a 0,2) debido a la actividad catalítica de iones metálicos cuando se remueve el agua de la esfera de hidratación que rodea a estos iones (St. Angelo et al., 1996). Esto también podría haber contribuido al deterioro oxidativo de estos sistemas.

Por su parte, el sistema secado por aspersion formulado con *H. pluvialis* (P-BC/ASX) y su control sin alga (P-BC), mostraron valores de IP muy bajos (< 4 meq O_2 /Kg de aceite) tras un mes de almacenamiento a 25°C.

Es por eso que se eligió esta formulación de co-encapsulados para continuar un análisis de la estabilidad oxidativa más extendido.

La Figura 7.14. muestra la evolución de los indicadores de oxidación (IP y TBARS) en los co-encapsulados P-BC/ASX durante el almacenamiento, en condiciones controladas de 70 %HR a dos temperaturas: 25 °C (Figura 17.14.A) y 40 °C (Figura 17.14.B). En ambos casos se observa un patrón típico de oxidación lipídica, con un aumento progresivo de los productos primarios de oxidación (IP) y una acumulación más moderada de los productos secundarios de oxidación (TBARS) en el tiempo.

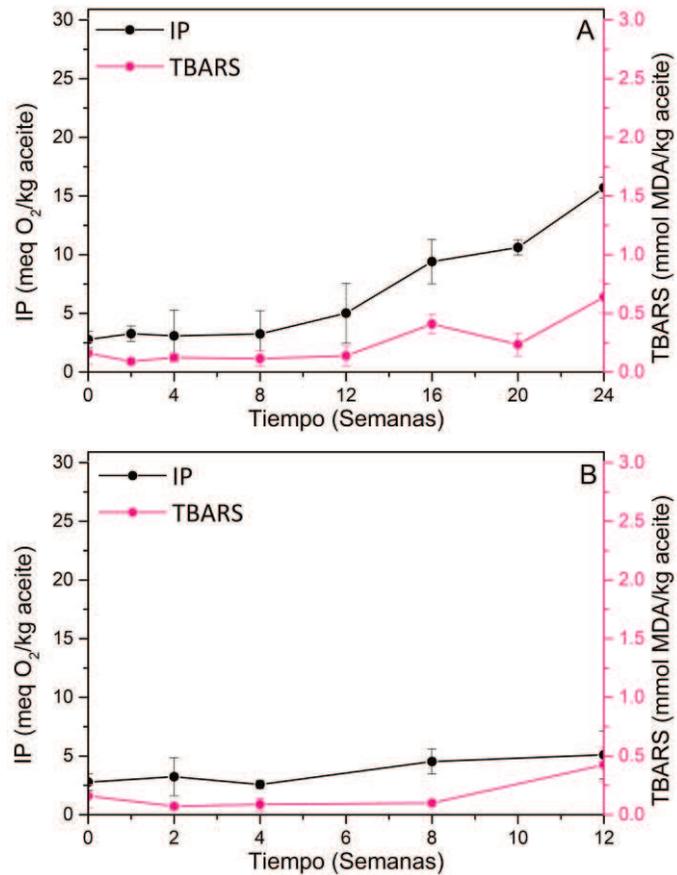


Figura 7.14. Estabilidad oxidativa de los co-encapsulados P-BC/ASX a 70 %HR y (A) 25°C y (B) 40°C.

Hasta la semana 12 (3 meses), no se registraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los IP de los sistemas almacenados a las diferentes temperaturas, que alcanzaron valores de 5 meq O₂/kg de aceite. Sin embargo, el análisis a 40 °C no pudo extenderse más allá de las 12 semanas, debido a la aparición del fenómeno de *caking* en las muestras en polvo, lo que imposibilitó la continuidad del ensayo (Fig. 7.15.).

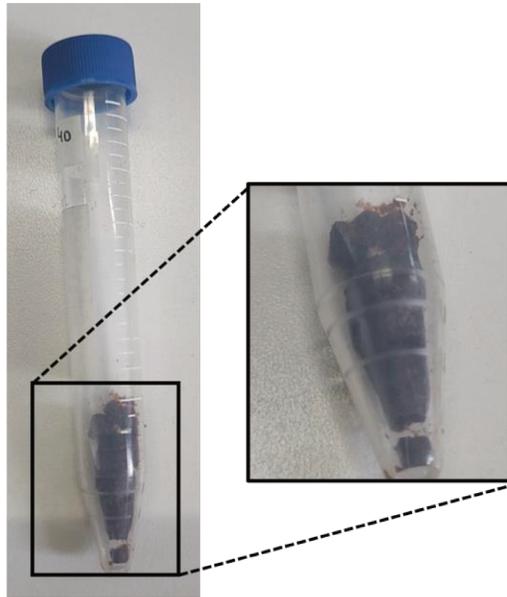


Figura 7.15. Imagen del caking desarrollado por P-BC/ASX luego de 3 meses de almacenamiento a 40 °C y 70 % de HR.

El fenómeno de caking ocurre cuando las partículas que fluyen libremente se agregan para formar grumos más grandes, generalmente en detrimento de la calidad del material. Este proceso de aglomeración está influenciado por el tiempo de almacenamiento, la presión ejercida sobre las partículas, así como por las condiciones de temperatura y humedad relativa en las que se conserva el polvo (Descamps et al., 2013). En este caso, la formación de *caking* imposibilitó la rehidratación de los polvos para luego realizar la extracción de aceite necesaria para hacer las determinaciones de los parámetros de oxidación (Figura 7.15.).

Este fenómeno de *caking* observado en las muestras P-BC/ASX podría explicarse por la proximidad entre la temperatura de almacenamiento y la temperatura de transición vítrea (T_g) del sistema. Según Saavedra-Leos et al. (2015), la T_g de la MDX DE 15, el componente mayoritario del co-encapsulado en polvo, se sitúa en torno a 45 ± 2 °C a una a_w cercana a 0,5,

que es la actividad de agua determinada en los co-encapsulados P-BC/ASX (Tabla 7.5.B). Dado que la humedad relativa del entorno promueve la adsorción de agua y reduce la T_g del material debido al efecto plastificante del agua, es razonable asumir que, durante el almacenamiento, la T_g efectiva de la matriz descendió por debajo de los 40 °C. Esta condición ($T > T_g$) generaría una transición del estado vítreo al amorfo, aumentando la movilidad molecular y favoreciendo la formación de puentes de sinterización entre partículas. Como resultado, se produce la pérdida de fluidez del polvo y el desarrollo progresivo de aglomerados o *caking*. Este fenómeno, ampliamente reportado para materiales amorfos higroscópicos (Fitzpatrick et al., 2017), representa una limitación funcional crítica de la matriz cuando se expone a este tipo de condiciones de almacenamiento.

Por otra parte, los co-encapsulados P-BC/ASX almacenados a 25 °C y 70 %HR se mantuvieron relativamente estables durante las primeras 12 semanas, observándose un incremento más marcado del IP a partir de la semana 16 (4 meses). En el quinto mes de almacenamiento (20 semanas), las muestras mostraron un IP de $10,62 \pm 0,64$ meq O_2 /kg de aceite, un valor dentro del límite establecido por el Código Alimentario Argentino (2018), que estableció un máximo de 10 meq O_2 /kg de aceite para el aceite de chía. Sin embargo, al cabo de 6 meses (24 semanas), el IP alcanzó los $15,70 \pm 0,90$ meq O_2 /kg aceite, superando la normativa nacional, pero manteniéndose dentro del umbral sugerido por el Codex Alimentarius (2001), que establece un valor límite de hasta 15 meq O_2 /kg de aceite para aceites obtenidos por prensado en frío.

Cabe aclarar que los valores de referencia citados, tanto del Código Alimentario Argentino (2018) como del Codex Alimentarius (2001), fueron establecidos específicamente para

aceites comestibles obtenidos por prensado en frío, y no para matrices complejas o subproductos derivados, como es el caso de los sistemas encapsulados en polvo evaluados en este estudio. Sin embargo, ante la ausencia de una normativa específica que regule los parámetros de calidad y estabilidad oxidativa en productos encapsulados o polvos enriquecidos en lípidos insaturados, estos valores son utilizados como referencia técnica para evaluar la aceptabilidad del estado oxidativo del aceite encapsulado durante el almacenamiento.

Si retomamos lo discutido en el Capítulo IV, donde se evaluó la estabilidad oxidativa de los distintos sistemas encapsulados (L-MC, P-BC y P-TC), se observó que la formulación BC sin agregado de *H. pluvialis* (P-BC) alcanzó un IP de aproximadamente 15meq O₂/kg de aceite tras 4 meses de almacenamiento a 25 °C. Comparando estos resultados con los obtenidos en este apartado, se puede comprobar que la incorporación del alga permitió extender la estabilidad oxidativa del sistema BC en aproximadamente 2 meses, retrasando el momento en que se alcanzan los valores límite sugeridos por el Codex.

En cuanto a las mediciones de compuestos secundarios de oxidación (TBARS), como se mencionó anteriormente, es una técnica que complementa la determinación de IP y resulta particularmente útil para identificar la fase de la curva de oxidación en la que se encuentra la muestra. Este aspecto cobra especial relevancia cuando los valores de IP comienzan a disminuir, ya que, según la propuesta de autooxidación hipotética de un lípido poliinsaturado a lo largo del tiempo (Sampels, 2013), podría conducir a interpretaciones erróneas si no se considera el comportamiento de los productos secundarios.

Aunque no existen valores de referencia para TBARS, podría tomarse como límite aceptable para este tipo de aceites, un valor de 1 mmol de MDA/ Kg aceite (Fioramonti et al., 2019; Spotti et al., 2024). En este sentido, en el presente estudio, los valores de TBARS se mantuvieron por debajo de este umbral en ambas condiciones de almacenamiento (Fig. 7.14.), lo que indica un buen control de la oxidación secundaria en los co-encapsulados P-BC/ASX.

Finalmente, se evaluó la degradación de ASX en los co-encapsulados durante el almacenamiento a 25°C y 70% HR que fue la condición en donde se lograron los mejores resultados de estabilidad oxidativa (Figura 7.16.). Tal como se muestra en la Figura 7.16., tras seis meses de almacenamiento en estas condiciones, se conservó aproximadamente el 80 % del contenido inicial de ASX, lo que indica una buena estabilidad del compuesto en los co-encapsulados.

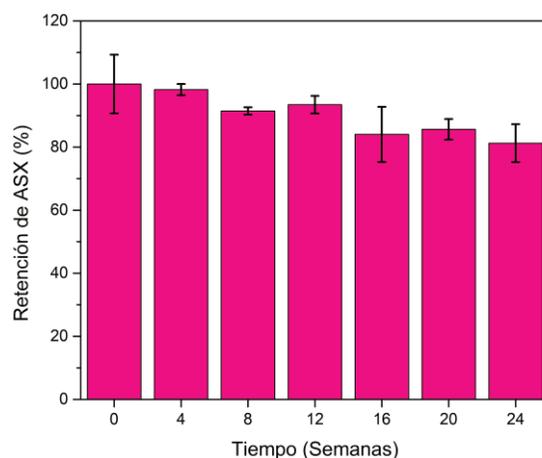


Figura 7.16. Retención de ASX en los co-encapsulados P-BC/ASX a 25 °C y 70 % HR.

En la bibliografía no se han encontrado estudios similares de co-encapsulación de aceite de chía y ASX mediante secado por aspersion. Espinaco et al. (2023) co-encapsularon aceite de chía y ASX, mediante la formulación de emulsiones con WPI y ALG, que luego fueron goteadas en una solución de CaCl_2 para obtener esferas gelificadas (humedad > 42 %). Aunque no deshidrataron las formulaciones, reportaron valores de IP superiores a 40 meq O_2/kg de aceite y una retención del 75 % de ASX luego de solo 30 días de almacenamiento a 25 °C. Estos autores trabajaron con una oleoresina de ASX que adicionaron directamente al aceite en menores concentraciones (400 ppm) que las utilizadas en esta tesis.

Por otro lado, Ixtaina et al. (2023) encapsularon aceite de chía y distintos antioxidantes (extracto de romero, extracto de camomila, palmitato de ascorbilo) utilizando caseinato de sodio y lactosa como materiales de pared y obteniendo polvos por secado por aspersion. Cuando evaluaron la estabilidad oxidativa de estos co-encapsulados a 25 °C (33 %HR), vieron que aquellos que contenían extractos de antioxidantes naturales (romero y camomila), alcanzaron valores de IP > 15 meq O_2/kg aceite a los 2 meses de almacenamiento. Solamente los co-encapsulados que contenían palmitato de ascorbilo (un antioxidante sintético) no superaron ese límite a los 2 meses de almacenamiento, logrando valores similares a los que obtuvimos en este estudio a ese tiempo (IP < 3 meq O_2/kg aceite) (Fig. 7.14.A).

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo son muy prometedores, ya que se logró desarrollar un ingrediente en polvo con buena estabilidad oxidativa a temperatura ambiente durante seis meses, así como una adecuada conservación de la ASX.

A partir de la formulación en polvo obtenida, con un contenido de aceite de chía cercano al 26%, se estimó la ingesta diaria necesaria de producto para alcanzar la dosis recomendada

de ASX, establecida en 2 mg/día según (Park et al., 2010), teniendo en cuenta la concentración de ASX a los 6 meses de almacenamiento a 25°C (80% de retención). En consecuencia, la cantidad de polvo necesaria para alcanzar los 2 mg diarios de sería 1,5 g de P-BC/ASX. De manera ilustrativa, esta masa es comparable al peso total de un comprimido farmacéutico convencional, como el de ibuprofeno 600 mg, cuyo peso total —incluidos los excipientes— suele oscilar entre 0,9 y 1,2 g. Esta analogía se utiliza con fines visuales, para facilitar la comprensión de la cantidad de polvo involucrada en una dosis potencialmente funcional. Si bien no se ha evaluado la factibilidad de su compactación en presentaciones sólidas (comprimidos o cápsulas), la cantidad requerida podría ser fácilmente administrada mediante cucharas medidoras calibradas (scoops), lo que permitiría su uso tanto como suplemento en polvo para adicionar a distintos tipos de alimentos, o como ingrediente funcional en productos de consumo controlado.

Si bien existen algunos estudios sobre la co-encapsulación de aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados y ASX, ninguno replica las formulaciones ni el enfoque metodológico del presente trabajo, en el que se desarrolló una formulación deshidratada basada en aceite de chía y *Haematococcus pluvialis*, utilizando un sistema BC con lecitina, CHT y MDX. A pesar de los desafíos inherentes a la alta susceptibilidad oxidativa del aceite de chía y al estrés térmico del secado por aspersión, la formulación P-BC/ASX presentó una vida útil notable, manteniéndose dentro de los límites aceptables de oxidación durante al menos 6 meses a 25 °C. Además, esta formulación logró conservar una alta proporción de ASX, lo que refuerza su eficacia funcional.

En conjunto, estos resultados posicionan a la formulación P-BC/ASX como una alternativa tecnológica prometedora, no solo por su capacidad de proteger compuestos bioactivos sensibles, sino también por su potencial aplicación como ingrediente funcional de alto valor agregado en alimentos o suplementos con propiedades antioxidantes sostenidas.

7.3. Conclusiones preliminares

La incorporación de *H. pluvialis* en las formulaciones MC gelificadas y liofilizadas (L-MC/ASX) y en las BC secadas por aspersión (P-BC/ASX), no afectó en gran medida las propiedades de las emulsiones, pero tuvo impacto en algunas propiedades de las formulaciones deshidratadas.

En las esferas liofilizadas promovió un aumento de la dureza de las formulaciones, y una disminución del a_w por debajo de 0,2. Si bien la incorporación del alga mejoró levemente la estabilidad oxidativa de los co-encapsulados L-MC/ASX, este efecto no fue suficiente para mantener los niveles de IP por debajo del límite sugerido (15 meq O_2 / kg de aceite), y luego de 2 semanas de almacenamiento a 25 °C, lo superó.

En cambio, en el sistema P-BC/ASX, logró extender la vida útil del aceite encapsulado hasta 6 meses a 25 °C, conservando además el 80 % del contenido de ASX inicial. El mismo sistema, almacenado a 40 °C, presentó una buena estabilidad oxidativa (IP = 5 meq O_2 /kg de aceite) hasta los 3 meses, pero a partir de este momento, se observó la desestabilización de los polvos por *caking* y no se pudieron continuar los ensayos de oxidación.

8. CONCLUSIONES GENERALES

8.1. Conclusiones generales

En este trabajo de investigación se lograron diseñar sistemas de co-encapsulación de aceite de chía y *H. pluvialis* (fuente de ASX), empleando la tecnología de emulsiones multicapa para obtener un ingrediente funcional en polvo.

En ensayos preliminares, se comprobó que la ASX es un antioxidante lipofílico natural altamente efectivo para proteger al aceite de chía del deterioro oxidativo, y que, incorporada mediante *H. pluvialis*, ejercía una capacidad antioxidante superior a la de otras fuentes comerciales que contienen β -caroteno y vitamina E.

Desde el punto de vista tecnológico, se formularon y caracterizaron emulsiones O/W MC, BC y TC de aceite de chía, utilizando distintas mezclas de biopolímeros como materiales de pared. Estas emulsiones fueron coloidalmente estables frente al cremado y la coalescencia, ya que ninguna presentó liberación de aceite, lo que evidenció las buenas propiedades de resistencia de sus membranas interfaciales.

Sin embargo, la selección del método de deshidratación resultó determinante para la estabilidad oxidativa del aceite encapsulado. Las esferas obtenidas por gelificación iónica de emulsiones MC, seguidas de liofilización (L-MC), aunque conservaron su forma y tamaño, presentaron una estructura altamente porosa que favoreció una rápida oxidación del aceite (IP muy elevados a 25 °C). Entre los encapsulados en polvo obtenidos por secado por aspersión de las emulsiones BC y TC, aquellos provenientes de emulsiones BC (P-BC) demostraron la mejor capacidad de protección.

Finalmente, la co-encapsulación de aceite de chía y *H. pluvialis* en el sistema BC secado por aspersión (P-BC/ASX) fue la estrategia más exitosa, logrando extender la vida útil del aceite

encapsulado hasta 6 meses a 25 °C, manteniendo el IP dentro de límites aceptables (<15 meq O₂/kg de aceite) y conservando aproximadamente el 80 % del contenido inicial de ASX.

Se estima que una cantidad de 1,5 g del ingrediente funcional en polvo sería suficiente para aportar una dosis diaria de 2 mg de ASX, que podría utilizarse como complemento nutracéutico para prevenir o modular procesos inflamatorios crónicos que contribuyen al desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles.

Los resultados obtenidos en esta tesis constituyen un importante aporte al conocimiento para el desarrollo de ingredientes funcionales estables y de fácil manipulación, con potencial aplicación en la creación de productos innovadores y saludables.

9. REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Abaee, A., Mohammadian, M., & Jafari, S. M. (2017). Whey and soy protein-based hydrogels and nano-hydrogels as bioactive delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 70, 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.011>
- Aberkane, L., Roudaut, G., & Saurel, R. (2014). Encapsulation and Oxidative Stability of PUFA-Rich Oil Microencapsulated by Spray Drying Using Pea Protein and Pectin. *Food and Bioprocess Technology*, 7(5), 1505–1517. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1202-9>
- Agles, A. A., & Bourg, I. C. (2024). Structure and Dynamics of Water in Polysaccharide (Alginate) Solutions and Gels Explained by the Core–Shell Model. *Biomacromolecules*, 25(10), 6403–6415. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.4c00447>
- Ahmed, F., Li, Y., Fanning, K., Netzel, M., & Schenk, P. M. (2015). Effect of drying, storage temperature and air exposure on astaxanthin stability from *Haematococcus pluvialis*. *Food Research International*, 74, 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.021>
- Akdaş, S., & Başlar, M. (2015). Dehydration and Degradation Kinetics of Bioactive Compounds for Mandarin Slices Under Vacuum and Oven Drying Conditions. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 1098–1107. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12324>
- Alcântara, M. A., Lima, A. E. A. de, Braga, A. L. M., Tonon, R. V., Galdeano, M. C., Mattos, M. da C., Brígida, A. I. S., Rosenhaim, R., Santos, N. A. dos, & Cordeiro, A. M. T. de M. (2019). Influence of the emulsion homogenization method on the stability of chia oil microencapsulated by spray drying. *Powder Technology*, 354, 877–885. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.06.026>
- Alu'datt, M. H., Alrosan, M., Gammoh, S., Tranchant, C. C., Alhamad, M. N., Rababah, T., Zghoul, R., Alzoubi, H., Ghatasheh, S., Ghozlan, K., & Tan, T.-C. (2022). Encapsulation-based technologies for bioactive compounds and their application in the food industry: A roadmap for food-derived functional and health-promoting ingredients. *Food Bioscience*, 50, 101971. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101971>
- Alves, A. I., Rodrigues, M. Z., Ribeiro Pinto, M. R. M., Lago Vanzela, E. S., Stringheta, P. C., Perrone, Í. T., & Ramos, A. M. (2017). Morphological characterization of pequi extract microencapsulated through spray drying. *International Journal of Food Properties*, 20, 1298–1305. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1343344>

- Ambati, R., Phang, S.-M., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. (2014). Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. *Marine Drugs*, 12(1), 128–152. <https://doi.org/10.3390/md12010128>
- AOAC. (2000). *Peroxide value of oils and fats 965.33.12. Official methods of analysis of AOAC international, 17th edn.*
- Arzeni, C. (2014). Modificación molecular y funcional de proteínas de clara de huevo mediante ultrasonidos de alta intensidad: aplicación de esta tecnología al diseño de nanovehículos para ácido fólico [Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.]. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5480_Arzeni
- Atta, E. M., Mohamed, N. H., & Abdelgawad, A. A. M. (2017). Antioxidants: an overview on the natural and synthetic types. *European Chemical Bulletin*, 6(8), 365. <https://doi.org/10.17628/ecb.2017.6.365-375>
- Avendaño -Romero, G. C., López -Malo, A., & Palou, E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 7*, 87–96.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2004). Composition of chia (*Salvia hispanica*) grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America. *Tropical Science*, 44(3), 131–135. <https://doi.org/10.1002/ts.154>
- Balachandar, J., Hameed Irshad Ahamed, S., Kumar Agrawal, A., Khanna, B., Khanna, D., & Jayachandran, M. (2023). Omega-3 and Its Anti-Inflammatory Properties – The Key to Fight Inflammation Effectively. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20231204.11>
- Barbosa, J., Borges, S., Amorim, M., Pereira, M. J., Oliveira, A., Pintado, M. E., & Teixeira, P. (2015). Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder. *Journal of Functional Foods*, 17, 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.001>
- Barsky, M., & Blesson, C. S. (2020). Oocytes, obesity, and omega-3 fatty acids. *Fertility and Sterility*, 113(1), 71–72. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.09.022>
- Bennacef, C., Desobry-Banon, S., Probst, L., & Desobry, S. (2021). Advances on alginate use for spherification to encapsulate biomolecules. *Food Hydrocolloids*, 118, 106782. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106782>

- Blandino, A., Macias, M., & Cantero, D. (1999). Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of Sodium Alginate and CaCl₂ Concentration on Gelation Kinetics. In *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING* (Vol. 88, Issue 6).
- Bodoira, R. M., Penci, M. C., Ribotta, P. D., & Martínez, M. L. (2017). Chia (*Salvia hispanica* L.) oil stability: Study of the effect of natural antioxidants. *LWT - Food Science and Technology*, *75*, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.031>
- Bordón, M. G., Barrera, G. N., González, A., Ribotta, P. D., & Martínez, M. L. (2023). Complex coacervation and freeze drying using whey protein concentrate, soy protein isolate and arabic gum to improve the oxidative stability of chia oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *103*(7), 3322–3333. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12489>
- Bordón, M. G., Bodoira, R. M., González, A., Piloni, R., Ribotta, P. D., & Martínez, M. L. (2022). Spray-Drying, Oil Blending, and the Addition of Antioxidants Enhance the Storage Stability at Room Temperature of Omega-3-Rich Microcapsules Based on Chia Oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *124*(4), 2100181. <https://doi.org/10.1002/ejlt.202100181>
- Bordón, M. G., Meriles, S. P., Ribotta, P. D., & Martínez, M. L. (2019). Enhancement of Composition and Oxidative Stability of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seed Oil by Blending with Specialty Oils. *Journal of Food Science*, *84*(5), 1035–1044. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14580>
- Both, E. M., Boom, R. M., & Schutyser, M. A. I. (2020). Particle morphology and powder properties during spray drying of maltodextrin and whey protein mixtures. *Powder Technology*, *363*, 519–524. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2020.01.001>
- Brewer, M. S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *10*(4), 221–247. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x>
- Brosolo, G., Da Porto, A., Marcante, S., Capilupi, F., Bertin, N., Vivarelli, C., Bulfone, L., Vacca, A., Catena, C., & Sechi, L. A. (2024). The role for ω -3 polyunsaturated and short chain fatty acids in hypertension: An updated view on the interaction with gut microbiota. *European Journal of Pharmacology*, *985*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.177107>
- Campelo, P. H., Sanches, E. A., Fernandes, R. V. de B., Botrel, D. A., & Borges, S. V. (2018). Stability of lime essential oil microparticles produced with protein-carbohydrate

- blends. *Food Research International*, 105, 936–944.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.034>
- Cao, L., Lu, W., Mata, A., Nishinari, K., & Fang, Y. (2020). Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. *Carbohydrate Polymers*, 242, 116389.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116389>
- Chan, K., Chen, S., & Chen, P. (2019). Astaxanthin attenuated thrombotic risk factors in type 2 diabetic patients. *Journal of Functional Foods*, 53, 22–27.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.012>
- Choi, H. D., Youn, Y. K., & Shin, W. G. (2011). Positive Effects of Astaxanthin on Lipid Profiles and Oxidative Stress in Overweight Subjects. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(4), 363–369. <https://doi.org/10.1007/s11130-011-0258-9>
- Chung, C., & McClements, D. J. (2015). Structure and texture development of food-emulsion products. In *Modifying Food Texture* (pp. 133–155). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-333-1.00007-3>
- Codex Alimentarius. (2001). *Norma del Codex para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales CODEX STAN 19-1981 (Rev. 2-1999)*.
- Código Alimentario Argentino. (2018). *Capítulo VII: Alimentos grasos y aceites comestibles. Artículo 523bis - (Resolución Conjunta RESFC-2018-1-APN-SRYGS#MSYDS N°1/2018)*.
- Copado, C. N., Julio, L. M., Diehl, B. W., Ixtaina, V. Y., & Tomás, M. C. (2022). *Characterization of Three-Layer Microcapsules of Chia Seed Oil Obtained for Electrostatic Deposition Technology*. 23. <https://doi.org/10.3390/blsf2022017023>
- Copado, C. N., Julio, L. M., Diehl, B. W. K., Ixtaina, V. Y., & Tomás, M. C. (2021). Multilayer microencapsulation of chia seed oil by spray-drying using electrostatic deposition technology. *LWT*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112206>
- Corrêa-Filho, L. C., Lourenço, M. M., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2019). Microencapsulation of β -Carotene by Spray Drying: Effect of Wall Material Concentration and Drying Inlet Temperature. *International Journal of Food Science*, 2019, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2019/8914852>
- da Costa, M. P. M., Delpech, M. C., de Mello Ferreira, I. L., de Macedo Cruz, M. T., Castanharo, J. A., & Cruz, M. D. (2017). Evaluation of single-point equations to determine intrinsic

viscosity of sodium alginate and chitosan with high deacetylation degree. *Polymer Testing*, 63, 427–433. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.09.003>

da Silva Júnior, M. E., Araújo, M. V. R. L., Martins, A. C. S., dos Santos Lima, M., da Silva, F. L. H., Converti, A., & Maciel, M. I. S. (2023). Microencapsulation by spray-drying and freeze-drying of extract of phenolic compounds obtained from ciriguela peel. *Scientific Reports*, 13(1), 15222. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40390-4>

Damiani, M. C., Popovich, C. A., Constenla, D., & Leonardi, P. I. (2010). Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, 101(11), 3801–3807. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.136>

Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2017). *Fennema's Food Chemistry* (5th ed.). CRC Press.

Descamps, N., Palzer, S., Roos, Y. H., & Fitzpatrick, J. J. (2013). Glass transition and flowability/caking behaviour of maltodextrin de 21. *Journal of Food Engineering*, 119(4), 809–813. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.045>

Dinicolantonio, J. J., O'keefe, J., & O'keefe, J. H. (2021). *The importance of Maintaining a Low omega-6/omega-3 Ratio for Reducing the Risk of autoimmune diseases, asthma, and allergies* (Vol. 118). <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8504498/>

Domian, E., Brynda-Kopytowska, A., & Oleksza, K. (2015). Rheological properties and physical stability of o/w emulsions stabilized by OSA starch with trehalose. *Food Hydrocolloids*, 44, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.08.020>

Donoso, A., González-Durán, J., Muñoz, A. A., González, P. A., & Agurto-Muñoz, C. (2021). "Therapeutic uses of natural astaxanthin: An evidence-based review focused on human clinical trials." *Pharmacological Research*, 166, 105479. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105479>

Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., & Nedović, V. (2015). Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Engineering Reviews*, 7(4), 452–490. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9106-7>

Echegaray, N., Pateiro, M., Nieto, G., Rosmini, M. R., Munekata, P. E. S., Sosa-Morales, M. E., & Lorenzo, J. M. (2022). Lipid oxidation of vegetable oils. In *Food Lipids* (pp. 127–152). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823371-9.00009-5>

- Eijkelboom, N. M., van Boven, A. P., Siemons, I., Wilms, P. F. C., Boom, R. M., Kohlus, R., & Schutyser, M. A. I. (2023). Particle structure development during spray drying from a single droplet to pilot-scale perspective. In *Journal of Food Engineering* (Vol. 337). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2022.111222>
- Endale, H. T., Tesfaye, W., & Mengstie, T. A. (2023). ROS induced lipid peroxidation and their role in ferroptosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1226044>
- Escalona-García, L. A., Pedroza-Islas, R., Natividad, R., Rodríguez-Huezo, M. E., Carrillo-Navas, H., & Pérez-Alonso, C. (2016). Oxidation kinetics and thermodynamic analysis of chia oil microencapsulated in a whey protein concentrate-polysaccharide matrix. *Journal of Food Engineering*, 175, 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.12.009>
- Espinaco, B. Y., Niizawa, I., Marino, F., Zorrilla, S. E., & Sihufe, G. A. (2021). Storage stability of chia (*Salvia hispanica* L.) oil incorporated with astaxanthin. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(2). <https://doi.org/10.1111/jfpp.15184>
- Espinaco, B. Y., Niizawa, I., Zorrilla, S. E., & Sihufe, G. A. (2023). Whey protein aggregates-alginate composite gel for astaxanthin-chia oil encapsulation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 125(8). <https://doi.org/10.1002/ejlt.202300010>
- Farhoosh, R. (2021). Critical kinetic parameters and rate constants representing lipid peroxidation as affected by temperature. *Food Chemistry*, 340, 128137. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128137>
- Farjami, T., & Madadlou, A. (2019). An overview on preparation of emulsion-filled gels and emulsion particulate gels. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.043>
- Fernández-Lázaro, D., Arribalzaga, S., Gutiérrez-Abejón, E., Azarbayjani, M. A., Mielgo-Ayuso, J., & Roche, E. (2024). Omega-3 Fatty Acid Supplementation on Post-Exercise Inflammation, Muscle Damage, Oxidative Response, and Sports Performance in Physically Healthy Adults—A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. In *Nutrients* (Vol. 16, Issue 13). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/nu16132044>
- Ferreira, M. R. A., Santiago, R. R., de Souza, T. P., Egito, E. S. T., Oliveira, E. E., & Soares, L. A. L. (2010). Development and Evaluation of Emulsions from *Carapa guianensis* (Andiroba)

Oil. *AAPS PharmSciTech*, 11(3), 1383–1390. <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9491-z>

Fioramonti, S. A., Arzeni, C., Pilosof, A. M. R., Rubiolo, A. C., & Santiago, L. G. (2015). Influence of freezing temperature and maltodextrin concentration on stability of linseed oil-in-water multilayer emulsions. *Journal of Food Engineering*, 156, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.01.013>

Fioramonti, S. A., Rubiolo, A. C., & Santiago, L. G. (2017). Characterisation of freeze-dried flaxseed oil microcapsules obtained by multilayer emulsions. *Powder Technology*, 319, 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.06.052>

Fioramonti, S. A., Stepanic, E. M., Tibaldo, A. M., Pavón, Y. L., & Santiago, L. G. (2019). Spray dried flaxseed oil powdered microcapsules obtained using milk whey proteins-alginate double layer emulsions. *Food Research International*, 119, 931–940. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.079>

Fitzpatrick, J. J., O'Connor, J., Cudmore, M., & Dos Santos, D. (2017). Caking behaviour of food powder binary mixes containing sticky and non-sticky powders. *Journal of Food Engineering*, 204, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.021>

Fortuna Clara, M. P., Veronezi, C. M., & Jorge, N. (2020). Evaluation of Quality of Chia (*Salvia hispanica*), Sesame (*Sesamum indicum*), and Quinoa (*Chenopodium quinoa*) Oils. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 63. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020190351>

Francisco, C. R. L., Paulo, B. B., De Oliveira Júnior, F. D., Pereira, A. P. A., Pastore, G. M., Prata, A. S., Alvim, I. D., & Hubinger, M. D. (2022). The porosity of carbohydrate-based spray-dried microparticles containing limonene stabilized by pea protein: Correlation between porosity and oxidative stability. *Current Research in Food Science*, 5, 878–885. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.05.003>

Galarza, J. I., Pillacela Zhunio, B., Arredondo-Vega, B. O., & Ríos Tomalá, S. (2023). Astaxantina: El antioxidante natural con múltiples beneficios para la salud. Una revisión. *REVISTA CIENTÍFICA ECOCIENCIA*, 10(4), 1–23. <https://doi.org/10.21855/ecociencia.104.782>

Gañan, N., Bordón, M. G., Ribotta, P. D., & González, A. (2020). Study of chia oil microencapsulation in soy protein microparticles using supercritical Co₂-assisted impregnation. *Journal of CO₂ Utilization*, 40, 101221. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2020.101221>

- Gencer, Ö., & Turan, G. (2025). Enhancing biomass and lipid productivities of *Haematococcus pluvialis* for industrial raw materials products. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 18(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13068-025-02604-x>
- Geranpour, M., Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2020). Recent advances in the spray drying encapsulation of essential fatty acids and functional oils. *Trends in Food Science & Technology*, 102, 71–90. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.028>
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. In *Food Research International* (Vol. 40, Issue 9, pp. 1107–1121). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>
- Gharsallaoui, A., Saurel, R., Chambin, O., & Voilley, A. (2012). Pea (*Pisum sativum*, L.) Protein Isolate Stabilized Emulsions: A Novel System for Microencapsulation of Lipophilic Ingredients by Spray Drying. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2211–2221. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0497-z>
- Giménez, P., Peralta, G. H., Batistela, M. E., George, G. A., Ale, E. C., Quintero, J. P., Hynes, E. R., & Bergamini, C. V. (2023). Impact of the use of skim milk powder and adjunct cultures on the composition, yield, proteolysis, texture and melting properties of Cremoso cheese. *International Dairy Journal*, 140, 105595. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105595>
- Griffiths, K., Aggarwal, B., Singh, R., Buttar, H., Wilson, D., & De Meester, F. (2016). Food Antioxidants and Their Anti-Inflammatory Properties: A Potential Role in Cardiovascular Diseases and Cancer Prevention. *Diseases*, 4(3), 28. <https://doi.org/10.3390/diseases4030028>
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. In *Archives of Toxicology* (Vol. 94, Issue 3, pp. 651–715). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Guzey, D., & McClements, D. J. (2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 128–130, 227–248. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.11.021>
- Hashimoto, H., Arai, K., Hayashi, S., Okamoto, H., Takahashi, J., Chikuda, M., & Obara, Y. (2013). Effects of astaxanthin on antioxidation in human aqueous humor. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 53(1), 1–7. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.13-6>

- Hou, L., & Wu, P. (2019). Exploring the hydrogen-bond structures in sodium alginate through two-dimensional correlation infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 205, 420–426. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.091>
- Institute of Medicine. (2005). *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids*. National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/10490>
- Ito, N., Seki, S., & Ueda, F. (2018). The Protective Role of Astaxanthin for UV-Induced Skin Deterioration in Healthy People—A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Nutrients*, 10(7), 817. <https://doi.org/10.3390/nu10070817>
- Ixtaina, V. Y., Hoffman, E., Copado, C. N., Diehl, B. W. K., & Tomás, M. C. (2023). Microencapsulation of Chia Seed Oil by Spray-Drying: Influence of the Antioxidant Addition. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 125(1), 2200134. <https://doi.org/10.1002/ejlt.202200134>
- Ixtaina, V. Y., Martínez, M. L., Spotorno, V., Mateo, C. M., Maestri, D. M., Diehl, B. W. K., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2011). Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(2), 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.08.006>
- Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012). Oxidative Stability of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seed Oil: Effect of Antioxidants and Storage Conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(6), 1077–1090. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1990-x>
- Jafari, S. M., Ghalegi Ghalenoei, M., & Dehnad, D. (2017). Influence of spray drying on water solubility index, apparent density, and anthocyanin content of pomegranate juice powder. *Powder Technology*, 311, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.01.070>
- Jiménez-Gómez, C. P., & Cecilia, J. A. (2020). Chitosan: A Natural Biopolymer with a Wide and Varied Range of Applications. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25173981>
- Jiménez-Martín, E., Gharsallaoui, A., Pérez-Palacios, T., Carrascal, J. R., & Rojas, T. A. (2015). Suitability of Using Monolayered and Multilayered Emulsions for Microencapsulation of ω -3 Fatty Acids by Spray Drying: Effect of Storage at Different Temperatures. *Food and Bioprocess Technology*, 8(1), 100–111. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1382-y>

- Julio, L. M., Copado, C. N., Diehl, B. W. K., Ixtaina, V. Y., & Tomás, M. C. (2018). Chia bilayer emulsions with modified sunflower lecithins and chitosan as delivery systems of omega-3 fatty acids. *LWT - Food Science and Technology*, *89*, 581–590. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.044>
- Kandasamy, S., & Naveen, R. (2022). A review on the encapsulation of bioactive components using spray-drying and freeze-drying techniques. In *Journal of Food Process Engineering* (Vol. 45, Issue 8). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14059>
- Kanwal, S., Rehman, M. H., Hussain, A., Nadeem, M., Abbas, F., Akram, M., Inayat, M., Sughra, F., & Ali, K. (2024). Development of chitosan based microencapsulated spray dried powder of tuna fish oil: oil load impact and oxidative stability. *Brazilian Journal of Biology*, *84*. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.254010>
- Katagiri, M., Satoh, A., Tsuji, S., & Shirasawa, T. (2012). Effects of astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* extract on cognitive function: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, *51*(2), 102–107. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.D-11-00017>
- Khutoryanskiy, V. V. (2014). *Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems*.
- Ki, S. B., Singh, D., Kim, S. C., Son, T. W., & Han, S. S. (2013). Effect of cross-linkers in fabrication of carrageenan–alginate matrices for tissue engineering application. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *60*(6), 589–595. <https://doi.org/10.1002/bab.1123>
- Klinkesorn, U., & McClements, D. J. (2009). Influence of chitosan on stability and lipase digestibility of lecithin-stabilized tuna oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, *114*(4), 1308–1315. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.012>
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2006). Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Research International*, *39*(4), 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.09.008>
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2005). Increasing the Oxidative Stability of Liquid and Dried Tuna Oil-in-Water Emulsions with Electrostatic Layer-by-Layer Deposition Technology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(11), 4561–4566. <https://doi.org/10.1021/jf0479158>

- Krishnamurthy, P., & Wadhvani, A. (2012). Antioxidant Enzymes and Human Health. In *Antioxidant Enzyme*. InTech. <https://doi.org/10.5772/48109>
- LA Bazyma and VA Kutovoy. (2005). Vacuum drying and hybrid technologies. *Stewart Postharvest Review*, 1(4), 1–4. <https://doi.org/10.2212/spr.2005.4.7>
- Laguerre, M., Tenon, M., Bily, A., & Birtić, S. (2020). Toward a Spatiotemporal Model of Oxidation in Lipid Dispersions: A Hypothesis-Driven Review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 122(3). <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900209>
- Li, D., Wei, Z., & Xue, C. (2021). Alginate-based delivery systems for food bioactive ingredients: An overview of recent advances and future trends. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(6), 5345–5369. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12840>
- Li, L., Chen, Y., Wang, Y., Shi, F., Nie, Y., Liu, T., & Song, K. (2019). Effects of concentration variation on the physical properties of alginate-based substrates and cell behavior in culture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 184–195. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.123>
- Li, X., Wang, X., Duan, C., Yi, S., Gao, Z., Xiao, C., Agathos, S. N., Wang, G., & Li, J. (2020). Biotechnological production of astaxanthin from the microalga *Haematococcus pluvialis*. In *Biotechnology Advances* (Vol. 43). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107602>
- Linke, A., Weiss, J., & Kohlus, R. (2020). Oxidation rate of the non-encapsulated- and encapsulated oil and their contribution to the overall oxidation of microencapsulated fish oil particles. *Food Research International*, 127, 108705. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108705>
- Liu, X. J., Wu, Y. H., Zhao, L. C., Xiao, S. Y., Zhou, A. M., & Liu, X. (2011). Determination of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* by first-order derivative spectrophotometry. *Journal of AOAC International*, 94(6), 1752–1757. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.10-177>
- Loyeau, P. A., Spotti, M. J., Vinderola, G., & Carrara, C. R. (2021). Encapsulation of potential probiotic and canola oil through emulsification and ionotropic gelation, using protein/polysaccharides Maillard conjugates as emulsifiers. *LWT*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111980>

- Lu, C. C., & Yen, G. C. (2015). Antioxidative and anti-inflammatory activity of functional foods. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 2, pp. 1–8). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.11.002>
- Ma, B., Lu, J., Kang, T., Zhu, M., Xiong, K., & Wang, J. (2022a). Astaxanthin supplementation mildly reduced oxidative stress and inflammation biomarkers: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. In *Nutrition Research* (Vol. 99, pp. 40–50). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2021.09.005>
- Ma, B., Lu, J., Kang, T., Zhu, M., Xiong, K., & Wang, J. (2022b). Astaxanthin supplementation mildly reduced oxidative stress and inflammation biomarkers: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. In *Nutrition Research* (Vol. 99, pp. 40–50). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2021.09.005>
- Mansouri, R. A. (2020). Oxidative Stabilization of Olive Oil by Punicalagin During Storage. *J Biochem Tech*, 12(2), 10–16.
- Marineli, R. da S., Moraes, É. A., Lenquiste, S. A., Godoy, A. T., Eberlin, M. N., & Maróstica Jr, M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 1304–1310. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.014>
- Mariod, A. A., Saeed Mirghani, M. E., & Hussein, I. (2017). *Vangueria madagascariensis* (Rubiaceae) as New Oil Source. In *Unconventional Oilseeds and Oil Sources* (pp. 167–180). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809435-8.00028-7>
- Marques, G. R., Fernandes, R. V. de B., Lago, A. M. T., Borges, S. V., Bertolucci, S. K. V., Lima, A. de J. B., & Botrel, D. A. (2021). Spray-dried thyme essential oil microparticles using different polymeric matrices. *Drying Technology*, 39(12), 1883–1894. <https://doi.org/10.1080/07373937.2021.1871917>
- Martău, G. A., Mihai, M., & Vodnar, D. C. (2019). The Use of Chitosan, Alginate, and Pectin in the Biomedical and Food Sector—Biocompatibility, Bioadhesiveness, and Biodegradability. *Polymers*, 11(11), 1837. <https://doi.org/10.3390/polym11111837>
- Martínez, M. L., Curti, M. I., Rocchia, P., Llabot, J. M., Penci, M. C., Bodoira, R. M., & Ribotta, P. D. (2015). Oxidative stability of walnut (*Juglans regia* L.) and chia (*Salvia hispanica* L.) oils microencapsulated by spray drying. *Powder Technology*, 270(Part A), 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.10.031>

- Martínez-Delgado, A. A., Khandual, S., & Villanueva-Rodríguez, S. J. (2017a). Chemical stability of astaxanthin integrated into a food matrix: Effects of food processing and methods for preservation. In *Food Chemistry* (Vol. 225, pp. 23–30). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.092>
- Martínez-Delgado, A. A., Khandual, S., & Villanueva-Rodríguez, S. J. (2017b). Chemical stability of astaxanthin integrated into a food matrix: Effects of food processing and methods for preservation. In *Food Chemistry* (Vol. 225, pp. 23–30). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.092>
- McCall, B., McPartland, C. K., Moore, R., Frank-Kamenetskii, A., & Booth, B. W. (2018). Effects of astaxanthin on the proliferation and migration of breast cancer cells in vitro. *Antioxidants*, 7(10). <https://doi.org/10.3390/antiox7100135>
- McClements, D. J. (2004a). *Food Emulsions*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420039436>
- McClements, D. J. (2004b). *Food Emulsions*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420039436>
- McClements, D. J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 24(6), 621–625. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.07.003>
- McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components. *Journal of Food Science*, 72(8), R109–R124. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x>
- Meng, F., Doi, M., & Ouyang, Z. (2014). Cavitation in Drying Droplets of Soft Matter Solutions. *Physical Review Letters*, 113(9), 098301. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.113.098301>
- Miao, F., Geng, Y., Lu, D., Zuo, J., & Li, Y. (2013). Stability and changes in astaxanthin ester composition from *Haematococcus pluvialis* during storage. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 31(6), 1181–1189. <https://doi.org/10.1007/s00343-013-2105-3>
- Miranda-Linares, V., Quintanar-Guerrero, D., Del Real, A., & Zambrano-Zaragoza, M. L. (2020). Spray-drying method for the encapsulation of a functionalized ingredient in alginate-pectin nano- and microparticles loaded with distinct natural actives: Stability

and antioxidant effect. *Food Hydrocolloids*, 101.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105560>

Mohamed Basuny, A., Mohammed, M., & Basuny, M. (2020). Chia (*Salvia Hispanica L.*) Seed oil a new source of omega-3 (Vol. 20).
<https://www.researchgate.net/publication/339722236>

Moran-Valero, M. I., Ruiz-Henestrosa, V. M. P., & Pilosof, A. M. R. (2017). Synergistic performance of lecithin and glycerol monostearate in oil/water emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 151, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.12.015>

Mota, G. C. P., Moraes, L. B. S. de, Oliveira, C. Y. B., Oliveira, D. W. S., Abreu, J. L. de, Dantas, D. M. M., & Gálvez, A. O. (2022a). Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*: processes, applications, and market. In *Preparative Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 52, Issue 5, pp. 598–609). Taylor and Francis Ltd.
<https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1966802>

Mota, G. C. P., Moraes, L. B. S. de, Oliveira, C. Y. B., Oliveira, D. W. S., Abreu, J. L. de, Dantas, D. M. M., & Gálvez, A. O. (2022b). Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*: processes, applications, and market. In *Preparative Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 52, Issue 5, pp. 598–609). Taylor and Francis Ltd.
<https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1966802>

Mularczyk, M., Michalak, I., & Marycz, K. (2020). Astaxanthin and other nutrients from *haematococcus pluvialis*—Multifunctional applications. In *Marine Drugs* (Vol. 18, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md18090459>

Mundo, J. L. M., Zhou, H., Tan, Y., Liu, J., & McClements, D. J. (2021). Enhancing emulsion functionality using multilayer technology: Coating lipid droplets with saponin-polypeptide-polysaccharide layers by electrostatic deposition. *Food Research International*, 140. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109864>

Nakagawa, K., Kiko, T., Miyazawa, T., Carpennero Burdeos, G., Kimura, F., Satoh, A., & Miyazawa, T. (2011). Antioxidant effect of astaxanthin on phospholipid peroxidation in human erythrocytes. *British Journal of Nutrition*, 105(11), 1563–1571.
<https://doi.org/10.1017/S0007114510005398>

NAKAO, R., NELSON, O. L., PARK, J. S., MATHISON, B. D., THOMPSON, P. A. M. A., & CHEW, B. P. (2010). Effect of Dietary Astaxanthin at Different Stages of Mammary Tumor Initiation in BALB/c Mice. *Anticancer Research*, 30(6), 2171.
<http://ar.iiarjournals.org/content/30/6/2171.abstract>

- Nassar, M., Jaffery, A., Ibrahim, B., Baraka, B., & Abosheaishaa, H. (2023). The multidimensional benefits of eicosapentaenoic acid: from heart health to inflammatory control. *The Egyptian Journal of Internal Medicine*, 35(1). <https://doi.org/10.1186/s43162-023-00265-6>
- Ogawa, S., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2004). Production and characterization of O/W emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan-pectin multilayered membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3595–3600. <https://doi.org/10.1021/jf034436k>
- Organización Mundial de la Salud. (2020). *Noncommunicable diseases progress monitor 2020*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240000490>
- Östbring, K., Matos, M., Marefati, A., Ahlström, C., & Gutiérrez, G. (2021). The Effect of pH and Storage Temperature on the Stability of Emulsions Stabilized by Rapeseed Proteins. *Foods*, 10(7), 1657. <https://doi.org/10.3390/foods10071657>
- Park, J. S., Chyun, J. H., Kim, Y. K., Line, L. L., & Chew, B. P. (2010). Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutrition and Metabolism*, 7. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-18>
- Patel, A., Desai, S. S., Mane, V. K., Enman, J., Rova, U., Christakopoulos, P., & Matsakas, L. (2022). Futuristic food fortification with a balanced ratio of dietary ω -3/ ω -6 omega fatty acids for the prevention of lifestyle diseases. *Trends in Food Science & Technology*, 120, 140–153. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.006>
- Petyaev, I. M., Klochkov, V. A., Chalyk, N. E., Pristensky, D. V., Chernyshova, M. P., Kyle, N. H., & Bashmakov, Y. K. (2018). Markers of Hypoxia and Oxidative Stress in Aging Volunteers Ingesting Lysosomal Formulation of Dark Chocolate Containing Astaxanthin. *The Journal of Nutrition, Health and Aging*, 22(9), 1092–1098. <https://doi.org/10.1007/s12603-018-1063-z>
- Premjit, Y., Pandey, S., & Mitra, J. (2024). Encapsulation of probiotics in freeze-dried calcium alginate and κ -carrageenan beads using definitive screening design: A comprehensive characterisation and in vitro digestion study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 258, 129279. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129279>
- Pu, J., Bankston, J. D., & Sathivel, S. (2011). Developing microencapsulated flaxseed oil containing shrimp (*Litopenaeus setiferus*) astaxanthin using a pilot scale spray dryer. *Biosystems Engineering*, 108(2), 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2010.11.005>

- Pudziuelyte, L., Marksa, M., Sosnowska, K., Winnicka, K., Morkuniene, R., & Bernatoniene, J. (2020). Freeze-drying technique for microencapsulation of elsholtzia ciliata Ethanolic extract using different coating materials. *Molecules*, 25(9). <https://doi.org/10.3390/molecules25092237>
- Radford, S. J., & Dickinson, E. (2004). Depletion flocculation of caseinate-stabilised emulsions: what is the optimum size of the non-adsorbed protein nano-particles? *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 238(1–3), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.02.020>
- Radosavljević, M., Lević, S., Belović, M., Pejin, J., Djukić-Vuković, A., Mojović, L., & Nedović, V. (2020). Immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* in polyvinyl alcohol/calcium alginate matrix for production of lactic acid. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(2), 315–322. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02228-0>
- Rahim, M. A., Imran, M., Khan, M. K., Ahmad, M. H., & Ahmad, R. S. (2022). Impact of spray drying operating conditions on encapsulation efficiency, oxidative quality, and sensorial evaluation of chia and fish oil blends. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(2). <https://doi.org/10.1111/jfpp.16248>
- Ramakrishnan, S., Ferrando, M., Aceña-Muñoz, L., Mestres, M., De Lamo-Castellví, S., & Güell, C. (2013). Influence of Emulsification Technique and Wall Composition on Physicochemical Properties and Oxidative Stability of Fish Oil Microcapsules Produced by Spray Drying. *Food and Bioprocess Technology*. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1187-4>
- Ramanery, F. P., Mansur, A. A., & Mansur, H. S. (2013). One-step colloidal synthesis of biocompatible water-soluble ZnS quantum dot/chitosan nanoconjugates. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 512. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-512>
- Rao, A. R., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2007). Stabilization of astaxanthin in edible oils and its use as an antioxidant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(6), 957–965. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2766>
- Rayees, R., Gani, A., Noor, N., Ayoub, A., & Ashraf, Z. U. (2024). General approaches to biopolymer-based Pickering emulsions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 267, 131430. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131430>
- Rietjens, I. M. C. M., Boersma, M. G., Haan, L. de, Spenkelink, B., Awad, H. M., Cnubben, N. H. P., van Zanden, J. J., Woude, H. van der, Alink, G. M., & Koeman, J. H. (2002). The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and

flavonoids. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11(3–4), 321–333.
[https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00003-0)

Saavedra-Leos, Z., Leyva-Porras, C., Araujo-Díaz, S. B., Toxqui-Terán, A., & Borrás-Enríquez, A. J. (2015). Technological application of maltodextrins according to the degree of polymerization. *Molecules*, 20(12), 21067–21081.
<https://doi.org/10.3390/molecules201219746>

Sagñay Llinin, G. S., & Ocaña Noriega, J. R. (2024). Análisis de la Alimentación de los Adultos Mayores y su Influencia en las Enfermedades Crónico no Transmisibles. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 8(5), 143–156.
https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i5.13285

Sain, J., Scanarotti, I. G., Gerstner, C. D., Fariña, A. C., Lavandera, J. V., & Bernal, C. A. (2023). Enriched functional milk fat ameliorates glucose intolerance and triacylglycerol accumulation in skeletal muscle of rats fed high-fat diets. *European Journal of Nutrition*, 62(3), 1535–1550. <https://doi.org/10.1007/s00394-023-03098-9>

Saini, R. K., & Keum, Y.-S. (2018). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. *Life Sciences*, 203, 255–267.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.049>

Sampels, S. (2013). Oxidation and Antioxidants in Fish and Meat from Farm to Fork. In *Food Industry*. InTech. <https://doi.org/10.5772/53169>

Santiago, L. G., Carrara, C., & González, R. J. (2005). Interaction of Soy Protein Isolate and Meat Protein in a Model Emulsion System. Effect of Emulsification Order and Characteristics of Soy Isolate Used. *Food Science and Technology International*, 11(2), 79–88. <https://doi.org/10.1177/1082013205052515>

Sekikawa, T., Kizawa, Y., Li, Y., & Miura, N. (2023). Effects of diet containing astaxanthin on visual function in healthy individuals: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel study. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 72(1), 22–65.
<https://doi.org/10.3164/jcbrn.22-65>

Sepeidnameh, M., Fazlara, A., Hosseini, S. M. H., & Pourmahdi Borujeni, M. (2024). Encapsulation of grape seed oil in oil-in-water emulsion using multilayer technology: Investigation of physical stability, physicochemical and oxidative properties of emulsions under the influence of the number of layers. *Current Research in Food Science*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100771>

- Seyedsadjadi, N., & Grant, R. (2020). *antioxidants The Potential Benefit of Monitoring Oxidative Stress and Inflammation in the Prevention of Non-Communicable Diseases (NCDs) The Potential Benefit of Monitoring Oxidative Stress and Inflammation in.* <https://doi.org/10.3390/antiox>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2010). Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*, 39(11), 4067. <https://doi.org/10.1039/b922183m>
- Shi, F., Chang, Y., Shen, J., Chen, G., & Xue, C. (2023). A comparative investigation of anionic polysaccharides (sulfated fucan, ι-carrageenan, κ-carrageenan, and alginate) on the fabrication, stability, rheology, and digestion of multilayer emulsion. *Food Hydrocolloids*, 134. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108081>
- Silveira Coelho, M., & de las Mercedes Salas-Mellado, M. (2014). Chemical Characterization of CHIA (*Salvia hispanica L.*) for Use in Food Products. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(5), 263–269. <https://doi.org/10.12691/jfnr-2-5-9>
- Simopoulos, A. P. (2016). An increase in the Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. In *Nutrients* (Vol. 8, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu8030128>
- Singh, K. N., Patil, S., & Barkate, H. (2020). Protective effects of astaxanthin on skin: Recent scientific evidence, possible mechanisms, and potential indications. In *Journal of Cosmetic Dermatology* (Vol. 19, Issue 1, pp. 22–27). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jocd.13019>
- Sponton, O. E., Perez, A. A., & Santiago, L. G. (2017). Protein-polysaccharide associative phase separation applied to obtain a linoleic acid dried ingredient. *Food Hydrocolloids*, 71, 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.020>
- Spotti, M. L., Acosta, C. A., Carrara, C. R., & Fioramonti, S. A. (2024). Influence of storage temperature and natural antioxidants addition on chia oil nutraceutical blends shelf life. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 126(4). <https://doi.org/10.1002/ejlt.202300179>
- St. Angelo, A. J., Vercellotti, J., Jacks, T., & Legendre, M. (1996). Lipid oxidation in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(3), 175–224. <https://doi.org/10.1080/10408399609527723>

- Syll, O., Khalloufi, S., & Schuck, P. (2013). Dispersibility and morphology of spray-dried soy powders depending on the spraying system. *Dairy Science & Technology*, 93(4–5), 431–442. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0112-y>
- Thy, L. T. M., Duy, H. K., & Dat, N. M. (2025). Applications of lecithin in emulsion stabilization and advanced delivery systems in cosmetics: A mini-review. *Results in Surfaces and Interfaces*, 19, 100543. <https://doi.org/10.1016/j.rsufi.2025.100543>
- Tolve, R., Condelli, N., Can, A., & Tchuenbou-Magaia, F. L. (2018). Development and Characterization of Phytosterol-Enriched Oil Microcapsules for Foodstuff Application. *Food and Bioprocess Technology*, 11(1), 152–163. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1990-4>
- Tominaga, K., Hongo, N., Fujishita, M., Takahashi, Y., & Adachi, Y. (2017). Protective effects of astaxanthin on skin deterioration. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 61(1), 33–39. <https://doi.org/10.3164/jcbn.17-35>
- Torres, J. D., Acevedo Correa, D., David Torres González, J., & José González Morelos, K. (2015). *Análisis del perfil de textura en frutas, productos cárnicos y quesos*. <http://revistareciteia.es.tl/>
- Tortosa-Caparrós, E., Navas-Carrillo, D., Marín, F., & Orenes-Piñero, E. (2017). Anti-inflammatory effects of omega 3 and omega 6 polyunsaturated fatty acids in cardiovascular disease and metabolic syndrome. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16), 3421–3429. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1126549>
- Vélez, M. A., Zeiter, A., Capra, M. L., Pozza, L., Hynes, E. R., & Perotti, M. C. (2021). Developing yoghurts containing CLA isomers-loaded liposomes and free CLA oil. *International Dairy Journal*, 116, 104956. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104956>
- Vera-Candioti, L., Leiva, P. M. L., Valli, F., Bernal, C. A., Piña, C. I., Simoncini, M. S., & González, M. A. (2021). Optimization of oil extraction from caiman fat. Characterization for use as food supplement. *Food Chemistry*, 357, 129755. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129755>
- Vieira, M. V., Derner, R. B., & Lemos-Senna, E. (2021). Preparation and characterization of *Haematococcus pluvialis* carotenoid-loaded PLGA nanocapsules in a gel system with antioxidant properties for topical application. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61, 102099. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102099>

- Wang, M., Yan, W., Zhou, Y., Fan, L., Liu, Y., & Li, J. (2021). Progress in the application of lecithins in water-in-oil emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, *118*, 388–398. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.10.019>
- Wang, Y., Li, D., Wang, L.-J., & Adhikari, B. (2011). The effect of addition of flaxseed gum on the emulsion properties of soybean protein isolate (SPI). *Journal of Food Engineering*, *104*(1), 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.11.027>
- Wani, S. U. D., Ali, M., Mehdi, S., Masoodi, M. H., Zargar, M. I., & Shakeel, F. (2023). A review on chitosan and alginate-based microcapsules: Mechanism and applications in drug delivery systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, *248*, 125875. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125875>
- Weinbreck, F. (2004). *Whey protein/gum arabic coacervates: structure and dynamics*. Utrecht University.
- Yoon, H.-S., Cho, H. H., Cho, S., Lee, S.-R., Shin, M.-H., & Chung, J. H. (2014). Supplementing with Dietary Astaxanthin Combined with Collagen Hydrolysate Improves Facial Elasticity and Decreases Matrix Metalloproteinase-1 and -12 Expression: A Comparative Study with Placebo. *Journal of Medicinal Food*, *17*(7), 810–816. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.3060>
- Yoshida, H., Yanai, H., Ito, K., Tomono, Y., Koikeda, T., Tsukahara, H., & Tada, N. (2010). Administration of natural astaxanthin increases serum HDL-cholesterol and adiponectin in subjects with mild hyperlipidemia. *Atherosclerosis*, *209*(2), 520–523. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.10.012>
- Zabot, G. L., Schaefer Rodrigues, F., Polano Ody, L., Vinícius Tres, M., Herrera, E., Palacin, H., Córdova-Ramos, J. S., Best, I., & Olivera-Montenegro, L. (2022). Encapsulation of Bioactive Compounds for Food and Agricultural Applications. *Polymers*, *14*(19), 4194. <https://doi.org/10.3390/polym14194194>
- Zare, T., Fournier-Level, A., Ebert, B., & Roessner, U. (2024). Chia (*Salvia hispanica* L.), a functional ‘superfood’: new insights into its botanical, genetic and nutraceutical characteristics. *Annals of Botany*. <https://doi.org/10.1093/aob/mcae123>
- Zhang, F., Cai, X., Ding, L., & Wang, S. (2021). Effect of pH, ionic strength, chitosan deacetylation on the stability and rheological properties of O/W emulsions formulated with chitosan/casein complexes. *Food Hydrocolloids*, *111*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106211>

- Zhang, G., Cheng, P., Wang, Z., Han, J., & Fan, Z. (2024). *Haematococcus pluvialis* meets gellan gum: Rheological and thermal exploration of a new resource food and biomedical gel matrix. *Journal of Food Science*, *89*(11), 7831–7845. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.17433>
- Zhang, L., Wang, S., Yang, R., Mao, J., Jiang, J., Wang, X., Zhang, W., Zhang, Q., & Li, P. (2019). Simultaneous determination of tocopherols, carotenoids and phytosterols in edible vegetable oil by ultrasound-assisted saponification, LLE and LC-MS/MS. *Food Chemistry*, *289*, 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.067>
- Zhang, X., Li, Y., Li, J., Liang, H., Chen, Y., Li, B., Luo, X., Pei, Y., & Liu, S. (2022). Edible oil powders based on spray-dried Pickering emulsion stabilized by soy protein/cellulose nanofibrils. *LWT*, *154*, 112605. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112605>
- Zhang, Z., Zhang, R., Chen, L., Tong, Q., & McClements, D. J. (2015). Designing hydrogel particles for controlled or targeted release of lipophilic bioactive agents in the gastrointestinal tract. *European Polymer Journal*, *72*, 698–716. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.01.013>
- Zhao, T., Yan, X., Sun, L., Yang, T., Hu, X., He, Z., Liu, F., & Liu, X. (2019). Research progress on extraction, biological activities and delivery systems of natural astaxanthin. *Trends in Food Science & Technology*, *91*, 354–361. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.014>
- Zhou, H., Song, X., Feng, Y., Li, B., Li, T., Xi, P., Yang, W., & Chen, F. (2024). Evaluating structural properties and stable sustained release mechanism of ω -3 fatty acid enriched microcapsules prepared with multi-component composite wall materials. *LWT*, *210*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116896>