

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del Grado Académico de  
Doctora en Ciencias Biológicas

**INCORPORACIÓN DE BIOACTIVOS LIPOFÍLICOS A  
MATRICES ALIMENTARIAS USANDO MICROGELES EN  
EMULSIÓN COMO TECNOLOGÍA DE VEHICULIZACIÓN**

Lic. Brenda Yanina Espinaco

Director de Tesis: Dr. Guillermo A. Sihufe  
Co-directora de Tesis: Dra. Susana E. Zorrilla

Lugar de realización: Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria  
Química (INTEC, UNL-CONICET)

2024

## **Agradecimientos**

A la educación pública, por brindarme la oportunidad de seguir estudiando y formándome en lo que me apasiona.

A la Universidad Nacional del Litoral, al Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC), y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por hacer posible el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

A mis Directores Guillermo y Susana, por brindarme todo su conocimiento y sobre todo por acompañarme y apoyarme durante todos estos años. Fue un privilegio poder recorrer todo este camino con ustedes como directores.

A Ignacio, por las ganas de enseñar siempre y la paciencia infinita. Tu acompañamiento desde que comencé a recorrer este camino fue fundamental para que haya podido llegar hasta acá.

A mis compañeras (y amigas) del laboratorio y oficina. Gracias por todos los momentos lindos, por las charlas y las risas compartidas estos años, y también por haber estado ahí en los momentos en los que las cosas se ponían más difíciles.

A Daniel, por las charlas compartidas que me motivaban y me ayudaban a confiar más en mí.

A todos los integrantes del grupo de Ingeniería en Alimentos y Biotecnología del INTEC, por su ayuda y buena predisposición para todo lo que necesité.

A mis amigas de la vida, por su tiempo y sus ganas para escuchar mis presentaciones y por festejar conmigo cada logro. Es muy valioso tener amigas como ustedes.

A mi familia, por su amor y acompañamiento en todo lo que hago.

*A los que buscan  
aunque no encuentren*

*a los que avanzan  
aunque se pierdan*

*a los que viven  
aunque se mueran*

**Mario Benedetti**

## **Aportes científicos-tecnológicos**

### *Publicaciones en revistas internacionales con referato:*

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), e15184. <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), 2300010. <https://doi.org/10.1002/ejlt.202300010>

Espinaco, B. Y., Niizawa, I., Zorrilla, S. E., & Sihufe, G. A. (2023). Behavior of whey protein aggregates-alginate beads filled with astaxanthin and chia oil during *in vitro* digestion. *Journal of Food Process Engineering*, 47(1), e14532. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14532>

### *Capítulo de libro:*

Niizawa, I., Espinaco, B. Y., Zorrilla, S. E., & Sihufe, G. A. (2021). Astaxanthin production by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis*: A success story. In G. A. Ravishankar, & A. Ranga-Rao (Eds.), *Global Perspectives on Astaxanthin* (1<sup>st</sup> ed., pp. 71-89). Academic Press.

## ÍNDICE

---

<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>19</b>
ALIMENTOS FUNCIONALES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	19
ASTAXANTINA.....	20
ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3.....	22
ESTABILIDAD DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	24
DIGESTIBILIDAD DE COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	26
ENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	26
SISTEMAS DE ENCAPSULACIÓN BASADOS EN EMULSIONES.....	28
HIDROGELES PARA LA ENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	29
ALGINATO.....	30
CONCENTRADOS DE PROTEÍNAS DE LACTOSUERO.....	31
LIBERACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DESDE SISTEMAS DE ENCAPSULACIÓN.....	32
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO 1 - ESTABILIDAD DE MEZCLAS DE ACEITES RICOS EN OMEGA-3 Y ASTAXANTINA.....</b>	<b>39</b>
<b>1.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>1.2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO.....</b>	<b>41</b>
<b>1.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
1.3.1. Materiales.....	41
1.3.2. Formulación de oleoresina.....	42
1.3.3. Evaluación de la estabilidad de aceites sin encapsular.....	42
1.3.4. Determinación de la actividad antioxidante.....	43

1.3.5. Almacenamiento de los aceites .....	44
1.3.6. Determinación del contenido de $\omega$ -3 mediante cromatografía gaseosa .....	45
1.3.7. Determinación del contenido de AX.....	45
1.3.8. Determinación de productos de la oxidación lipídica .....	46
1.3.8.1. Determinación de productos primarios de oxidación lipídica.....	46
1.3.8.2. Determinación de productos secundarios de oxidación lipídica .....	47
1.3.9. Análisis estadístico de los datos .....	48
<b>1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
1.4.1. Aceite de chía.....	48
1.4.1.1. Actividad antioxidante .....	48
1.4.1.2. Contenido de $\omega$ -3 durante el almacenamiento .....	49
1.4.1.3. Contenido de AX durante el almacenamiento.....	52
1.4.1.4. Oxidación lipídica .....	54
1.4.2. Aceite de pescado.....	58
1.4.2.1. Actividad antioxidante .....	58
1.4.2.2. Contenido de $\omega$ -3 durante el almacenamiento .....	58
1.4.2.3. Contenido de AX durante el almacenamiento.....	62
1.4.2.4. Oxidación lipídica .....	62
<b>1.5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>CAPÍTULO 2 - OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS MEDIANTE GELIFICACIÓN IÓNICA PARA LA ENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE CHÍA Y ASTAXANTINA ....</b>	<b>68</b>
<b>2.1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>68</b>
<b>2.2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO.....</b>	<b>69</b>
<b>2.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>69</b>
2.3.1. Materiales.....	69
2.3.2. Etapas experimentales desarrolladas para la obtención de partículas .....	70
2.3.3. Preparación de las soluciones.....	71

2.3.3.1. Solución de ALG .....	71
2.3.3.2. Solución de WPC .....	71
2.3.3.3. Tratamiento térmico de la solución de WPC para la obtención de agregados proteicos WPA.....	72
2.3.3.4. Solución receptora de CaCl <sub>2</sub> .....	72
2.3.3.5. Preparación de la oleorresina .....	73
2.3.4. Preparación de las partículas mediante gelificación iónica.....	73
2.3.5. Determinación del contenido de proteína incorporada en las partículas .....	73
2.3.6. Extracción de oleorresina desde las partículas .....	74
2.3.7. Determinación de la EE .....	74
2.3.8. Tamaño y forma .....	75
2.3.9. Humedad .....	75
2.3.10. Contenido de calcio.....	75
2.3.11. Microscopía confocal de barrido láser .....	75
2.3.12. Parámetros texturales .....	76
2.3.13. Estabilidad durante el almacenamiento.....	76
2.3.14. Contenido de AX .....	76
2.3.15. Productos primarios de oxidación lipídica (IP).....	77
2.3.16. Productos secundarios de oxidación lipídica (TBARS).....	77
2.3.17. Análisis estadístico.....	77
<b>2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
2.4.1. Evaluación de diferentes proporciones entre ALG y WPA para la obtención de partículas mediante gelificación iónica .....	77
2.4.2. Proteína incorporada en las partículas.....	78
2.4.3. Evaluación de la cantidad de oleorresina incorporada en las partículas .....	78
2.4.4. Caracterización de las partículas .....	79
2.4.4.1. Aspecto, tamaño y morfología .....	79
2.4.4.2. Contenido de humedad.....	80
2.4.4.3. Contenido de calcio.....	80

2.4.4.4. Morfología interna .....	81
2.4.4.5. Parámetros texturales .....	81
2.4.4.6. Eficiencia de encapsulación .....	84
2.4.5. Estabilidad de los compuestos encapsulados durante el almacenamiento .....	84
2.4.5.1. Estabilidad de AX .....	84
2.4.5.2. Estabilidad oxidativa.....	86
<b>2.5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>88</b>

### **CAPÍTULO 3 - LIBERACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS**

#### **ENCAPSULADOS BAJO CONDICIONES SIMULADAS DE DIGESTIÓN *IN VITRO* . 90**

<b>3.1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>90</b>
<b>3.2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO.....</b>	<b>91</b>
<b>3.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>92</b>
3.3.1. Materiales.....	92
3.3.2. Preparación de partículas .....	92
3.3.3. Determinación de las actividades enzimáticas .....	92
3.3.4. Preparación de fluidos de digestión gastrointestinal .....	95
3.3.5. Protocolo de digestión <i>in vitro</i> .....	95
3.3.6. Liberación de AX y $\omega$ -3 desde las partículas .....	96
3.3.7. Cinética de liberación de AX y $\omega$ -3 .....	96
3.3.8. Bioaccesibilidad .....	98
3.3.9. Digestión lipídica .....	99
3.3.10. Análisis estadístico.....	100
<b>3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>100</b>
3.4.1. Actividades enzimáticas.....	100
3.4.2. Liberación de AX y $\omega$ -3 desde las partículas .....	100
3.4.3. Cinética de liberación.....	102
3.4.4. Bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos .....	104



3.4.5. Digestión lipídica .....	104
<b>3.5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>106</b>
<b>CAPÍTULO 4 – ANÁLISIS SENSORIAL DE UNA MATRIZ ALIMENTARIA CONTENIENDO LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS ENCAPSULADOS.....</b>	<b>108</b>
<b>4.1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>108</b>
<b>4.2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO.....</b>	<b>110</b>
<b>4.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>110</b>
4.3.1. Materiales.....	110
4.3.2. Preparación de las partículas.....	110
4.3.3. Preparación de los yogures.....	110
4.3.4. Estabilidad de AX y $\omega$ -3 en yogur .....	111
4.3.5. Análisis microbiológico .....	112
4.3.6. Caracterización sensorial basada en consumidores.....	112
4.3.7. Aceptabilidad global .....	113
4.3.8. Preguntas CATA .....	113
4.3.9. Análisis de penalización.....	114
<b>4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>114</b>
4.4.1. Estabilidad de AX y $\omega$ -3 en el yogur .....	114
4.4.2. Análisis microbiológico .....	115
4.4.3. Aceptabilidad global .....	115
4.4.4. Análisis de penalización.....	116
4.4.5. Preguntas CATA .....	118
<b>4.5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>121</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>124</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>127</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>147</b>

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>Abreviaturas y símbolos</b>	<b>Definición</b>
<b>2-MAG</b>	2-monoacilglicerol
<b>AAO</b>	Actividad antioxidante
<b>ABTS</b>	Ácido 2,2-azino-bis-(3-etiltiazolinabencenosulfónico-6)
<b>AC</b>	Análisis de correspondencia
<b>ALA</b>	Ácido linolénico
<b>ALG</b>	Alginato de sodio
<b>AP</b>	Análisis de penalización
<b>ARA</b>	Ácido araquidónico
<b>AX</b>	Astaxantina
<b>BHT</b>	Butilhidroxitolueno
<b>BHA</b>	Butilhidroxianisol
<b>CATA</b>	Marque todo lo que aplica
<b>CLSM</b>	Microscopía confocal de barrido láser
<b>DHA</b>	Ácido docosapentanoico
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EE</b>	Eficiencia de encapsulación
<b>EPA</b>	Ácido eicosapentanoico
<b>FAMES</b>	Ésteres metílicos de ácidos grasos
<b>FFA</b>	Ácidos grasos libres
<b>GRAS</b>	Generalmente reconocido como seguro
<b>IDA</b>	Ingesta diaria admisible
<b>IP</b>	Índice de peróxido
<b>LA</b>	Ácido linoleico
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>PcoA</b>	Análisis de coordenadas principales
<b>SGF</b>	Fluido de digestión gástrica
<b>SIF</b>	Fluido de digestión intestinal
<b>TAME</b>	p-toluenosulfónico-L-arginina metil éster
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>TBARS</b>	Índice de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TEAC</b>	Actividad antioxidante equivalente al Trolox
<b>TAG</b>	Triglicéridos
<b>TGI</b>	Tracto gastrointestinal
<b>TMP</b>	1,1,3,3-tetrametoxipropano
<b>TPA</b>	Análisis de perfil de textura
<b>WPA</b>	Agregados de proteínas del lactosuero
<b>WPC</b>	Concentrado de proteínas del lactosuero

<b><i>WPI</i></b>	Aislado de proteínas del lactosuero
<b><i>γ-TF</i></b>	Gamma-tocoferol
<b><i>α-TF</i></b>	Alfa-tocoferol
<b><i>ω-3</i></b>	Omega-3
<b><i>ω-6</i></b>	Omega-6

# RESUMEN

---

## RESUMEN

Actualmente, el concepto de nutrición ha evolucionado notablemente y el rol de los alimentos ya no se centra solo en aportar los nutrientes básicos para satisfacer las necesidades nutricionales, sino que mediante su consumo se busca prevenir el desarrollo de enfermedades y mejorar el estado de salud y la calidad de vida de los individuos. En este sentido, se ha demostrado que el consumo de compuestos bioactivos tiene efectos beneficiosos en la salud humana. Entre los compuestos bioactivos de interés, se destacan los ácidos grasos esenciales omega-3 y el pigmento astaxantina, los cuales han demostrado ejercer diversos efectos, entre los cuales se puede mencionar la actividad anticancerígena y antidiabética, el efecto neuroprotector y hepatoprotector, la prevención de enfermedades cardiovasculares y de la aterosclerosis. No obstante, la adición directa de compuestos bioactivos en los alimentos presenta dificultades relacionadas con la baja estabilidad de los mismos y con la alteración negativa que pueden generar sobre las características organolépticas de la matriz alimentaria en la cual se incorporan. Por ello, en los últimos años ha cobrado gran relevancia el estudio de metodologías que permitan la estabilización de compuestos bioactivos y su transporte hasta el sitio adecuado de acción, de tal manera que los mismos puedan ejercer su acción benéfica.

La encapsulación es una metodología en pleno crecimiento, mediante la cual los compuestos bioactivos son recubiertos por una pared que los protege de las condiciones adversas, favoreciendo su estabilidad y la liberación de los mismos en el sitio deseado. Actualmente se cuenta con distintas metodologías de encapsulación, dentro de las cuales, la gelificación iónica es una de las más utilizadas en el área de alimentos. Dicha técnica presenta la ventaja de utilizar materiales seguros como el alginato de sodio, por lo que resulta compatible con el desarrollo de alimentos. Además, es una metodología relativamente simple y puede ser escalable, permitiendo su utilización a nivel industrial. A su vez, existe evidencia de que la adición de otros biopolímeros a sistemas de encapsulación basados en alginato de sodio podría mejorar la funcionalidad de las partículas obtenidas mediante gelificación iónica, por lo que el estudio de la combinación de distintos materiales de pared ha ganado relevancia.

En función a lo mencionado, en la presente Tesis se estudió la encapsulación de aceites ricos en ácidos grasos omega-3 y astaxantina mediante la metodología de gelificación iónica externa, utilizando alginato de sodio solo o combinado con agregados de proteínas de lactosuero como materiales de pared. A partir de una primera caracterización de diferentes aceites ricos en ácidos grasos omega-3, se seleccionó al aceite de chía adicionado con astaxantina para los estudios de encapsulación e incorporación en una matriz alimentaria. Se evaluaron diferentes combinaciones entre los materiales de pared para obtener partículas de diversas composiciones, seleccionando algunas de ellas para ser caracterizadas mediante diferentes parámetros de relevancia. Se logró

obtener partículas con una elevada carga de aceite y astaxantina, con una alta eficiencia de encapsulación. La presencia de agregados proteicos como parte de la matriz de las partículas modificó algunos parámetros, como el tamaño y la textura de las partículas (dureza, gomosidad y resiliencia), y favoreció la estabilidad de los compuestos encapsulados.

Otro aspecto considerado, debido a su importancia en el desarrollo de sistemas de encapsulación de bioactivos, fue el comportamiento de las partículas durante los procesos de digestión a partir de la aplicación de metodologías *in vitro*. En este sentido, se observó que los compuestos bioactivos encapsulados fueron protegidos por las partículas durante la fase de digestión gástrica y liberados desde las mismas durante la fase de digestión intestinal. El contenido final de compuestos bioactivos liberados fue elevado y similar para ambas partículas, mientras que la velocidad de liberación fue mayor en las partículas con agregados proteicos. Por otra parte, se evaluó la lipólisis del aceite y la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos. La encapsulación mediante gelificación iónica externa incrementó levemente los valores de lipólisis del aceite, mientras que no tuvo efecto sobre la bioaccesibilidad de los compuestos, no observándose diferencias en relación al material de pared utilizado.

Finalmente, se evaluó el efecto de la incorporación de las partículas obtenidas en una matriz alimentaria modelo sobre la aceptabilidad sensorial del producto estudiado, lo cual es un paso necesario y de especial interés debido a la importancia de la aceptabilidad sensorial de los nuevos alimentos formulados, a fin de que los mismos sean consumidos y puedan tener un efecto beneficioso sobre la salud. Para ello, se seleccionó al yogur como matriz alimentaria debido a sus características fisicoquímicas, su valor nutritivo y al alto consumo de este alimento por parte de la población, y se realizó un análisis sensorial con 101 potenciales consumidores. Los compuestos bioactivos encapsulados incorporados al yogur se mantuvieron estables durante su almacenamiento, a la vez que la incorporación de las partículas dio como resultado un producto con una buena aceptabilidad, siendo la misma mayor para las partículas que contenían agregados de proteínas del lactosuero.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis contribuyen al desarrollo de sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos lipofílicos que podrían ser utilizados para la formulación de alimentos funcionales, con potenciales beneficios tanto a la hora de pensar en el desarrollo de nuevos productos como en la salud de la población.

# ABSTRACT

---

## **ABSTRACT**

Nowadays, the concept of nutrition has evolved significantly and the role of food is no longer focused only on providing basic nutrients to satisfy nutritional needs, but also on preventing the development of diseases and improving health status and quality of people's life through its consumption. In this sense, it has been shown that the consumption of bioactive compounds has beneficial effects on human health. Among the bioactive compounds of interest are omega-3 essential fatty acids and the pigment astaxanthin, which have been shown to exert various effects, including anticancer and antidiabetic activity, neuroprotective and hepatoprotective effects, prevention of cardiovascular diseases and atherosclerosis. However, the direct addition of bioactive compounds in foods presents difficulties related to their low stability and the negative alteration that they can generate on the organoleptic characteristics of the food matrix in which they are incorporated. For this reason, in recent years the study of methodologies that allow the stabilization of bioactive compounds and their transport to the appropriate site of action has gained great relevance.

Encapsulation is a growing methodology through which bioactive compounds are coated with a wall that protects them from adverse conditions, favoring their stability and release at the desired site. Currently, there are different encapsulation methodologies, among which ionic gelation is one of the most widely used in the food area. This technique has the advantage of using safe materials such as sodium alginate, which makes it compatible with food development. In addition, it is a relatively simple methodology and can be scalable, allowing its use at the industrial level. In turn, there is evidence that the addition of other biopolymers to encapsulation systems based on sodium alginate could improve the functionality of the particles obtained by ionic gelation, which is why the study of the combination of different wall materials has become relevant.

Based on the above, this Thesis studied the encapsulation of oils rich in omega-3 fatty acids and astaxanthin through the external ionic gelation methodology, using sodium alginate alone or combined with whey protein aggregates as wall materials. From a first characterization of different oils rich in omega-3 fatty acids, chia oil added with astaxanthin was selected for encapsulation studies and incorporation into a food matrix. Different combinations between wall materials were evaluated to obtain particles of different compositions, selecting some of them to be characterized by different relevant parameters. It was possible to obtain particles with high oil and astaxanthin loading, with high encapsulation efficiency. The presence of protein aggregates as part of the particle matrix modified some parameters, such as particle size and texture, and favored the stability of the encapsulated compounds.



Another aspect considered due to its importance in the development of bioactive encapsulation systems was the behavior of the particles during the digestion processes, based on the application of *in vitro* methodologies. In this sense, it was observed that the encapsulated bioactive compounds were protected by the particles during the gastric digestion phase and released from the particles during the intestinal digestion phase. The final content of released bioactive compounds was high and similar for both particles, while the release rate was higher in the particles with protein aggregates. On the other hand, lipolysis of the oil and the bioaccessibility of the bioactive compounds were evaluated. Encapsulation by ionic gelation slightly increased the values of oil lipolysis, while it had no effect on the bioaccessibility of the compounds, and no differences were observed concerning to the wall material used.

Finally, the effect of incorporating the obtained particles in a model food matrix on the sensory acceptability of the studied product was evaluated, which is a necessary step of special interest due to the importance of the sensory acceptability of the newly formulated foods, so that they can be consumed and have a beneficial effect on health. For this purpose, yogurt was selected as a food matrix due to its physicochemical characteristics, its nutritional value and the high consumption of this food by the population, and a sensory analysis was carried out with 101 potential consumers. The encapsulated bioactive compounds incorporated into the yogurt remained stable during storage, while the incorporation of the particles resulted in a product with good acceptability, which was higher for the particles containing whey protein aggregates.

The results obtained in this Thesis contribute to the development of an encapsulation system for lipophilic bioactive compounds that might be used for the formulation of functional foods, with potential benefits both in the development of new products and in the health of the population.

# INTRODUCCIÓN GENERAL

---

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

### **ALIMENTOS FUNCIONALES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS**

Los alimentos son esenciales para los seres humanos y contienen compuestos que son necesarios para el desarrollo de las funciones del organismo. Los mismos aportan energía y nutrientes que posibilitan el soporte de las actividades metabólicas y el crecimiento y mantenimiento del organismo (Domínguez Díaz et al., 2020). De acuerdo al Código Alimentario Argentino (CAA, 2010), los alimentos son definidos como “toda sustancia o mezcla de sustancias naturales o elaboradas que ingeridas por el hombre aporten a su organismo los materiales y la energía necesarios para el desarrollo de sus procesos biológicos”. La designación alimento incluye además, “las sustancias o mezcla de sustancias que se ingieren por hábito, costumbre, o como coadyuvantes, tengan o no valor nutritivo”. La relación entre alimentación y salud es muy estrecha y, en este sentido, actualmente hay una mayor conciencia de que el rol de los alimentos no se centra solo en aportar los nutrientes básicos para satisfacer las necesidades nutricionales, sino que los mismos pueden contribuir con la prevención de enfermedades y mejorar el estado de salud y la calidad de vida de los individuos. Como resultado de la comprensión de la relación entre alimentación y salud, en 1984 surgió en Japón el concepto de alimentos funcionales, en referencia a alimentos que contienen ingredientes que, además de ser nutritivos, contribuyen a funciones específicas en el organismo (Kaur & Das, 2011). A partir de entonces, han surgido diversas definiciones con relación a los alimentos funcionales, no existiendo actualmente un consenso a nivel mundial. La mayor parte de las definiciones contempla a los alimentos funcionales como aquellos alimentos biológica y fisiológicamente activos, que proveen beneficios para la salud que van más allá de su aporte nutritivo básico (Pulvirenti & Paterna, 2022). De acuerdo con Pulvirenti & Paterna (2022), los alimentos funcionales pueden ser clasificados en función de su naturaleza de la siguiente forma:

- Alimento natural no procesado (o alimento convencional), como frutas, vegetales, pescados, los cuales contienen en forma natural compuestos bioactivos en su composición.
- Alimentos modificados durante el cultivo de plantas con el objetivo de mejorar determinadas características deseadas.
- Alimentos modificados a los cuales se les ha añadido un compuesto bioactivo.
- Alimentos modificados mediante la eliminación o reducción de determinados componentes.

El concepto de alimentos funcionales se encuentra estrechamente relacionado al de compuestos bioactivos. Estos compuestos son componentes tanto esenciales como no esenciales, los cuales se encuentran presentes en la naturaleza y han demostrado ejercer efectos beneficiosos en la salud humana (Biesalski et al., 2009). Los mismos se encuentran de manera natural en

algunos alimentos como frutas, vegetales y pescados o pueden ser adicionados durante la formulación de alimentos (Pulvirenti & Paterna, 2022). Dentro de estos compuestos se encuentran compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas, probióticos, minerales, polifenoles, ácidos grasos omega-3 y fitoesteroles (Đorđević et al., 2015; Banwo et al., 2021).

La adición directa de compuestos bioactivos en los alimentos presenta dificultades relacionadas con la estabilidad de dichos compuestos y con la alteración negativa que se puede generar sobre las características organolépticas de la matriz alimentaria en la cual se incorporan (Alu'datt et al., 2022). A raíz de lo expuesto anteriormente, en los últimos años ha cobrado gran relevancia el estudio de metodologías que permitan la estabilización de compuestos bioactivos y su transporte hasta el sitio adecuado de acción para que los mismos puedan ejercer su acción benéfica.

## **ASTAXANTINA**

Muchas enfermedades crónicas no transmisibles se encuentran vinculadas a la acumulación en el organismo de productos de oxidación, tales como radicales libres y especies reactivas del oxígeno (Banwo et al., 2021). En este sentido, cobran relevancia aquellos compuestos bioactivos con actividad antioxidante.

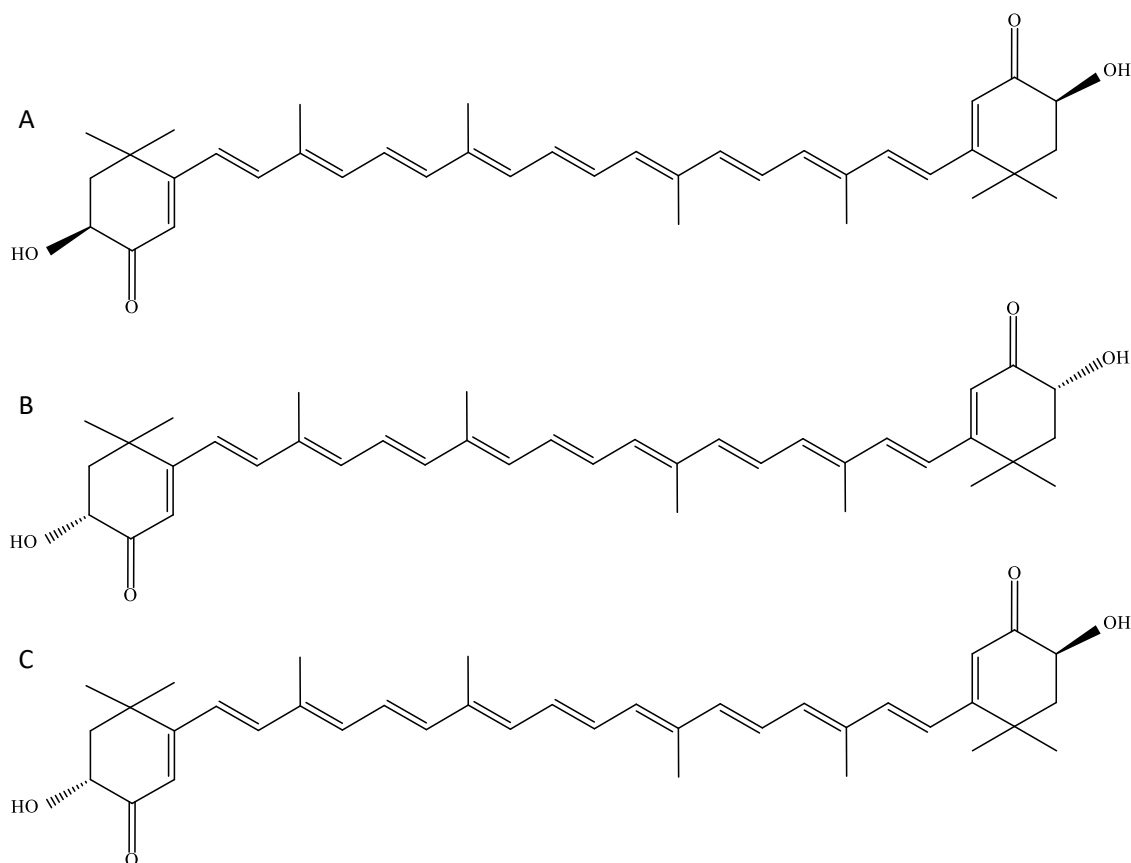
La astaxantina (AX) es un pigmento carotenoide perteneciente al grupo de las xantófilas. Presenta en su estructura regiones polares en los anillos ionona ubicados en ambos extremos de la cadena, que le otorgan la capacidad de neutralizar los radicales libres y una estructura no polar en el centro conformada por enlaces poliinsaturados dobles conjugados. Esta estructura con zonas polares y no polares le otorga la habilidad de ubicarse a lo largo de toda la membrana celular, lo cual tiene importantes implicancias en su rol como antioxidante en el organismo (Fakhri et al., 2018).

La molécula de AX puede obtenerse de forma sintética o a partir de fuentes naturales, siendo la obtenida a partir de fuentes naturales más segura para el consumo. La AX de origen natural se encuentra en algas, bacterias, levaduras, crustáceos y algunos peces como trucha y salmón (Kumar et al., 2022). A su vez, las distintas fuentes de AX producen diferentes estereoisómeros designados como 3R,3'R, 3R,3'S y 3S,3'S (**Figura 1**). Dentro de las fuentes naturales, se destaca la microalga *Haematococcus pluvialis*. La molécula de AX obtenida a partir de esta fuente está conformada por isómeros de configuración 3S,3S', los cuales han demostrado mejores propiedades bioactivas (Niizawa et al., 2021).

La AX ha demostrado ejercer diversos efectos benéficos sobre la salud, entre los cuales se destaca principalmente su actividad antioxidante. Actúa contra el daño oxidativo a través de diferentes mecanismos, como la neutralización del oxígeno singlete, la eliminación de radicales

para prevenir reacciones de oxidación en cadena, la preservación de la estructura de la membrana a través de la inhibición de la peroxidación lipídica, la mejora en el sistema inmunitario y la regulación de la expresión génica (Fakhri et al., 2018). La actividad antioxidante de la AX se atribuye no solo a la presencia de dobles enlaces conjugados, sino también a la forma en que la molécula se ubica en la membrana celular, la cual le permite capturar radicales libres tanto entre la bicapa de fosfolípidos de la membrana, como dentro y fuera de la membrana (Zhao et al., 2019).

Dada sus características únicas, la bioactividad de AX ha sido ampliamente estudiada en los últimos años, tanto en estudios *in vitro*, como en estudios *in vivo* realizados en animales y en humanos (Donoso et al., 2021). La molécula de AX se destaca por su actividad anticancerígena, antidiabética, su efecto neuroprotector y hepatoprotector, su efecto sobre el sistema inmune, su rol en la prevención de enfermedades cardiovasculares y de la aterosclerosis y su participación en el mantenimiento de la función ocular y en la protección del sistema nervioso central (Fakhri et al., 2018; Zhao et al., 2019). Debido a la relación entre el estrés oxidativo y la carcinogénesis, los compuestos con actividad antioxidante como la AX pueden contribuir en gran medida en la prevención del desarrollo de cáncer. Estudios *in vitro* en líneas celulares y estudios *in vivo* en modelos animales han demostrado la efectividad de AX en relación a su actividad anticancerígena (Faraone et al., 2020). Asimismo, la actividad antioxidante de la molécula de AX ha demostrado contribuir a la protección de los tejidos que pueden ser dañados patologías tales como diabetes. Además, la molécula de AX ha demostrado mejorar la secreción de insulina por parte de las células pancreáticas y la sensibilidad a la insulina por parte de diversos tejidos (Gowd et al., 2021). Finalmente, ensayos clínicos realizados en humanos han demostrado que el consumo de AX se encuentra relacionado a beneficios sobre la salud ocular y de la piel, capacidad neuroprotectiva y cardioprotectiva, como así también efectos sobre el sistema inmune (Donoso et al., 2021).



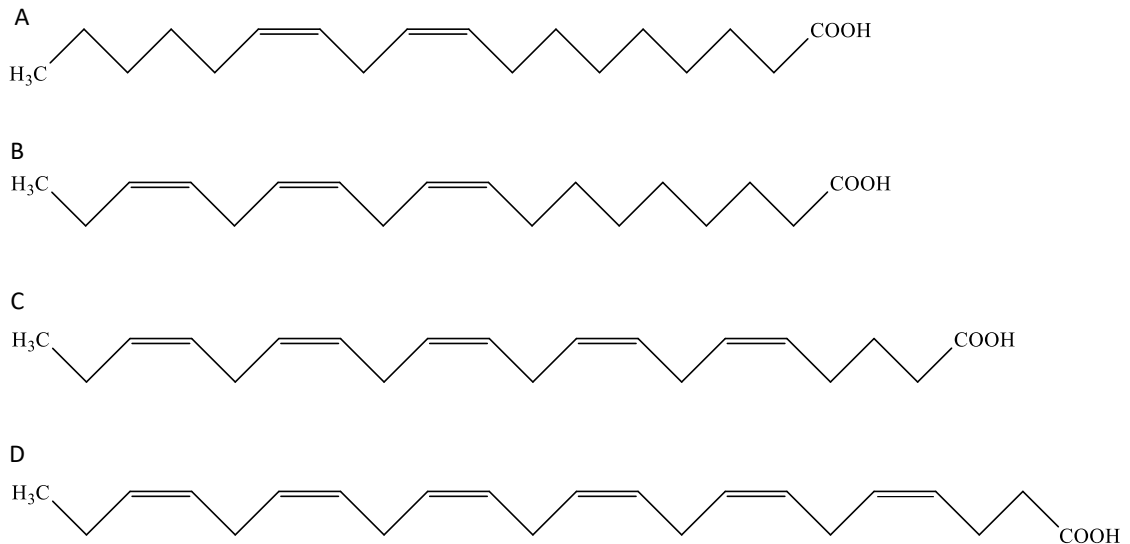
**Figura 1.** Estructura de los diferentes estereoisómeros de la molécula de AX. 3S,3'S (A), 3R,3'R (B) y 3R,3'S (C).

### ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3

Los lípidos forman una parte muy importante de la dieta siendo una de las principales fuentes de energía del organismo. A su vez, los mismos aportan vitaminas liposolubles, forman parte de las membranas celulares y actúan como agentes de señalización en sistemas biológicos ([Shahidi & Zhong, 2010](#)). Los ácidos grasos pueden clasificarse en función del número de dobles enlaces presentes en la cadena en ácidos grasos saturados (los cuales no presentan dobles enlaces), ácidos grasos monoinsaturados (los cuales presentan un único doble enlace en la cadena) y ácidos grasos poliinsaturados (los cuales presentan 2 o más dobles enlaces en la cadena) ([Saini & Keum, 2018](#)).

Las dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados han demostrado ser benéficas para la salud ([Kapoor et al., 2021](#)). En función de la ubicación del primer doble enlace empezando por el metilo terminal los ácidos grasos pueden clasificarse a su vez en ácidos grasos omega-6 ( $\omega$ -6) y omega-3 ( $\omega$ -3). Dentro de los ácidos grasos  $\omega$ -6 se encuentra el ácido linoleico (LA), mientras que los ácidos grasos  $\omega$ -3 comprenden al ácido linolénico (ALA) y a los ácidos grasos de cadena larga eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) ([Saini & Keum, 2018](#)). Estos ácidos grasos son esenciales, dado que no pueden ser sintetizados por el organismo, por lo que deben ser

incorporados a través de la dieta (Geranpour et al., 2020). En la **Figura 2**, se muestran las estructuras de cada uno de ellos.



**Figura 2.** Estructura de los ácidos grasos  $\omega$ -6 y  $\omega$ -3: LA (A), ALA (B), EPA (C) y DHA (D).

Tanto LA como ALA cumplen un papel relevante y participan de una gran variedad de funciones biológicas, no obstante, es importante un correcto balance en su ingesta. LA y ALA son responsables de la síntesis de eicosanoides tanto proinflamatorios como antiinflamatorios. Ambos ácidos grasos comparten la misma ruta metabólica y poseen roles competitivos en la síntesis de estos eicosanoides. La ingesta de LA se encuentra asociada a la formación de ácido araquidónico (ARA), vinculado a procesos de inflamación, vasoconstricción y agregación plaquetaria. Por otra parte, la ingesta de ALA se encuentra asociada a la formación de EPA y DHA, vinculados con efectos antiinflamatorios, vasodilatación y anti-agregación plaquetaria y a la formación de sustancias como resolvinas y protectinas. Dado que la enzima  $\Delta$ -desaturasa (involucrada tanto en el metabolismo de LA como de ALA) posee una mayor afinidad por ALA, la elevada ingesta de este último ácido graso favorece la formación de eicosanoides antiinflamatorios (Saini & Keum, 2018). La relación recomendada entre  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 en la ingesta es de 1:1 a 5:1. No obstante, las dietas occidentales son ricas en ácidos grasos  $\omega$ -6 y bajas en ácidos grasos  $\omega$ -3, por lo cual dicho balance no resulta adecuado (Patel et al., 2022).

El consumo de ácidos grasos  $\omega$ -3 se encuentra asociado a múltiples efectos benéficos sobre el organismo, relacionados principalmente con la prevención de enfermedades cardiovasculares (disminución del riesgo de isquemia y aterosclerosis, mantenimiento de la función endotelial y prevención de trombosis y arritmia). El ácido graso ALA ha demostrado incrementar la sensibilidad a la insulina y, en consecuencia, disminuir el riesgo de diabetes tipo 2 y disminuir la

proliferación de células cancerígenas. DHA se destaca particularmente por su actividad neuroprotectiva y resulta esencial para el desarrollo del cerebro (Patel et al., 2022). Por su parte, el ácido graso EPA se caracteriza por su capacidad de disminuir los niveles de triglicéridos y de colesterol plasmático (Saini & Keum, 2018).

## **ESTABILIDAD DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS**

Tanto la molécula de AX como los ácidos grasos  $\omega$ -3 son muy inestables por lo que se pueden degradar fácilmente cuando se someten a condiciones adversas como altas temperaturas, presencia de oxígeno y exposición a la luz. Estas condiciones son habituales durante el almacenamiento y procesamiento de los alimentos y pueden generar pérdida de la bioactividad de los compuestos y posibles alteraciones organolépticas desfavorables en el alimento en el cual los compuestos bioactivos son incorporados (Martínez-Delgado et al., 2017; Bakry et al., 2016).

Los carotenoides exhiben una gran cantidad de interacciones químicas, como transferencia de electrones, abstracción de hidrógeno o adición de radicales libres, que pueden generar la degradación de los mismos (Martínez-Delgado et al., 2017). La cadena poliénica de la AX es propensa a la oxidación e isomerización debido a la presencia de dobles enlaces. Como resultado de estas reacciones se generan compuestos de bajo peso molecular y la pérdida del color de la molécula. Entre los principales factores que afectan la estabilidad de AX se encuentran la luz, el pH y la temperatura elevada. La luz genera la excitación de la molécula de AX y puede generar la formación de radicales libres. Por otro lado, el calor puede afectar la estabilidad de la molécula de AX generando la degradación de la misma. Esta degradación se produce aún más rápido en presencia de oxígeno, ya que causa la isomerización y degradación de la molécula. El pH también impacta en la estabilidad de AX. Tanto los pH ácidos como alcalinos pueden afectar la estabilidad de AX, siendo la misma más susceptible a las condiciones alcalinas (Tahergorabi et al., 2021). La molécula de AX puede encontrarse en su forma libre o esterificada con ácidos grasos, formando monoésteres o diésteres. Aunque en su forma esterificada presenta una mayor estabilidad térmica que en su forma libre, la misma continúa siendo inestable y muy susceptible a la degradación química debido a su estructura altamente insaturada (Yang et al., 2020).

Por otro lado, los aceites son propensos a sufrir transformaciones, las cuales se pueden dividir en dos grupos: lipólisis (o rancidez hidrolítica) y autooxidación (o rancidez oxidativa). Dichas transformaciones reducen el valor nutritivo del aceite y producen compuestos volátiles que imparten olores y sabores que alteran sus características organolépticas. Además, se generan compuestos de oxidación que son potencialmente tóxicos. La oxidación de lípidos es una de las principales causas de deterioro de los alimentos, siendo la autooxidación el proceso de oxidación más común de grasas y aceites. Este proceso se da principalmente en ácidos grasos insaturados,



aunque puede presentarse también con otros compuestos de interés como la vitamina A y los carotenoides (Badui Dergal, 2006; Shahidi & Zhong, 2010).

La autooxidación de lípidos ocurre en presencia de iniciadores tales como el calor, la luz UV, la radiación ionizante, la presencia de iones metálicos o metaloproteínas. En general, se considera que el mecanismo de autooxidación de los lípidos consta de tres etapas. Durante la etapa de iniciación, las moléculas de lípidos insaturados (RH) en presencia de iniciadores pierden un átomo de hidrógeno y se producen radicales libres (R<sup>•</sup>). Los radicales libres reaccionan con el oxígeno para formar radicales peróxidos (ROO<sup>•</sup>), los cuales a su vez reaccionan con otros lípidos insaturados formándose hidroperóxidos (ROOH) y nuevos radicales libres. Los hidroperóxidos son reactivos y producen nuevos radicales libres que alimentan la reacción. Este proceso se repite durante la etapa de propagación, en la cual se van formando hidroperóxidos y más radicales libres que vuelven a entrar en la cadena de oxidación. Finalmente, en la etapa de terminación los radicales libres comienzan a interactuar entre ellos dando lugar a compuestos estables no radicalarios. Dada la estabilidad de los productos originados en las reacciones de terminación, se finaliza la actividad de oxidación (Badui Dergal, 2006; Shahidi & Zhong, 2010). En la **Figura 3**, se esquematiza el proceso anteriormente descrito.

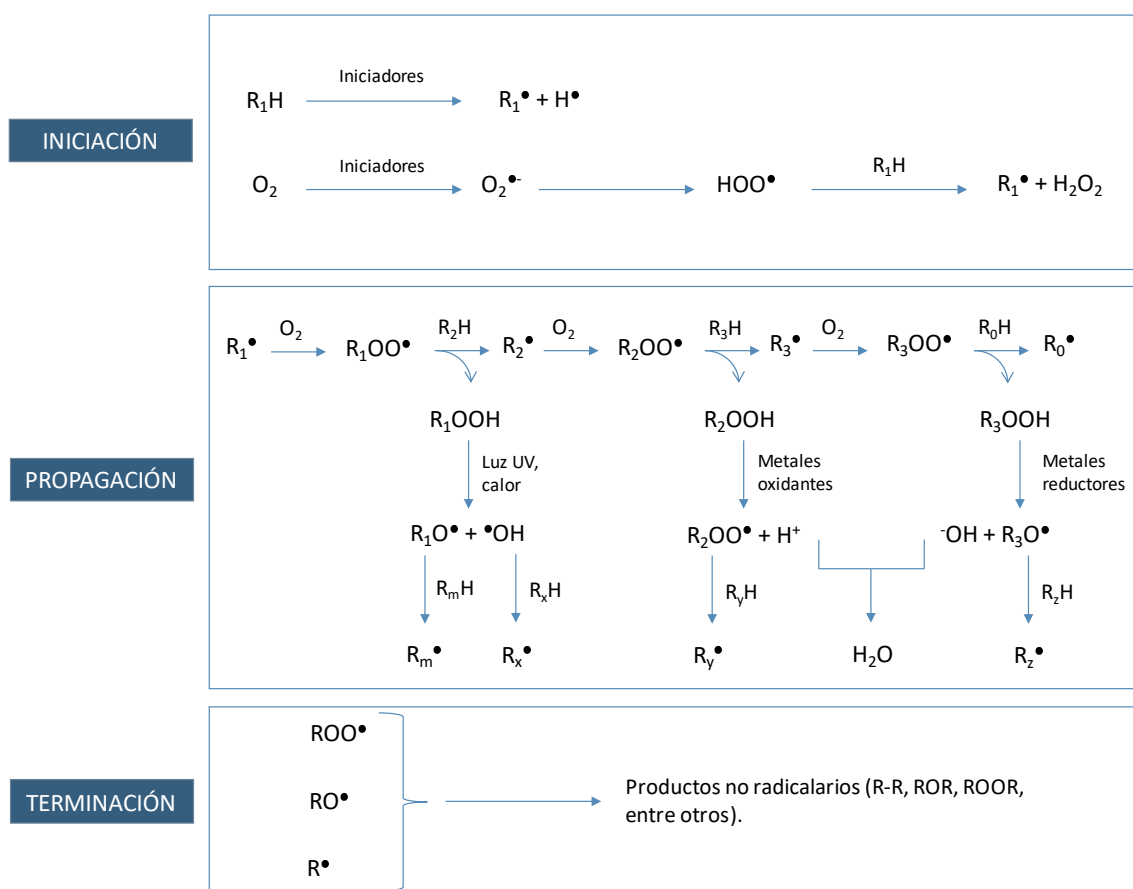


Figura 3. Esquema del proceso de autooxidación lipídica. Imagen modificada de Shahidi & Zhong, 2010.

## **DIGESTIBILIDAD DE COMPUESTOS BIOACTIVOS**

La digestión gastrointestinal de los lípidos es un proceso complejo. La hidrólisis comienza en la boca por la acción de la enzima lipasa lingual. En el estómago, los lípidos entran en contacto con el jugo gástrico que contiene a la enzima lipasa gástrica, la cual hidroliza principalmente ácidos grasos de cadena corta como algunos de los presentes en la leche y la yema de huevo. La mayor parte de la digestión (cerca del 70%) ocurre en el intestino en presencia de la enzima lipasa pancreática. Los productos de la digestión lipídica son emulsionados por las sales biliares y fosfolípidos en el lumen intestinal y forman micelas que posteriormente son absorbidas por el epitelio intestinal (Zhang et al., 2021). El tipo de ácido graso y la composición de los triglicéridos tienen influencia en este proceso de digestión lipídica (Ye et al., 2018).

Dada su naturaleza lipofílica, el proceso de digestión de la AX es similar al de los lípidos. Para ser absorbida, debe liberarse de la matriz, emulsificarse y mezclarse con lípidos, productos de digestión lipídica y sales biliares, para formar micelas. Una vez disuelta en las micelas, la AX es absorbida en el intestino delgado por las células epiteliales y empaquetada en quilomicrones, para finalmente llegar a la circulación sanguínea y ser distribuida a los distintos tejidos (Liu et al., 2023).

Los compuestos bioactivos lipofílicos se caracterizan por presentar una baja biodisponibilidad, definida como la fracción de compuesto ingerido que permanece disponible para ejercer su función en el sitio de acción correspondiente (Alegría et al., 2015). La misma se encuentra afectada por 3 parámetros: bioaccesibilidad, absorción y transformación. La bioaccesibilidad es la fracción del compuesto bioactivo que se libera de la matriz que lo transporta y luego se disuelve en el tracto gastrointestinal (TGI). En el caso de los compuestos bioactivos lipofílicos, se considera bioaccesible a la fracción liberada de la matriz e incorporada en las micelas que se forman durante la digestión intestinal. La absorción corresponde a la fracción de compuesto bioactivo bioaccesible que es absorbida por las células epiteliales intestinales. Finalmente, la transformación hace referencia a la fracción de compuesto bioactivo que permanece en su forma biológicamente activa en su sitio de acción (Anal et al., 2023). La baja biodisponibilidad de gran parte de los compuestos bioactivos dificulta el aprovechamiento de sus efectos benéficos.

## **ENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS**

Tal como se mencionó anteriormente, tanto la AX como los ácidos grasos  $\omega$ -3 son susceptibles a degradarse cuando se exponen a factores ambientales como el oxígeno, la luz, el agua y el calor. Esta característica es común a gran parte de los compuestos bioactivos lipofílicos,

y representa uno de los principales desafíos para su incorporación en matrices alimentarias. Durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos, los compuestos bioactivos se exponen habitualmente a estas condiciones adversas, que pueden afectar su estabilidad y/o generar la formación de sabores u olores indeseables. Asimismo, durante el paso por el TGI, los compuestos bioactivos pueden sufrir transformaciones en su estructura que afecten su estabilidad y bioactividad. Por otro lado, los compuestos bioactivos lipofílicos presentan una baja solubilidad en agua, dificultando su incorporación en matrices alimentarias de base acuosa (Đorđević et al., 2015; Alu'datt et al., 2022). En este sentido, la encapsulación es una estrategia útil que permite mejorar la solubilidad de los mismos y a su vez protegerlos de las condiciones adversas.

La encapsulación es definida como un proceso en el cual el material central (un compuesto líquido, sólido o gaseoso) es recubierto por una pared que los protege de la interacción con el entorno (Zabot et al., 2022). En aplicaciones alimentarias, el material central suele ser el compuesto bioactivo, mientras que el material de pared suele estar formado por polímeros de grado alimentario, principalmente proteínas y/o polisacáridos (Alu'datt et al., 2022).

Un sistema de encapsulación destinado al desarrollo de alimentos debe contemplar idealmente las siguientes características (McClements, 2012):

- Grado alimenticio: el sistema de encapsulación debe ser fabricado con ingredientes de grado alimenticio (tales como lípidos, proteínas, carbohidratos, minerales, agua) y las operaciones del procesamiento deben estar aprobadas en el país en el cual el producto va a ser consumido.
- Producción económica: el sistema de encapsulación debe ser capaz de ser producido de manera económica con ingredientes de bajo costo (los beneficios de encapsular el compuesto bioactivo deben superar los costos asociados con dicho proceso).
- Compatibilidad con la matriz alimentaria: el sistema de encapsulación debe ser compatible con la matriz en la cual se incorpore (no debe afectar en forma negativa la apariencia, la textura, el sabor o la vida útil del producto).
- Protección contra la degradación química: el sistema de encapsulación debe ser capaz de proteger al compuesto bioactivo de degradaciones químicas, tales como oxidación o hidrólisis.
- Capacidad de carga y retención: idealmente, un sistema de encapsulación debe ser capaz de encapsular una elevada cantidad de compuesto bioactivo por unidad de masa de material de pared y retenerlo hasta que sea necesaria su liberación (por ejemplo, en su sitio de acción).
- Mecanismo de transporte y liberación: el sistema de encapsulación debe ser diseñado para liberar al compuesto bioactivo en un sitio de acción específico, a una velocidad controlada o en respuesta a un estímulo ambiental específico (como pH, fuerza iónica o temperatura).

Este estímulo ambiental puede ocurrir durante el almacenamiento del alimento (por ejemplo, para la liberación de un compuesto con actividad antimicrobiana) o en el organismo humano (por ejemplo, liberación en la boca, el estómago, el intestino delgado o el intestino grueso).

- Bioactividad/biodisponibilidad: el sistema de encapsulación debe mejorar (o no afectar adversamente) la bioactividad y la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos.

Existen diferentes metodologías que pueden utilizarse para la encapsulación de bioactivos alimentarios, entre las cuales pueden mencionarse el secado por aspersión, la liofilización, el entrapamiento en liposomas, la coacervación compleja y la gelificación iónica (Alu'datt et al., 2022). Su elección depende de las características del compuesto bioactivo a encapsular y de la aplicación que tendrán finalmente las partículas. Por otro lado, existe una gran variedad de materiales de pared que pueden ser utilizados para la encapsulación de compuestos bioactivos. En general, estos están basados en ingredientes de grado alimenticio como proteínas, carbohidratos y lípidos (Alu'datt et al., 2022). Tanto la metodología de encapsulación como el material de pared utilizado tendrán impacto en las características físicas de las partículas obtenidas, como así también en la estabilidad, bioactividad y biodisponibilidad de los compuestos bioactivos encapsulados.

## **SISTEMAS DE ENCAPSULACIÓN BASADOS EN EMULSIONES**

Los sistemas de transporte basados en emulsiones son uno de los principales métodos para la encapsulación de compuestos bioactivos lipofílicos. Dentro de los mismos se encuentran emulsiones y nanoemulsiones, partículas y nanopartículas lipídicas sólidas, emulsiones múltiples y partículas de hidrogel rellenas (McClements & Li, 2010; Zhang et al., 2015).

- Emulsiones y nanoemulsiones: ambas consisten en gotas de lípidos dispersas en un medio acuoso, en donde cada gota se encuentra rodeada de una delgada capa del agente emulsificante. La principal diferencia entre ambos tipos de emulsiones radica en el tamaño de las gotas, las cuales se encuentran en el rango de 100 nm a 100  $\mu$ m para las emulsiones convencionales, y de 10 a 100 nm para las nanoemulsiones. Los ingredientes bioactivos lipofílicos son normalmente dispersados en la fase oleosa antes de que la misma sea homogeneizada en la fase acuosa.
- Partículas lipídicas sólidas: este tipo de sistema posee características similares a las emulsiones y nanoemulsiones, ya que también consiste en partículas lipídicas rodeadas de un agente emulsificante y dispersas en una fase acuosa. A diferencia de las emulsiones, en este caso la fase lipídica se encuentra parcial o totalmente solidificada.
- Emulsiones multicapas: este sistema está formado por pequeñas gotas de aceite dispersas en un medio acuoso, en el cual cada gota se encuentra rodeada de una pared nanolaminada, la

cual consiste normalmente en un recubrimiento emulsificante y una o varias capas de biopolímeros.

- Partículas de hidrogel rellenas: este tipo de partículas consiste en gotas de aceites atrapadas dentro de una partícula de hidrogel la cual se encuentra dispersa dentro de un medio acuoso. Las partículas de hidrogel están formadas normalmente por una mezcla de biopolímeros (proteínas y/o polisacáridos) y agua.

## **HIDROGELES PARA LA ENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS**

Los hidrogeles son redes tridimensionales sólidas fabricadas por estructuras poliméricas hidrofílicas entrecruzadas física o químicamente, capaces de atrapar y retener gran cantidad de agua u otros líquidos biológicos dentro de su red (Abaee et al., 2017). La formación de hidrogeles mejora la estabilidad de las emulsiones al inmovilizar las gotas en la estructura tipo gel y pueden proteger a los compuestos bioactivos de las condiciones externas, a la vez que los libera en respuesta a determinados estímulos externos (por ejemplo, cambios en la temperatura o el pH) (Farjami & Madadlou, 2019).

En el caso de las partículas de hidrogel rellenas, los compuestos bioactivos lipofílicos se disuelven en una fase oleosa la cual se dispersa posteriormente en una fase acuosa, formando una emulsión de aceite en agua. Cuando se produce la formación de los hidrogeles, las gotas de aceite quedan atrapadas en la red polimérica formada (Zhang et al., 2015). Las gotas de aceite pueden actuar como rellenos activos o inactivos. En el primer caso, las gotas interaccionan con la red del gel contribuyendo a la fuerza del mismo, mientras que en el segundo caso las gotas poseen poca afinidad por la matriz del gel y no interaccionan con ella o lo hacen de forma limitada (Farjami & Madadlou, 2019).

Existen diferentes métodos para la formación de partículas de hidrogel rellenas. En general, el primer paso consiste en la formación de la emulsión, mientras que el proceso siguiente depende del mecanismo mediante el cual el polímero utilizado es capaz de gelificar. Uno de los métodos comúnmente utilizados para la formación de hidrogeles es el método de inyección o extrusión. En este método, la solución polimérica que contiene a los compuestos bioactivos emulsionados es inyectada en una solución que promueve su gelificación. La composición de la solución gelificante dependerá del polímero utilizado (Zhang et al., 2015; Wen et al., 2018). A su vez, la formación de partículas de hidrogel de grado alimenticio puede llevarse a cabo mediante el uso de polímeros naturales, como proteínas y/o polisacáridos, los cuales presentan como ventaja su seguridad, disponibilidad comercial y bajo costo. Dentro de los polisacáridos utilizados para la formación de partículas de hidrogel se pueden mencionar alginato, pectina, carragenina, agar, almidón y quitosano, entre otros. Por su parte, dentro del grupo de las proteínas, se destacan las proteínas del lactosuero, caseína, proteínas de soja y de huevo y gelatina (Zhang et al., 2015). Los

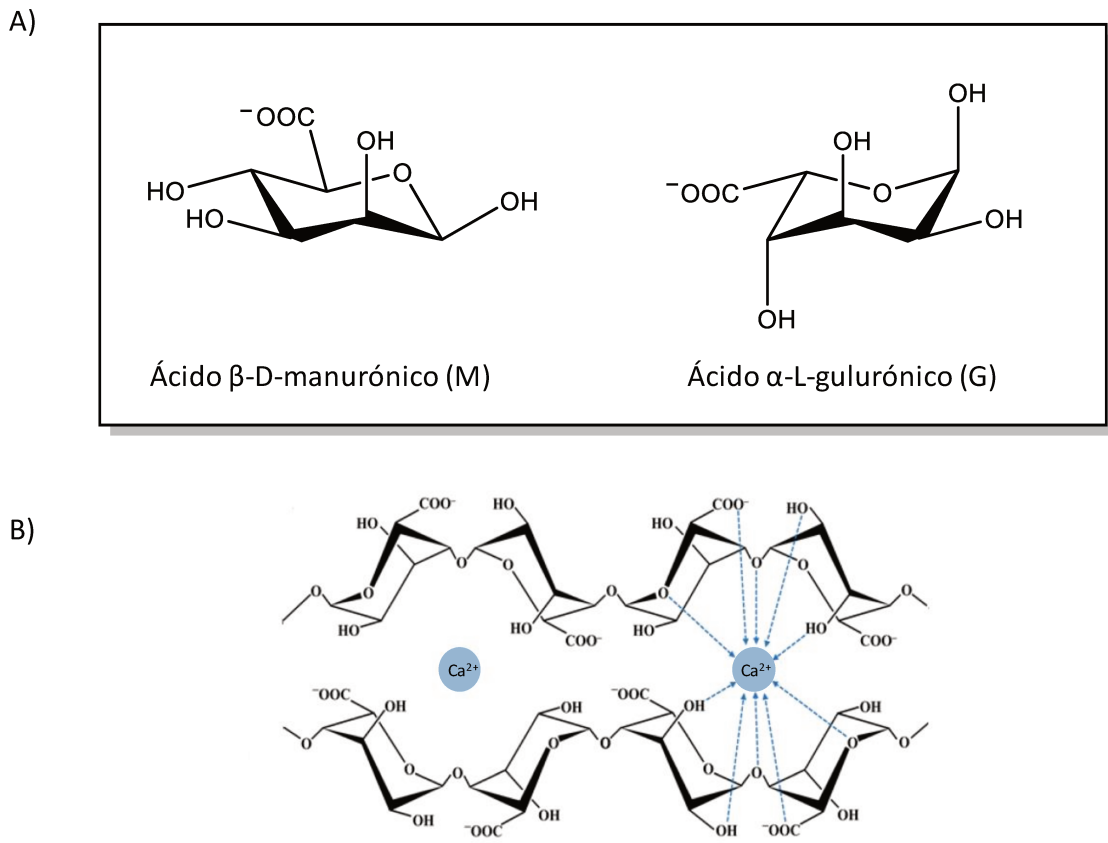
materiales de pared seleccionados en la presente Tesis fueron el alginato de sodio y las proteínas del lactosuero, los cuales tienen la capacidad de formar geles y pueden ser utilizados para obtener partículas mediante el método de inyección/extrusión.

## **ALGINATO**

El alginato (ALG) es un polisacárido aniónico derivado de algas marinas, formado por unidades de ácido  $\beta$ -D-manurónico (unidades M) y ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (unidades G) unidas entre sí mediante enlaces glicosídicos (**Figura 4A**). Las cadenas lineales del ALG están conformadas por bloques de homopolímeros (M o G) y bloques de heteropolímeros (MG), donde los bloques M y G se alternan. El porcentaje de estas unidades varía de acuerdo a la especie de alga e impacta en las propiedades del ALG (Bennacef et al., 2021; Li et al., 2021).

El ALG se encuentra dentro de la categoría de compuestos “Generalmente Reconocido Como Seguro (GRAS)”, es un material no tóxico, no antigénico, biocompatible y biodegradable, por lo cual es utilizado en diversas aplicaciones cosméticas, farmacéuticas, médicas y alimentarias. Una de las principales propiedades del ALG es su capacidad de interactuar con iones divalentes o trivalentes como el  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Sr}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$ , que le permite formar hidrogeles. En aplicaciones cosméticas y alimentarias el ion más utilizado es el  $\text{Ca}^{+2}$  (Bennacef et al., 2021).

La interacción entre el ALG y los iones  $\text{Ca}^{+2}$  se genera principalmente a través de las unidades de ácido gulurónico. El proceso de gelificación del ALG con iones  $\text{Ca}^{+2}$  se puede explicar mediante un modelo denominado “caja de huevos”. Este modelo puede ser dividido en 3 pasos: 1) formación de monocomplejos entre iones  $\text{Ca}^{+2}$  y unidades de ácido gulurónico de una cadena única de ALG; 2) formación de dímeros mediante el modelo de “caja de huevos” por la interacción de monocomplejos; 3) formación de multímeros mediante la interacción lateral de dímeros (Cao et al., 2020). En la **Figura 4B**, se esquematiza el proceso de interacción entre el ALG y los iones  $\text{Ca}^{+2}$ , responsable de la formación de geles.



**Figura 4.** Unidades de ácido  $\beta$ -D-manurónico (unidades M) y ácido  $\alpha$ -L-galacturónico (unidades G) (A) y representación de la interacción entre el ALG y los iones  $\text{Ca}^{2+}$  mediante el modelo de caja de huevos (B). Imagen adaptada de [Martău et al. \(2019\)](#).

## CONCENTRADOS DE PROTEÍNAS DE LACTOSUERO

Durante la producción de quesos u otros productos obtenidos a partir de la coagulación de la leche, se obtiene un líquido denominado suero, el cual se encuentra conformado mayormente por agua y posee una fracción de sólidos compuesta por lactosa, proteínas, lípidos y minerales ([Soares de Castro et al., 2017](#)). El suero representa más del 80% de la leche que ingresa a la producción de quesos y contiene más del 25% de las proteínas de la leche. Gran parte de la producción de leche en Argentina se destina a la elaboración de quesos, generando por lo tanto un gran volumen de suero ([Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, 2019](#)). El suero de quesería presenta una alta demanda biológica de oxígeno y una importante carga orgánica, por lo que su desecho tiene un impacto ambiental negativo. En función de ello, y considerando los esfuerzos actuales en aumentar la sustentabilidad a nivel agroalimentario, actualmente se busca darle un uso a este subproducto evitando su descarte ([Barba, 2021](#)). A su vez, debido a que presenta un elevado valor nutricional y diversas propiedades tecnofuncionales, existe un creciente

interés en su aprovechamiento. Entre dichas propiedades se destacan su capacidad espesante, estabilizante, emulsificante y gelificante (Falsafi et al., 2022). A partir del lactosuero es posible obtener diferentes subproductos como polvo, concentrado de proteínas (WPC), aislado de proteínas (WPI), permeado y lactosa (Soares de Castro et al., 2017). En general, el contenido de proteínas en el WPC está en un rango aproximado de 34-89%, mientras que el WPI contiene un 90% de proteínas como mínimo (Minj & Anand, 2020).

Las principales proteínas presentes en el lactosuero son proteínas globulares, entre las que se encuentran  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina y albúmina sérica bovina. Estas proteínas son capaces de formar hidrogeles en frío o mediante calentamiento. El calentamiento directo de la solución de proteínas conduce a su desnaturalización con la posterior formación de agregados. En este caso, la red de gel se forma través de enlaces covalentes (enlaces disulfuro inter e intramoleculares) y una gran variedad de enlaces no covalentes (enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas e hidrofóbicas). El uso de estos tipos de geles no resulta adecuado para el atrapamiento de compuestos bioactivos sensibles al calor, siendo más apropiada para este tipo de compuestos la formación de geles en frío (Abaee et al., 2017).

La formación de geles en frío puede producirse mediante la formación de agregados proteicos y su posterior interacción con iones como el  $\text{Ca}^{+2}$ . Las proteínas globulares del lactosuero en solución presentan una estructura compacta, con los aminoácidos apolares dentro de la estructura terciaria protegidos del medio hidrofílico externo. Al calentarse por encima de su temperatura de desnaturalización, las cadenas peptídicas se vuelven móviles, se produce el desplegamiento de la estructura terciaria de la proteína y los grupos hidrofóbicos y las cisteínas se vuelven accesibles. Esto permite que se formen enlaces fuertes, como enlaces disulfuros, entre diferentes moléculas proteicas, dando lugar a la formación de agregados de diferentes tamaños y morfología. Estos agregados proteicos tienen además la capacidad de formar geles al interactuar con iones como el  $\text{Ca}^{+2}$  (Kharlamova et al., 2018; Meza et al., 2020). La obtención de geles en frío resulta adecuada para la encapsulación de compuestos bioactivos sensibles al calor. Cuando se utilizan agregados proteicos para la obtención de partículas de hidrogel rellenas, se obtienen hidrogeles denominados comúnmente microgeles basados en emulsiones. La terminología hace referencia a la estructura de microgel que forman los agregados proteicos, los cuales estabilizan las gotas de emulsión formando una pared sólida suave alrededor de las mismas, que genera mejores propiedades mecánicas de las emulsiones (Torres et al., 2016).

## **LIBERACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DESDE SISTEMAS DE ENCAPSULACIÓN**

Además de proteger a los compuestos bioactivos durante el almacenamiento, los sistemas de encapsulación deben favorecer su liberación en el sitio adecuado. De acuerdo al objetivo

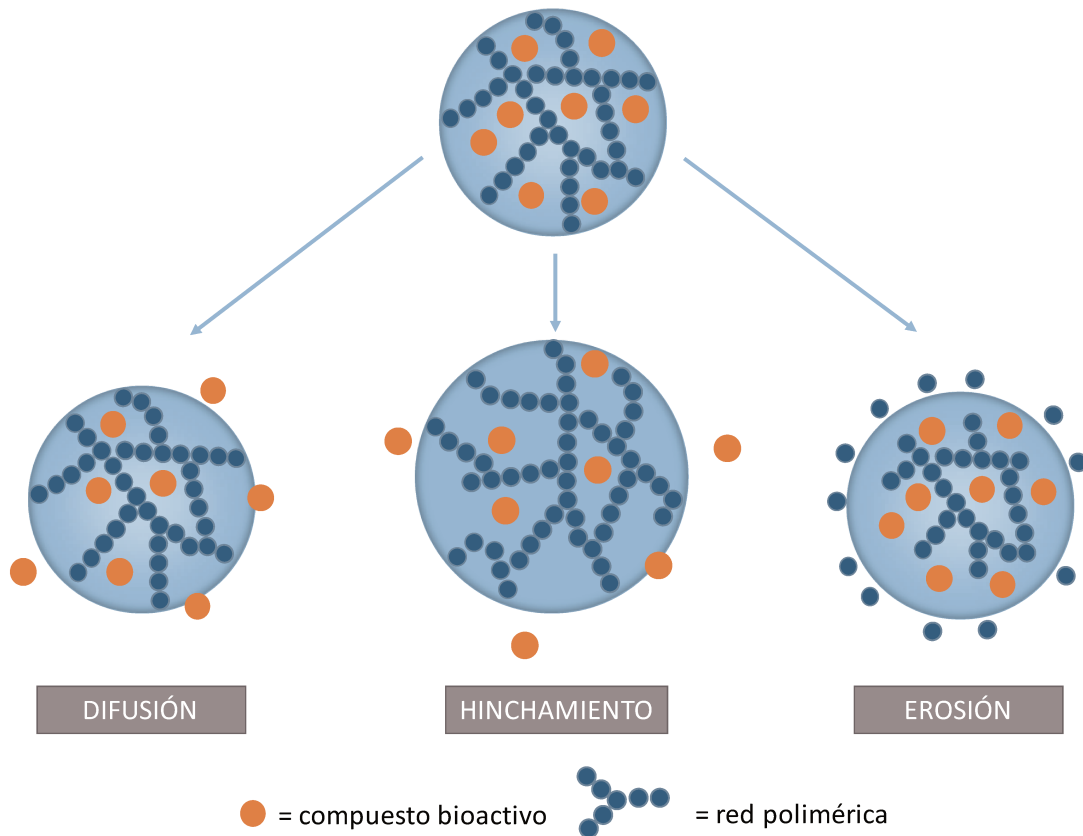


perseguido, los compuestos bioactivos encapsulados pueden ser liberados durante el almacenamiento de los alimentos (por ejemplo, la liberación de compuestos antimicrobianos o antioxidantes) o dentro del organismo humano (Boostani & Jafari, 2020). Cuando el objetivo perseguido es la liberación del compuesto bioactivo en el TGI, es importante tener en cuenta que las condiciones del medio pueden afectar la estabilidad y bioactividad de los mismos. En este caso, el sistema de encapsulación debería idealmente proteger al compuesto hasta el sitio de absorción o de acción específico.

Los procesos químicos, físicos y biológicos que tienen lugar durante el paso por el TGI, actúan sobre la matriz alimentaria y promueven la liberación de los compuestos bioactivos desde la misma (Hu et al., 2023). Para evitar la pérdida o el uso inadecuado de los bioactivos alimentarios, este proceso de liberación debe ser idealmente controlado. La liberación controlada se define como la liberación de los compuestos bioactivos en un intervalo de tiempo específico ante un estímulo particular. Los sistemas de liberación controlada permiten entonces modificar la velocidad o el sitio en el cual los compuestos son liberados (Assadpour & Jafari, 2020).

La liberación de compuestos bioactivos desde la matriz se encuentra asociada a tres mecanismos principales: difusión, hinchamiento y erosión o degradación (Zhang et al., 2015), lo cual se observa en el esquema de la **Figura 5**. Cuando la matriz está formada por polímeros no degradables, el mecanismo que domina la liberación del compuesto bioactivo es la difusión, mientras que cuando está formada por polímeros degradables, el hinchamiento y la erosión de la matriz también son responsables de la liberación de los compuestos. A continuación, se describen brevemente los fenómenos mencionados:

- **Difusión:** se define como el transporte de átomos o moléculas desde un sitio de mayor concentración a uno de menor concentración. La fuerza impulsora para la difusión de los compuestos bioactivos es el gradiente de concentración.
- **Hinchamiento:** la liberación de los compuestos se produce por la absorción de solvente por la matriz y el consecuente hinchamiento del sistema de encapsulación. La velocidad de liberación se encuentra gobernada por la de hinchamiento y por el tiempo necesario para que el compuesto bioactivo difunda a través del sistema hinchado.
- **Erosión:** consiste en la degradación de la matriz encapsulante, lo cual permite la liberación de los compuestos bioactivos atrapados. La erosión puede ser superficial (en este caso la degradación se produce solo en la parte más externa de la matriz) o masiva (en la cual la degradación se produce en toda la matriz).



**Figura 5.** Principales mecanismos involucrados en la liberación de compuestos encapsulados.

La liberación de los compuestos bioactivos es influenciada por características inherentes a los propios compuestos y por el tipo de sistema de encapsulación en el cual son incorporados. En cuanto a las características de los compuestos bioactivos, la cantidad inicial, el tamaño, la solubilidad, la difusividad y el coeficiente de partición, el gradiente de concentración, su ubicación en la matriz y la interacción con la red de hidrogel impactan en la liberación de los mismos. En lo que refiere al sistema de encapsulación, los materiales de pared, la carga de las gotas de la emulsión, el tamaño, la forma, la estructura, la porosidad y el estado de las gotas de la emulsión (por ejemplo, si están coalescidas o no) tienen efecto en la liberación de los compuestos bioactivos encapsulados (Boostani & Jafari, 2021). De acuerdo con el objetivo deseado, estos factores pueden controlarse o modificarse para obtener un sistema con determinadas características de liberación.

De acuerdo con lo mencionado en el presente capítulo, la incorporación de compuestos bioactivos lipofílicos a matrices alimentarias es un gran desafío. Los sistemas de encapsulación son una estrategia prometedora para mejorar la estabilidad de dichos compuestos, permitir su incorporación en matrices alimentarias y asegurar su liberación en el sitio adecuado del TGI para

que puedan finalmente ejercer su acción en el organismo. La gelificación iónica es una técnica de encapsulación compatible con el desarrollo de alimentos, ya que puede realizarse utilizando materiales seguros como el ALG y, además, puede ser escalable permitiendo su utilización a nivel industrial. A su vez, el agregado de WPA a sistemas de encapsulación basados en ALG podría mejorar las potencialidades de las partículas obtenidas mediante gelificación iónica. El estudio del efecto de este tipo de partículas sobre la estabilidad de los compuestos bioactivos y sobre las características de los mismos, permite la generación de conocimiento de relevancia para su posterior incorporación en matrices alimentarias. Finalmente, el estudio del efecto de la incorporación de este tipo de partículas en una matriz alimentaria es un paso necesario y de especial interés, debido a la importancia de la aceptabilidad sensorial de los nuevos alimentos formulados, a fin de que los mismos sean consumidos y puedan tener un efecto beneficioso sobre la salud.

# OBJETIVOS

---

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Estudiar procesos de encapsulación de compuestos bioactivos de naturaleza lipofílica mediante la formación de partículas de microgeles en emulsión, analizando las características y la aptitud de las microcápsulas para ser incorporadas en matrices alimentarias.

### **Objetivos específicos**

- Evaluar el uso de diferentes materiales de cubierta para la obtención de microcápsulas que sean compatibles con la formulación de alimentos.
- Caracterizar las partículas obtenidas y evaluar la capacidad de las mismas para mantener la estabilidad del compuesto bioactivo en el tiempo.
- Determinar la bioaccesibilidad del compuesto encapsulado para las diferentes condiciones estudiadas.
- Evaluar el efecto de la incorporación de las partículas en matrices alimentarias.
- Evaluar el grado de aceptabilidad de los productos alimenticios funcionales formulados a partir de la incorporación de las partículas obtenidas.

# **CAPÍTULO 1**

---

## **ESTABILIDAD DE MEZCLAS DE ACEITES RICOS EN OMEGA-3 Y ASTAXANTINA**

**CAPÍTULO 1 - ESTABILIDAD DE MEZCLAS DE ACEITES RICOS EN OMEGA-3 Y ASTAXANTINA**

**1.1. INTRODUCCIÓN**

Las dietas occidentales son ricas en ácidos grasos  $\omega$ -6 y bajas en  $\omega$ -3, por lo cual el balance en la ingesta de ambos ácidos grasos no resulta adecuado. Uno de los principales motivos de la baja ingesta de ácidos grasos  $\omega$ -3 radica en que, a diferencia de lo que ocurre con los ácidos grasos  $\omega$ -6, sus fuentes son limitadas (Saini & Keum, 2018). Algunos aceites vegetales como los de soja y canola contienen ALA, pero en cantidades relativamente bajas, por lo que no representan un aporte significativo de ALA a la dieta. Dentro de los alimentos con un mayor contenido de ALA se encuentran las semillas de chía y de lino, las cuales contienen más del 15% de ALA en su composición, y los aceites extraídos de ellas, los cuales contienen más del 50% de ALA. En cuanto a las fuentes de EPA y DHA, los pescados y sus aceites presentan un elevado contenido, pudiéndose obtener también a partir de otras fuentes menos convencionales como las microalgas (Perdana et al., 2021). En la **Tabla 1**, se muestran algunas de las principales fuentes de ácidos grasos  $\omega$ -6 y  $\omega$ -3, y sus respectivos contenidos.

**Tabla 1.** Contenido (g/100g) de  $\omega$ -6 (LA) y  $\omega$ -3 (ALA, EPA y DHA) en alimentos de origen animal y vegetal. Fuente: USDA (U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. FoodData Central) <https://fdc.nal.usda.gov/> y Nutrinfo, <https://www.nutrinfo.com/vademecum>. Acceso en mayo de 2023.

<b>Matriz</b>	<b>Alimento</b>	<b>LA</b>	<b>ALA</b>	<b>EPA</b>	<b>DHA</b>
<b>Aceite vegetal</b>	Maíz	51,9	1,04	-	-
	Soja	50,9	6,62	-	-
	Girasol	39,8	0,2	-	-
	Girasol alto oleico	3,61	0,192	-	-
	Canola	17,8	7,45	-	-
	Oliva extra virgen	8,4	0,651	-	-
	Chía	18,6	56,7	-	-
	Lino prensado en frío	14,2	53,4	-	-
<b>Aceite de pescado</b>	Menhaden (sábalo atlántico)	-	1,49	13,2	8,56
	Sardina	-	1,33	10,1	10,7
	Salmón	-	1,06	13	18,2
	Hígado de bacalao	-	0,935	6,9	11
<b>Semillas</b>	Chía	5,84	17,8	-	-
	Lino	5,9	22,8	-	-
	Sésamo	21,4	0,376	-	-
<b>Pescado</b>	Salmón rosado (crudo)	0,081	0,045	0,182	0,333
	Caballa (crudo)	0,219	0,159	0,898	1,4

Tal como puede observarse en la **Tabla 1**, los aceites de chía y de pescado representan unas de las principales fuentes de ácidos grasos  $\omega$ -3. En el caso del aceite de chía, Argentina se encuentra entre los principales productores a nivel mundial (junto con Paraguay, Bolivia y México) (Ferreira et al., 2023). El aceite de chía es extraído a partir de semillas de la planta de chía (*Salvia hispánica*), una especie anual de la familia *Lamiaceae*. Este aceite presenta cerca de un 80% de ácidos grasos poliinsaturados en su composición y contiene aproximadamente un 20% de LA y un 65% de ALA (con una relación promedio de  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 de 0,30-0,35) (Tak et al., 2022; Julio et al., 2022). Contiene además otros compuestos de gran interés, tales como esteroides, los cuales poseen efectos antibactericidas, antifúngicos, antiinflamatorios y antioxidantes. Finalmente, también contiene tocoferoles (principalmente  $\gamma$ -tocoferol) y compuestos fenólicos. Dentro de los últimos, se destaca la presencia de ácido clorogénico y ácido cafeico, y otros en menores cantidades como kaempferol, quercetina y miricetina (Nadeem & Imran, 2019).

Los pescados son una de las principales fuentes de ácidos grasos  $\omega$ -3 de cadena larga como EPA y DHA. No obstante, el aceite de pescado puede ser una alternativa interesante para la obtención de estos ácidos grasos en áreas donde hay un menor acceso al producto fresco (Jamshidi et al., 2020). En Argentina, la obtención de aceite de pescado se realiza a partir de la fracción de pescado que no se destina al consumo humano. Dicha fracción se utiliza para la obtención de harina de pescado, de la cual a su vez se obtiene el aceite como subproducto. La utilización del aceite con fines nutricionales permite aprovechar el subproducto generado. El aceite es generalmente extraído de especies pequeñas de pescados de agua fría, como anchoa, sardina, arenque, caballa o capelán, así como del hígado de especies magras de pescado como el bacalao (Encina et al., 2016).

Además de los efectos benéficos que presentan tanto la AX como los ácidos grasos  $\omega$ -3, diversos estudios han demostrado que la ingesta simultánea de ambos compuestos incrementa los beneficios de cada uno. La combinación de aceite de lino (rico en ALA) y AX ha demostrado que incrementa significativamente la capacidad de defensa antioxidante y disminuye la oxidación lipídica en estudios realizados en ratas (Xu et al., 2014). Además, el consumo de aceite de lino y AX ha demostrado que disminuye la esteatosis hepática, el estrés oxidativo y los niveles de colesterol y triglicéridos en ratas (Xu et al., 2017). En esta misma línea, la combinación de AX con EPA y DHA resultó tener un efecto sinérgico, incrementando la capacidad antioxidante de cada uno de ellos en estudios realizados con líneas celulares (Saw et al., 2013).

Por otra parte, la estabilidad y biodisponibilidad de algunos carotenoides suele incrementarse cuando se incorporan en aceites, dependiendo del tipo de aceite y de la composición de ácidos grasos del mismo (Honda et al., 2021; Saini et al., 2022). Asimismo, la adición de antioxidantes exógenos puede prevenir la degradación de AX (Martínez-Delgado et al., 2017) y retardar o detener la autooxidación lipídica del aceite (Shahidi & Zhong, 2010). No obstante, el efecto de



los antioxidantes adicionados depende de varios factores, siendo relevante entre ellos la composición de la matriz. Hasta el momento, la estabilidad de la molécula de AX en aceites de chía y de pescado, y el efecto de su incorporación sobre ambos aceites no han sido evaluados en profundidad, por lo que su estudio proporciona información de relevancia para el potencial desarrollo de alimentos funcionales que aprovechen los efectos sinérgicos de ambos compuestos.

El objetivo de este capítulo fue evaluar la estabilidad de dos aceites fuentes de  $\omega$ -3 (aceite de chía y de pescado) con AX incorporada durante el almacenamiento a diferentes temperaturas. La caracterización se realizó en forma previa al estudio de encapsulación de los compuestos bioactivos, con el objetivo de tener un mayor conocimiento de la matriz a encapsular.

## 1.2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

- ✓ Evaluar la actividad antioxidante de aceites de chía y de pescado con AX incorporada.
- ✓ Evaluar la estabilidad de AX incorporada en aceites de chía y de pescado a diferentes temperaturas de almacenamiento.
- ✓ Evaluar la estabilidad de  $\omega$ -3 en aceites de chía y de pescado con AX incorporada a diferentes temperaturas de almacenamiento.
- ✓ Evaluar la estabilidad oxidativa de aceites de chía y de pescado con AX incorporada a diferentes temperaturas de almacenamiento.
- ✓ Evaluar el efecto de la adición de  $\alpha$ -tocoferol como antioxidante exógeno en el aceite de chía.

## 1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.3.1. Materiales

El aceite de chía prensado en frío (Sturla S.R.L., Burzaco, Argentina) fue adquirido en un mercado local. La composición de ácidos grasos (provista por el fabricante) fue la siguiente: ácido palmítico (6,00±1,00%), ácido esteárico (2,00±1,00%), ácido oleico (6,00±1,50%), ácido linoleico (21,00±2,00%) y ácido linolénico (60,00±3,00%).

El aceite de pescado fue adquirido en Omega Sur S.A. (Mar del Plata, Argentina). La composición de ácidos grasos (provista por el fabricante) fue la siguiente: ácido docosaheptaenoico (>21%), ácido eicosapentanoico (>7%), total  $\omega$ -3 (>34%), total  $\omega$ -6 (>3%), total ácidos grasos polinsaturados (>37%).

El extracto de astaxantina (AstaZine®) fue provisto por Lipomize S.R.L (Santa Fe, Argentina). El  $\alpha$ -tocoferol fue adquirido en Laboratorios Vitafor S.R.L (Santa Fe, Argentina). El

estándar de astaxantina DRE-CA10307000 utilizado para la curva de calibrado fue adquirido en Dr. Ehrenstorfer GmbH (Ausburgo, Alemania). El ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS), Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2 carboxílico), éster metílico de ácido linolénico, éster metílico de ácido eicosapentaenoico, éster metílico de ácido docosaheptaenoico, hidroxitolueno butilado (BHT), ácido tiobarbitúrico (TBA) y 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, Estados Unidos). El tiocianato de amonio ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ) y ácido tricloroacético (TCA) fueron adquiridos en Cicarelli Laboratorios S.A. (Santa Fe, Argentina). El cloruro de bario dihidrato ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) y tricloruro de hierro hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) fueron adquiridos en Biopack (Buenos Aires, Argentina).

### 1.3.2. Formulación de oleorresina

Para la obtención de la oleorresina se pesó la cantidad necesaria de extracto de AX y se disolvió en los aceites de chía y de pescado. La concentración final de AX en la oleorresina fue de 400  $\mu\text{g/g}$  de aceite.

### 1.3.3. Evaluación de la estabilidad de aceites sin encapsular

Se evaluaron dos aceites fuentes de  $\omega$ -3, aceite de chía y aceite de pescado, adicionados ambos con AX. En el caso del aceite de chía, se partió de un aceite comercial prensado en frío, sin antioxidantes exógenos agregados. Se analizó el efecto de la adición de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TF) como antioxidante exógeno con el objetivo de proteger a la molécula de AX y los ácidos grasos  $\omega$ -3 y evitar la oxidación de los mismos (Martínez-Delgado et al., 2014). Se evaluó aceite de chía adicionado con 400  $\mu\text{g}$  AX/g aceite (CO+AX) y aceite de chía adicionado con 400  $\mu\text{g}$  AX/g aceite y 100  $\mu\text{g}$  de  $\alpha$ -TF/g aceite (CO+AX/TF). A su vez, aceite de chía adicionado solo con 100  $\mu\text{g}$  de  $\alpha$ -TF/g aceite (CO+TF) y aceite de chía sin adición de antioxidantes (CO), fueron evaluados como control (Tabla 2). La cantidad de AX agregada se seleccionó teniendo en cuenta los valores de ingesta diaria recomendada para dicho pigmento (Ranga Rao et al., 2014). La cantidad de  $\alpha$ -TF adicionada se seleccionó en base a los valores reportados por bibliografía, de manera de trabajar dentro del rango de concentraciones en la cual el  $\alpha$ -TF presenta actividad antioxidante (AAO) y no ejerce efecto prooxidante (Kul & Ackman, 2001; Jung & Mil, 1990).

En el caso del aceite de pescado, se evaluó un aceite adicionado con 400  $\mu\text{g}$  AX/g de aceite (FO+AX) y como control aceite de pescado sin AX adicionada (FO) (Tabla 2). Cabe aclarar que el aceite de pescado adquirido contenía butilhidroxianisol (BHA), gamma-tocoferol ( $\gamma$ -TF) y  $\alpha$ -TF como antioxidantes exógenos (100  $\mu\text{g}$  de BHA/g aceite y 500  $\mu\text{g}$  de mezcla de  $\alpha$ -TF y  $\gamma$ -TF/g de aceite).

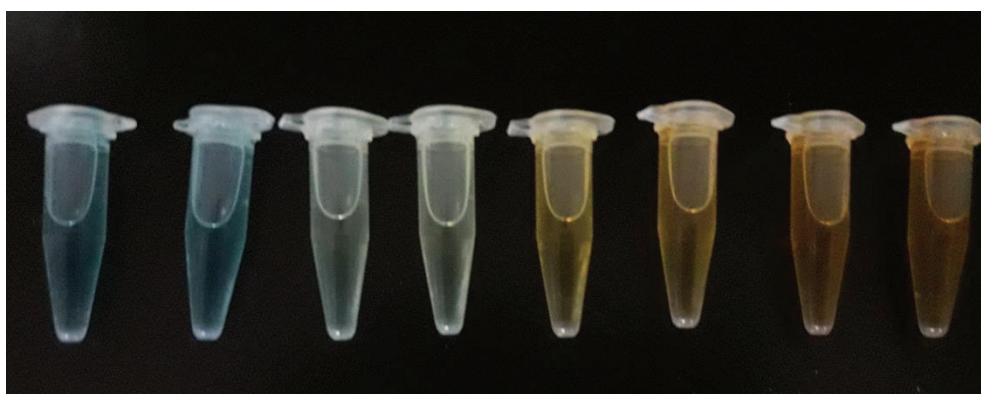
Las muestras fueron almacenadas a distintas temperaturas (25°C, 45°C y 65°C) durante diferentes períodos de tiempo (según la temperatura de trabajo). Para cada muestra, se determinó en forma inicial el contenido de  $\omega$ -3 y AX, la AAO y la presencia de productos primarios y secundarios de oxidación lipídica. Por otra parte, se evaluó la evolución del contenido  $\omega$ -3 y AX y la estabilidad oxidativa de los aceites durante su almacenamiento.

**Tabla 2.** Composición de los aceites evaluados.

Muestra	AX ( $\mu\text{g/g}$ aceite)	TF ( $\mu\text{g/g}$ aceite)
CO	-	-
CO+AX	400	-
CO+TF	-	100
CO+AX/TF	400	100
FO	-	-
FO+AX	400	-

#### 1.3.4. Determinación de la actividad antioxidante

La AAO se determinó a partir de la técnica ABTS (Re et al., 1999). Dicha técnica se basa en la reducción del radical catiónico 2,2'-azino-bis (ABTS<sup>•+</sup>) tras su reacción con compuestos con AAO, lo cual genera un cambio en la coloración de la muestra que puede ser determinado espectrofotométricamente. En la **Figura 6**, se muestra el cambio en la coloración del radical ABTS<sup>•+</sup> a medida que se agrega a la muestra AX en concentraciones crecientes.



**Figura 6.** Cambio en la coloración del radical ABTS<sup>•+</sup> con el incremento de la concentración de AX.

En primer lugar, se preparó una solución madre de ABTS 7 mM en buffer fosfato salino (PBS) 5 mM (pH 7,4). Para la generación del radical ABTS<sup>•+</sup> se tomó un volumen de la solución madre y se agregó un volumen de solución de persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 61,25 mM preparada

en buffer PBS 5 mM (pH 7,4), de manera de lograr una concentración final de  $K_2S_2O_8$  de 2,45 mM. La mezcla se incubó en oscuridad durante 12-16 h para la generación del radical. Tras dicho período, se preparó una solución de trabajo para lo cual la solución del radical  $ABTS^{+}$  se diluyó en metanol de manera de obtener una absorbancia de aproximadamente 0,75 a 734 nm.

Para determinar la AAO de las muestras, se pesaron aproximadamente 0,15 g de cada aceite los cuales se diluyeron en 1 mL de acetato de etilo. Un pequeño volumen de la solución obtenida para cada aceite se agregó a 1425  $\mu$ L de la solución de trabajo de  $ABTS^{+}$ . Las muestras se agitaron en vortex y se dejaron reaccionar durante 7 min en oscuridad. Luego de la reacción, se determinó la absorbancia de las muestras a 734 nm. Se realizó a su vez un blanco de reactivo siguiendo el mismo procedimiento, pero sin el agregado de muestra. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado y los resultados se reportaron como la media  $\pm$  desvío estándar. La AAO se expresó como actividad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC), que representa los micromoles de Trolox que poseen la misma AAO que un gramo de aceite. Para ello se realizó en forma previa una curva de calibrado con Trolox y el valor de TEAC se calculó mediante las ecuaciones 1 y 2:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_{BR} - A_M}{A_{BR}} \times 100 \quad (1)$$

donde  $A_{BR}$  es la absorbancia del blanco de reactivo y  $A_M$  es la absorbancia de la muestra.

$$TEAC = \frac{\% \text{ Inhibición} + o}{n} \quad (2)$$

donde  $o$  y  $n$  son la ordenada al origen y la pendiente de la curva de calibrado de Trolox, respectivamente.

### 1.3.5. Almacenamiento de los aceites

Para evaluar la estabilidad de los aceites, los mismos se almacenaron a 25°C (durante 35 y 30 días para CO y FO, respectivamente), 45°C (durante 16 días) y 65°C (durante 4 días). En todos los casos, las muestras se mantuvieron dentro de una cámara con una solución saturada de NaBr de manera de asegurar una humedad del 57,8%, 51,95% y 49,49% a 25°C, 45°C y 65°C, respectivamente. Para evaluar la estabilidad de los compuestos bioactivos, se determinó el

contenido de AX y  $\omega$ -3 en los aceites a diferentes intervalos de tiempo. Para evaluar la estabilidad oxidativa de los aceites se determinaron productos primarios y secundarios de la oxidación lipídica durante el almacenamiento de los aceites.

### 1.3.6. Determinación del contenido de $\omega$ -3 mediante cromatografía gaseosa

En primer lugar, se prepararon los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMEs) mediante transesterificación en frío con una solución metanólica de hidróxido potásico (KOH), siguiendo la metodología ISO (2002) con algunas modificaciones. Para ello, se pesaron 0,02 g de aceite y se les agregaron 3 mL de hexano. Las muestras se agitaron con vortex para disolver el aceite y a continuación se agregaron 0,5 mL de una solución metanólica de KOH 2M. Las muestras se agitaron nuevamente con vortex durante 30 s y luego se centrifugaron a 1120 g durante 3 min. Finalmente, se tomó una alícuota del sobrenadante para la determinación de los ácidos grasos.

Los FAMEs obtenidos fueron analizados utilizando un cromatógrafo de gases CLARUS 600 (Perkin-Elmer, Massachusetts, Estados Unidos) equipado con un detector FID y una columna DB-5MS (50 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) de Agilent (Santa Clara, Estados Unidos). Se utilizó un volumen de inyección de 1  $\mu$ L a una relación de split 20:1. El gas transportador utilizado fue N<sub>2</sub> con un flujo de 1,5 mL/min. La temperatura inicial del horno fue de 100°C y se mantuvo durante 2 min. Luego se incrementó a 280°C (a 10°C/min) y se mantuvo a esta temperatura durante 5 min. Las temperaturas del inyector y detector fueron establecidas en 280°C y 300°C, respectivamente. Las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados se reportaron como la media  $\pm$  desvío estándar. La identificación de los ácidos grasos (ALA, EPA y DHA) fue realizada mediante la comparación con el tiempo de retención de los estándares de los ésteres metílicos y cuantificados a partir de curvas de calibrado realizadas con dichos estándares.

### 1.3.7. Determinación del contenido de AX

La concentración de AX se determinó mediante espectrofotometría derivativa de primer orden (Liu et al., 2011). El extracto obtenido a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis* contiene además de AX, otros pigmentos como  $\beta$ -caroteno y clorofila. Por ello, cuando se determina el contenido de AX mediante espectrofotometría es necesario tener en cuenta la superposición de los espectros de absorción que se genera debido a la coexistencia de estos pigmentos. Cuando se utiliza la espectrofotometría derivativa de primer orden, la absorbancia se correlaciona con la concentración de AX mediante la ecuación 3:

$$dA/d\lambda \sim c \quad (3)$$

donde  $A$  es la absorbancia,  $\lambda$  es la longitud de onda y  $c$  es la concentración de AX.

Se analiza la  $dA/d\lambda$  en la región de los 432 nm, dado que en la misma la interferencia del  $\beta$ -caroteno y la clorofila es mínima. Para poder cuantificar el contenido de AX, se realizó previamente una curva de calibrado con un estándar de AX en el cual se graficó el valor de  $dA/d\lambda$  a 432 nm en función de la concentración de AX.

Para determinar el contenido de AX en las muestras, se pesaron aproximadamente 0,15 g de cada aceite, los cuales se diluyeron posteriormente en 1 mL de acetato de etilo. A continuación, se tomó un volumen de la solución obtenida y se agregó un volumen equivalente de etanol. Finalmente, se realizó un barrido espectrofotométrico de las muestras obtenidas en un rango de 400-700 nm y se calculó el valor de la pendiente a 432 nm. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado y los resultados se reportaron como la media  $\pm$  desvío estándar. La concentración de AX en las muestras se calculó mediante la curva de calibrado realizada previamente con un estándar de AX y se expresó como  $\mu\text{g}$  de AX por g de aceite.

### 1.3.8. Determinación de productos de la oxidación lipídica

#### 1.3.8.1. Determinación de productos primarios de oxidación lipídica

La oxidación lipídica genera una formación continua de hidroperóxidos. Estos compuestos son los productos primarios de dicha oxidación y por lo tanto el índice de peróxido (IP) es un indicador de las etapas iniciales de degradación de los aceites. Uno de los métodos más reconocidos para determinar hidroperóxidos en aceites es el método colorimétrico, basado en la formación de complejos con el ion férrico. Dicho método se basa en la oxidación del ion ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) a férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ), el cual tiene la habilidad de formar un complejo con el  $\text{NH}_4\text{SCN}$ , que puede ser determinado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 510 nm. Este método es simple, reproducible y sensible, y ha sido utilizado para medir la oxidación lipídica en productos lácteos, grasas, aceites y liposomas (Shahidi & Zhong, 2005). Mediante curvas de calibrado realizadas con el ion  $\text{Fe}^{+3}$ , es posible determinar la cantidad de hierro que ha sido oxidado como consecuencia de los peróxidos presentes en el aceite y por lo tanto, la cantidad de peróxidos en el mismo.

Los productos primarios de oxidación lipídica se cuantificaron a partir del IP, siguiendo el protocolo de Shanta & Decker (1994) con algunas modificaciones. Para ello, inicialmente se pesaron aproximadamente 0,15 g de cada aceite, los cuales se diluyeron en 1 mL de acetato de etilo. Un pequeño volumen de la solución obtenida para cada aceite se agregó a 2,8 mL de una mezcla de metanol/butanol (2:1). Las muestras se agitaron en vortex durante unos segundos. Se añadieron 15  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{SCN}$  y 15  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_2$ , las muestras se agitaron en vortex unos segundos

y se dejaron reaccionar durante 5 min en oscuridad. Finalmente, se midió la absorbancia a 510 nm contra la mezcla de metanol/butanol. Además, se realizó un blanco de reactivo siguiendo el mismo procedimiento, pero sin el agregado de la muestra de aceite, y un blanco de muestra para los aceites con AX, para los cuales se agregó la solución de aceite en acetato de etilo en la mezcla metanol/butanol (2:1). Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado y los resultados se reportaron como la media  $\pm$  desvío estándar. Para determinar el valor de IP, se realizó previamente una curva de calibrado de absorbancia en función de la masa de  $\text{Fe}^{+3}$ . El valor de IP se expresó como mEq de peróxido por Kg de aceite y se calculó mediante la ecuación 4:

$$IP = \frac{A_M - (A_{BR} + A_{BM})/n}{55,84 \times m \times 2} \quad (4)$$

donde  $A_M$  es la absorbancia de la muestra,  $A_{BR}$  es la absorbancia del blanco de reactivo,  $A_{BM}$  es la absorbancia del blanco de muestra,  $n$  es la pendiente de la curva de calibrado,  $m$  es la masa en gramos de aceite utilizado, 55,84 es el peso atómico del hierro (g/mol), y 2 es un factor necesario para expresar el resultado como peróxidos.

### 1.3.8.2. Determinación de productos secundarios de oxidación lipídica

Durante la oxidación lipídica, la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados da lugar a la formación compuestos primarios de oxidación, los cuales se descomponen generando compuestos de oxidación secundarios, como el malondialdehído (MDA). El MDA reacciona con el TBA formando un compuesto coloreado, el cual puede ser determinado espectrofotométricamente y presenta un máximo de absorción en el rango de longitudes de onda de 530-535 nm ([Shahidi & Zhong, 2005](#)).

Los productos secundarios de la oxidación lipídica se determinaron a partir del índice de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) siguiendo el protocolo de [McDonald & Hultin \(1987\)](#), con algunas modificaciones. Para ello, inicialmente se pesaron aproximadamente 0,15 g de cada aceite los cuales se diluyeron en 1 mL de acetato de etilo. Un pequeño volumen de la solución obtenida para cada aceite se agregó a 2 mL de solución TBA (15% p/v TCA, 0,375% p/v TBA en 0,25M HCl + 3 mL de BHT). Las muestras se llevaron a un baño en ebullición durante 15 min y tras el período de reacción se enfriaron a temperatura ambiente en un baño de hielo. Se centrifugaron a 2786  $\times$ g durante 15 min a temperatura ambiente y finalmente se determinó la absorbancia de las muestras a 532 nm. Se realizó a su vez un blanco de reactivo siguiendo el mismo procedimiento, pero sin agregado de muestra. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado y los resultados se reportaron como la media  $\pm$  desvío estándar. Para

determinar el valor de MDA se realizó previamente una curva de calibrado utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) como reactivo estándar. Los resultados se expresaron como mmol de MDA por Kg aceite y se calcularon mediante las ecuaciones 5 y 6:

$$C = \frac{A_M}{n \times p_o} \quad (5)$$

$$\text{mmol/Kg aceite} = \frac{C}{m \times FD \times 10^6} \quad (6)$$

donde  $A_M$  es la absorbancia de la muestra,  $n$  es la pendiente de la curva de calibrado,  $p_o$  es el paso óptico de la celda (cm),  $m$  es la masa de aceite utilizada (mg), FD es el factor de dilución utilizado y  $10^6$  resulta necesario para expresar los resultados como mmol/Kg.

### 1.3.9. Análisis estadístico de los datos

Se aplicó un Análisis de Varianza (ANOVA) para la comparación de los datos obtenidos, utilizando un nivel de confianza del 95%. Se aplicaron Pruebas de Rangos Múltiples para identificar diferencias estadísticamente significativas, mediante el uso del Test de Fischer (LSD) con un nivel de confianza del 95%. Los análisis se realizaron mediante el uso del programa Statgraphics (Statgraphics Inc., Rockville, MD, Estados Unidos).

## 1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

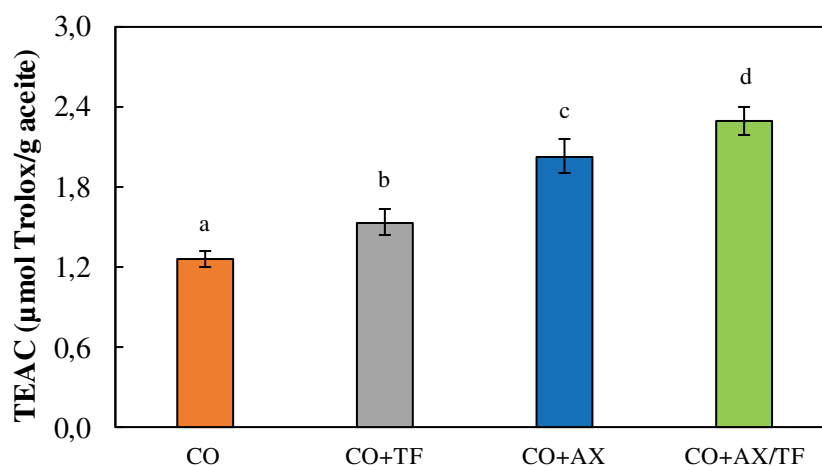
### 1.4.1. Aceite de chía

#### 1.4.1.1. Actividad antioxidante

En la **Figura 7**, se muestran los valores de TEAC correspondiente a cada aceite analizado (un mayor valor de TEAC corresponde a una mayor AAO). El valor de TEAC para el aceite de chía sin antioxidantes exógenos agregados (CO) fue de  $1,26 \pm 0,06$   $\mu\text{mol Trolox/g}$  aceite. Dicho valor se debe posiblemente a la presencia de compuestos antioxidantes presentes naturalmente en aceites de origen vegetal prensados en frío (Dąbrowski et al., 2018; Grajzer et al., 2020). Valores similares de TEAC ( $1,00 \pm 0,07$  y  $1,58 \pm 0,17$ ), determinados mediante otras técnicas de AAO, fueron reportados para aceite de lino, otro aceite vegetal con alto contenido de ALA (Prescha et al., 2014; Tuberoso et al., 2007). La incorporación de  $\alpha$ -TF y de AX incrementó de manera



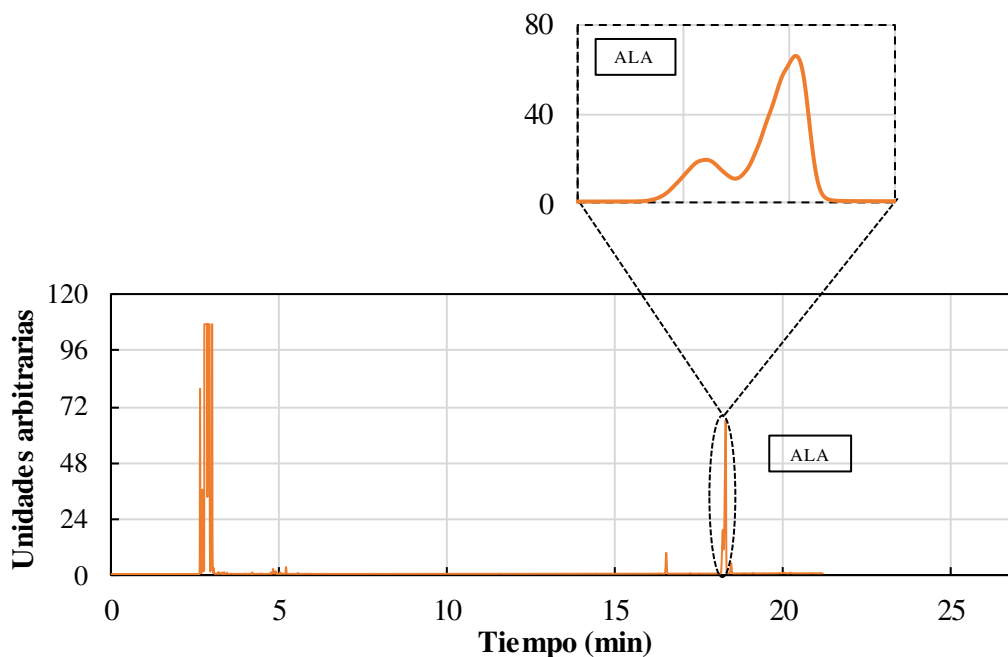
significativa la AAO del aceite de chía ( $p < 0,05$ ), siendo los valores de TEAC en CO+TF y CO+AX de  $1,53 \pm 0,10$  y  $2,03 \pm 0,13$   $\mu\text{mol Trolox/g aceite}$ , respectivamente. El aceite de chía adicionado con ambos antioxidantes (TF y AX) mostró el mayor valor de TEAC ( $2,29 \pm 0,11$   $\mu\text{mol Trolox/g aceite}$ ), indicando una mayor AAO de dicho aceite, siendo el efecto de la adición de AX y TF aditivo.



**Figura 7.** Valores iniciales de TEAC para los diferentes aceites de chía. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

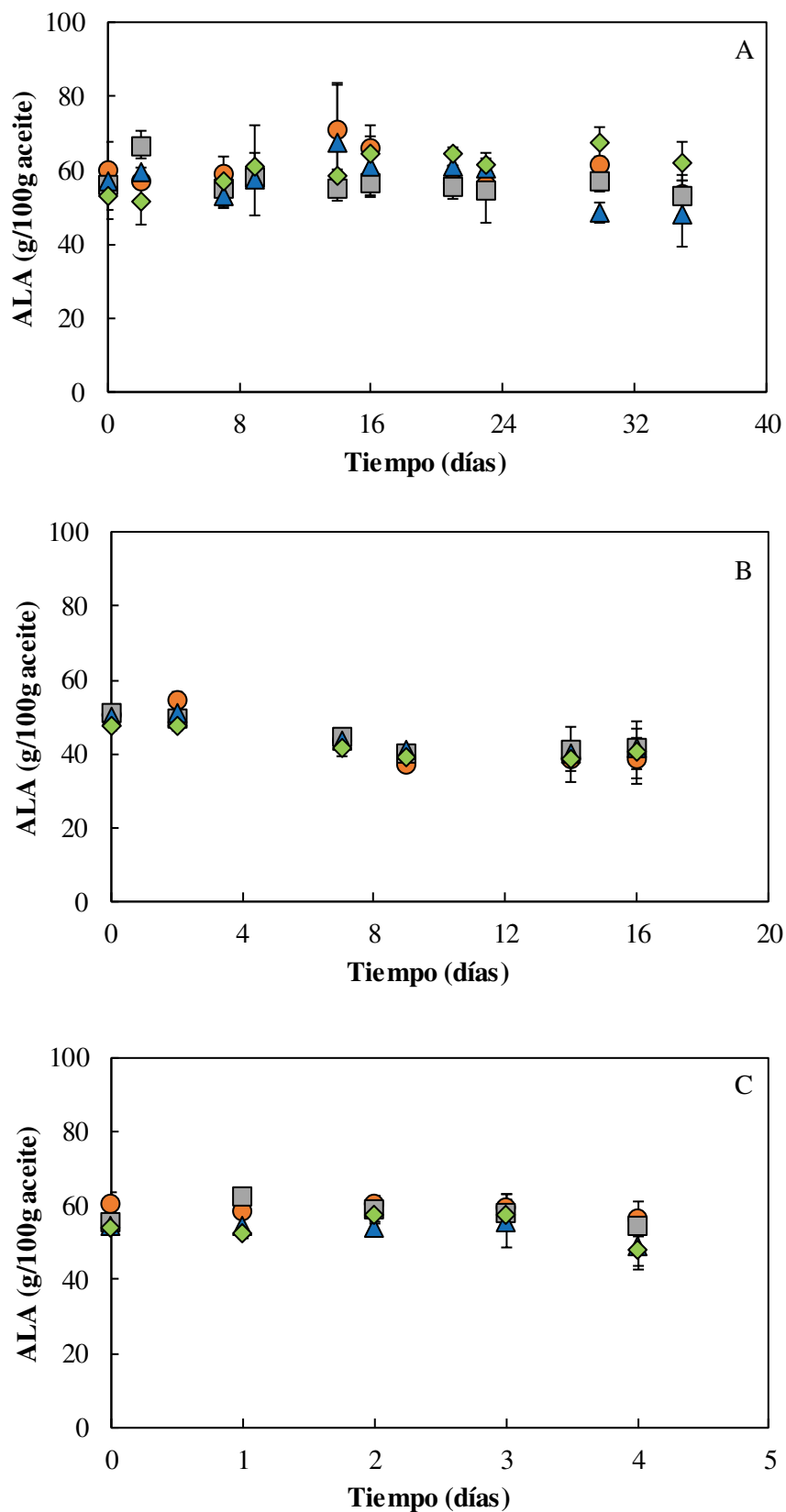
#### 1.4.1.2. Contenido de $\omega$ -3 durante el almacenamiento

En la **Figura 8**, se muestra un cromatograma representativo de los ácidos grasos presentes en el aceite de chía. El contenido inicial de ALA en el aceite de chía fue del  $54,19 \pm 4,08\%$ . Valores similares de ALA en aceite de chía prensado en frío fueron reportados por otros autores (Julio et al., 2016; Bodoira et al., 2017).



**Figura 8.** Cromatograma representativo de los ácidos grasos presentes en el aceite de chía a tiempo inicial.

Por otra parte, se analizó la evolución del contenido de ALA durante el almacenamiento de los aceites a 25°C, 45°C y 65°C (**Figura 9**). En el caso de los aceites almacenados a 25°C (**Figura 9A**), no se observó una variación significativa del contenido de ALA durante el almacenamiento para ninguna de las muestras evaluadas ( $p > 0,05$ ). A 45°C (**Figura 9B**), se pudo observar una disminución significativa en el contenido de ALA luego de 2 días de almacenamiento, no obstante, luego de dicha disminución el contenido de ALA se mantuvo constante durante el resto del período evaluado. En los aceites almacenados a 65°C (**Figura 9C**), si bien el análisis ANOVA mostró un efecto significativo del tipo de aceite y tiempo de almacenamiento ( $p < 0,05$ ), del análisis de los perfiles correspondientes se observa que no se produjeron importantes variaciones en el contenido de ALA durante el almacenamiento para ninguno de los aceites evaluados. En el Anexo (**Tablas A1-A3**), se muestran los valores promedios y sus desviaciones estándares correspondientes al contenido de ALA en las distintas muestras evaluadas.



**Figura 9.** Contenido de ALA durante el almacenamiento de los aceites de chía a 25°C (A), 45°C (B) y 65°C (C). CO (-●-); CO+TF (-■-); CO+AX (-▲-); CO+AX/TF (-◆-).

### 1.4.1.3. Contenido de AX durante el almacenamiento

En la **Figura 10**, se muestra el contenido de AX durante el almacenamiento de los aceites a 25°C, 45°C y 65°C. El contenido de AX en el aceite de chía adicionado con AX (CO+AX) no varió durante los primeros 10 días del almacenamiento a 25°C ( $p>0,05$ ). Luego de este período, la tasa de degradación de AX se incrementó y al final del almacenamiento (35 días) fue del 26% respecto del contenido inicial (**Figura 10A**). La temperatura de almacenamiento afectó la estabilidad de AX en los aceites y su degradación fue mayor a 45°C y 65°C. La degradación de AX en CO+AX luego de 4 días de almacenamiento a 65°C fue del 77%, mientras que luego de 16 días de almacenamiento a 45°C se degradó totalmente (**Figuras 10B y 10C**).

En relación al efecto del agregado de  $\alpha$ -TF, el comportamiento de CO+AX/TF fue similar a CO+AX durante los primeros 10 días de almacenamiento a 25°C, donde el contenido de AX se mantuvo constante ( $p>0,05$ ). Tras este período, el contenido de AX comenzó a disminuir, observándose una tasa de degradación del 46% a los 35 días de almacenamiento (**Figura 10A**). Como se puede observar, el contenido de AX al final del almacenamiento fue significativamente menor en el aceite adicionado con  $\alpha$ -TF ( $p<0,05$ ). Si bien la incorporación de  $\alpha$ -TF en nanodispersiones de AX y en sistemas nanoestructurados basados en lípidos ha demostrado incrementar la estabilidad de AX ([Anarjan et al., 2013](#); [Tamjidi et al., 2014](#)), las diferencias en la composición de la matriz de estudio podrían explicar lo observado en el presente trabajo. Finalmente, durante el almacenamiento a 45°C y 65°C (**Figuras 10B y 10C**), no se observaron diferencias significativas en la degradación de AX entre CO+AX y CO+AX/TF ( $p>0,05$ ). En el Anexo (**Tablas A4-A6**), se muestran los valores promedios y sus desviaciones estándares correspondientes al contenido de AX en las distintas muestras evaluadas.

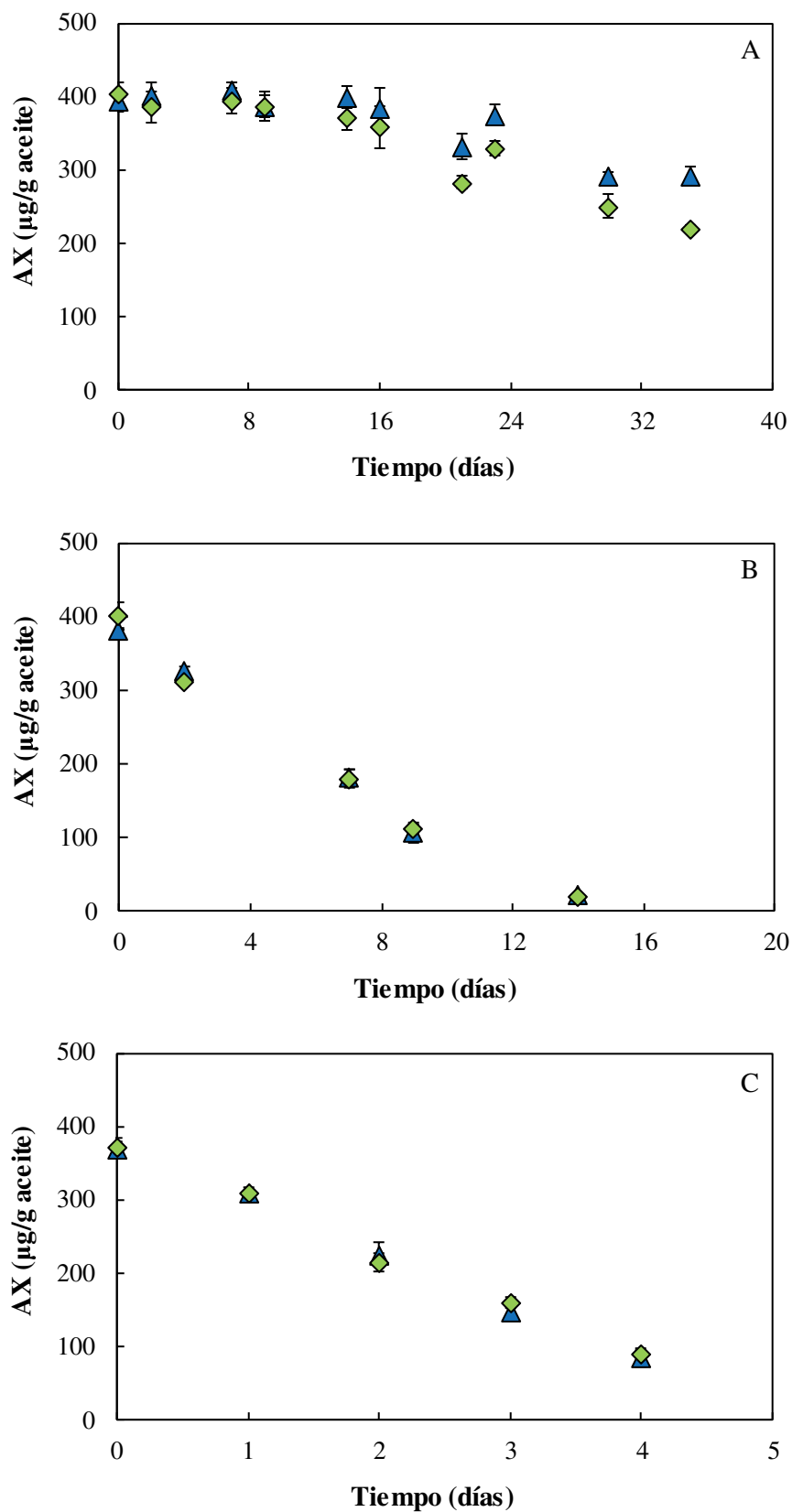


Figura 10. Estabilidad de AX a 25°C (A), 45°C (B) y 65°C (C). CO+AX (-▲-); CO+AX/TF (-◆-).

#### 1.4.1.4. Oxidación lipídica

Durante las primeras fases de la oxidación lipídica, la misma procede lentamente hasta cierto período de tiempo en el cual se produce un cambio repentino en la velocidad del proceso, lo cual se conoce como tiempo o período de inducción. En la **Figura 11**, se muestran los valores de IP para los distintos aceites almacenados a 25°C, 45°C y 65°C. En los aceites almacenados a 25°C (**Figura 11A**) se pudo observar un período de inducción, cuya extensión varió para los distintos aceites. En el aceite de chía puro (CO), se observó un período de inducción de 14 días, luego del cual el contenido de peróxidos se incrementó levemente. En el caso de los aceites con antioxidantes adicionados (CO+TF; CO+AX y CO+AX/TF) el período de inducción fue menor y el contenido de peróxidos se incrementó en forma significativa respecto del contenido inicial a partir de los 2 días de almacenamiento ( $p < 0,05$ ). La adición de AX y  $\alpha$ -TF, tanto en forma individual como conjunta, generó un efecto prooxidante sobre el aceite de chía almacenado a 25°C ( $p < 0,05$ ). No obstante, dicho efecto prooxidante fue significativamente menor para CO+AX en comparación con CO+TF y CO+TF/AX. Los aceites almacenados a 45°C y 65°C (**Figuras 11B y 11C**) no mostraron un período de inducción, observándose un incremento significativo en el valor de IP ( $p < 0,05$ ) en todas las muestras desde el inicio del almacenamiento. El aceite adicionado con AX (CO+AX) solo mostró un efecto prooxidante a 45°C a partir de los 14 días de almacenamiento, mientras que a 65°C el valor de IP no varió en forma significativa respecto del control (CO) ( $p > 0,05$ ). Los aceites adicionados con  $\alpha$ -TF (CO+TF y CO+AX/TF), mostraron un efecto prooxidante durante de todo el período de almacenamiento (tanto a 45°C como a 65°C). Sin embargo, la diferencia en el valor de IP respecto del control (CO) fue menor que la observada a 25°C. La reducción del efecto prooxidante a altas temperaturas puede ser explicada por una menor solubilidad del oxígeno en el aceite bajo estas condiciones, lo cual disminuye la tasa de formación de peróxidos ([Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996](#)).

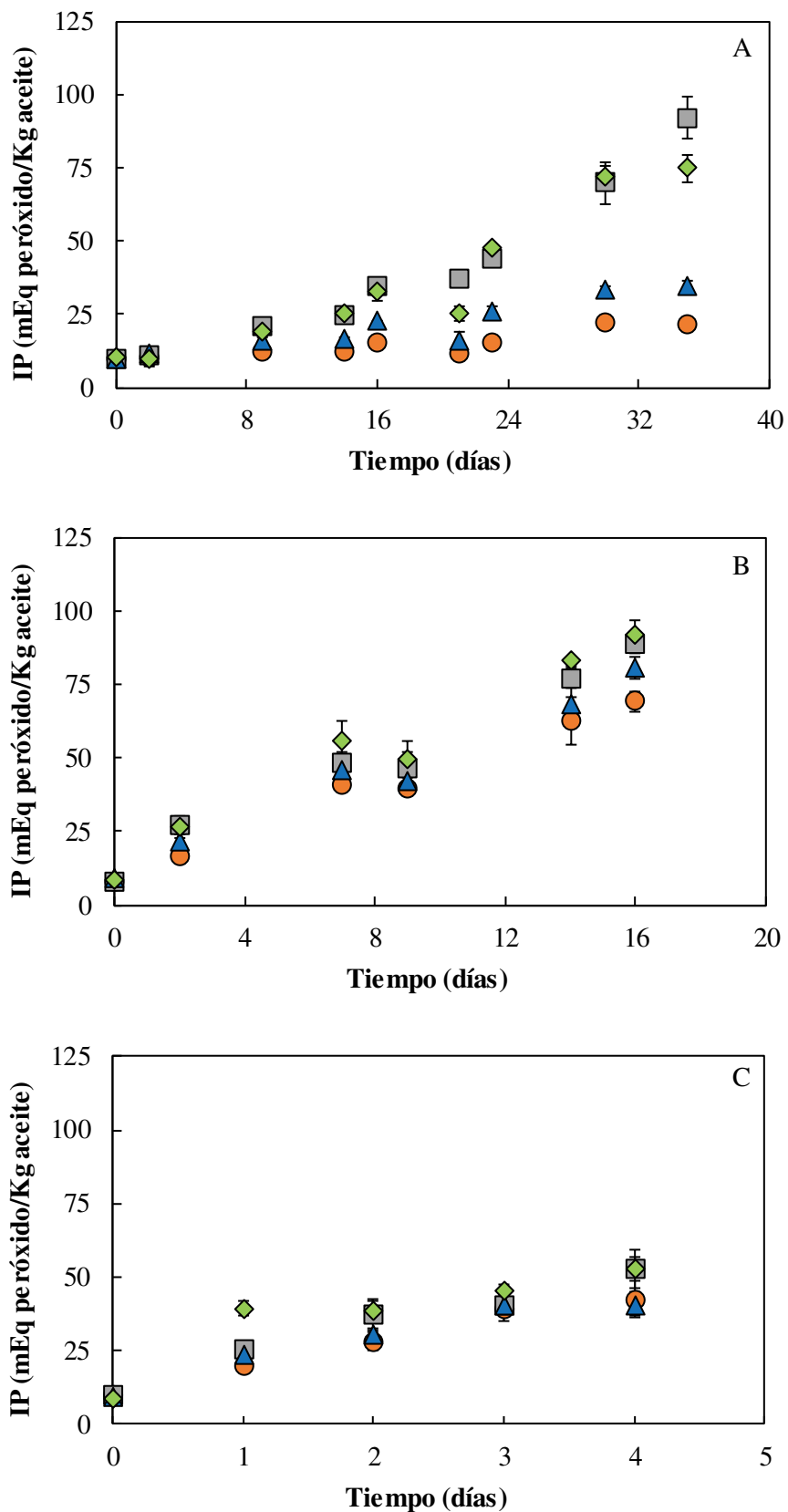
La degradación de los compuestos primarios de oxidación da lugar a compuestos de oxidación secundarios, como el malondialdehído (MDA), los cuales generan olor rancio y alteran organolépticamente al aceite. La formación de MDA en los distintos aceites siguió una tendencia similar a la formación de peróxidos (**Figura 12**). La adición de  $\alpha$ -TF generó una mayor producción de MDA (tanto en CO+TF como CO+AX/TF) en los aceites almacenados a 25°C y 45°C, mientras que a 65°C la formación de MDA no varió en forma significativa en los distintos aceites evaluados ( $p > 0,05$ ). En el Anexo (**Tablas A7-A9**), se muestran los valores promedios y sus desviaciones estándares correspondientes al contenido de IP y MDA en las distintas muestras evaluadas.

La adición de compuestos antioxidantes a matrices alimentarias lipídicas puede retrasar el inicio de la oxidación o disminuir la velocidad de las reacciones implicadas en dicho proceso

(Wanasundara & Shahidi, 2005), y por lo tanto evitar el deterioro en la calidad de los aceites. Mediante el uso de la técnica de ABTS es posible evaluar la habilidad de moléculas antioxidantes de donar un electrón al radical ABTS<sup>•+</sup> y como consecuencia estabilizar dicho radical (Huang et al., 2005). El aceite de chía adicionado con  $\alpha$ -TF y AX (CO+AX/TF) mostró la mayor actividad antirradicalaria y como consecuencia la mayor AAO. Sin embargo, la adición de ambos antioxidantes en forma conjunta generó la mayor oxidación lipídica durante el almacenamiento de los aceites. Aunque el aceite de chía adicionado solo con AX mostró un menor valor de TEAC que aquel adicionado con AX y  $\alpha$ -TF, la formación de compuestos de oxidación lipídica en el mismo fue menor.

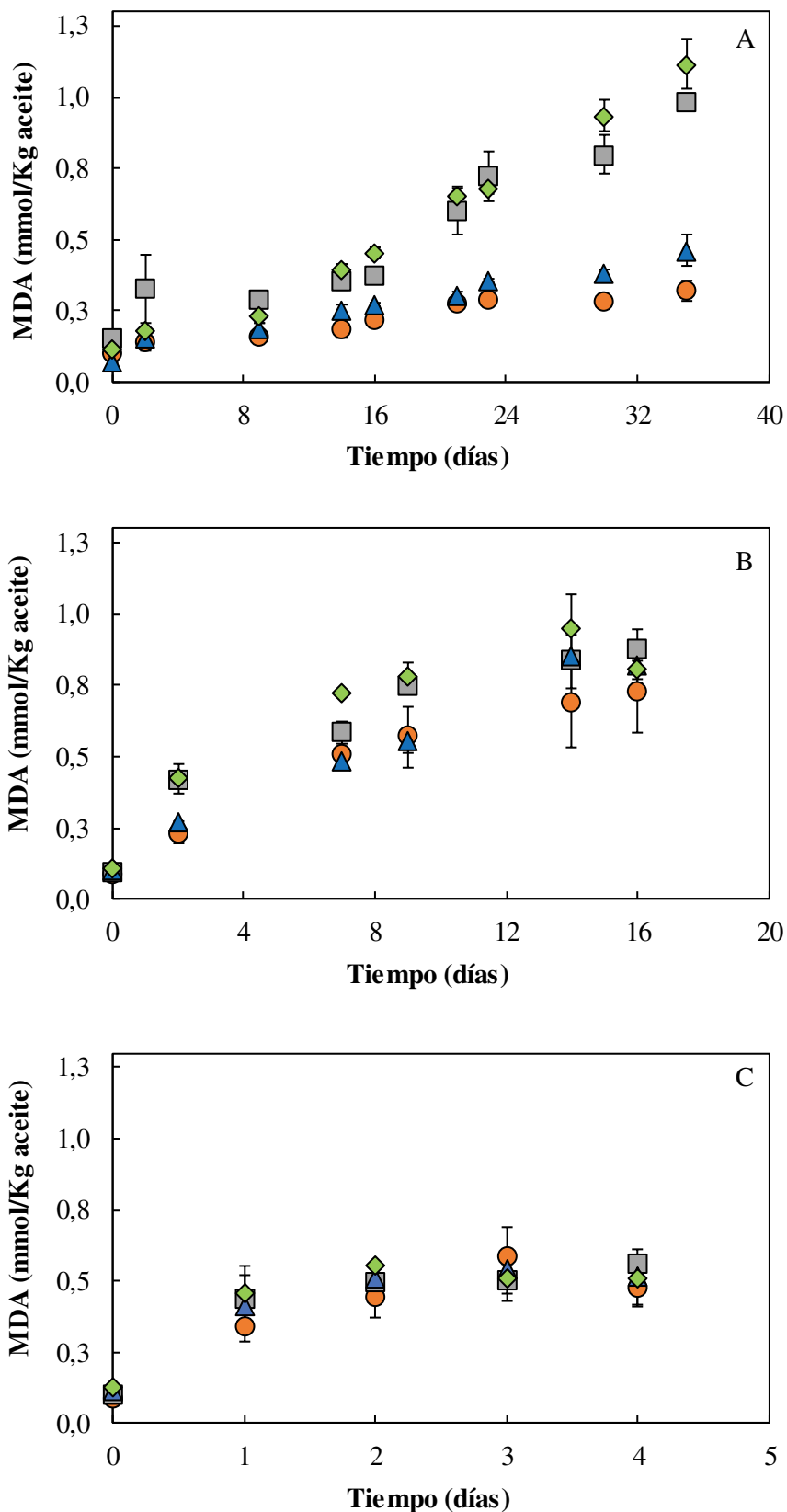
Los ensayos de actividad antirradicalaria son útiles para determinar la actividad antioxidante de compuestos aislados. Sin embargo, esta metodología puede no ser suficiente para predecir el comportamiento antioxidante en matrices alimentarias complejas (Alamed et al., 2009). Por esta razón es importante evaluar la capacidad de las moléculas antioxidantes de retrasar o inhibir la oxidación en matrices alimentarias durante su almacenamiento.

Algunos compuestos reconocidos como potentes antioxidantes han demostrado ejercer efectos prooxidantes bajo determinadas condiciones. El  $\alpha$ -TF ha demostrado a altas concentraciones una inversión en su AAO, pasando de presentar una AAO a ejercer un efecto prooxidante. Kul & Ackman (2001) evaluaron el efecto de la adición de  $\alpha$ -TF en aceite de pescado y observaron una inversión de la actividad antioxidante a concentraciones mayores a 100  $\mu\text{g/g}$  de aceite. Por su parte, Zuta et al. (2007) evaluaron la adición de  $\alpha$ -TF en aceite de caballa y observaron que concentraciones elevadas de este antioxidante (250 y 500  $\mu\text{g/g}$  de aceite) fueron menos efectivas para controlar la oxidación del aceite. Por el contrario, Mohanan et al. (2018) reportaron un efecto prooxidante de  $\alpha$ -TF adicionado a aceite de lino en un rango de concentraciones de 50-400  $\mu\text{g/g}$  de aceite. En el presente trabajo, el  $\alpha$ -TF actuó como prooxidante incluso a bajas concentraciones (100  $\mu\text{g/g}$  de aceite). Es posible que la composición de la matriz del aceite de chía y la presencia de componentes menores hayan sido factores importantes que influyeron en la AAO observada.



**Figura 11.** Evolución de los valores de IP durante el almacenamiento de los aceites de chía a 25°C (A), 45°C (B) y 65°C (C). CO (-●-); CO+TF (-■-); CO+AX (-▲-); CO+AX/TF (-◆-).



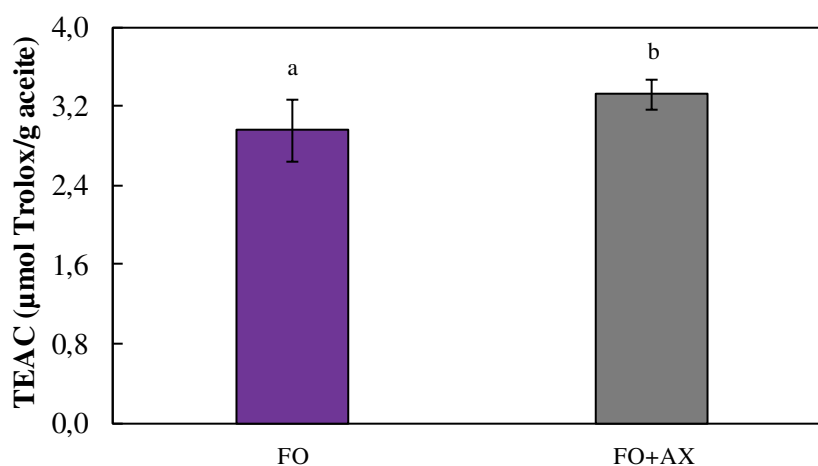


**Figura 12.** Evolución de los valores de MDA durante el almacenamiento de los aceites de chía a 25°C (A), 45°C (B) y 65°C (C). CO (●); CO+TF (■); CO+AX (▲); CO+AX/TF (◆).

## 1.4.2. Aceite de pescado

### 1.4.2.1. Actividad antioxidante

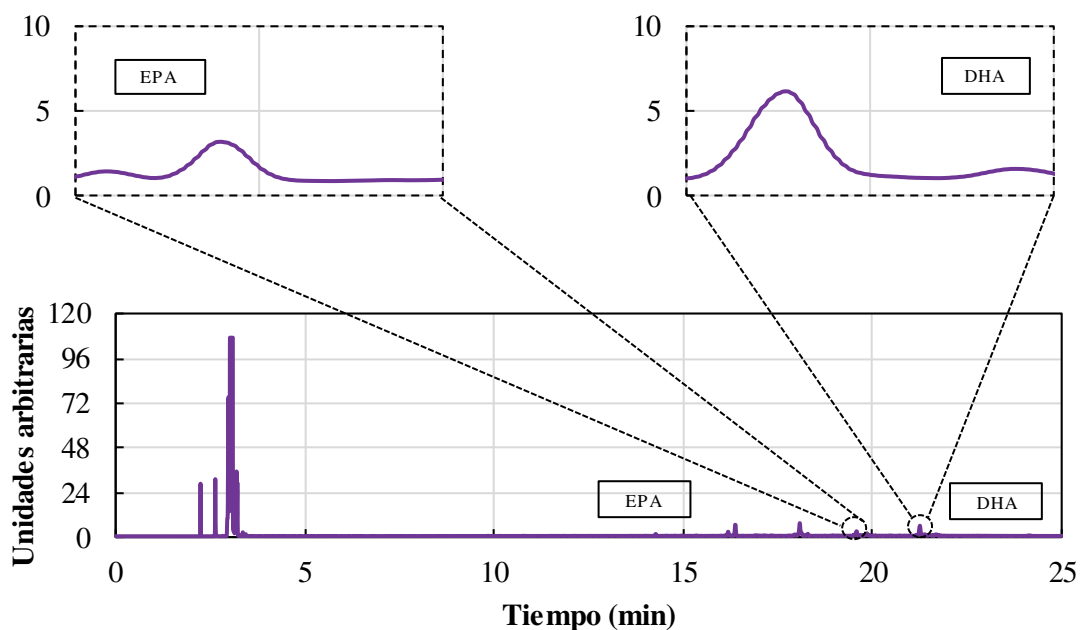
En la **Figura 13**, se muestra el valor de TEAC correspondiente a cada aceite. El aceite de pescado (FO) presentó un valor de TEAC de  $2,96 \pm 0,07$   $\mu\text{mol Trolox/g}$  aceite. Dicho valor se incrementó de manera significativa ( $p < 0,05$ ) con el agregado de AX, siendo de  $3,32 \pm 0,01$   $\mu\text{mol Trolox/g}$  aceite para la muestra FO+AX. El valor de TEAC del aceite de pescado fue mayor que el determinado para el aceite de chía, posiblemente debido a la presencia de antioxidantes exógenos (BHA y TF) en el aceite comercial de pescado. No obstante, el incremento de AX generó un incremento menor de la AAO en FO respecto a CO.



**Figura 13.** Valores iniciales de TEAC para los diferentes aceites de pescado. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

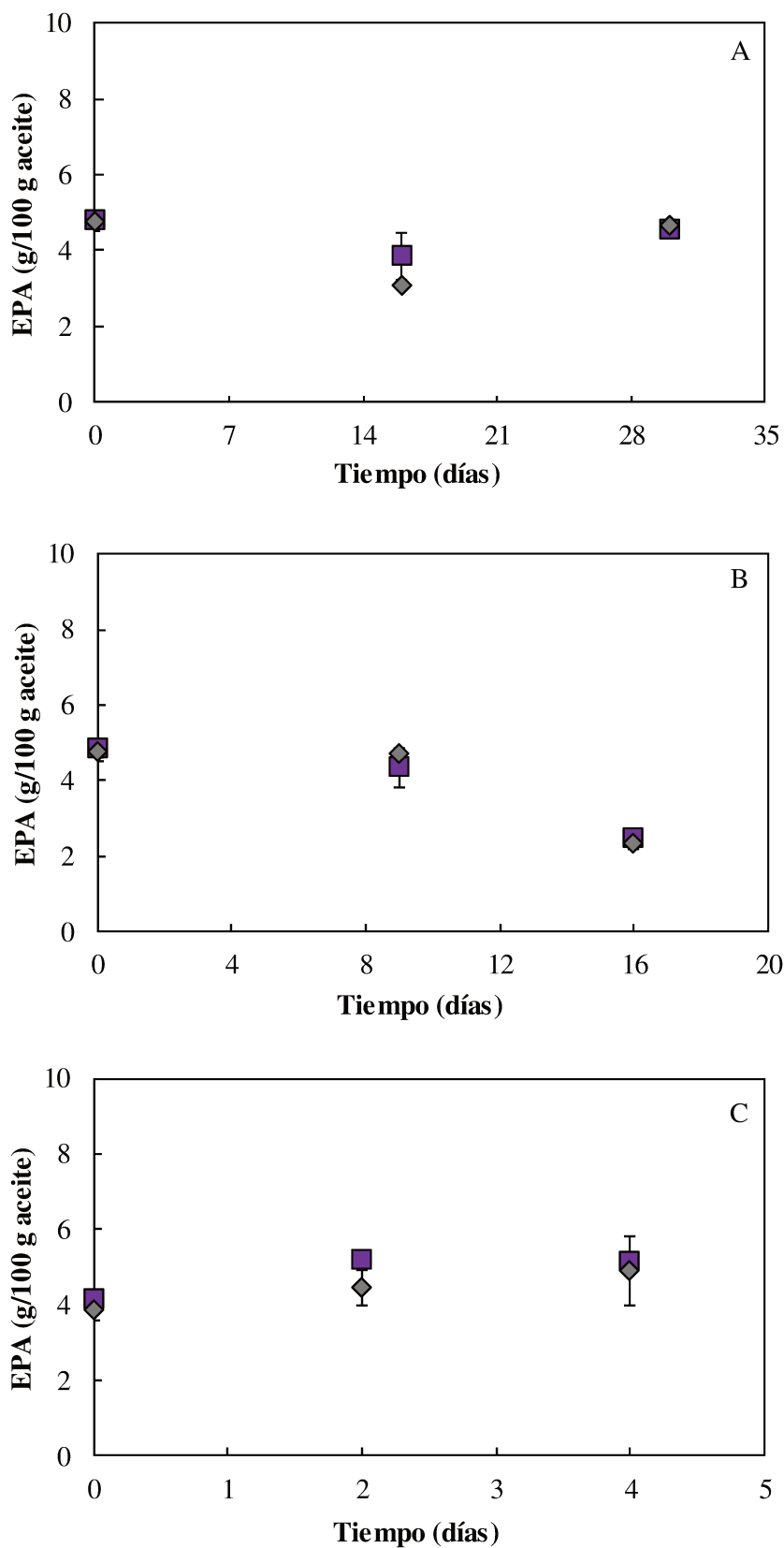
### 1.4.2.2. Contenido de $\omega$ -3 durante el almacenamiento

En la **Figura 14**, se muestra un cromatograma representativo del contenido de ácidos grasos en el aceite de pescado. Los valores iniciales de EPA y DHA en el aceite de pescado fueron de 4,5% y 14,4%, respectivamente. Dichos valores se encuentran en concordancia con lo reportado en la literatura para este tipo de matrices (Saini & Keum, 2018).

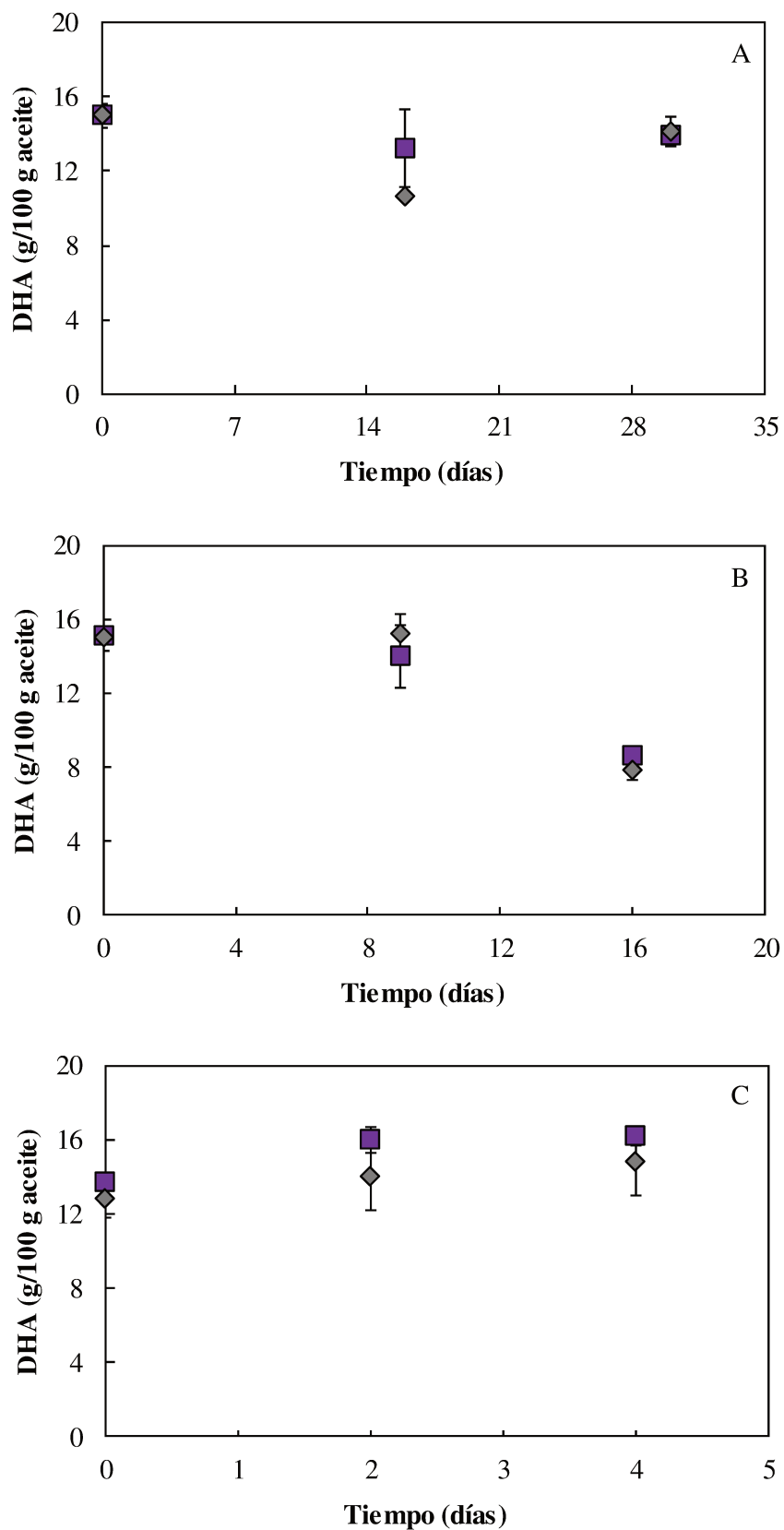


**Figura 14.** Cromatograma representativo de los ácidos grasos presentes en el aceite de pescado a tiempo inicial.

En las **Figuras 15 y 16**, se muestra el contenido de EPA y DHA durante el almacenamiento de los distintos aceites. Durante el almacenamiento a temperatura ambiente (25°C) y a 65°C no se observó una disminución en el contenido de ninguno de los dos ácidos grasos. Por el contrario, a 45°C, se observó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de ambos ácidos grasos a partir de 9 días de almacenamiento. Dicho comportamiento se observó tanto en FO como en FO+AX. En el Anexo (**Tablas A10-A12**), se muestran los valores promedios y sus desviaciones estándares correspondientes al contenido de EPA y DHA en las distintas muestras evaluadas.



**Figura 15.** Contenido de EPA durante el almacenamiento de los aceites de pescado a 25°C (A), 45°C (B) y 65°C (C). FO (-■-); FO+AX (-◆-).



**Figura 16.** Contenido de DHA durante el almacenamiento de los aceites de pescado a 25°C (A), 45°C (B) y 65°C (C). FO (-■-); FO+AX (-◆-).

### 1.4.2.3. Contenido de AX durante el almacenamiento

Para todas las temperaturas evaluadas se observó una disminución en el contenido de AX durante el almacenamiento del aceite, siendo dicha disminución mayor a medida que se incrementó la temperatura (**Figura 17**). Al final del almacenamiento del aceite de pescado a 25°C (30 días), la degradación de AX fue de un 54% (**Figura 17A**), mientras que luego de 16 días a 45°C y 4 días a 65°C, la degradación de AX fue del 83% y 63%, respectivamente (**Figuras 17B y 17C**). Es posible observar que la degradación de AX a 25°C fue mayor en el aceite de pescado respecto al aceite de chía (en un período de tiempo similar, la degradación de AX en CO+AX fue del 26% frente a un 54% observado en FO+AX). La efectividad de los antioxidantes se encuentra influenciada por diferentes factores tales como la temperatura, la presencia de prooxidantes y la presencia de otros antioxidantes ([Mishra et al., 2021](#)). En función de ello, es posible pensar que la presencia de antioxidantes exógenos (BHA y TF) que ya formaban parte del aceite, puede haber generado efecto prooxidante a 25°C, al estar estos en conjunto con la AX. Por otro lado, las diferencias en la composición de ácidos grasos del aceite pueden influir en la estabilidad de AX. En este sentido, [Honda et al. \(2021\)](#) observaron que la degradación de AX incorporada en aceites varió significativamente de acuerdo al tipo de aceite, observando una menor estabilidad de AX en aceites de pescado respecto a aceites de origen vegetal (como soja y maíz). En el Anexo (**Tablas A13-A15**), se muestran los valores promedios y sus desviaciones estándares correspondientes al contenido de AX en las distintas muestras evaluadas.

### 1.4.2.4. Oxidación lipídica

En la **Figura 18**, se muestran los valores de IP para los distintos aceites almacenados a 25°C, 45°C y 65°C. Inicialmente, el aceite de pescado presentó un valor de IP menor a 5 mEq peróxido/Kg de aceite y se observó un incremento significativo de dicho valor durante el almacenamiento de los aceites para todas las temperaturas evaluadas. En los aceites almacenados a 25°C y 45°C (**Figuras 18A y 18B**), se observaron valores de IP significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) para el aceite adicionado con AX (FO+AX). No obstante, a 65°C (**Figura 18C**) no se observó una diferencia significativa en el valor de IP de ambos aceites ( $p > 0,05$ ).

La formación de MDA en los distintos aceites siguió una tendencia similar a la formación de peróxidos (**Figura 19**). La formación de dichos productos secundarios de la oxidación lipídica fue mayor en FO+AX ( $p < 0,05$ ). En el caso de los aceites almacenados a 65°C, a pesar de que el ANOVA mostró un efecto significativo del tipo de aceite sobre el valor de MDA ( $p < 0,05$ ), del análisis de los perfiles obtenidos se puede observar que, al igual que el valor de IP, el valor de MDA resultó similar para ambos aceites en la mayor parte de los tiempos evaluados.

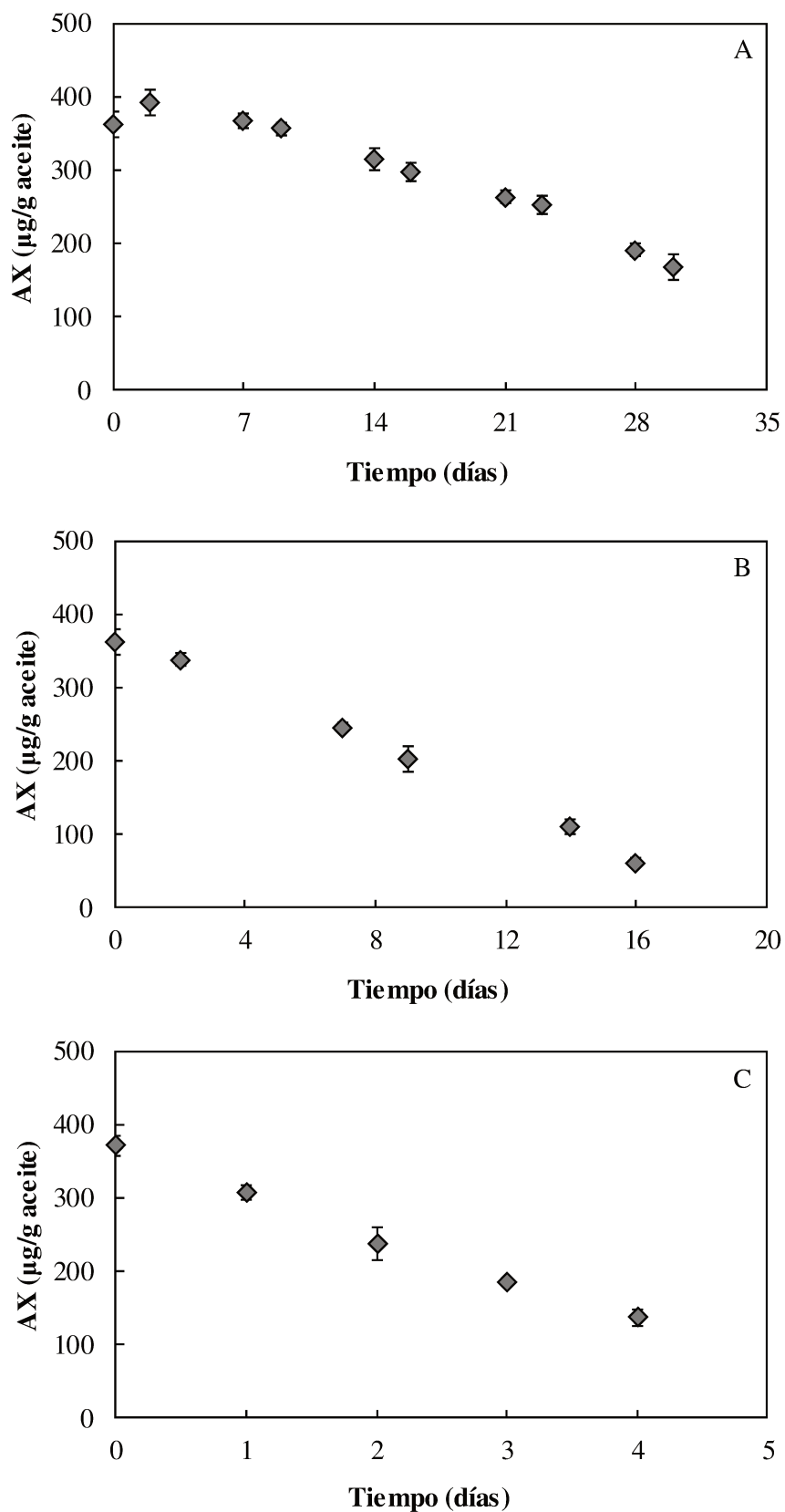


Figura 17. Contenido de AX durante el almacenamiento del aceite FO+AX a 25°C (A), 45°C (B) y 65°C (C).

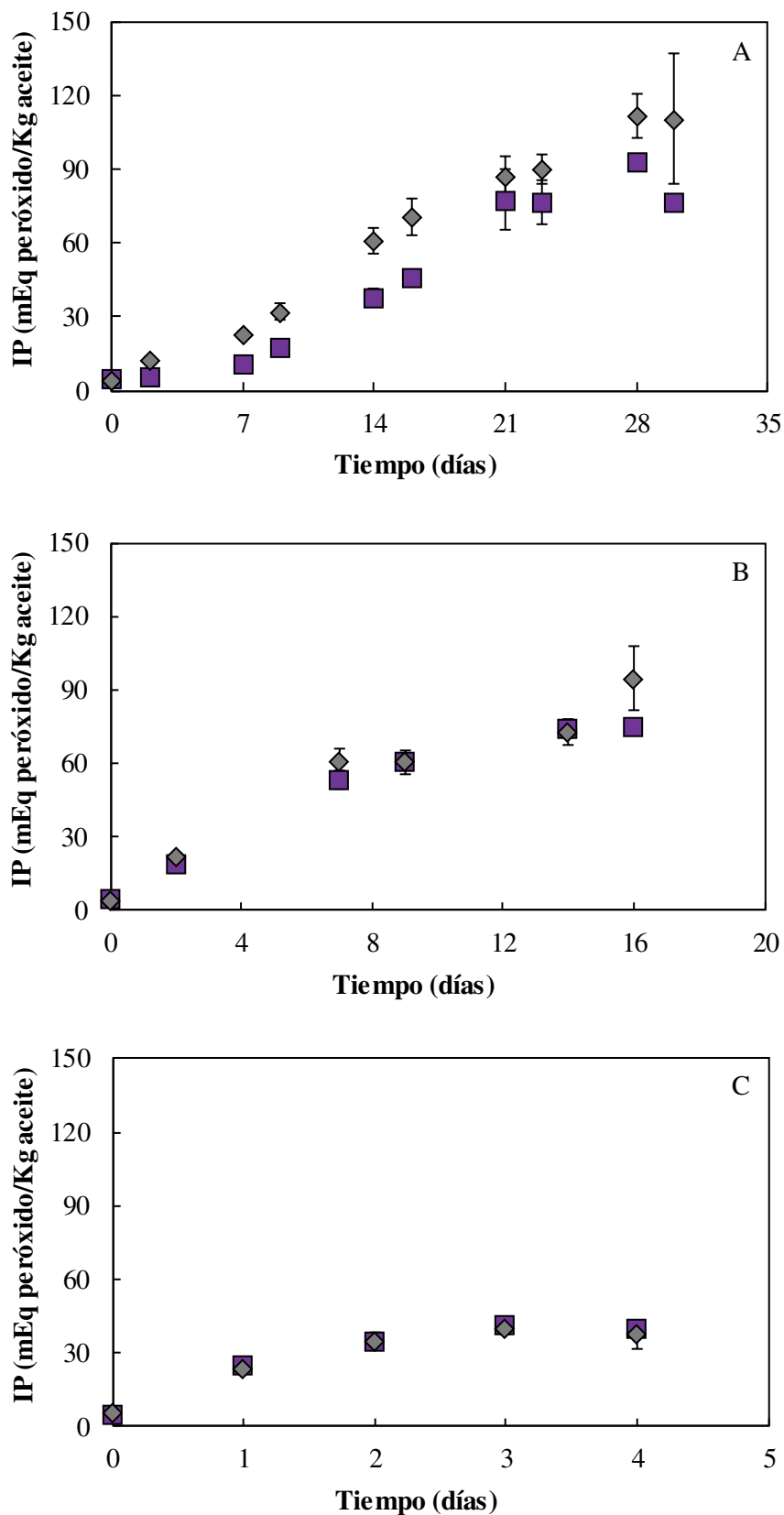


Figura 18. Evolución de los valores de IP durante el almacenamiento de los aceites de pescado a 25°C (A), 45°C (B) y 65°C (C). FO (-■-); FO+AX (-◆-).



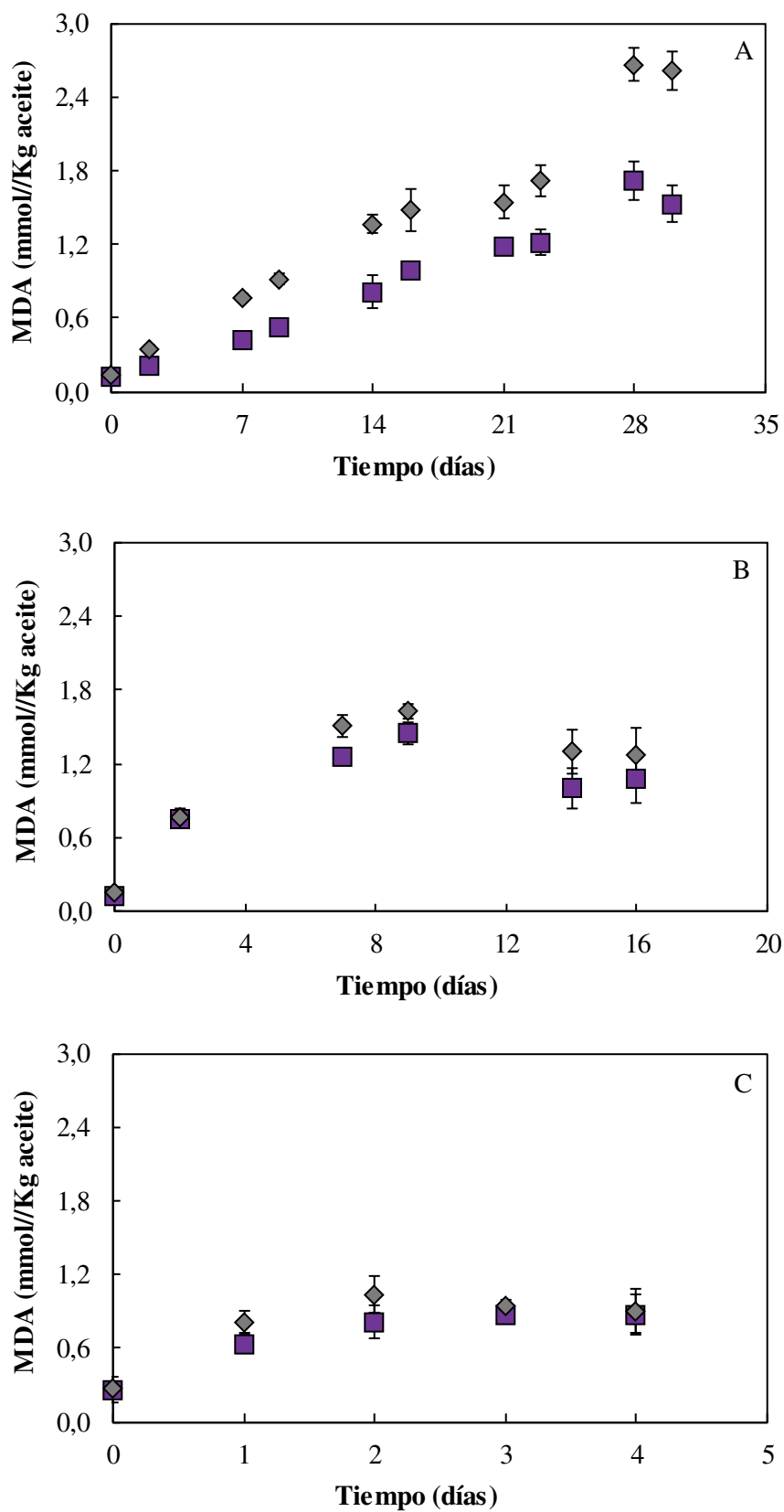


Figura 19. Evolución de los valores de MDA durante el almacenamiento de los aceites de pescado a 25°C (A), 45°C (B) y 65°C (C). FO (-■-); FO+AX (-◆-).

El uso de varias moléculas con AAO en forma simultánea puede generar un efecto sinérgico. Sin embargo, este efecto sinérgico depende de un adecuado balance entre todos los componentes, pudiendo el incremento en la concentración de uno de ellos alterar el balance, reduciendo la capacidad antioxidante de los mismos (Young & Lowe, 2001). En este sentido, al igual que se observó en el aceite de chía, a pesar de la mayor actividad antioxidante presente en el aceite de pescado adicionado con AX, la estabilidad oxidativa del aceite no fue favorecida por la adición de este compuesto. En el Anexo (Tablas A16-A18), se muestran los valores promedios y sus desviaciones estándares correspondientes al contenido de IP y MDA en las distintas muestras evaluadas.

## 1.5. CONCLUSIONES

A pesar de la mayor AAO del aceite de chía adicionado con  $\alpha$ -TF y AX determinada mediante la técnica ABTS, dicho aceite presentó la mayor formación de productos de oxidación lipídica. La molécula de  $\alpha$ -TF generó un efecto prooxidante, incrementando la formación de productos de oxidación. A su vez, la estabilidad de la molécula de AX durante el almacenamiento del aceite no resultó favorecida por el agregado de  $\alpha$ -TF. El mismo fenómeno se observó para el aceite de pescado, donde la adición de AX incrementó la AAO, pero la formación de productos de oxidación lipídica durante el almacenamiento a 25°C y 45°C fue mayor. No obstante, la presencia de antioxidantes exógenos en el aceite de pescado no permite una adecuada evaluación del efecto de la molécula de AX sobre la estabilidad de dicho aceite. A partir de esta caracterización, se seleccionó al aceite de chía adicionado con AX como matriz para continuar con el proceso de encapsulación, dado que dicha matriz mostró la mejor estabilidad de AX y oxidativa, respecto de las otras matrices con AX evaluadas.

# **CAPÍTULO 2**

---

## **OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS MEDIANTE GELIFICACIÓN IÓNICA PARA LA ENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE CHÍA Y ASTAXANTINA**

## CAPÍTULO 2 - OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS MEDIANTE GELIFICACIÓN IÓNICA PARA LA ENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE CHÍA Y ASTAXANTINA

### 2.1. INTRODUCCIÓN

La gelificación iónica mediante el uso de ALG como material de pared es uno de los métodos más utilizados para la encapsulación de compuestos bioactivos. Entre las principales ventajas del uso de este material, se encuentran su biocompatibilidad, biodegradabilidad, ausencia de toxicidad y de inmunogenicidad, características que cobran importancia cuando se formulan partículas para ser aplicadas en alimentos (Bennacef et al., 2021). Además, las condiciones de obtención de geles de ALG resultan ventajosas para la encapsulación de compuestos bioactivos, debido a que el procedimiento se puede realizar a bajas temperaturas y a pH no extremos. Sin embargo, la matriz formada en los geles de ALG es porosa, permeable y degradable (Ramdhan et al., 2020), lo cual puede afectar la estabilidad y la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos incorporados en los mismos.

La formación de geles compuestos mediante la adición de otros biopolímeros como polisacáridos o proteínas puede mejorar las propiedades de las partículas obtenidas, proteger a los compuestos bioactivos incorporados y mejorar sus características de liberación (Bennacef et al., 2021). Dentro de los biopolímeros utilizados para la obtención de geles compuestos se pueden mencionar al quitosano, gelatina, pectina, carragenina, caseína, proteínas de lactosuero, proteínas de soja y almidón (Ramdhan et al., 2020). De acuerdo a las características del biopolímero adicionado y a las condiciones de obtención, se pueden obtener diferentes tipos de geles compuestos, denominados complejos, mixtos y rellenos. En los geles complejos, los biopolímeros utilizados presentan cargas opuestas e interactúan entre sí formando un gel. Dentro de estas categorías se encuentran los geles recubiertos, en los cuales un segundo polímero es utilizado como material de cubierta del gel de ALG primario. En los geles mixtos, tanto el ALG como el biopolímero adicionado forman el gel, pero sin interactuar entre sí (o interactuando solo de manera física). Por último, en los geles rellenos, se adiciona al ALG un polímero que no posee la capacidad de gelificar (Ramdhan et al., 2020).

En la bibliografía se pueden encontrar algunos trabajos que utilizan satisfactoriamente geles compuestos para encapsular compuestos bioactivos, los cuales han demostrado ventajas frente al uso de geles formados solamente por ALG. Por ejemplo, geles compuestos de ALG,  $\kappa$ -carragenina y quitosano mostraron una mejor protección del aceite de jengibre en comparación con aquellos fabricados solo con ALG (Atencio et al., 2020). En esta misma línea, Peniche et al. (2004) reportaron que los geles de ALG recubiertos con quitosano permitían reducir la permeabilidad de las partículas obtenidas y, como consecuencia, reducir la pérdida del aceite encapsulado.

Las proteínas del lactosuero pueden formar geles mediante la interacción con iones  $\text{Ca}^{+2}$  a través de un mecanismo similar a la gelificación iónica del ALG (Wichchukit et al., 2013). Diferentes trabajos han demostrado que las proteínas de lactosuero pueden utilizarse de manera satisfactoria para la encapsulación de compuestos bioactivos (Beaulieu et al., 2002; Hébrard et al., 2013), utilizándose WPI como fuente proteica. Así, el uso de WPC como fuente de proteínas para la formación de WPA y la posterior obtención de geles se encuentra menos reportado. El empleo de esta fuente proteica presenta la ventaja de tener un menor costo asociado, lo cual, como se mencionó en la introducción general, es una de las características que se persigue en la encapsulación de compuestos bioactivos destinados al desarrollo de alimentos.

En este capítulo se evaluó el uso de WPA, obtenido a partir de WPC, en combinación con ALG para la formación de geles compuestos, con el objetivo de encapsular mezclas de aceite de chía y AX. Se analizó el efecto del WPA sobre las características de las partículas y sobre la estabilidad de los compuestos bioactivos encapsulados.

## 2.2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

- ✓ Encapsular aceite de chía y AX en geles de ALG y geles compuestos de ALG y WPA.
- ✓ Evaluar las principales características de las partículas de ALG y ALG-WPA.
- ✓ Evaluar la estabilidad de los compuestos bioactivos encapsulados durante el almacenamiento de las partículas.

## 2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.3.1. Materiales

El alginato de sodio de baja viscosidad fue adquirido en Kelco (Atlanta, Estados Unidos). El concentrado de proteína de lactosuero (LACPRODAN 80) fue adquirido en Arla Foods Ingredientes S.A. (Córdoba, Argentina). El aceite de chía prensado en frío fue adquirido en Sturla S.R.L. (Burzaco, Argentina). La astaxantina natural (AstaZine®) fue provista por Lipomize S.R.L. (Santa Fe, Argentina).

Butilhidroxitolueno (BHT), ácido tiobarbitúrico (TBA) y 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, Estados Unidos). Tiocianato de amonio ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ), ácido tricloroacético (TCA), polisorbato 80 y cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) fueron adquiridos en Cicarelli Laboratorios S.A. (Santa Fe, Argentina). Cloruro de bario dihidratado ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) y cloruro férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) fueron adquiridos en Biopack (Buenos Aires, Argentina).

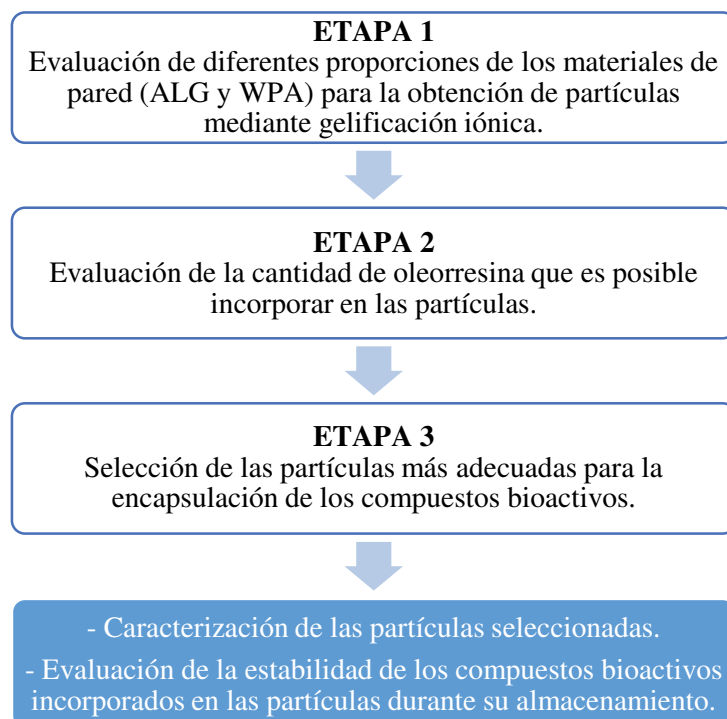
### 2.3.2. Etapas experimentales desarrolladas para la obtención de partículas

Para la obtención de las partículas se desarrollaron las etapas que se muestran en la **Figura 20** y se describen a continuación.

En la primera etapa, se evaluaron diferentes proporciones de los materiales de pared (ALG y WPA) para la obtención de partículas mediante la metodología de gelificación iónica externa, las cuales se detallan en la **Tabla 3**. Estas partículas se obtuvieron sin el agregado de oleorresina. El contenido de proteína incorporada en las partículas se determinó mediante la técnica de Bradford (sección 2.3.5).

En la segunda etapa, se obtuvieron partículas mediante la metodología de gelificación iónica externa a partir de las condiciones seleccionadas en la etapa anterior y se evaluó la cantidad de oleorresina que era posible incorporar en cada formulación. Para esto se evaluaron 3 relaciones material de pared:oleorresina (p/p) (**Tabla 4**). Para seleccionar las partículas más adecuadas para continuar en la siguiente etapa, se determinó la eficiencia de encapsulación (EE) (sección 2.3.7) de AX.

En la tercera etapa, se prepararon partículas a partir de las proporciones de materiales de pared y concentración de oleorresina definidas las etapas anteriores. Las partículas obtenidas se caracterizaron mediante diferentes parámetros (secciones 2.3.8 a 2.3.12) y se evaluó la estabilidad de los compuestos bioactivos encapsulados durante el almacenamiento (sección 2.3.13).



**Figura 20.** Esquema de las etapas experimentales desarrolladas para la obtención de partículas.

**Tabla 3.** Porcentajes de los materiales de pared (WPA y ALG) expresados como g de material en 100 g totales.

Formulación	Material de pared (% p/p)	
	WPA	ALG
25WPA75ALG	25	75
50WPA50ALG	50	50
75WPA25ALG	75	25
100WPA	100	-
100ALG	-	100

**Tabla 4.** Formulaciones evaluadas con diferente contenido de oleorresina.

Formulación	Relación másica del material de pared:oleorresina
100ALG	4:1
	2,6:1
	2:1
25WPA75ALG	4:1
	2,6:1
	2:1
50WPA50ALG	4:1
	2,6:1
	2:1

### 2.3.3. Preparación de las soluciones

#### 2.3.3.1. Solución de ALG

Se preparó una solución de ALG al 2% p/p, para lo cual se pesaron 2 g de ALG y se dispersaron en la cantidad necesaria de agua ultrapura. La solución se mantuvo bajo agitación constante a 45°C hasta una completa disolución del material.

#### 2.3.3.2. Solución de WPC

Se preparó una solución de WPC al 8% p/p, para lo cual se pesaron 10,75 g de WPC y se dispersaron en la cantidad necesaria de agua ultrapura (el contenido de proteína en el WPC es de 74,4±0,9% p/p). Para favorecer la disolución del WPC, la solución se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente (25°C) hasta una completa disolución del material. La solución obtenida se almacenó en heladera hasta el día siguiente cuando se realizó el tratamiento térmico.

### 2.3.3.3. Tratamiento térmico de la solución de WPC para la obtención de agregados proteicos WPA

El objetivo del tratamiento térmico de la solución de WPC es inducir la desnaturalización y despliegue de las proteínas, y la posterior formación de agregados proteicos que puedan interactuar con el  $\text{Ca}^{+2}$ . La desnaturalización y agregación de las proteínas depende de diferentes factores como la temperatura, el tiempo de calentamiento, el pH, la fuerza iónica y la concentración de proteína en la solución (Niizawa et al., 2021; Ryan et al., 2013). Considerando que la principal proteína presente en el WPC es la  $\beta$ -lactoglobulina, el modelo de desnaturalización y agregación de la misma puede ser utilizado para explicar el comportamiento de las soluciones de WPC sometidas a tratamiento térmico. Cuando la solución es calentada, la estructura proteica se modifica, aumentando su movilidad y exponiendo grupos hidrofóbicos y grupos tioles. A partir de estos últimos se producen interacciones inter e intramoleculares, formando dímeros y trímeros no nativos y otros agregados de bajo peso molecular. Los oligómeros formados pueden reaccionar entre sí mediante interacciones covalentes y no covalentes, formando agregados solubles, los cuales pueden continuar interactuando entre sí, formando agregados de mayor tamaño, geles o precipitados (Nicolai et al., 2011; Ryan et al., 2013). En función de las condiciones del tratamiento, se formarán agregados de diferentes características y propiedades funcionales (Ryan et al., 2013).

Las condiciones del tratamiento térmico utilizadas en el presente estudio (pH de la solución de WPC, temperatura y duración del tratamiento) fueron seleccionadas a partir de trabajos previos realizados por el grupo de investigación (Meza et al., 2020). Dichas condiciones permiten obtener agregados de mayor tamaño con probabilidad de interactuar con iones  $\text{Ca}^{+2}$ . El tratamiento térmico se realizó de la siguiente manera:

- 1) La solución de WPC obtenida el día anterior se retiró de la heladera y se dejó atemperar durante 2 h.
- 2) El pH de la solución se ajustó a 7 con una solución de NaOH 1M.
- 3) 3 mL de la solución se colocaron en tubos de vidrio (10 mm de diámetro y 1 mm de pared), los cuales se taparon y se llevaron a un baño termostático a 80°C durante 30 min.
- 4) Las muestras se enfriaron en un baño de hielo para detener el tratamiento térmico y luego se almacenaron en heladera hasta el día siguiente.

### 2.3.3.4. Solución receptora de $\text{CaCl}_2$

Se preparó una solución de  $\text{CaCl}_2$  250 mM. Para ello se pesaron 18,38 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y se dispersaron en agua ultrapura.



### 2.3.3.5. Preparación de la oleorresina

Para la obtención de la oleorresina, se disolvió la AX en aceite de chía a partir del procedimiento descrito en la sección 1.3.2. La cantidad de extracto pesada inicialmente se calculó para obtener una concentración de AX en la oleorresina de 400  $\mu\text{g/g}$  aceite.

### 2.3.4. Preparación de las partículas mediante gelificación iónica

En primer lugar, se pesó la cantidad necesaria de solución de WPA o ALG de acuerdo a las proporciones de cada formulación descritas anteriormente (**Tablas 3 y 4**). A continuación, se agregó polisorbato 80 (2% p/p) como surfactante y azida sódica (0,02% v/p) como conservante. Para las partículas realizadas en la segunda y tercera etapa (**Figura 20**), se adicionó además la cantidad correspondiente de oleorresina de acuerdo a la formulación. La emulsión se obtuvo utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax T25 (IKA, Staufen, Alemania) a 13000 rpm durante 5 min.

Las partículas se prepararon mediante la metodología de gelificación iónica externa. La mezcla obtenida en la sección anterior se goteó mediante una aguja 22G utilizando una bomba peristáltica con un caudal de 0,4 mL/min, sobre una solución receptora de  $\text{CaCl}_2$  250 mM, bajo agitación constante a 100 rpm. A la solución receptora se le agregó polisorbato 80 (1% p/p) para reducir su tensión superficial y, en consecuencia, prevenir la deformación de las partículas al ingresar a la solución (Lee et al., 2013; Wichchukit et al., 2013). La distancia entre la aguja y la superficie del baño de gelificación fue de 7 cm. Una vez finalizado el goteo, las partículas se mantuvieron en la solución de  $\text{CaCl}_2$  con agitación durante 330 min para favorecer la interacción entre los materiales de pared y el  $\text{Ca}^{+2}$ . Finalmente, las partículas se separaron de la solución mediante filtración (malla metálica de 250  $\mu\text{m}$  de apertura), se lavaron con agua destilada y se secaron en estufa a 25°C durante 2 h para retirar el exceso de agua. Las partículas y la solución receptora de  $\text{CaCl}_2$  fueron conservadas en heladera para su posterior análisis.

### 2.3.5. Determinación del contenido de proteína incorporada en las partículas

Para estimar la cantidad de proteína que se incorporó en las partículas, se determinó el contenido de proteína presente en el baño de  $\text{CaCl}_2$  (el cual corresponde a la proteína no incorporada). El total de proteína incorporada en las partículas formadas se calculó por diferencia respecto al total de proteína inicial en la formulación.

Para la determinación de proteína en el baño de  $\text{CaCl}_2$  se utilizó la técnica colorimétrica de Bradford (Bradford, 1976). Dicha técnica se basa en la unión entre el colorante Comassie Blue G250 a las proteínas (unión que se produce principalmente a través de la forma aniónica azul del

colorante), por lo que la cantidad de proteína es estimada mediante la determinación del complejo proteína-colorante a una longitud de onda de 595 nm.

Previamente, se obtuvo una curva de calibrado utilizando la solución de WPA como proteína estándar. Por otro lado, se obtuvo una curva de calibrado con un estándar de albúmina sérica bovina, la cual permite corroborar que la determinación por la técnica de Bradford fue adecuada. En ambos casos, las muestras se analizaron por duplicado.

### 2.3.6. Extracción de oleorresina desde las partículas

Para extraer la oleorresina desde las partículas se pesó la cantidad necesaria de partículas y se agregaron 3 mL de acetato de etilo. A continuación, se realizó la ruptura mecánica de las partículas utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax T25 (IKA, Staufen, Alemania) a 11000 rpm durante 2 min. La solución obtenida se centrifugó a 1120 ×g durante 5 min utilizando una centrífuga CAPP Rondo Clinical Centrifuge CRC-658 (CAPP, Nordhausen, Alemania). Un total de 1 mL del sobrenadante se lo transfirió a un tubo eppendorf para su posterior análisis. La extracción de oleorresina desde cada muestra se realizó por duplicado.

### 2.3.7. Determinación de la EE

Para estimar la EE se determinó el contenido de AX y ω-3 en las partículas a partir del extracto obtenido en la sección anterior. Para ello, un volumen del extracto de oleorresina en acetato de etilo se mezcló con un volumen equivalente de etanol. El contenido de AX en las muestras se determinó mediante espectrofotometría de acuerdo con la metodología descrita en la sección 1.3.7 y el contenido de ω-3 se determinó mediante cromatografía gaseosa de acuerdo con la metodología descrita la sección 1.3.6.

La EE se determinó en función del contenido de compuesto bioactivo incorporado inicialmente a la oleorresina, mediante la ecuación 7:

$$EE (\%) = \frac{CB_{partículas}}{CB_{oleorresina}} \times 100 \quad (7)$$

donde  $CB_{partículas}$  es el contenido de compuesto bioactivo medido en la oleorresina extraída de las partículas y  $CB_{oleorresina}$  es el contenido de compuesto bioactivo incorporado inicialmente en la oleorresina.

### 2.3.8. Tamaño y forma

El tamaño y la forma de las partículas se determinaron mediante el análisis de imágenes, para lo cual una imagen de 30 partículas fue analizada utilizando el software ImageJ (National Institute of Health, Maryland, Estados Unidos) (Lee et al., 2023). Se calculó el diámetro promedio de cada tipo de partículas, mientras que la forma de las partículas fue descrita mediante el parámetro de circularidad (ecuación 8).

$$Circularidad = 4\pi \times \frac{\text{área}}{\text{perímetro}^2} \quad (8)$$

### 2.3.9. Humedad

La humedad de las partículas se determinó gravimétricamente. Se pesaron 0,5 g de partículas y se las secó a 80°C hasta peso constante, determinándose la humedad mediante la diferencia de peso antes y luego del secado. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

### 2.3.10. Contenido de calcio

El contenido de calcio de las partículas se determinó para evaluar si existían diferencias en el calcio incorporado en los geles formados solo por alginato respecto a los geles formados por alginato y WPA. La determinación del calcio en las partículas se realizó utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica de llama (Perkin Elmer AAnalyst 20, Massachusetts, Estados Unidos) a una longitud de onda de 422,67 nm. Se realizó un blanco de muestra considerando el contenido de calcio presente en el WPA. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

### 2.3.11. Microscopía confocal de barrido láser

La microscopía confocal de barrido láser (CLSM) es una técnica con gran potencial en el área de alimentos, la cual permite visualizar diferentes componentes de micro y nanocápsulas a través de la tinción y fluorescencia (Sharif, 2020). Las características internas de las partículas fueron analizadas utilizando un microscopio confocal de barrido láser invertido Leica TCS SP8 (Leica, Wetzlar, Alemania) con un lente objetivo de 63x. Las muestras se tiñeron antes de la formación de las partículas. Para la fase lipídica se utilizó una solución de Rojo de Nilo (1 mg/mL en dimetilsulfoxido). Se añadieron 5  $\mu$ L de solución por mL de aceite. Por otro lado, para la fase proteica se empleó una solución de Rodamina B (0,2 mg/mL en agua). Se añadieron 480  $\mu$ L de

solución por mL de solución de WPA. El Rojo de Nilo fue excitado a 488 nm y detectado a 501-655 nm, mientras que la Rodamina B fue excitada a 514 nm y detectada a 501-655 nm.

### **2.3.12. Parámetros texturales**

La textura es un atributo sensorial estrechamente vinculado con la aceptabilidad de un alimento y se considera un atributo complejo en el cual participan diferentes sentidos como la visión, la audición y el tacto. El análisis de perfil de textura (TPA) es un test desarrollado con el objetivo de simular la masticación y brindar medidas objetivas, ya que los parámetros medidos con este método se pueden relacionar con la textura de un alimento. El test consiste en dos compresiones sucesivas de la muestra en estudio que permiten registrar una curva de fuerza en función de tiempo. A partir de dicha curva, es posible medir 5 parámetros y calcular otros 2 en función de los anteriores (Ramdhan et al., 2021).

Los parámetros texturales de las partículas fueron evaluados mediante un ensayo de doble compresión utilizando un texturómetro TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido). Para ello, se utilizaron una celda de carga de 5 Kg y una probeta cilíndrica de 75 mm de diámetro, operando con una fuerza de disparo de 5 g, una velocidad de 0,1 mm/s, un porcentaje de deformación del 75% y un tiempo entre las 2 compresiones de 5 s. Se ubicaron 168 partículas en el centro del plato formando una monocapa. Los parámetros analizados fueron: dureza, elasticidad, cohesividad, gomosidad y resiliencia. Cada muestra fue analizada en quintuplicado.

### **2.3.13. Estabilidad durante el almacenamiento**

Las partículas fueron almacenadas a 25°C bajo una humedad relativa del 57,8% durante un período 30 días. Para evaluar la estabilidad de los compuestos bioactivos encapsulados, se determinó el contenido de AX y la formación de productos de oxidación lipídica, 2 veces a la semana. Por otra parte, se almacenó oleoresina sin encapsular bajo las mismas condiciones (compuesto control). El ensayo de almacenamiento se realizó por duplicado. El contenido de AX y los productos de oxidación lipídica se determinaron a partir de muestras independientes.

### **2.3.14. Contenido de AX**

Se determinó el contenido de AX en las partículas durante el almacenamiento mediante la metodología descrita en la sección 1.3.7. El contenido de AX se expresó como el porcentaje AX remanente en las partículas respecto del contenido inicial en las mismas.

### 2.3.15. Productos primarios de oxidación lipídica (IP)

El contenido de productos primarios de la oxidación lipídica en el aceite encapsulado se determinó a partir del extracto obtenido previamente, utilizando la metodología de IP de [Shantha & Decker \(1994\)](#) descrita en la sección 1.3.8.1.

### 2.3.16. Productos secundarios de oxidación lipídica (TBARS)

El contenido de productos secundarios de oxidación lipídica en el aceite encapsulado se determinó a partir del extracto obtenido previamente, utilizando la metodología de TBARS de [McDonald & Hultin \(1987\)](#) descrita en la sección 1.3.8.2.

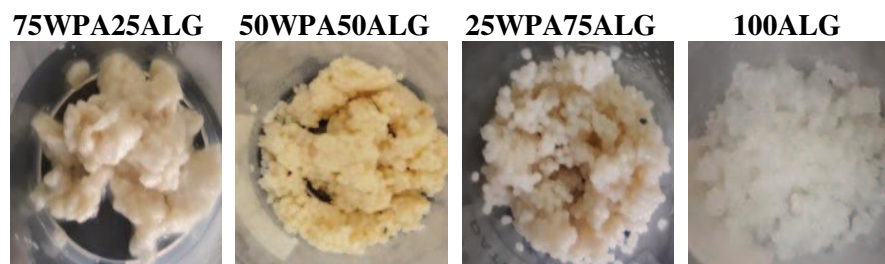
### 2.3.17. Análisis estadístico

Se aplicó un Análisis de Varianza (ANOVA) para la comparación de los datos obtenidos, utilizando un nivel de confianza del 95%. Se aplicaron Pruebas de Rangos Múltiples para identificar diferencias estadísticamente significativas, mediante el uso del Test de Fischer (LSD) con un nivel de confianza del 95%. Los análisis se realizaron mediante el uso del programa Statgraphics (Statgraphics Inc., Rockville, MD, Estados Unidos).

## 2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.4.1. Evaluación de diferentes proporciones entre ALG y WPA para la obtención de partículas mediante gelificación iónica

En la **Figura 21**, se puede observar el aspecto de las partículas obtenidas con cada formulación. En la correspondiente a 100WPA no fue posible obtener partículas, observándose que la solución goteada se dispersó en la solución receptora de  $\text{CaCl}_2$  al entrar en contacto con la misma. Por su parte, con la formulación 75WPA25ALG, si bien se observó la formación de partículas, las mismas no presentaron forma esférica y se desarmaron luego del proceso de filtrado. Finalmente, en el caso de las muestras 25WPA75ALG, 50WPA50ALG y 100ALG, se pudieron obtener partículas que mantuvieron su estructura luego del proceso de filtrado.



**Figura 21.** Aspecto de las partículas obtenidas con las distintas formulaciones sin oleorresina.

### 2.4.2. Proteína incorporada en las partículas

En la **Tabla 5**, se muestra el porcentaje de proteína retenida en las partículas. La formulación 100WPA presentó un contenido elevado de proteína en la solución receptora de  $\text{CaCl}_2$ , lo cual se debe a la ausencia de formación de partículas que se observó al utilizar solamente WPA como material de pared. En el caso de la formulación 75WPA25ALG, aproximadamente un 54% de la proteína se incorporó a las partículas. Para las formulaciones 50WPA50ALG y 25WPA75ALG, aproximadamente un 76 al 80% de la proteína se incorporó en las partículas.

**Tabla 5.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes al porcentaje de proteína retenida en las partículas.

Formulación	Proteína retenida (%)
25WPA75ALG	80,03±0,75 <sup>c</sup>
50WPA50ALG	75,94±0,80 <sup>c</sup>
75WPA25ALG	53,52±8,75 <sup>b</sup>
100WPA	13,77±1,39 <sup>a</sup>
<b>Tipo de partícula</b>	*

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. La última fila muestra los resultados del ANOVA. \*: Efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

### 2.4.3. Evaluación de la cantidad de oleorresina incorporada en las partículas

Las partículas 100ALG, 25WPA75ALG y 50WPA50ALG fueron seleccionadas para evaluar la cantidad de oleorresina que podían incorporar. En la **Tabla 6**, se muestran los valores de EE de AX determinados para cada partícula.

La EE de AX no fue afectada por la cantidad de oleorresina incorporada en las partículas ( $p > 0,05$ ), pudiendo entonces incorporarse una mayor cantidad de oleorresina sin afectar la EE del proceso.

A pesar de que en las partículas formuladas con 50WPA50ALG se observaron valores altos de EE, las mismas resultaron frágiles y difíciles de manipular, por lo cual no se continuó con las mismas para las siguientes experiencias. Así, para las siguientes etapas se continuó el estudio con las partículas 100ALG y 25WPA75ALG con una relación material de pared:oleorresina de 2:1.

**Tabla 6.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondiente a la EE de las formulaciones evaluadas.

Formulación	Relación másica del material de pared:oleorresina	EE (%)
100ALG	4:1	91,77±4,14
	2,6:1	88,55±3,16
	2:1	87,64±0,23
25WPA75ALG	4:1	80,95±4,55
	2,6:1	73,38±0,49
	2:1	85,40±6,26
50WPA50ALG	4:1	84,91±9,88
	2,6:1	89,66±1,68
	2:1	79,50±7,50
<b>Relación material de pared:oleorresina</b>		NS

La última fila muestra los resultados del ANOVA. NS: Efecto no significativo ( $p > 0,05$ ).

#### 2.4.4. Caracterización de las partículas

##### 2.4.4.1. Aspecto, tamaño y morfología

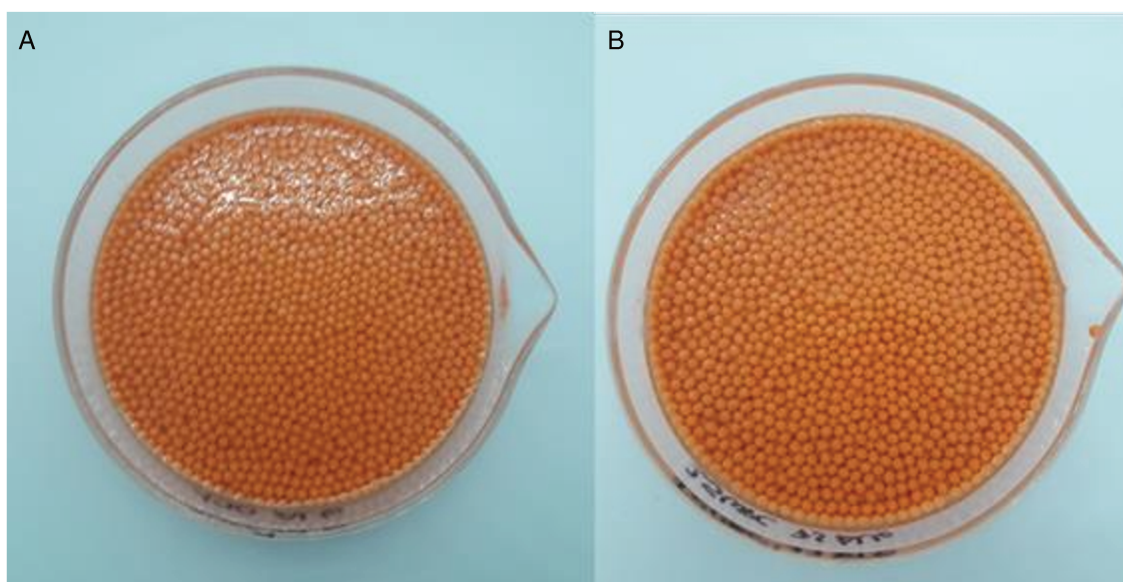
En la **Figura 22**, se muestra el aspecto de las partículas obtenidas mediante gelificación iónica. En la **Tabla 7**, se muestran los valores de tamaño y circularidad de cada tipo de partícula. Las partículas formuladas solo con ALG (100ALG) tuvieron un menor tamaño que aquellas con WPA (25WPA75ALG) ( $p < 0,05$ ). No obstante, es necesario aclarar que la diferencia observada fue muy pequeña. Resultados similares fueron reportados por [Wichchukit et al. \(2013\)](#), quienes observaron que las partículas formadas solo con ALG presentaban menores tamaños que aquellas formadas con mezclas de WPA (50%) y ALG (50%). Los autores consideraron que esta diferencia se debe a las diferencias de viscosidades de las suspensiones goteadas durante el proceso de obtención de las partículas mediante gelificación iónica.

La adición de WPA no afectó la forma de las partículas ( $p > 0,05$ ). Los valores de circularidad de ambos tipos de partículas fueron cercanos a 1, lo cual indica que las partículas presentan una morfología circular (un valor de circularidad de 1 indica un círculo perfecto). Valores de circularidad similares fueron reportados por [Sampaio et al. \(2019\)](#) para partículas de licopeno obtenidas mediante gelificación iónica.

La obtención de partículas monodispersas y esféricas es deseable debido a que la esfericidad de las partículas impacta tanto en la estabilidad mecánica como química de las mismas. Además, las partículas con tamaño y formas bien definidas permiten obtener perfiles de liberación controladas de los bioactivos encapsulados, lo cual resulta importante durante los procesos de liberación gastrointestinal (Lee et al., 2013).

#### 2.4.4.2. Contenido de humedad

La formación de la red de hidrogel durante el proceso de entrecruzamiento reduce el espacio ocupado por el material polimérico y causa una pérdida de agua (Lee et al., 2013). El contenido de humedad de las partículas luego del proceso de gelificación fue de aproximadamente 42-45%, no siendo significativa la diferencia entre ambos tipos de partículas ( $p>0,05$ ) (Tabla 7).



**Figura 22.** Aspecto de las partículas obtenidas mediante gelificación iónica externa. 100ALG (A); 25WPA75ALG (B).

#### 2.4.4.3. Contenido de calcio

En la **Tabla 7**, se muestra el contenido de calcio en cada tipo de partícula. El calcio incorporado en las partículas fue similar para ambas muestras ( $p>0,05$ ).



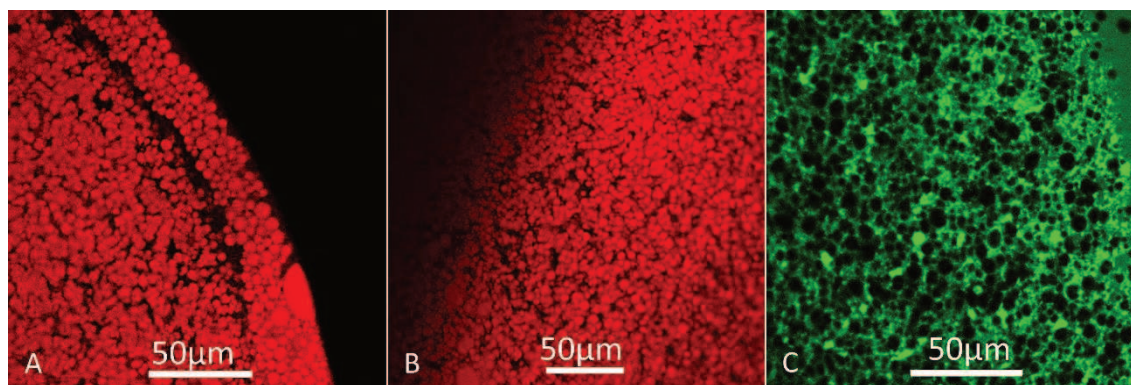
**Tabla 7.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes a las diferentes características evaluadas en las partículas.

Partícula	Tamaño (mm)	Circularidad	Humedad (% p/p)	Calcio (g/Kg de partícula)
100ALG	2,08±0,04 <sup>a</sup>	0,74±0,07	42,70±0,89	3,97±0,20
25WPA75ALG	2,19±0,07 <sup>b</sup>	0,76±0,10	45,72±1,13	3,82±0,25
Tipo de partícula	*	NS	NS	NS

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas. La última fila muestra los resultados del ANOVA. NS: Efecto no significativo ( $p>0,05$ ); \*: Efecto significativo ( $p<0,05$ ).

#### 2.4.4.4. Morfología interna

En la **Figura 23**, se muestran las imágenes de la estructura interna de las partículas obtenidas a partir del análisis de CLSM. En ambas partículas evaluadas, se puede observar una distribución homogénea de las gotas de aceite (gotas esféricas densamente empaquetadas). En este sentido, surfactantes como el polisorbato 80 cumplen un rol crucial en la formulación de partículas cuando se utilizan procesos de emulsión/gelificación y extrusión para la obtención de las mismas (Uyen et al., 2020). Por otra parte, en las imágenes se puede observar una clara distribución de las proteínas alrededor de las gotas de aceite en las partículas 25WPA75ALG (**Figura 23C**). Tal como se discutirá más adelante, la presencia de proteínas en la cercanía de las gotas de aceite puede ejercer un rol importante en la estabilidad de los compuestos bioactivos encapsulados.



**Figura 23.** Imágenes de microscopía confocal de las partículas 100ALG y 25WPA75ALG. 100ALG (A) (fase lipídica teñida); 25WPA75ALG (B) (fase lipídica teñida); 25WPA75ALG (C) (fase proteica teñida).

#### 2.4.4.5. Parámetros texturales

En la **Tabla 8**, se muestran los parámetros obtenidos mediante el ensayo TPA para cada tipo de partícula. El reemplazo de parte del ALG por WPA afectó de manera significativa ( $p<0,05$ )

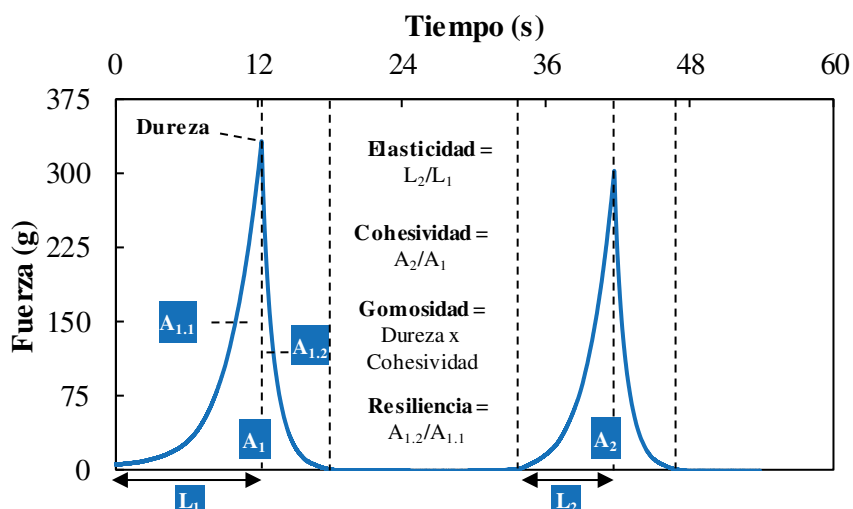
algunos de los parámetros de textura (dureza, gomosidad y resiliencia). En las **Figuras 24 y 25** se muestran los perfiles de TPA obtenidos para las muestras.

El estudio de los parámetros texturales de las partículas es de gran importancia, debido a que los mismos pueden influir sobre la estabilidad de los compuestos bioactivos encapsulados, en las características de liberación de los mismos y finalmente, en su percepción sensorial cuando se adicionan en productos alimenticios (Lupo et al., 2015; Aguayo-Mendoza et al., 2020; Sandoval-Castilla, 2010).

**Tabla 8.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes a los parámetros texturales de las partículas obtenidos a partir de los ensayos de TPA.

Partícula	Dureza (g)	Elasticidad	Cohesividad	Gomosidad (g)	Resiliencia
<b>100ALG</b>	372,94±6,84 <sup>b</sup>	0,76±0,03	0,74±0,01	277,18±4,86 <sup>b</sup>	0,38±0,00 <sup>b</sup>
<b>25WPA75ALG</b>	287,96±7,85 <sup>a</sup>	0,74±0,05	0,74±0,01	212,41±5,91 <sup>a</sup>	0,37±0,01 <sup>a</sup>
<b>Tipo de partícula</b>	*	NS	NS	*	*

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas. La última fila muestra los resultados del ANOVA. NS: Efecto no significativo ( $p > 0,05$ ); \*: Efecto significativo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 24.** Perfiles de TPA correspondientes a las partículas 100ALG.

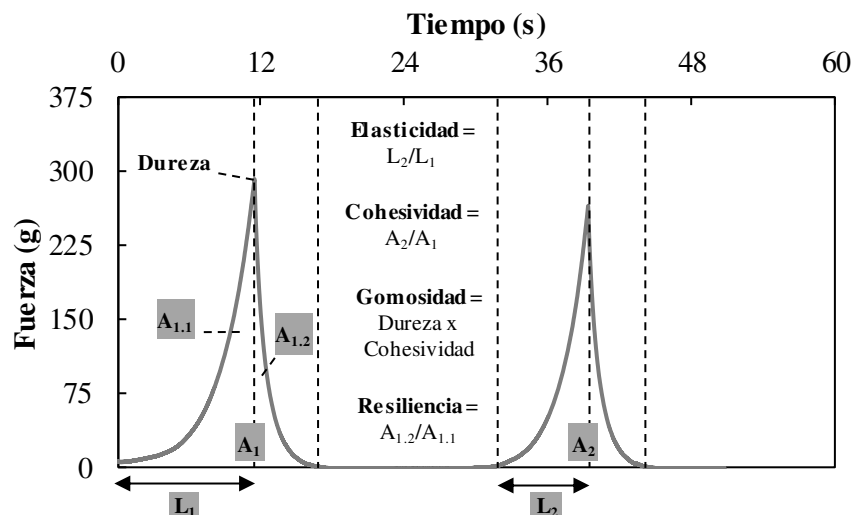


Figura 25. Perfiles de TPA correspondientes a las partículas 25WPA75ALG.

La **dureza** es un parámetro relacionado con la fuerza del gel (Feng et al., 2018). En el presente estudio, la dureza en las partículas 100ALG fue significativamente mayor que en aquellas formuladas con el agregado de proteína (25WPA75ALG). Resultados similares fueron reportados por Ramdhan et al (2021), quienes observaron una disminución en la dureza de las partículas cuando parte del ALG fue remplazado por concentrados de proteínas de leche (sin tratar y tratados a 80°C durante 30 min). De acuerdo a los autores, una menor interacción entre los iones calcio y las proteínas, en comparación con la interacción entre el calcio y el ALG, podría ser la causa de esta menor dureza.

La **gomosidad** es un parámetro utilizado para describir la energía necesaria para desintegrar alimentos semisólidos y se encuentra relacionada con los parámetros dureza y cohesividad (Szczesniak, 1963). En este sentido, y en concordancia con lo observado para el parámetro dureza, la gomosidad en las partículas 100ALG fue mayor que en las partículas 25WPA75ALG ( $p < 0,05$ ).

La **resiliencia** de un material hace referencia a la recuperación inmediata y es indicativa de la respuesta elástica inmediata y de la naturaleza cohesiva del material (Feng et al., 2018). La resiliencia en las partículas 100ALG fue mayor que en las partículas 25WPA75ALG ( $p < 0,05$ ), aunque la diferencia observada fue muy baja.

La **elasticidad** de un material está relacionada con el tiempo requerido para recuperarse de la deformación luego de que se retira la carga, mientras que la **cohesividad** está relacionada con la intensidad mecánica de los enlaces internos dentro de la estructura del alimento (Funami & Nakauma, 2022). No se observaron diferencias significativas entre ambas partículas para ninguno de los dos parámetros ( $p > 0,05$ ). La elasticidad se encuentra correlacionada con el grado de relajación de la muestra y puede tomar valores entre 0 y 1. Así, valores altos de elasticidad

(cerca de 1) se relacionan con una textura de tipo gomosa, mientras que valores de elasticidad bajos (cerca de 0) se relacionan con una estructura frágil (Lupo et al., 2015). Tanto las partículas 100ALG como 25WPA75ALG presentaron valores de elasticidad cercanos a 1, indicando características correspondientes a textura de tipo gomosa.

#### 2.4.4.6. Eficiencia de encapsulación

La EE de AX y  $\omega$ -3 en las partículas formuladas solo con ALG fue de  $86,65 \pm 1,15\%$  y  $86,00 \pm 1,85\%$ , respectivamente (Tabla 9). El reemplazo de parte del ALG por WPA como material de pared no afectó de manera significativa a la EE de ninguno de los dos compuestos bioactivos ( $p > 0,05$ ). Las partículas 25WPA75ALG mostraron un valor de EE de AX y  $\omega$ -3 de  $85,79 \pm 5,10\%$  y  $76,96 \pm 2,97\%$ , respectivamente. Estos valores demuestran que la gelificación iónica es un buen método para encapsular la oleorresina.

Los valores elevados de EE son particularmente deseados cuando se encapsulan ingredientes de alto valor agregado para el desarrollo de alimentos funcionales, evitando la pérdida de dichos ingredientes durante el proceso de formación de las partículas. Valores similares de EE fueron reportados por otros autores para la encapsulación de bioactivos lipofílicos. Us-Medina et al. (2017) reportaron valores de EE en un rango de 71-89% para aceite de chía encapsulado en una matriz formada por ALG y mucílago de *Salvia hispánica*, mientras que Benavides et al. (2016) reportaron valores de EE del 85% para aceite esencial de tomillo encapsulado en una matriz de ALG.

**Tabla 9.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes a la EE de AX y  $\omega$ -3 de las partículas.

Partícula	EE AX (%)	EE $\omega$ -3 (%)
100ALG	$86,65 \pm 1,15$	$86,00 \pm 1,85$
25WPA75ALG	$85,79 \pm 5,10$	$76,96 \pm 2,97$
Tipo de partícula	NS	NS

La última fila muestra los resultados del ANOVA. NS: Efecto no significativo ( $p > 0,05$ ).

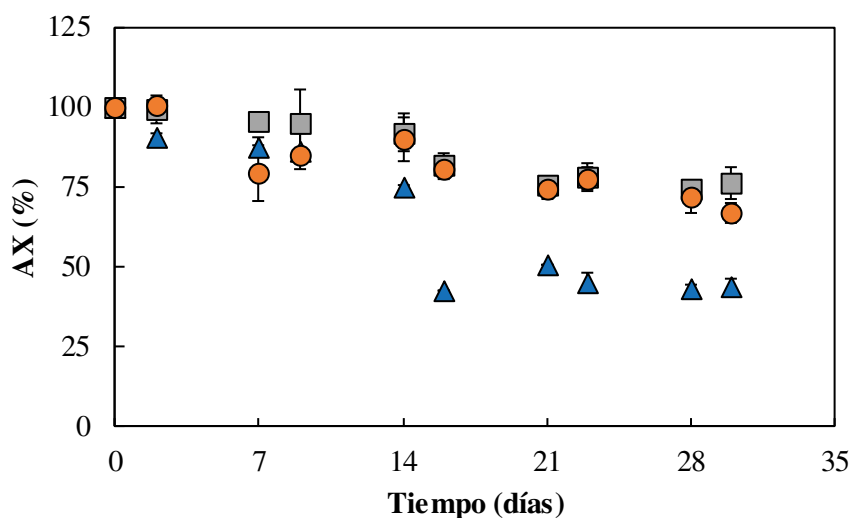
#### 2.4.5. Estabilidad de los compuestos encapsulados durante el almacenamiento

##### 2.4.5.1. Estabilidad de AX

En la Figura 26, se muestra el contenido de AX en las partículas y en la oleorresina sin encapsular durante el almacenamiento de las muestras a 25°C. La estabilidad de AX en las partículas fue afectada de manera significativa por el material de pared utilizado ( $p < 0,05$ ), siendo la degradación de AX significativamente mayor en las partículas formuladas utilizando solo ALG

como material de pared ( $p < 0,05$ ) respecto a la oleorresina sin encapsular y a las partículas 25WPA75ALG. Este comportamiento demuestra que el reemplazo de parte del ALG por WPA afectó de manera positiva a la estabilidad de AX. Por otra parte, se puede observar que, durante la mayor parte del período almacenamiento, el contenido de AX en las partículas 25WPA75ALG fue similar al contenido en la oleorresina sin encapsular ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, hacia el final del período de almacenamiento se observó una mejor preservación de la AX en las partículas 25WPA75ALG. Finalmente, a los 30 días las partículas 25WPA75ALG preservaron un 75% de la AX incorporada inicialmente, mientras que las partículas 100ALG preservaron solo un 44% de la AX incorporada.

Resultados similares fueron reportados por [da Silva Carvalho et al. \(2019\)](#). Los autores observaron una mejor preservación de antocianinas encapsuladas en partículas de ALG recubiertas con WPC, en comparación con aquellas formuladas utilizando solo ALG. Por otra parte, [Jin et al. \(2023\)](#) evaluaron el efecto de la adición de proteína de soja en geles de ALG y observaron una mayor preservación del  $\beta$ -caroteno encapsulado en los geles que contenían proteína.



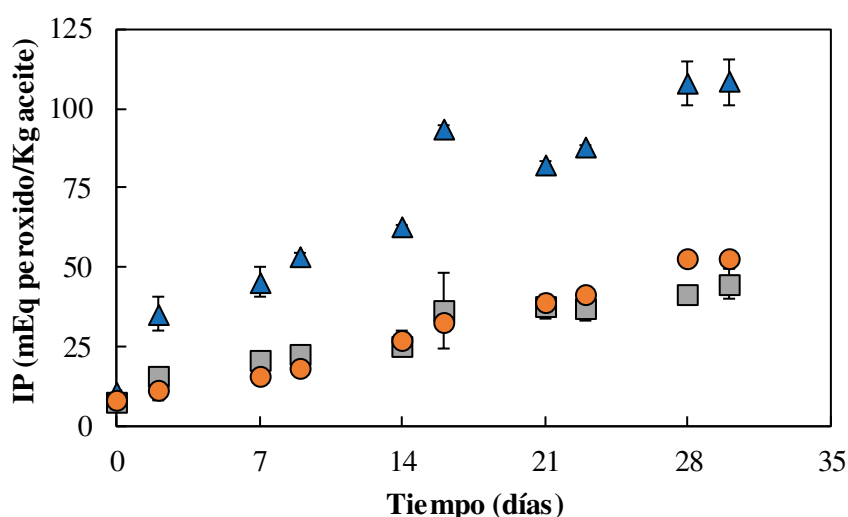
**Figura 26.** Estabilidad de AX durante el almacenamiento de las muestras a 25°C. 100ALG (-▲-); 25WPA75ALG (-■-); oleorresina sin encapsular (-●-).

La formación de una emulsión aceite/agua incrementa el área de superficie de la fase lipídica, lo cual puede afectar su estabilidad oxidativa y, como consecuencia, la estabilidad de los compuestos bioactivos dispersados en el aceite ([Cercaci et al., 2007](#)). Algunos autores reportaron que la red de biopolímero que se forma durante la gelificación iónica puede reducir la difusión del oxígeno, de compuestos pro-oxidantes y de radicales libres a la fase lipídica y mejorar la

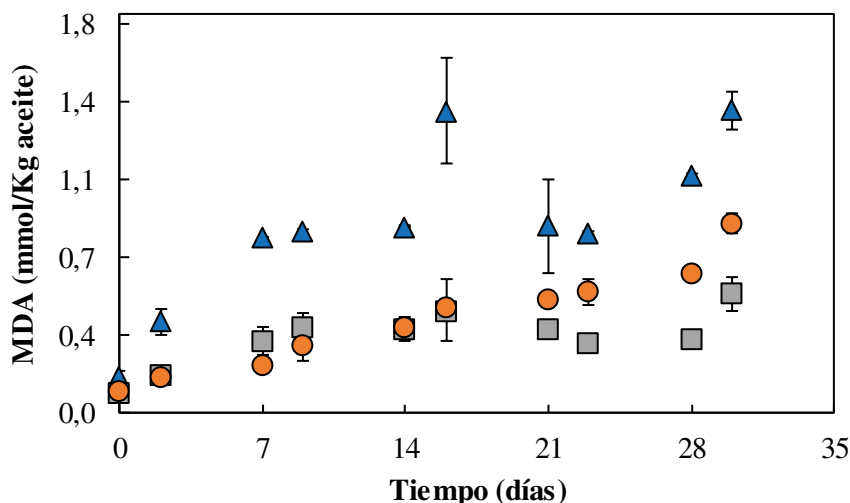
estabilidad de los compuestos bioactivos (Jin et al., 2023; Liu et al., 2018). En cambio, en el presente trabajo, la formación de la red polimérica en las partículas de ALG no promovió la estabilidad de AX, posiblemente debido a la porosidad de este tipo de partículas. Un comportamiento similar fue reportado por Rahiminezhad et al. (2020), quienes observaron una mayor oxidación en aceite de lino encapsulado en partículas de ALG respecto al aceite sin encapsular. Por otro lado, una mayor preservación de AX en las partículas 25WPA75ALG puede ser atribuida a la presencia de proteínas en la fase continua, como se puede observar en las imágenes de microscopía laser confocal (Figura 23C). Las propiedades antioxidantes de las proteínas del lactosuero (Mohammandian et al., 2019; Ries et al., 2010) podrían contribuir a reducir la oxidación de AX y su degradación.

#### 2.4.5.2. Estabilidad oxidativa

En las Figuras 27 y 28, se muestran los valores de IP y MDA para las partículas y la oleorresina sin encapsular almacenadas a 25°C, siendo los valores iniciales en ambos casos similares en la oleorresina y en las partículas ( $p > 0,05$ ). Esto demuestra que los procesos de emulsificación y encapsulación mediante gelificación iónica no indujeron la formación de productos de oxidación lipídica. En el Anexo (Tabla A19), se muestran los valores promedios y sus desviaciones estándares correspondientes al contenido de AX en las distintas muestras evaluadas.



**Figura 27.** Evolución de los valores de IP durante el almacenamiento de las muestras a 25°C. 100ALG (-▲-); 25WPA75ALG (-■-); oleorresina sin encapsular (-●-).



**Figura 28.** Evolución de los valores de MDA durante el almacenamiento de las muestras a 25°C. 100ALG (-▲-); 25WPA75ALG (-■-); oleorresina sin encapsular (-●-).

Durante el almacenamiento, la formación de peróxidos fue mayor en las partículas 100ALG que en las partículas 25WPA75ALG y en la oleorresina sin encapsular. Este resultado puede deberse a la menor área superficial en la oleorresina en comparación con las partículas. La generación de gotas de aceite durante el proceso de emulsión genera una mayor exposición frente al oxígeno, lo cual puede inducir a una mayor oxidación del aceite. Por otro lado, la alta porosidad de las partículas formuladas solo con ALG como material de pared, puede generar una mayor difusión del oxígeno y, como consecuencia, mayor formación de peróxidos y de MDA.

Una menor estabilidad oxidativa en aceites encapsulados en comparación con aceites sin encapsular fue reportada por otros autores. [Tello et al. \(2015\)](#), reportaron mayores valores de IP en partículas formuladas con ALG y pectina que en aceite libre luego de 28 días de almacenamiento a 45°C. De manera similar, [Polavarapu et al. \(2011\)](#) reportaron una menor estabilidad oxidativa en partículas formuladas mediante secado en spray con pectina de remolacha azucarera que en aceite de pescado sin encapsular. Por otra parte, [Di Giorgio et al. \(2019\)](#) reportaron valores mayores de IP y MDA en aceite de pescado encapsulado mediante secado por aspersion utilizando proteína de soja respecto al aceite de pescado sin encapsular. La adición de WPA como material de pared favoreció la estabilidad oxidativa de la oleorresina, siendo los valores de IP significativamente menores en las partículas formuladas con WPA respecto a aquellas formuladas solo con ALG (100ALG) ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, los valores de IP en las partículas 25WPA75ALG fueron similares a los de la oleorresina, sin embargo, hacia el final del almacenamiento se observaron menores valores de IP en las partículas 25WPA75ALG ( $p < 0,05$ ).

La formación de MDA siguió una tendencia similar a la formación de peróxidos (**Figura 28**), con mayores valores de MDA en las partículas 100ALG respecto a las partículas 25WPA75ALG y a la oleorresina sin encapsular, desde el segundo día de almacenamiento. Por otra parte, la formación de MDA hacia el final del almacenamiento fue significativamente mayor en la oleorresina sin encapsular respecto a las partículas 25WPA75ALG ( $p < 0,05$ ). En el Anexo (**Tabla A20**), se muestran los valores promedios y sus desviaciones estándares correspondientes al contenido de IP y MDA en las distintas muestras evaluadas.

Los resultados obtenidos parecen indicar que, tal como se describió en la discusión de la estabilidad de AX, la estructura creada por las proteínas alrededor de las gotas de aceite puede proteger a la oleorresina, disminuyendo la difusión de oxígeno, de compuestos pro-oxidantes y de radicales libres, favoreciendo de esta forma la estabilidad tanto de AX como del aceite de chía.

## 2.5. CONCLUSIONES

A partir de la técnica de gelificación iónica externa se pudieron obtener partículas utilizando ALG y mezclas de ALG y WPA como materiales de pared, no siendo posible el uso solamente de WPA para tal fin en las condiciones ensayadas. En el caso de las partículas con una mayor proporción de WPA respecto al ALG, si bien fue posible su formación, las mismas perdieron parcialmente su forma tras el filtrado. Por otro lado, las formulaciones 50WPA50ALG y 25WPA75ALG permitieron obtener partículas con un porcentaje de incorporación de WPA adecuado y se logró incorporar un elevado contenido de oleorresina en las partículas sin afectar la EE de AX y  $\omega$ -3. No obstante, las partículas 50WPA50ALG resultaron frágiles y difíciles de manipular, por lo cual se decidió no continuar con las mismas en las siguientes etapas.

La formulación que utiliza 25% de WPA y 75% de ALG permitió la formación de geles compuestos con características adecuadas, permitiendo la encapsulación de mezclas de aceite de chía y AX. El tamaño de las partículas y algunos parámetros texturales (dureza, gomosidad y resiliencia) fueron afectados por la incorporación de WPA como material de pared. Por su parte, la EE no fue afectada por la adición de WPA y se obtuvieron valores elevados de este parámetro tanto para 100ALG como para 25WPA75ALG. Finalmente, la incorporación de WPA en las partículas provocó una mejor preservación de la AX y una mayor estabilidad oxidativa en comparación con las partículas formuladas solo con ALG durante todo el periodo estudiado. Asimismo, hacia el final del almacenamiento, tanto la estabilidad de AX como la estabilidad oxidativa del aceite de chía fue levemente mayor en las partículas 25WPA75ALG respecto a la observada en la oleorresina sin encapsular.



# CAPÍTULO 3

---

## **LIBERACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS ENCAPSULADOS BAJO CONDICIONES SIMULADAS DE DIGESTIÓN *IN VITRO***

## CAPÍTULO 3 - LIBERACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS ENCAPSULADOS BAJO CONDICIONES SIMULADAS DE DIGESTIÓN *IN VITRO*

### 3.1. INTRODUCCIÓN

Durante el paso por el TGI, los compuestos bioactivos se exponen a diferentes condiciones que pueden afectar su estabilidad (Nieva-Echevarría et al., 2020; Cheng et al., 2021). Los sistemas de encapsulación deben proteger a los compuestos bioactivos de estas condiciones, pero permitir su liberación en el sitio deseado del TGI para promover su bioaccesibilidad y biodisponibilidad. Las características de liberación de los sistemas de encapsulación se encuentran influenciadas por diferentes factores, los cuales están relacionados tanto con las propiedades de los compuestos bioactivos encapsulados, como con los materiales de pared utilizados y las propiedades físicas del sistema, como el tamaño, la forma y las características morfológicas (Malekjani & Jafari, 2021). Además de sus ventajas tales como biocompatibilidad y biodegradabilidad, la sensibilidad del ALG al pH, lo convierte en un excelente material cuando el objetivo es liberar a los compuestos bioactivos en el intestino (Li et al., 2021). En el caso de las proteínas, su comportamiento durante los procesos digestivos depende de diferentes factores, como su estado conformacional (p. ej., nativa o modificada), su interacción con la interface, pudiendo variar asimismo cuando se encuentran formando geles (Mat et al., 2020; Singh et al., 2014). Cuando se combinan distintos biopolímeros en el desarrollo de sistemas de encapsulación, el comportamiento de los mismos durante el paso por el TGI dependerá de las características del nuevo sistema formado. El estudio del comportamiento de estos sistemas mixtos durante los procesos de digestión gastrointestinal es de gran relevancia para una adecuada formulación de alimentos funcionales o suplementos nutricionales.

La digestión es un proceso complejo mediante el cual los alimentos son transformados en nutrientes que pueden ser absorbidos por el organismo. El proceso de digestión de los alimentos comienza en la boca, con la masticación y producción de saliva. En el caso de los alimentos sólidos, el procesamiento en la boca produce la reducción en el tamaño de las partículas y la formación de un bolo alimenticio, mientras que los líquidos solo requieren un mínimo procesamiento. El bolo alimenticio obtenido es transportado al estómago, donde se mezcla con los fluidos gástricos, los cuales contienen ácidos, sales y enzimas digestivas (pepsina y lipasa), por lo que en este compartimiento comienza la digestión de algunos nutrientes. El pH de este compartimiento varía entre 1 y 5, con un tiempo de residencia de los alimentos en el mismo que va de 15 minutos a 3 horas. La mayor parte de la digestión de los alimentos se produce en el intestino, principalmente en el duodeno. Las enzimas pancreáticas (conformadas por proteasas, amilasas y lipasas) y otras enzimas digestivas actúan en conjunto sobre el bolo alimenticio dando lugar a la digestión de los nutrientes. Asimismo, el intestino es el principal sitio de absorción de

los nutrientes, especialmente en la región del yeyuno y el íleon. El digerido que no es hidrolizado y absorbido en el intestino delgado, es transportado al colon a través de la válvula ileocecal, lugar donde ocurren los procesos de fermentación y el metabolismo de ciertos compuestos bioactivos, como los fenólicos (Li et al., 2020; Mackie et al., 2020).

El comportamiento de las matrices alimentarias durante su paso por el TGI puede ser evaluado mediante métodos *in vivo* o *in vitro*. Los métodos *in vivo* continúan siendo el “estándar de oro” para estudios vinculados a la dieta. Los mismos proveen información directa acerca de la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos y permiten analizar otros parámetros como la saciedad y el efecto sobre la microbiota intestinal. Como contraparte, la interpretación de sus resultados puede dificultarse debido a la gran variedad de respuestas entre individuos (Bornhorst et al., 2016; Xavier & Mariutti, 2021). Asimismo, dichos métodos presentan un costo elevado, son complejos y conllevan implicancias éticas debido a que involucran estudios con animales o humanos (Lucas-González et al., 2018). Por otro lado, los métodos de digestión *in vitro* estáticos son una metodología útil para simular las condiciones de digestión gastrointestinal humana y han demostrado ser adecuados para predecir la digestión *in vivo* (Brodkorb et al., 2019). Mediante estos métodos no es posible predecir la biodisponibilidad de los compuestos, pero sí permiten predecir su bioaccesibilidad, la cual es un prerequisite para la biodisponibilidad de los mismos (Mackie et al., 2020). Las condiciones utilizadas (concentración de enzimas, pH, tiempos de duración de cada fase de la digestión y composición de los fluidos digestivos) tienen una gran influencia sobre los procesos de digestión evaluados (como el perfil de liberación de compuestos bioactivos desde matrices o la digestibilidad de los compuestos bioactivos), por lo que las variaciones en las metodologías utilizadas impiden una adecuada comparación de los resultados y la formulación de conclusiones generales (Minekus et al., 2014). A raíz de ello, Minekus et al. (2014) propusieron una metodología de digestión *in vitro* estandarizada, la cual fue actualizada posteriormente por Brodkorb et al. (2019), permitiendo un consenso acerca de las condiciones utilizadas para simular los procesos de digestión *in vitro*.

En el presente capítulo, se evaluó el comportamiento de los sistemas de digestión formados por ALG y ALG-WPA sobre las características de liberación de los compuestos bioactivos encapsulados cuando los mismos se someten a condiciones de digestión gastrointestinales simuladas, a través de la metodología estandarizada de digestión *in vitro* INFOGEST (Brodkorb et al., 2019).

### 3.2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

- ✓ Evaluar el perfil de liberación de AX y  $\omega$ -3 desde las partículas 100ALG y 25WPA75ALG.

- ✓ Evaluar el grado de lipólisis del aceite de chía incorporado en partículas 100ALG y 25WPA75ALG.
- ✓ Determinar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos liberados desde las partículas.

### 3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.3.1. Materiales

El aceite de chía prensado en frío fue adquirido en Sturla S.R.L. (Burzaco, Argentina). La astaxantina natural (AstaZine®) fue provista por Lipomize S.R.L. (Santa Fe, Argentina). El alginato de sodio de baja viscosidad fue adquirido en Kelco (Atlanta, Estados Unidos). El concentrado de proteína de lactosuero (LACPRODAN 80) fue adquirido en Arla Foods Ingredients S.A. (Córdoba, Argentina).

Polisorbato 80, cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y ácido ticloroacético (TCA) fueron adquiridos en Cicarelli Laboratorios S.A. (Santa Fe, Argentina). La pepsina fue adquirida en Riedel-de Haën AG (Seelze, Alemania). La hemoglobina fue adquirida en Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, Estados Unidos). La pancreatina de páncreas porcino, lipasa de páncreas porcino, bilis bovina, Orlistat, pepstatina A, Pefabloc, *p*-toluenosulfónico-L-arginina metil ester (TAME) y tributirina, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Corp (St. Louis, MO, Estados Unidos).

#### 3.3.2. Preparación de partículas

Las partículas se obtuvieron mediante gelificación iónica externa utilizando la metodología descrita en la sección 2.3.4. Se evaluaron los dos tipos de partículas descritos anteriormente: 100ALG y 25WPA75ALG.

#### 3.3.3. Determinación de las actividades enzimáticas

Se determinó la actividad de las distintas enzimas involucradas en las etapas gástrica e intestinal, con el objetivo de calcular la cantidad necesaria de enzima a agregar durante los ensayos de digestión. Para ello se utilizó la metodología propuesta por [Brodkorb et al. \(2019\)](#).

Para la etapa estomacal se determinó la actividad enzimática de la pepsina, mientras que para la etapa intestinal se utilizó pancreatina, la cual es un extracto que contiene una mezcla de las diferentes enzimas involucradas en la digestión intestinal. La cantidad de pancreatina a utilizar en los ensayos se basa en la actividad de la tripsina, por lo cual se determinó la actividad enzimática de esta última. Por otro lado, si bien la pancreatina contiene lipasa pancreática en su composición, la cantidad de pancreatina que se agrega (en función de la actividad de la tripsina)

puede no cubrir la actividad enzimática de lipasa necesaria, especialmente cuando la concentración de aceite es alta o el objetivo del ensayo de digestión es la evaluación de la digestión de lípidos o compuestos liposolubles. Por ello, se determinó también la actividad de la lipasa en la pancreatina y la actividad de la lipasa pancreática porcina.

### 3.3.3.1. Actividad enzimática de la pepsina

La actividad enzimática de la pepsina se determinó mediante espectrofotometría. La metodología se basa en la reacción de la hemoglobina (Hb) con la enzima, ya que la Hb no digerida es precipitada con ácido tricloroacético (TCA) y los péptidos que contienen tirosina soluble en TCA son determinados espectrofotométricamente a 280 nm.

En primer lugar, se preparó una solución 2% p/v de hemoglobina a pH 2. Por otro lado, se preparó una solución de 1 mg/mL de pepsina en buffer (10 mM Tris Buffer, 150 mM NaCl a pH 6,5), y previo al ensayo se prepararon 3 diluciones (0,25, 0,50 y 0,75 mg/mL) en HCl 10 mM. Se agregaron 400 µL de la solución de hemoglobina a un tubo eppendorf y las muestras se incubaron en un baño de agua a 37°C por 4 min para su termostatación. Luego, se agregaron 80 µL de la solución de pepsina para cada concentración y las muestras se incubaron durante 10 min a 37°C. Para detener la reacción se agregaron 800 µL de TCA 5% p/v a cada muestra. A continuación, las muestras se centrifugaron a 16000 ×g por 10 min para precipitar la hemoglobina remanente. Finalmente, se determinó la absorbancia de la fase soluble clara a 280 nm. Para los blancos se siguió el mismo procedimiento, pero incorporando la pepsina luego de la adición de TCA para frenar la reacción. La actividad enzimática se calculó mediante la ecuación 9:

$$\frac{U}{mg} = \frac{[(A_M - A_{BR}) \times 1000]}{\Delta t \times X \times 0,001} \quad (9)$$

donde  $A_M$  corresponde a la absorbancia de la muestra y  $A_{BR}$  la del blanco a 280 nm,  $\Delta t$  es la duración de la reacción (10 min),  $X$  es la masa de pepsina (µg) en 1 mL de la solución de trabajo,  $1000$  es el factor de dilución y  $0,001$  corresponde a la absorbancia a 280 nm por unidad de pepsina.

### 3.3.3.2. Actividad enzimática de la tripsina

La actividad enzimática de la tripsina se determinó mediante espectrofotometría. La reacción se basa en la reacción del *p*-toluenosulfónico-L-arginina metil ester (TAME) con la tripsina, que da lugar a la formación de *p*-toluenosulfónico-L-arginina y metanol. En primer lugar, se agregaron 1300 µL de la solución de ensayo (46 mM Tris/HCl buffer conteniendo 11,5 mM CaCl<sub>2</sub>

a pH 8,1 a 25°C), 150 µL del sustrato (TAME 10 mM) y 50 µL de la solución de enzima (a 3 concentraciones distintas) a un tubo eppendorf. A continuación, se registró la absorbancia de las muestras a 247 nm de manera continua durante 10 min y se determinó la pendiente de la porción lineal de la curva. Para el blanco se siguió el mismo procedimiento, reemplazando la enzima por HCl 1 mM. La actividad enzimática se calculó mediante la ecuación 10:

$$\frac{U}{mg} = \frac{[\Delta A_M - \Delta A_{BR}] \times 1000 \times 1,5}{540 \times X} \quad (10)$$

donde  $\Delta A_M$  corresponde a la pendiente de la región lineal inicial de la curva (absorbancia/min) para la muestra con enzima y  $\Delta A_{BR}$  para el blanco sin enzima, 540 es el coeficiente de extinción molar del TAME a 247 nm ( $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 1,5 es el volumen de la mezcla de reacción (mL), X es la cantidad de tripsina en la mezcla de reacción final (mg).

### 3.3.3.3. Actividad enzimática de la lipasa pancreática

El ensayo de actividad enzimática de la lipasa pancreática (tanto aislada como presente en el extracto de pancreatina), se realizó mediante titulación con tributirina como sustrato. Los ácidos grasos libres liberados se titularon a pH constante con NaOH durante 15 min.

En primer lugar, se preparó una solución de trabajo compuesta por NaCl (9000 mg/L), taurocolato de sodio (2000 mg/L),  $\text{CaCl}_2$  (200 mg/L) y Tris-(hidroximetil)-aminometano (36 mg/L), y una solución de pancreatina de 1 mg/L.

Para la reacción de titulación, se colocaron en un vaso de precipitado 14,5 mL de la solución de ensayo y 0,5 mL de tributirina. En primer lugar, se realizó un blanco sin agregado de enzima, manteniendo el pH constante en 8 mediante el agregado de NaOH 0,01 M. A continuación, se agregaron 50 ó 100 µL de la solución de pancreatina y se mantuvo el pH en 8 durante aproximadamente 15 min, registrándose la cantidad de NaOH utilizada. Cada concentración de enzima se evaluó por triplicado. La actividad enzimática se determinó mediante la ecuación 11:

$$\frac{U}{mg} = \frac{R(\text{NaOH}) \times 1000}{V \times [E]} \quad (11)$$

donde  $R(NaOH)$  corresponde a los  $\mu\text{moles/min}$  de reacción de NaOH agregados,  $V$  es el volumen de la solución de enzima agregada ( $\mu\text{L}$ ),  $[E]$  es la concentración de la solución de enzima ( $\text{mg/mL}$ ).

### 3.3.4. Preparación de fluidos de digestión gastrointestinal

Los fluidos de digestión gástrica (SGF) y de digestión intestinal (SIF) se prepararon de acuerdo al protocolo de [Brodkorb et al. \(2019\)](#). Las soluciones se prepararon a una concentración 2X de manera de obtener la concentración final luego de las diluciones correspondientes. En la **Tabla 10** se muestra la composición de cada fluido.

**Tabla 10.** Composición de SGF y SIF.

Compuesto	Concentración final (mM)	
	SGF 1X (pH 3)	SIF 1X (pH 7)
KCl	6,9	6,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,9	0,8
NaHCO <sub>3</sub>	25,0	85,0
NaCl	47,2	38,4
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	0,12	0,33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (CO <sub>3</sub> )	0,5	-
HCl	15,6	8,4
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	0,15	0,6

### 3.3.5. Protocolo de digestión *in vitro*

Se utilizó un modelo de digestión *in vitro* estático para evaluar el comportamiento de las partículas durante el proceso de digestión gastrointestinal. Las fases gástrica e intestinal del proceso digestivo fueron simuladas de acuerdo al protocolo propuesto por [Brodkorb et al. \(2019\)](#). La fase oral de la digestión no fue considerada en el presente estudio debido a las características de las partículas evaluadas y a la baja probabilidad de que sufran cambios durante la misma ([Velderrain-Rodríguez et al., 2023](#)).

Fase gástrica: se pesaron 0,35 g de partículas (con un contenido de 0,2 g de oleorresina) o 0,2 g de oleorresina y se mezclaron con 1,5 mL de SGF a pH 3, calentado previamente a 37°C. Se adicionaron 0,5 mL de solución de pepsina de manera de alcanzar una actividad enzimática de 2000 U/mL en la mezcla final. Las muestras se incubaron a 37°C durante 2 h con agitación rotacional.

Fase intestinal: el pH del quimo obtenido en la etapa anterior se ajustó a 7 y se adicionó 1 mL de SIF a pH 7, calentado previamente a 37°C. Luego, se agregaron 0,5 mL de solución de

sales biliares de manera de alcanzar una concentración de 10 mM en la mezcla final. A continuación, se agregaron 0,4 mL de solución de pancreatina de manera de alcanzar una actividad enzimática de tripsina de 100 U/mL en la mezcla final y 0,1 mL de solución de lipasa de manera de alcanzar una actividad enzimática de lipasa de 2000 U/mL en la mezcla final. Las muestras se incubaron a 37°C durante 2 h con agitación rotacional. La cantidad de enzima a agregar en cada caso se calculó teniendo en cuenta la correspondiente actividad enzimática determinada previamente (sección 3.3.3).

Para finalizar las reacciones, las muestras se enfriaron y se adicionó pepstatina A (concentración final 1  $\mu$ M) al finalizar la fase gástrica, y ácido 4-bromofenilborónico para inhibir la actividad de la lipasa (concentración final 5 mM) y Pefabloc para inhibir la actividad de la tripsina (concentración final 5 mM) al finalizar la fase intestinal.

### 3.3.6. Liberación de AX y $\omega$ -3 desde las partículas

Para evaluar el perfil de liberación de AX y  $\omega$ -3 desde las partículas, se tomaron muestras a los 15, 30, 60 y 120 min de digestión gástrica y 15, 30, 60 y 120 min de digestión intestinal y se determinó el contenido de AX y  $\omega$ -3 liberado al medio. Las muestras se analizaron por duplicado.

Para determinar el contenido de los compuestos bioactivos liberados al medio se agregaron 2 mL de acetato de etilo a cada tubo y el contenido se mezcló por inversión 3 veces. A continuación, las muestras se centrifugaron a 570  $\times$ g durante 5 min de manera de extraer los compuestos bioactivos en la fase orgánica.

Para determinar el contenido de AX se mezclaron 700  $\mu$ L del sobrenadante con 700  $\mu$ L de etanol. A continuación, las muestras se analizaron por espectrofotometría de acuerdo a la metodología descrita en la sección 1.3.7.

Para determinar el contenido de  $\omega$ -3, se mezclaron 150  $\mu$ L del sobrenadante con 2850  $\mu$ L de hexano. Se obtuvieron los FAMES correspondientes y se determinaron mediante cromatografía gaseosa de acuerdo a la metodología descrita en la sección 1.3.6.

### 3.3.7. Cinética de liberación de AX y $\omega$ -3

La liberación de bioactivos alimentarios puede ser evaluada mediante diferentes modelos matemáticos, incluyendo modelos empíricos, semiempíricos y mecanísticos. Aunque los modelos empíricos no suelen elucidar los mecanismos fisicoquímicos y biológicos involucrados en el proceso de liberación, permiten comparar el perfil de liberación de diferentes materiales mediante el uso de parámetros como la constante de liberación (Malekjani & Jafari, 2021). En el caso de los modelos semiempíricos, los mismos describen mejor las condiciones reales y pueden permitir indicar el mecanismo subyacente del proceso (Siepmann & Siepmann, 2008).



La cinética de liberación intestinal fue evaluada mediante los siguientes modelos empíricos/semiempíricos:

- **Modelo de Korsmeyer-Peppas**

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (12)$$

donde  $\frac{M_t}{M_\infty}$  es la fracción de bioactivo liberada al tiempo  $t$  (s),  $k$  ( $s^{-n}$ ) es la constante de liberación y  $n$  es el exponente de liberación.

- **Modelo de primer orden:**

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-kt) \quad (13)$$

donde  $\frac{M_t}{M_\infty}$  es la fracción de bioactivo liberada al tiempo  $t$  (s) y  $k$  ( $s^{-1}$ ) es la constante de liberación.

- **Modelo de Higuchi:**

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k\sqrt{t} \quad (14)$$

donde  $\frac{M_t}{M_\infty}$  es la fracción de bioactivo liberada al tiempo  $t$  (s) y  $k$  ( $s^{-0.5}$ ) es la constante de liberación.

- **Modelo de Hopferberg:**

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[ 1 - \frac{kt}{C_0 a_0} \right]^n \quad (15)$$

donde  $\frac{M_t}{M_\infty}$  es la fracción de bioactivo liberada al tiempo  $t$  (s),  $k$  es la constante de liberación ( $\mu\text{g mm}^{-2} \text{s}^{-1}$  para la liberación de AX y  $\text{mg mm}^{-2} \text{s}^{-1}$  para la liberación de  $\omega$ -3),  $C_0$  es el contenido inicial de bioactivo en la matriz ( $\mu\text{g mm}^{-3}$  para la liberación de AX y  $\text{mg mm}^{-3}$  para la liberación de  $\omega$ -3),  $a_0$  es el radio inicial la partícula (mm) y  $n$  es un valor relacionado con la geometría del sistema y equivalente a 3 para partículas esféricas.

### 3.3.8. Bioaccesibilidad

La bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos lipofílicos corresponde a la fracción que se libera de la matriz y es solubilizada en las micelas formadas durante la digestión intestinal. Estos compuestos son los que estarán disponibles para ser absorbidos posteriormente. En el caso de las sustancias altamente lipofílicas, la bioaccesibilidad puede ser utilizada como indicador de la biodisponibilidad (Tan et al., 2022) Se determinó la bioaccesibilidad de AX y  $\omega$ -3 en la oleorresina sin encapsular y en las partículas. El análisis de cada muestra se realizó por duplicado. Para determinar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos, el quimo obtenido al final de la etapa intestinal se centrifugó a  $3606 \times g$  durante 40 min a  $4^\circ\text{C}$ . Se tomó 1 mL de la fase clara acuosa correspondiente a la micela y se mezcló con 1 mL de acetato de etilo. Las muestras se centrifugaron a  $3870 \times g$  durante 10 min para extraer los compuestos bioactivos en la fase orgánica.

Para determinar la bioaccesibilidad de AX se tomaron 500  $\mu\text{L}$  de la fase orgánica y se mezclaron con 500  $\mu\text{L}$  de etanol. Finalmente se determinó el contenido de AX en las muestras mediante espectrofotometría, de acuerdo a la metodología descrita en la sección 1.3.7. Para determinar el contenido de  $\omega$ -3, se tomaron 150  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se agregaron a 2850  $\mu\text{L}$  de hexano. El contenido de  $\omega$ -3 se determinó mediante cromatografía gaseosa utilizando el protocolo descrito en la sección 1.3.6.

La bioaccesibilidad se calculó como la relación entre el contenido de compuesto bioactivo en la micela respecto al contenido de compuesto bioactivo liberado al final de la digestión gastrointestinal (Jain et al., 2020), mediante la ecuación 16:

$$\text{Bioaccesibilidad} = \frac{C_{\text{micela}}}{C_{\text{digerido}}} \times 100 \quad (16)$$

donde  $C_{micela}$  representa la concentración de compuesto bioactivo en la micela y  $C_{digerido}$  representa la concentración de compuesto bioactivo liberado a medio al final de la digestión gastrointestinal.

### 3.3.9. Digestión lipídica

La digestión lipídica de las muestras se analizó utilizando el método del pH-stato. Los fluidos SGF y SIF se prepararon de acuerdo a lo especificado en [Brodkorb et al. \(2019\)](#), excepto por el  $\text{NaHCO}_3$ , que se reemplazó por  $\text{NaCl}$  manteniendo la misma concentración molar para evitar un incremento del pH durante la reacción en viales abiertos ([Mat et al., 2016](#)). Las soluciones de enzimas y sales biliares se prepararon de acuerdo a lo especificado en el protocolo de [Brodkorb et al. \(2019\)](#).

Se analizó la digestión lipídica de las partículas 100ALG y 25WPA75ALG y de la oleoresina sin encapsular. Primero, se simuló la fase gástrica de la digestión, para lo cual las muestras se mezclaron con SGF a pH 3 y con la solución de pepsina, y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 h bajo agitación. Al finalizar las 2 h de digestión gástrica, el pH se ajustó a 7 mediante el agregado de  $\text{NaOH}$  y se agregó la cantidad necesaria de SIF a pH 7. Luego, se agregaron las soluciones de enzimas y de sales biliares correspondientes a la etapa intestinal. A continuación, el pH se reajustó a 7 y se inició la titulación con  $\text{NaOH}$  (se agregó  $\text{NaOH}$  a medida que el pH disminuyó por debajo de 7 y se registró la cantidad de  $\text{NaOH}$  agregada en función del tiempo durante 2 h).

Se realizó un blanco sin muestras, el cual se sustrajo a cada curva de titulación. Además, se realizó un blanco de proteína el cual se restó a las muestras 25WPA75ALG. Este último blanco se realizó debido a que la metodología de pH-stato es sensible tanto a la lipólisis como a la proteólisis intestinal, por lo que la presencia de proteínas en las muestras puede influir en los resultados al evaluar la lipólisis ([Mat et al., 2020](#)). El blanco de proteína se realizó siguiendo el protocolo propuesto por [Mat et al. \(2020\)](#). Para ello se utilizó Orlistat como inhibidor de la hidrólisis lipídica, de manera de evaluar el descenso del pH causado solo por la hidrólisis proteica. Se reemplazaron 150  $\mu\text{L}$  de SIF por 150  $\mu\text{L}$  de una solución de Orlistat en dimetilsulfóxido (DMSO), de manera de alcanzar una concentración final de Orlistat de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En estas muestras no se adicionó lipasa pancreática con el objetivo de no promover la hidrólisis lipídica. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

El porcentaje de ácidos grasos libres (FFA) liberados durante la digestión lipídica se calculó mediante la ecuación 17:

$$FFA(\%) = \frac{V_{NaOH} \times C_{NaOH} \times M_{lipidos}}{2 \times W_{lipidos}} \times 100 \quad (17)$$

donde  $V_{NaOH}$  es el volumen de NaOH agregado (L),  $C_{NaOH}$  es la concentración de NaOH utilizada (0,25 M)  $M_{lipidos}$  es el peso molecular del aceite (830,15 g/mol), y  $W_{lipidos}$  es la masa de aceite (g) utilizada en el ensayo.

### 3.3.10. Análisis estadístico

Se aplicó un Análisis de Varianza (ANOVA) para la comparación de los datos obtenidos, utilizando un nivel de confianza del 95%. Se aplicaron Pruebas de Rangos Múltiples para identificar diferencias estadísticamente significativas, mediante el uso del Test de Fischer (LSD) con un nivel de confianza del 95%. Los análisis se realizaron mediante el uso del programa Statgraphics (Statgraphics Inc., Rockville, MD, Estados Unidos).

## 3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.4.1. Actividades enzimáticas

En la **Tabla 11**, se muestran las actividades correspondientes a cada enzima utilizada en los ensayos de digestión *in vitro*.

**Tabla 11.** Actividades de las enzimas utilizadas para los ensayos de digestión *in vitro*.

Enzima	Actividad enzimática (U/mg)
<b>Pepsina</b>	199,74±14,76
<b>Lipasa pancreática (aislada)</b>	61,42±4,97
<b>Lipasa en pancreatina</b>	78,34±4,12
<b>Tripsina en pancreatina</b>	4,37±0,52

### 3.4.2. Liberación de AX y ω-3 desde las partículas

En primer lugar, se evaluó la liberación de los compuestos bioactivos desde las partículas 100ALG y 25WPA75ALG cuando las mismas se expusieron a condiciones de digestión gástrica e intestinal. En las **Figuras 29 y 30**, se muestra el porcentaje AX y ω-3 liberados durante la digestión gástrica. Tanto las partículas 100ALG como 25WPA75ALG protegieron a los compuestos bioactivos durante la fase de digestión gástrica, siendo el porcentaje de liberación de AX y ω-3 desde ambas partículas menor al 10%. Considerando que el sitio de absorción de la AX y los ácidos grasos ω-3 es el intestino, la retención de ambos compuestos durante la fase gástrica

es deseable para protegerlos de las condiciones estomacales. Bajo condiciones de pH ácido, el ALG se contrae, lo cual permite explicar la protección de los compuestos bioactivos durante la digestión gástrica (Azad et al., 2020; Li et al., 2021). La adición de WPA no afectó a estas características de liberación y se observó la misma tendencia en las partículas 25WPA75ALG. La resistencia de la  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\alpha$ -lactoalbúmina (las 2 principales proteínas del lactosuero) a la digestión por la pepsina puede haber contribuido a la protección de los compuestos bioactivos durante la digestión gástrica (Alavi et al., 2018).

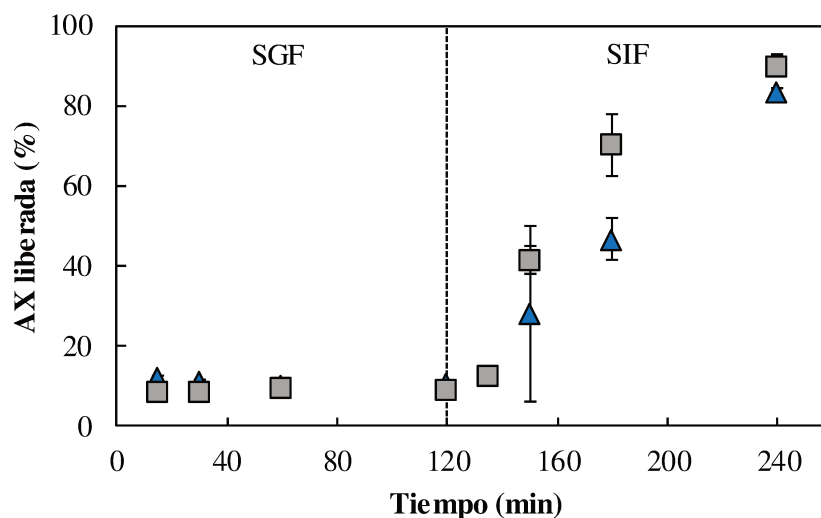


Figura 29. Liberación de AX durante las fases de digestión gástrica e intestinal. 100ALG (-▲-); 25WPA75ALG (-■-).

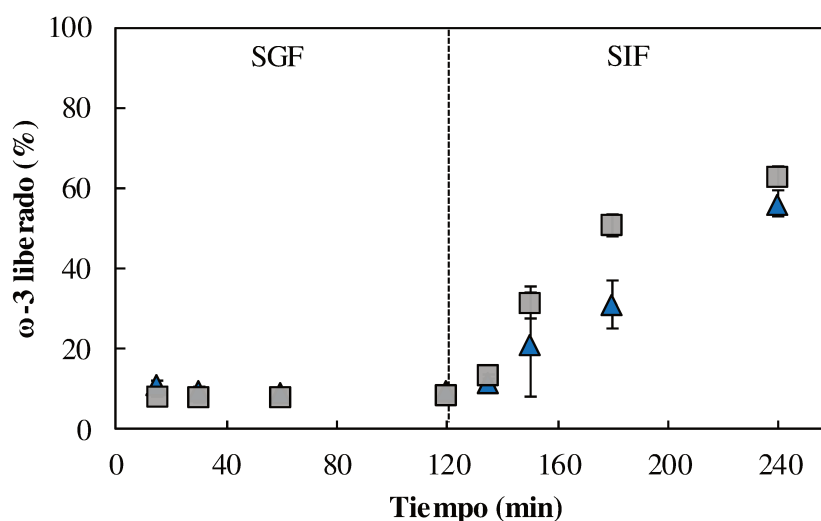


Figura 30. Liberación de  $\omega$ -3 durante las fases de digestión gástrica e intestinal. 100ALG (-▲-); 25WPA75ALG (-■-).

Por otro lado, se observaron altos porcentajes de liberación de los compuestos bioactivos encapsulados durante la digestión intestinal, no observándose diferencias en el porcentaje liberado por ambos tipos de partículas al final de la fase intestinal (**Figuras 29 y 30**). Las partículas 100ALG liberaron al medio  $83,46 \pm 1,07\%$  y  $56,10 \pm 3,20\%$  de AX y  $\omega$ -3, respectivamente, mientras que las partículas 25WPA75ALG liberaron al medio  $90,04 \pm 2,85$  y  $63,01 \pm 2,43\%$  de AX y  $\omega$ -3, respectivamente. El hinchamiento del ALG bajo condiciones de pH neutro es el principal responsable de la liberación los compuestos bioactivos durante la digestión intestinal ([Azad et al., 2020](#); [Li et al., 2021](#)). Por otra parte, la mayor sensibilidad de las proteínas del suero a la acción de la pancreatina en relación a la pepsina también contribuye a los altos porcentajes de liberación de los compuestos encapsulados en el fluido SIF ([Ozel et al., 2020](#)). La liberación de los compuestos bioactivos encapsulados durante la fase intestinal es necesaria para su posterior absorción. De esta forma, con ambos tipos de partículas se logró la liberación en un sitio específico (intestino), tanto para la molécula de AX como para los ácidos grasos  $\omega$ -3.

El perfil de liberación de los compuestos bioactivos desde las matrices que los contienen puede presentar distintos patrones. La liberación tipo *burst* se caracteriza por la liberación rápida de la mayor parte del compuesto en un período corto de tiempo ([Boostani & Jafari, 2021](#)). Este tipo de patrón es poco deseado tanto desde el punto de vista farmacológico como económico. La liberación repentina de concentraciones altas de vitaminas y nutraceuticos puede provocar una concentración relativamente alta de estos compuestos en el torrente sanguíneo, lo que podría tener efectos potencialmente dañinos para algunos individuos ([Tan & McClements, 2021](#)). En contraposición, los perfiles de liberación sostenida resultan más efectivos ([Sarkar & Mackie, 2020](#)), evitando los efectos no deseados mencionados anteriormente. En el presente estudio, se observó una liberación sostenida de ambos compuestos bioactivos desde 100ALG y 25WPA75ALG durante la fase de digestión intestinal. Dicho patrón de liberación puede estar vinculado al tamaño de las partículas, dado que la liberación tipo *burst* suele estar asociada a sistemas de liberación con una gran relación superficie/volumen ([Brazel & Huang, 2004](#)).

### 3.4.3. Cinética de liberación

Se aplicaron diferentes modelos empíricos/semiempíricos para analizar el perfil de liberación de AX y  $\omega$ -3 desde las partículas durante la fase intestinal. En las **Tablas 12 y 13**, se muestran los parámetros asociados a cada modelo. De acuerdo al valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ), tanto para la liberación de AX como de  $\omega$ -3, todos los modelos presentaron un ajuste aceptable, a excepción del modelo de Higuchi.

De acuerdo al modelo de Korsmeyer-Peppas, el valor de  $n$  es indicativo del mecanismo de liberación ([Malekjani & Jafari, 2021](#)). En las partículas 100ALG, el valor de  $n$  fue de 1,11 y 1,12 para la liberación de AX y de  $\omega$ -3, respectivamente; mientras que para las partículas

25WPA75ALG, el valor de  $n$  fue de 0,77 y 0,71 para la liberación de AX y de  $\omega$ -3, respectivamente. Valores de  $n$  mayores a 0,43 para esferas indican un mecanismo de liberación no-Fickiano. Este tipo de transporte se presenta normalmente en polímeros vítreos cuando la temperatura del medio es menor que la temperatura de transición vítrea del polímero (Malekjani & Jafari, 2021). En este caso, el hinchamiento y la erosión de la matriz son los principales mecanismos implicados en la liberación de compuestos (Oroná et al., 2021).

**Tabla 12.** Parámetros asociados a cada modelo para la liberación de AX.

Modelo	Parámetro	100ALG	25WPA75ALG
<b>Korsmeyer-Peppas</b> $\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$	k [s <sup>-n</sup> ]	$3,80 \times 10^{-5}$	$9,18 \times 10^{-4}$
	n [-]	1,11	0,77
	R <sup>2</sup>	0,9911	0,9334
<b>Primer orden</b> $\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-kt)$	k [s <sup>-1</sup> ]	$1,41 \times 10^{-4}$	$2,23 \times 10^{-4}$
	R <sup>2</sup>	0,9679	0,9611
<b>Higuchi</b> $\frac{M_t}{M_\infty} = k\sqrt{t}$	k [s <sup>-0,5</sup> ]	$6,76 \times 10^{-3}$	$8,91 \times 10^{-3}$
	R <sup>2</sup>	0,8656	0,8993
<b>Hopfenberg</b> $\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{kt}{C_0 a_0}\right]^3$	k [μg mm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]	$1,38 \times 10^{-5}$	$2,02 \times 10^{-5}$
	R <sup>2</sup>	0,9796	0,9591

**Tabla 13.** Parámetros asociados a cada modelo para la liberación de  $\omega$ -3.

Modelo	Parámetro	100ALG	25WPA75ALG
<b>Korsmeyer-Peppas</b> $\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$	k [s <sup>-n</sup> ]	$2,20 \times 10^{-5}$	$1,07 \times 10^{-3}$
	n [-]	1,12	0,71
	R <sup>2</sup>	0,9937	0,9421
<b>Primer orden</b> $\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-kt)$	k [s <sup>-1</sup> ]	$7,82 \times 10^{-5}$	$1,25 \times 10^{-4}$
	R <sup>2</sup>	0,9819	0,9536
<b>Higuchi</b> $\frac{M_t}{M_\infty} = k\sqrt{t}$	k [s <sup>-0,5</sup> ]	$4,30 \times 10^{-3}$	$6,15 \times 10^{-3}$
	R <sup>2</sup>	0,8647	0,9199
<b>Hopfenberg</b> $\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{kt}{C_0 a_0}\right]^3$	k [mg mm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]	$1,05 \times 10^{-5}$	$1,44 \times 10^{-5}$
	R <sup>2</sup>	0,9868	0,9405

El coeficiente de liberación ( $k$ ) permite evaluar la velocidad de liberación de los compuestos bioactivos para las distintas partículas evaluadas. Para todos los modelos analizados, los valores de  $k$  fueron mayores para las partículas 25WPA75ALG, indicando una mayor velocidad de liberación de AX y  $\omega$ -3 desde este tipo de partículas. La alta susceptibilidad de las proteínas del lactosuero a la hidrólisis por las proteasas intestinales puede haber causado una velocidad más

rápida de erosión de esta matriz y, como consecuencia, una mayor velocidad de liberación de los compuestos bioactivos encapsulados (Ozel et al., 2020).

#### 3.4.4. Bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos

La bioaccesibilidad de AX en la oleorresina fue del  $3,56 \pm 2,56\%$ . Para el caso de las partículas, se obtuvieron valores de bioaccesibilidad del  $2,79 \pm 1,40\%$  y  $4,36 \pm 0,33\%$  para 100ALG y 25WPA75ALG, respectivamente. Por otro lado, el valor de bioaccesibilidad de  $\omega$ -3 en la oleorresina fue  $5,00 \pm 2,61\%$ , mientras que para las partículas 100ALG y 25WPA75ALG la bioaccesibilidad de  $\omega$ -3 fue del  $5,09 \pm 2,36\%$  y  $9,69 \pm 0,49\%$ , respectivamente. Se puede notar que el porcentaje de bioaccesibilidad fue bajo en todas las muestras estudiadas.

La bioaccesibilidad de compuestos lipofílicos depende de múltiples factores tales como el tipo y la cantidad de lípidos presentes, el tamaño de la gota de aceite, la composición de la interface y la presencia de aditivos alimenticios (Tan et al., 2022). Valores de bioaccesibilidad en un rango entre 3,7% y 54,3% fueron reportados en la bibliografía para AX incorporada en emulsiones con diferentes tamaños de gota, distintos tipos de aceites y/o diferentes tipos de emulsificantes (Boonlao et al., 2020; Yang et al., 2021). Asimismo, la bioaccesibilidad de  $\omega$ -3 también ha mostrado variaciones en función de la matriz estudiada, reportándose valores en un rango entre 7,9% y 23,6%, en micro y nano-partículas de aceite de chía generadas con ALG (Álvarez et al., 2022) y del 12,8% para aceite de linaza incorporado en nanopartículas (da Silva Stefani et al., 2019).

La disminución en el tamaño de las gotas de aceite que se produce durante el proceso de emulsificación genera una mayor superficie expuesta que favorece la acción de la lipasa (Tan et al., 2022). Sin embargo, la estructura de gel que se crea durante la formación de las partículas puede dificultar la difusión de la lipasa a la interface (Corstens et al., 2017). Teniendo en cuenta que la bioaccesibilidad de los carotenoides dispersados en aceites se encuentra relacionada a la digestión del aceite (Verkempinck et al., 2018), la bioaccesibilidad de la AX se puede ver afectada por la digestión del aceite de chía.

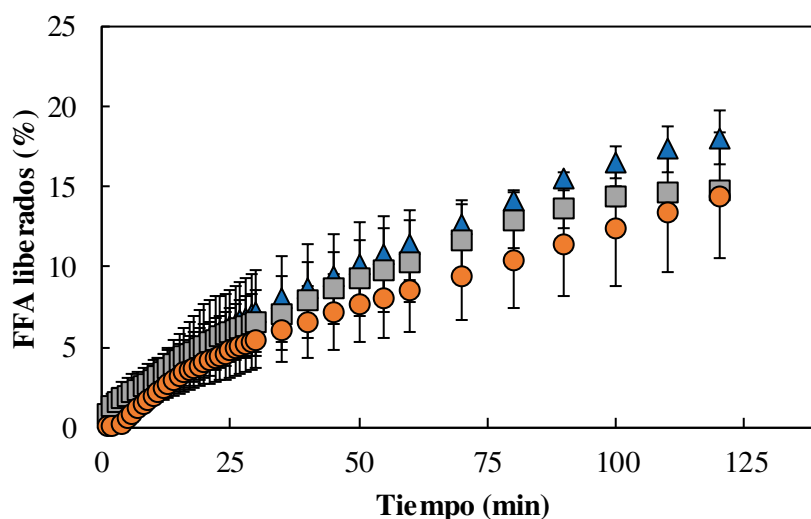
#### 3.4.5. Digestión lipídica

La mayor parte de la digestión de los lípidos se produce en el intestino por acción de la lipasa pancreática. Dicha enzima hidroliza los enlaces ésteres de las posiciones sn-1 y sn-3 de los triglicéridos (TAG), generando 2 ácidos grasos libres (FFA) y 2-monoacilglicerol (2-MAG). La capacidad de la lipasa de entrar en contacto con los sustratos es uno de los principales factores que afecta la tasa de digestión de los lípidos. Por otra parte, el tipo de ácido graso y su posición en el TAG tienen efecto en la hidrólisis por parte de la lipasa. El porcentaje de FFA liberados durante la digestión intestinal de la oleorresina sin encapsular fue del  $14,48 \pm 3,94\%$  (Figura 31).



La velocidad de liberación de FFA desde los ácidos grasos de cadena larga es menor que desde los ácidos grasos de cadena corta (Ye et al., 2019). Además, los ácidos grasos  $\omega$ -3 exhiben una mayor resistencia a la hidrólisis por la lipasa en comparación con otros ácidos grasos con cadenas de similar longitud y por tal razón, poseen una menor velocidad de digestión lipídica (Yoshikiyo et al., 2023). Como consecuencia, el alto contenido de  $\omega$ -3 en el aceite de chía da lugar a una menor digestibilidad en comparación con otros aceites (Ye et al., 2018; Pascoviche et al., 2019).

La lipólisis se incrementó levemente con la encapsulación de la oleorresina en partículas 100ALG y 25WPA75ALG ( $p < 0,05$ ), no siendo significativa la diferencia entre ambos tipos de partículas ( $p > 0,05$ ) (Figura 31). Este comportamiento puede ser explicado teniendo en cuenta que la emulsificación del aceite incrementa el área de interface y promueve la hidrólisis lipídica. Sin embargo, la estructura tipo gel formada durante la gelificación iónica puede dificultar la difusión de la lipasa hasta la interface, lo cual es un paso esencial para la digestión de lípidos. Resultados similares fueron reportados por Jin et al. (2023), quienes evaluaron la lipólisis del aceite de girasol encapsulado en microgeles de ALG y de ALG combinado con proteína de soja. Aunque en dicho trabajo la adición de proteína de soja generó un incremento en la lipólisis del aceite, los valores de FFA liberados fueron menores al 10% luego de 10 h de digestión intestinal en ambos tipos de partículas evaluadas, como consecuencia de la red de gel formada en las partículas de hidrogel rellenas.



**Figura 31.** Liberación de FFA durante la fase de digestión intestinal. 100ALG (-▲-); 25WPA75ALG (-■-); Oleorresina (-●-).

### **3.5. CONCLUSIONES**

La encapsulación de la oleorresina de aceite de chía y AX en partículas de ALG y WPA-ALG permitió la protección de los compuestos bioactivos durante la fase de digestión gástrica y su posterior liberación en la fase intestinal. La cantidad de compuestos bioactivos liberados al final de la fase intestinal fue similar para ambos tipos de partículas, aunque la velocidad de liberación fue mayor en las partículas 25WPA75ALG. La bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos encapsulados fue baja, siendo dichos valores similares a los observados en la oleorresina sin encapsular. En cuanto a la digestión lipídica, la misma se incrementó levemente al encapsular la oleorresina. El tipo de material de pared utilizado no tuvo un efecto en el grado de lipólisis alcanzado ni en la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos. En este sentido, la adición de WPA a las partículas de ALG demostró mejorar la estabilidad de los compuestos bioactivos encapsulados, conservando las ventajas que presentan las partículas de ALG durante la digestión gastrointestinal.

# **CAPÍTULO 4**

---

## **ANÁLISIS SENSORIAL DE UNA MATRIZ ALIMENTARIA CONTENIENDO LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS ENCAPSULADOS**

## CAPÍTULO 4 – ANÁLISIS SENSORIAL DE UNA MATRIZ ALIMENTARIA CONTENIENDO LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS ENCAPSULADOS

### 4.1. INTRODUCCIÓN

La fortificación directa de alimentos con compuestos bioactivos lipofílicos presenta desafíos vinculados con la estabilidad oxidativa de los mismos, su baja solubilidad en matrices acuosas y las alteraciones organolépticas desfavorables que pueden darse como consecuencia de los aromas y sabores característicos de muchos de estos compuestos. A raíz de ello, la adición de compuestos bioactivos encapsulados puede ser una estrategia útil para la fortificación de alimentos, dado que las partículas actúan como una barrera que impide su contacto directo con la matriz alimentaria (Gumus et al., 2021).

La aceptación de nuevos alimentos funcionales se encuentra influenciada por diferentes factores, siendo las características socio-demográficas de los consumidores (como la edad, género, nivel educativo y localización geográfica) y características psicológicas (como las motivaciones, creencias y neofobias), algunos de los más importantes. Además, cuando los consumidores tienen conocimientos acerca de nutrición y se les brinda información relacionada con los beneficios sobre la salud del producto, suele haber una valoración positiva sobre los nuevos alimentos. El precio del producto también tiene relevancia, aunque los efectos observados en este caso han sido contradictorios. Finalmente, uno de los principales factores que influye en la aceptabilidad de los alimentos funcionales se relaciona con las características de la matriz alimentaria a la cual se incorporan los compuestos bioactivos. En este sentido, algunos estudios han demostrado que los alimentos funcionales formados a partir de matrices consideradas saludables son más aceptados por los consumidores (Baker et al., 2022).

En relación a la matriz alimentaria, la misma debe ser compatible con las características de las partículas que se le adicionen y, por otro lado, el alimento debe ser ampliamente aceptado por la población. La leche y sus derivados están dentro de los alimentos más consumidos en diferentes países, lo que los convierte en una buena opción para la vehiculización de compuestos bioactivos (Adinepour et al., 2022), siendo los productos lácteos fermentados un grupo especial a ser considerado, dado que, además, proveen diversos beneficios para la salud (Gruskiene et al., 2021). El yogur, uno de los lácteos fermentados más consumido en algunas regiones, es una excelente fuente de proteínas y contiene gran cantidad de micronutrientes como vitaminas, calcio, zinc, potasio y magnesio, como así también bacterias lácticas y sus metabolitos, que le otorgan un elevado valor nutritivo (Gahruie et al., 2015; Gruskiene et al., 2021). Además, el pH ácido del yogur lo convierte en una matriz apropiada para la adición de partículas formuladas a partir de ALG, dado que favorece la estabilidad de las mismas. Por otra parte, la temperatura de almacenamiento de los yogures resulta favorable para la estabilidad de los compuestos bioactivos.

Así, algunos estudios previos mostraron resultados satisfactorios al incorporar compuestos bioactivos en yogures (Goyal et al., 2016; Balabanova et al., 2020).

Uno de los principales desafíos en la incorporación de partículas en matrices alimentarias es la alteración organoléptica que se puede generar, principalmente vinculada al aroma, sabor y a la apariencia del producto final. Estas alteraciones pueden afectar la aceptabilidad del alimento por parte de los consumidores. En este sentido, el análisis sensorial es una herramienta de gran relevancia cuando se modifica un alimento o se desarrolla uno nuevo. El análisis sensorial puede ser definido como “la rama de la ciencia utilizada para obtener, medir, analizar e interpretar las reacciones a determinadas características de los alimentos y materiales, tal y como son percibidas por los sentidos de la vista, gusto, olfato, tacto y oído” (Stone et al., 2004). Existen diferentes metodologías que se pueden aplicar para la evaluación sensorial de un producto; las mismas se pueden agrupar en tres categorías principales: pruebas discriminativas, pruebas descriptivas y pruebas afectivas (Stone et al., 2004).

Las pruebas discriminativas permiten detectar si existen diferencias significativas entre dos muestras y la magnitud de dichas diferencias. Para este tipo de pruebas, se requiere que los panelistas tengan cierto grado de entrenamiento. Por otro lado, las pruebas descriptivas consisten en una descripción sensorial completa del producto y también requieren de la participación de panelistas entrenados. Para este tipo de análisis, se necesita encontrar descriptores que proporcionen la máxima información sobre las propiedades sensoriales del producto evaluado. Finalmente, las pruebas afectivas evalúan la preferencia o elección de un producto y son llevadas a cabo por panelistas no entrenados, es decir que se recurre a los potenciales consumidores (Ruiz-Capillas et al., 2021). Tradicionalmente, la caracterización sensorial de los alimentos es llevada a cabo mediante pruebas descriptivas, las cuales proveen información detallada, confiable y reproducible. Sin embargo, dichas pruebas demandan de gran cantidad de tiempo y, como se ha mencionado, requieren de panelistas entrenados (Cadena et al., 2014).

Recientemente, nuevas metodologías de análisis sensorial han cobrado relevancia, las cuales tienen como ventaja su rapidez y simplicidad. Dentro de estas técnicas se pueden mencionar: *Flash Profiling*, *Napping* y *Check-All-That-Apply* (Ruiz-Capillas et al., 2021). La técnica *Check-All-That-Apply* (CATA) o Marque Todo Lo Que Aplica, es una técnica que permite obtener información acerca de la percepción de un producto por parte de los consumidores. Cuando se realiza un análisis sensorial a partir de esta metodología, se les presenta a los consumidores una serie de muestras y un listado de términos para que marquen aquellos que consideran apropiados para describir cada muestra. En general, estos términos están vinculados con las características sensoriales del producto, pero pueden utilizarse además algunos términos hedónicos relacionados con características no sensoriales, como ocasiones de consumo o emociones. Esta metodología

resulta intuitiva para los consumidores, requiere menos esfuerzo cognitivo que otras metodologías sensoriales y da lugar a una evaluación más espontánea (Ares & Jaeger, 2015).

En este capítulo, se evaluó el efecto del agregado de partículas 100ALG y 25WPA75ALG (conteniendo aceite de chía y AX) en un alimento modelo sobre sus características sensoriales. Se seleccionó al yogur como matriz para el agregado de las partículas. Se realizó un análisis sensorial del producto a fin de evaluar la aceptabilidad por parte de los potenciales consumidores, y para analizar, de manera integral, el efecto del agregado de las partículas a la matriz alimentaria.

## 4.2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

- ✓ Evaluar la aceptabilidad sensorial por parte de consumidores de una matriz alimentaria adicionada con aceite de chía y AX encapsulados en partículas 100ALG y 25WPA75ALG.
- ✓ Analizar el efecto del agregado de las partículas 100ALG y 25WPA75ALG en las características sensoriales del alimento modelo.

## 4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.3.1. Materiales

El yogur batido sabor frutilla fue adquirido en Milkaut S.A. (Santa Fe, Argentina). El alginato de sodio de baja viscosidad fue adquirido en Kelco (Atlanta, Estados Unidos). El concentrado de proteína de lactosuero (LACPRODAN 80) fue adquirido en Arla Foods Ingredientes S.A. (Córdoba, Argentina). El aceite de chía prensado en frío fue adquirido en Sturla S.R.L. (Burzaco, Argentina). La astaxantina natural (AstaZine®) fue provista por Lipomize S.R.L. (Santa Fe, Argentina). Polisorbato 80 y cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) fueron adquiridos en Cicarelli Laboratorios S.A. (Santa Fe, Argentina).

### 4.3.2. Preparación de las partículas

Las partículas se obtuvieron mediante gelificación iónica a partir de la metodología descrita en la sección 2.3.4. Se evaluaron los dos tipos partículas caracterizadas anteriormente: 100ALG y 25WPA75ALG.

### 4.3.3. Preparación de los yogures

Para el análisis sensorial, se utilizó un yogur comercial batido sabor frutilla, al cual se le agregaron las partículas mediante mezclado manual. Se evaluaron 3 tipos de muestras: yogur adicionado con partículas 100ALG con oleorresina encapsulada (Y-100ALG), yogur adicionado

con partículas 25WPA75ALG con oleorresina encapsulada (Y-25WPA75ALG), y como control, un yogur adicionado con partículas 100ALG sin compuestos bioactivos encapsulados (Y-C).

La cantidad de partículas adicionadas al yogur fue determinada en función de la dosis diaria recomendada para ambos compuestos (AX y  $\omega$ -3), y es por ello que se agregaron 1,83 g de partículas por porción de yogur (120 g). En cuanto a la dosis recomendada de AX, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) considera una ingesta diaria aceptable (IDA) de AX natural de 0,034 mg/Kg de peso corporal por día, lo cual equivale a 2 mg/día para un adulto con un peso de 60 Kg. Por otra parte, dentro de los suplementos comerciales encontrados en el mercado se encuentran dosis entre 1 y 12 mg (Brendler & Williamson, 2019). Respecto a la dosis diaria recomendada de  $\omega$ -3, el Código Alimentario Argentino (CAA, 2021) considera como “alimentos fuentes de ácidos grasos  $\omega$ -3” a aquellos con un contenido de 300 mg de  $\omega$ -3 por porción, y como “alimentos con alto contenido de ácidos grasos  $\omega$ -3” a aquellos que contienen al menos 600 mg de  $\omega$ -3 por porción. Por otra parte, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (FAO & FINUT, 2012), la recomendación de consumo de  $\omega$ -3 es del 0,5-2% de la energía consumida por día, siendo la recomendación de ácido linolénico (ALA) mayor al 0,5% de la energía (ingesta promedio de 2000 kcal por día), lo cual equivale a 1,11 g de ALA. Considerando la cantidad de oleorresina incorporada en las partículas y la EE de cada compuesto bioactivo, con 1,83 g de partículas se aportan 555 mg de ALA y 0,4 mg de AX. De esta forma, se cubre el 50% de la recomendación diaria de ALA de acuerdo con la FAO (y se obtiene un alimento fuente de ácidos grasos  $\omega$ -3 de acuerdo con el CAA), mientras que se cubre el 20% de la recomendación diaria de AX (considerando una dosis recomendada de 2 mg/día).

#### 4.3.4. Estabilidad de AX y $\omega$ -3 en yogur

Se evaluó la estabilidad de los compuestos bioactivos encapsulados en las partículas 100ALG y 25WPA75ALG incorporadas en el yogur. Los yogures se almacenaron a temperatura de refrigeración (4°C) durante 28 días y se determinó el contenido de AX y  $\omega$ -3 en las partículas, tanto al inicio como al final del almacenamiento de los yogures. Para la determinación del contenido de compuestos bioactivos, las partículas se separaron del yogur mediante filtración y se realizó la extracción de la oleorresina siguiendo la metodología descrita en la sección 2.3.6. El contenido de AX se determinó mediante espectrofotometría, de acuerdo a la metodología descrita en la sección 1.3.7; mientras que el contenido de  $\omega$ -3 se determinó mediante cromatografía gaseosa, de acuerdo a la metodología descrita en la sección 1.3.6. Se aplicó un ANOVA para la comparación de los datos obtenidos, utilizando un nivel de confianza del 95%. Los análisis se realizaron mediante el uso del programa Statgraphics (Statgraphics Inc., Rockville, MD, Estados Unidos).

#### 4.3.5. Análisis microbiológico

Se realizaron los recuentos de coliformes totales, coliformes fecales, hongos y levaduras en las muestras de yogures adicionados con partículas. Las condiciones utilizadas y las diluciones sembradas se indican en la **Tabla 14**. Para cada muestra, se realizaron dos diluciones 1:10 sucesivas, en agua de peptona 0,1% (p/v) estéril. Las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado.

**Tabla 14.** Condiciones utilizadas para las determinaciones microbiológicas. TC: muestra sin diluir. En todos los casos se sembró 1 mL por placa, en profundidad.

Tipo de microorganismo	Condiciones de incubación y medio de cultivo utilizado	Diluciones sembradas
<b>Coliformes totales</b>	Agar bilis Rojo Violeta 30°C, 24 h, aerobiosis	TC, 10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>
<b>Coliformes fecales</b>	Agar bilis Rojo Violeta 45°C, 24 h, aerobiosis	TC, 10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>
<b>Hongos y levaduras</b>	Agar Cloranfenicol Glucosa 25°C, 5-7 días, aerobiosis	TC, 10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>

#### 4.3.6. Caracterización sensorial basada en consumidores

El análisis sensorial se llevó a cabo con un total de 101 consumidores, los cuales formaban parte de la base de datos del Departamento de Análisis Sensorial de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina). Los consumidores presentaron una frecuencia de consumo de yogur de al menos dos veces por semana, disponibilidad e interés por participar. La edad de los participantes estuvo comprendida entre 18 y 65 años y la población estuvo conformada por un 62% de mujeres y un 38% de hombres. La muestra comprendía composiciones de hogares y niveles de ingresos variables. Los consumidores no recibieron ninguna información adicional sobre las muestras antes de la degustación y dieron su consentimiento informado por escrito.

Las pruebas se realizaron en un laboratorio sensorial en cabinas individuales (ISO8589, 2007). Se controló la luz artificial, la temperatura (22°C) y la circulación del aire. Los participantes contaron con agua mineral en todo momento para enjuagar su boca a fin de neutralizar los sabores residuales entre la ingesta de las diferentes muestras. Las muestras se entregaron a los consumidores en un vaso plástico transparente, cada una con 30 g de los diferentes tipos de yogures a 8°C. Cada muestra de yogur (Y-C, Y-100ALG y Y-25WPA75ALG) se codificó con números aleatorios de 3 dígitos (**Figura 32**). El orden en que los consumidores probaron los productos fue aleatorio, de manera de lograr un correcto equilibrio en las presentaciones y minimizar cualquier sesgo sensorial.





**Figura 32.** Presentación de las muestras a los consumidores dentro de las cabinas de análisis sensorial.

La prueba de chi-cuadrado indicó que las diferencias en las distribuciones de frecuencia de consumo de yogur (al menos dos veces por semana y más de dos veces por semana), por género (femenino y masculino) y edad (entre 18-40 años y 40-65 años), no resultaron significativas. Los análisis fueron realizados utilizando el programa XLSTAT 2014 (Addinsoft, París, Francia).

Finalmente, se destaca que el presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina, mediante las acciones correspondientes al proyecto “Metodologías sensoriales basadas en consumidores para desarrollar y caracterizar productos alimenticios a partir de sus percepciones y motivos de consumo”, aprobado según Resolución 379/23|19012020 del Honorable Consejo Superior.

#### 4.3.7. Aceptabilidad global

Se solicitó a los consumidores que probaran las muestras y calificaran su aceptabilidad mediante una escala hedónica horizontal de 9 puntos; donde 9 = me gusta muchísimo; 8 = me gusta mucho; 7 = me gusta moderadamente; 6 = me gusta poco; 5 = ni me gusta ni me disgusta; 4 = me disgusta poco; 3 = me disgusta; 2 = me disgusta mucho; y 1 = me disgusta extremadamente. Los anclajes verbales de la escala se seleccionaron de manera que la distancia psicológica entre puntos sucesivos de la escala sea siempre la misma (Wichchukit & O'Mahony, 2015). Se aplicó un ANOVA para la comparación de las muestras, utilizando un nivel de confianza del 95%. Cuando las diferencias fueron significativas ( $p < 0,05$ ), las medias se compararon mediante la prueba de Tukey.

#### 4.3.8. Preguntas CATA

Se pidió a los consumidores que completaran una pregunta de tipo CATA con 29 términos relacionados con las características sensoriales de los yogures: dulce, ácido, amargo, sabor extraño, sabor agradable, sabor desagradable, sabor a polvo, aceitoso, suave, áspero, espeso,

fluido, cremoso, homogéneo, heterogéneo, grumoso, gelatinoso, partículas agradables, partículas desagradables, fácil de ingerir, difícil de ingerir, para colación, para postre, saludable, agradable, desagradable, novedoso, tradicional y llamativo. Los términos fueron seleccionados en base a datos publicados (Tarrega et al., 2016; Farah et al., 2017; Ares et al., 2014), considerando los descriptores seleccionados por los evaluadores capacitados y estudios preliminares. Se solicitó a los participantes que marcaran todos los términos que consideraran apropiados para describir cada tipo de yogur. En el Anexo (**Figura A1**), se muestra un modelo de la planilla presentada a los consumidores.

La frecuencia de uso de cada uno de los términos de la pregunta CATA se determinó contando el número de consumidores que usaron ese término para describir cada muestra. Se realizó la prueba Q de Cochran para identificar diferencias significativas entre muestras para cada uno de los términos, utilizando el programa XLSTAT 2014 (Addinsoft, París, Francia). Asimismo, se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (PcoA) y un Análisis de Correspondencias (AC) sobre la matriz que contiene la frecuencia de uso de cada término para cada muestra.

#### 4.3.9. Análisis de penalización

Para vincular la información de la pregunta CATA con la de aceptabilidad, se realizó un Análisis de Penalización (AP). El AP se llevó a cabo calculando para cada producto evaluado, la aceptabilidad promedio entre todos los consumidores que marcaron el término en la pregunta CATA y todos los que no lo hicieron (Meyners & Castura, 2014). La diferencia entre estos dos valores puede considerarse como una estimación de cuánto cambia la aceptabilidad del producto cuando el término está presente o no. Solo se incluyeron en el AP aquellos términos CATA que fueron seleccionados por al menos el 20% de los consumidores para describir una de las muestras (Plaehn, 2012; Ares et al., 2014).

### 4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.4.1. Estabilidad de AX y $\omega$ -3 en el yogur

En la **Tabla 15**, se muestra el contenido de AX y de  $\omega$ -3 al tiempo inicial (0 día) y final (28 días) del almacenamiento de los yogures. Como se puede observar, en ambos casos prácticamente no hubo cambios ( $p > 0,05$ ), siendo similar el contenido de compuestos bioactivos luego de 28 días tanto para 100ALG como para 25WPA75ALG ( $p > 0,05$ ). Estos resultados muestran que la encapsulación de los compuestos bioactivos fue eficaz para protegerlos, siendo el yogur una matriz adecuada para su incorporación. Bajo condiciones de pH ácido, el ALG se contrae,

contribuyendo a la estabilidad de los compuestos encapsulados en dicha matriz. Por otra parte, la temperatura de almacenamiento del yogur también puede haber contribuido de manera positiva.

**Tabla 15.** Contenido de AX y  $\omega$ -3 al comienzo y final del almacenamiento de las muestras.

Muestra	Tiempo (días)	AX ( $\mu\text{g/g}$ partícula)	$\omega$ -3 (g/g partícula)
100ALG	0	134,52 $\pm$ 6,09	0,31 $\pm$ 0,02
	28	127,50 $\pm$ 1,50	0,32 $\pm$ 0,03
25WPA75ALG	0	131,68 $\pm$ 1,25	0,27 $\pm$ 0,00
	28	134,40 $\pm$ 4,78	0,32 $\pm$ 0,07
Tiempo		NS	NS
Tipo de partícula		NS	NS

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA. NS: Efecto no significativo ( $p > 0,05$ ).

#### 4.4.2. Análisis microbiológico

Todas las muestras presentaron recuentos  $< 1$  UFC/mL de bacterias coliformes totales, bacterias coliformes fecales, y de hongos y levaduras, con la excepción de uno de los duplicados de la muestra control (Y-C) que tuvo un recuento de 1 UFC/mL de hongos y levaduras. Estos resultados sirvieron para demostrar que el producto era seguro para su consumo, habilitando la realización del análisis sensorial.

#### 4.4.3. Aceptabilidad global

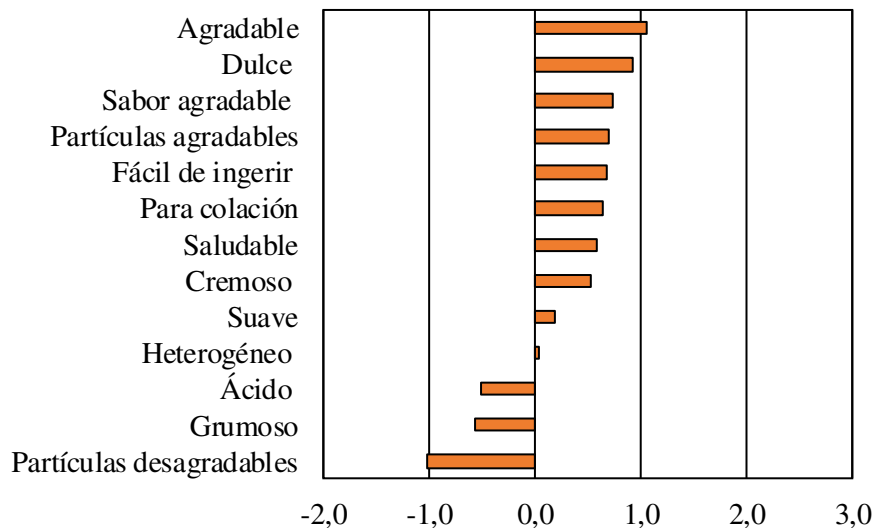
Se encontraron diferencias significativas en las puntuaciones generales de aceptabilidad de los diferentes tipos de yogures ( $p < 0,05$ ), siendo los mismos de 6,93 $\pm$ 1,18, 5,95 $\pm$ 1,81 y 6,51 $\pm$ 1,65 para las muestras Y-C, Y-100ALG y Y-25WPA75ALG, respectivamente. Las muestras Y-C e Y-25WPA75ALG fueron las más aceptadas por parte de los consumidores, no siendo significativa la diferencia detectada entre ambas ( $p > 0,05$ ). Por su parte, la muestra Y-100ALG fue la menos aceptada ( $p < 0,05$ ). Considerando un valor de 6 como el límite de aceptabilidad cuando se utiliza una escala hedónica de 9 puntos (Giménez et al., 2015; Gaze et al., 2015), las muestras con mejor aceptabilidad fueron la muestra de yogur control y la muestra de yogur Y-25WPA75ALG. No obstante, el valor de aceptabilidad de la muestra Y-100ALG se encontró muy cercano a 6 (5,95 $\pm$ 1,81). Los valores de aceptabilidad obtenidos en el presente trabajo están en concordancia con los reportados en la bibliografía para alimentos con el agregado de compuestos bioactivos encapsulados. De Campo et al. (2019) evaluaron el efecto de la incorporación de nanopartículas con zeaxantina a yogures, obteniendo valores de aceptabilidad global cercanos a 5 (correspondiente a la categoría ni me gusta ni me disgusta). De acuerdo con los autores, dichos valores son satisfactorios considerando la adición de ingredientes nuevos a una matriz alimentaria. Por su parte, Taksima et al. (2015) evaluaron el efecto del agregado de partículas con AX a

yogures, obteniendo valores de aceptabilidad global de  $6,22 \pm 1,13$ . Finalmente, [Comunian et al. \(2017\)](#) evaluaron el efecto del agregado de aceite de semillas de *Echium plantagineum* a yogures, reportando valores de aceptabilidad global de  $6,47 \pm 1,46$ .

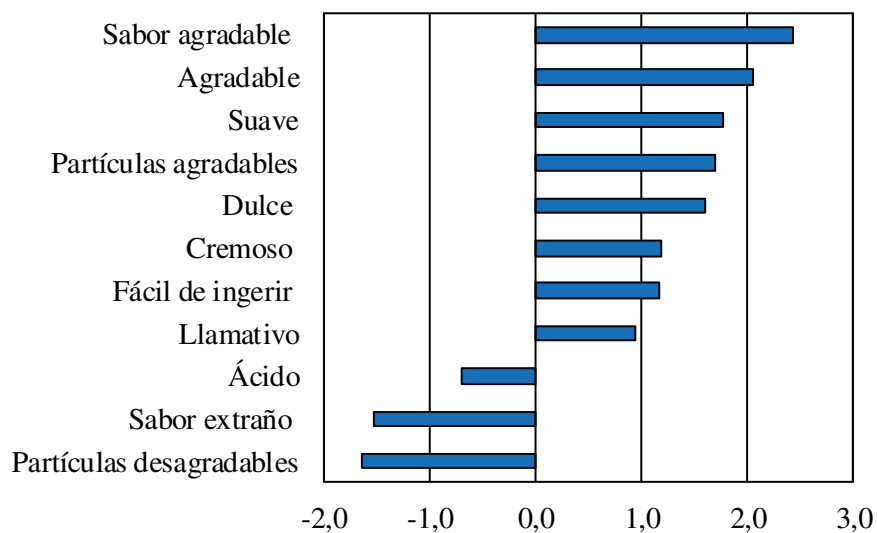
#### 4.4.4. Análisis de penalización

De acuerdo al análisis de penalización, los términos que tuvieron impacto positivo en todas las muestras fueron: dulce, sabor agradable, suave, cremoso, presencia de partículas agradables, agradable, y fácil de ingerir (**Figuras 33, 34 y 35**). El término llamativo influyó positivamente en las muestras Y-100ALG y Y-25WPA75ALG. El color de las partículas debido a la presencia de oleorresina en las mismas pudo haber afectado la apariencia de ambos yogures, generando un impacto positivo en la percepción de los consumidores. Por otra parte, el término que tuvo mayor impacto negativo para todas las muestras fue partículas desagradables. Se puede observar que la presencia de partículas fue percibida como agradable por una parte de los consumidores, mientras que otros asociaron a las mismas como desagradables. Algunos consumidores tienen una mayor aceptación hacia productos novedosos o no tradicionales, mientras que otros pueden mostrar una mayor resistencia a aceptar nuevos alimentos. La adición de ingredientes nuevos o poco usuales mediante tecnologías alimentarias poco conocidas puede provocar cierto escepticismo, más allá de que se trate incluso de la oferta de nuevos alimentos funcionales. En este sentido, algunos estudios sugieren que los consumidores demuestran una actitud neofóbica hacia los alimentos funcionales, especialmente cuando no conocen los ingredientes saludables que se les han adicionado y los beneficios que pueden aportar los mismos ([Baker et al., 2022](#)).

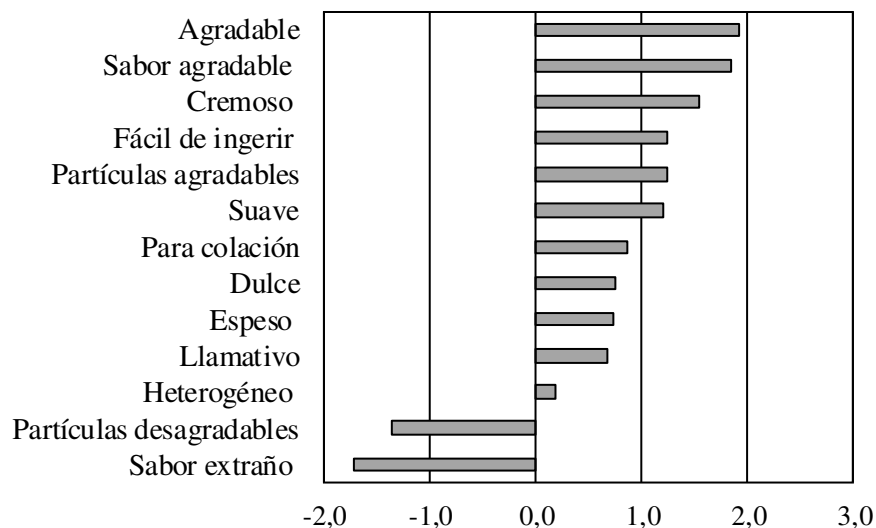
Por otra parte, la presencia de oleorresina en las partículas (Y-100ALG e Y-25WPA75ALG) provocó que algunos consumidores perciban un sabor extraño, teniendo este término un impacto negativo en el análisis de penalización de las muestras. Dicho sabor podría estar relacionado con la presencia de AX, la cual puede impartir un sabor amargo en ciertas ocasiones ([Taksima et al., 2015](#)). A pesar de ello, la muestra Y-25WPA75ALG tuvo una mayor aceptabilidad, lo cual podría indicar que la presencia de WPA en las partículas contribuyó a compensar este término negativo mediante otras características que mejoraron la aceptabilidad global del yogur.



**Figura 33.** Análisis de penalización aplicado sobre la muestra de yogur Y-C



**Figura 34.** Análisis de penalización aplicado sobre la muestra de yogur Y-100ALG.



**Figura 35.** Análisis de penalización aplicado sobre la muestra de yogur Y-25WPA75ALG.

#### 4.4.5. Preguntas CATA

Se encontraron diferencias significativas entre muestras en la frecuencia con que los consumidores utilizaron 9 de los 29 términos incluidos en la pregunta CATA (**Tabla 16**). Este resultado sugiere que mediante la pregunta CATA se pudieron detectar diferencias en la percepción de los consumidores sobre las características de los yogures evaluados. Los términos en los que las diferencias entre muestras resultaron significativas fueron: llamativo, desagradable, sabor a polvo, sabor agradable y tradicional ( $p < 0,05$ ); áspero, amargo y sabor desagradable ( $p < 0,01$ ) y sabor extraño ( $p < 0,001$ ) (**Tabla 16**).

En cuanto a la frecuencia de mención de los términos CATA (**Tabla 16**), puede observarse que el término llamativo fue significativamente menor para la muestra Y-C respecto a la muestra Y-100ALG ( $p < 0,05$ ). Tal como se mencionó anteriormente, esto puede deberse al color aportado por la oleorresina en la muestra Y-100ALG. Entre las muestras Y-100ALG e Y-25WPA75ALG no se observaron diferencias estadísticamente significativas para este término. Otro término a destacar es el sabor agradable, para el cual la muestra Y-C presentó un mayor valor que la muestra Y-100ALG, mientras que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre Y-C e Y-25WPA75ALG para dicho término. En cuanto al sabor amargo, el mismo fue mayor en las muestras Y-100ALG e Y-25WPA75ALG, lo cual indica que la presencia de oleorresina podría estar aportando sabor amargo a las muestras. Por otra parte, la muestra Y-C fue percibida como la más tradicional, aunque solo se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a la muestra Y-25WPA75ALG. Esto puede indicar que el aporte de color generado por la oleorresina da lugar a un producto más llamativo y, por lo tanto, menos tradicional.

**Tabla 16.** Fracción de consumidores que seleccionaron cada uno de los términos de la pregunta CATA para describir las muestras de yogures.

<b>Término</b>	<b>p-valores</b>	<b>Y-C</b>	<b>Y-100ALG</b>	<b>Y-25WPA75ALG</b>
<b>Dulce<sup>ns</sup></b>	0,0774	0,465 <sup>a</sup>	0,327 <sup>a</sup>	0,416 <sup>a</sup>
<b>Ácido<sup>ns</sup></b>	0,7283	0,208 <sup>a</sup>	0,218 <sup>a</sup>	0,178 <sup>a</sup>
<b>Amargo<sup>**</sup></b>	0,0036	0 <sup>a</sup>	0,079 <sup>b</sup>	0,089 <sup>b</sup>
<b>Sabor extraño<sup>***</sup></b>	0,0000	0,040 <sup>a</sup>	0,406 <sup>b</sup>	0,317 <sup>b</sup>
<b>Sabor agradable<sup>*</sup></b>	0,0312	0,525 <sup>b</sup>	0,366 <sup>a</sup>	0,406 <sup>ab</sup>
<b>Sabor desagradable<sup>**</sup></b>	0,0029	0 <sup>a</sup>	0,099 <sup>b</sup>	0,059 <sup>ab</sup>
<b>Sabor a polvo<sup>*</sup></b>	0,0346	0,010 <sup>a</sup>	0,040 <sup>ab</sup>	0,079 <sup>b</sup>
<b>Aceitoso<sup>ns</sup></b>	0,0498	0 <sup>a</sup>	0,050 <sup>a</sup>	0,040 <sup>a</sup>
<b>Suave<sup>ns</sup></b>	0,5165	0,416 <sup>a</sup>	0,347 <sup>a</sup>	0,386 <sup>a</sup>
<b>Áspero<sup>**</sup></b>	0,0092	0,010 <sup>a</sup>	0,099 <sup>b</sup>	0,059 <sup>ab</sup>
<b>Espeso<sup>ns</sup></b>	0,0162	0,139 <sup>ab</sup>	0,119 <sup>a</sup>	0,228 <sup>b</sup>
<b>Fluido<sup>ns</sup></b>	0,6412	0,178 <sup>a</sup>	0,198 <sup>a</sup>	0,158 <sup>a</sup>
<b>Cremoso<sup>ns</sup></b>	0,2880	0,683 <sup>a</sup>	0,594 <sup>a</sup>	0,634 <sup>a</sup>
<b>Homogéneo<sup>ns</sup></b>	0,0759	0,188 <sup>a</sup>	0,109 <sup>a</sup>	0,139 <sup>a</sup>
<b>Heterogéneo<sup>ns</sup></b>	0,5134	0,228 <sup>a</sup>	0,188 <sup>a</sup>	0,228 <sup>a</sup>
<b>Grumoso<sup>ns</sup></b>	0,1409	0,238 <sup>a</sup>	0,188 <sup>a</sup>	0,158 <sup>a</sup>
<b>Gelatinoso<sup>ns</sup></b>	0,1546	0,079 <sup>a</sup>	0,059 <sup>a</sup>	0,119 <sup>a</sup>
<b>Partículas agradables<sup>ns</sup></b>	0,6065	0,396 <sup>a</sup>	0,347 <sup>a</sup>	0,386 <sup>a</sup>
<b>Partículas desagradables<sup>ns</sup></b>	0,2270	0,267 <sup>a</sup>	0,327 <sup>a</sup>	0,257 <sup>a</sup>
<b>Fácil de ingerir<sup>ns</sup></b>	0,8071	0,416 <sup>a</sup>	0,386 <sup>a</sup>	0,386 <sup>a</sup>
<b>Difícil de ingerir<sup>ns</sup></b>	0,0755	0,079 <sup>a</sup>	0,030 <sup>a</sup>	0,020 <sup>a</sup>
<b>Para colación<sup>ns</sup></b>	0,0423	0,238 <sup>ab</sup>	0,149 <sup>a</sup>	0,267 <sup>b</sup>
<b>Para postre<sup>ns</sup></b>	0,1629	0,188 <sup>a</sup>	0,109 <sup>a</sup>	0,158 <sup>a</sup>
<b>Saludable<sup>ns</sup></b>	0,2748	0,238 <sup>a</sup>	0,178 <sup>a</sup>	0,188 <sup>a</sup>
<b>Agradable<sup>ns</sup></b>	0,2511	0,396 <sup>a</sup>	0,297 <sup>a</sup>	0,337 <sup>a</sup>
<b>Desagradable<sup>*</sup></b>	0,0342	0 <sup>a</sup>	0,059 <sup>b</sup>	0,030 <sup>ab</sup>
<b>Novedoso<sup>ns</sup></b>	0,2913	0,129 <sup>a</sup>	0,168 <sup>a</sup>	0,198 <sup>a</sup>
<b>Tradicional<sup>*</sup></b>	0,0131	0,188 <sup>b</sup>	0,099 <sup>ab</sup>	0,069 <sup>a</sup>
<b>Llamativo<sup>*</sup></b>	0,0408	0,139 <sup>a</sup>	0,257 <sup>b</sup>	0,218 <sup>ab</sup>

Letras distintas en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test Q de Cochran.

\*\*\* Indican diferencias significativas para un valor de  $p < 0,001$ .

\*\* Indican diferencias significativas para un valor de  $p < 0,01$ .

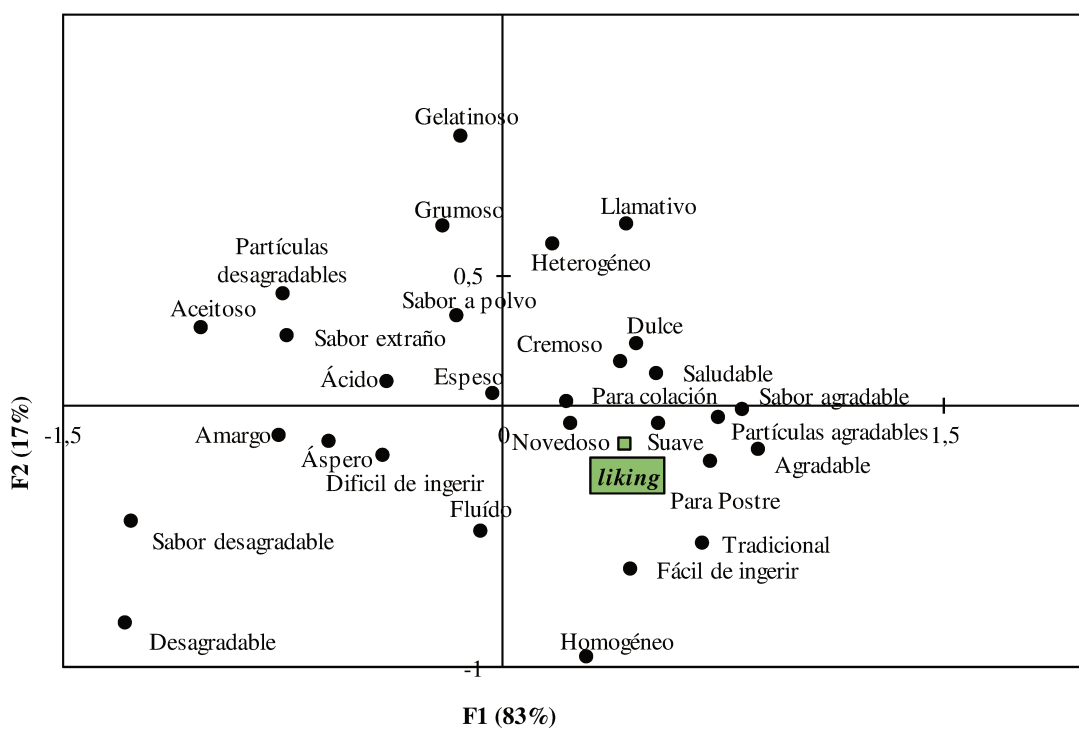
\* Indican diferencias significativas para un valor de  $p < 0,05$ .

<sup>ns</sup> No presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

El análisis del gráfico de PcoA (**Figura 36**), muestra que la aceptabilidad global (*liking*) se puede relacionar con los términos suave, agradable, con presencia de partículas agradables, novedoso, tradicional y fácil de ingerir. Estos términos se encuentran próximos al *liking* y en el mismo cuadrante (inferior derecho), siendo los resultados consistentes con lo observado en el análisis de penalización. Se puede destacar que la presencia de partículas agradables y la facilidad para ingerir el yogur estuvieron asociadas al *liking*, lo cual resulta positivo considerando que el

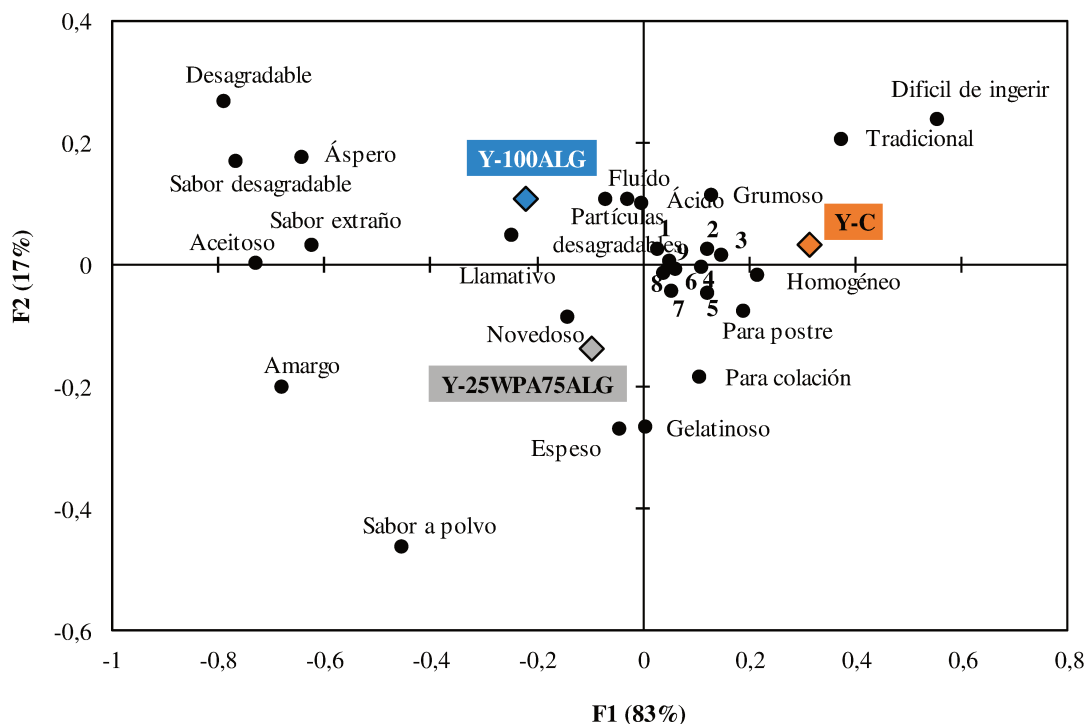
agregado de partículas se podría percibir como algo nuevo y dar lugar a un yogur distinto al que están habituados los consumidores.

Finalmente, se realizó un AC (**Figura 37**), a partir del cual se puede obtener un mapa sensorial de las muestras y los términos, permitiendo visualizar las similitudes y diferencias entre las muestras, como así también las principales características sensoriales de cada una (**Ares & Jaeger, 2015**). El AC mostró que los consumidores percibieron al yogur Y-C como fácil de ingerir, cremoso, saludable, con sabor agradable, grumoso y tradicional (**Figura 37**, cuadrante superior derecho). El yogur Y-100ALG fue percibido como llamativo, con presencia de partículas desagradables y fluido (**Figura 37**, cuadrante superior izquierdo). Finalmente, el yogur Y-25WPC75ALG fue percibido como novedoso y espeso (**Figura 37**, cuadrante inferior izquierdo).



**Figura 36.** Representación de los términos y del *liking* de los consumidores en la primera y segunda dimensión del PcoA realizado sobre la tabla de contingencias que contiene la frecuencia de mención de los términos de la pregunta CATA.





**Figura 37.** Análisis realizado sobre la tabla de contingencias que contiene la frecuencia de mención de los términos de la pregunta CATA. Los números indican: 1) Fácil de ingerir, 2) Saludable, 3) Sabor agradable, 4) Agradable, 5) Dulce, 6) Suave, 7) Heterogéneo, 8) Partículas agradables, 9) Cremoso.

#### 4.5. CONCLUSIONES

Las partículas 100ALG y 25WPA75ALG, formuladas en etapas anteriores, fueron agregadas a yogur como matriz alimentaria modelo, evaluándose la estabilidad de los compuestos bioactivos encapsulados en dicha matriz y las características sensoriales del producto obtenido. El contenido de compuestos bioactivos no se vio alterado durante el almacenamiento de los yogures, indicando que es una matriz adecuada para el agregado de las partículas en estudio. Por otro lado, la adición de partículas a yogures dio como resultado un producto con una buena aceptación sensorial por parte de los consumidores, siendo mayor para el yogur Y-25WPA75ALG. Los yogures Y-100ALG e Y-25WPA75ALG fueron considerados llamativos, mientras que gran parte de los consumidores percibió como agradable la presencia de partículas. A pesar de la buena aceptabilidad de ambos yogures, parte de los consumidores percibió un sabor extraño, por lo cual a futuro y para mejorar este aspecto, se podría agregar algún saborizante natural durante la formulación de las partículas.

En términos generales, se obtuvo un producto satisfactorio desde el punto de vista sensorial, siendo el yogur una buena matriz para el aporte de aceite de chía y AX y, en consecuencia, para el aprovechamiento de sus efectos beneficiosos. Tal como se observó en etapas anteriores, la presencia de WPA en la matriz de las partículas impactó de forma positiva. Los resultados

indicaron que partículas formuladas a partir de la combinación de ALG y WPA pueden ser una opción interesante para la fortificación de alimentos con compuestos bioactivos lipofílicos.

# CONCLUSIONES GENERALES

---

## CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo de Tesis permitió la generación de conocimiento de relevancia para el desarrollo de alimentos funcionales adicionados con AX y ácidos grasos  $\omega$ -3, a través del uso de la encapsulación como tecnología de vehiculización de los compuestos bioactivos.

En primer lugar, se evaluó la estabilidad de aceites de chía y de pescado (ricos en  $\omega$ -3) combinados con AX. Las matrices se estudiaron en función de su actividad antioxidante, estabilidad de los compuestos bioactivos y estabilidad oxidativa. La mezcla formada por aceite de chía y AX resultó la más apropiada en función de dichos parámetros, por lo cual fue seleccionada para las posteriores etapas de encapsulación e incorporación en una matriz alimentaria.

Se evaluaron diferentes materiales de pared para la obtención de partículas compatibles con la formulación de alimentos, utilizando la metodología de gelificación iónica externa. Se evaluó la formación de partículas utilizando ALG y WPA, y diferentes combinaciones de estos materiales. La obtención de partículas utilizando solamente WPA no fue posible; mientras que mediante el uso de ALG solo (100ALG) y la combinación de un 25% de WPA y un 75% de ALG, se pudieron obtener partículas con características adecuadas.

Las partículas formuladas solo con ALG y combinando un 25% de WPA y un 75% de ALG fueron caracterizadas, evaluando la capacidad de las mismas para mantener la estabilidad de los compuestos bioactivos encapsulados. Con ambos tipos de partículas se obtuvieron valores elevados de eficiencia de encapsulación, tanto para la AX como para los ácidos grasos  $\omega$ -3. Algunas características como el tamaño y la textura (dureza, gomosidad y resiliencia) de las partículas fueron afectadas por la adición de WPA. Por otro lado, el uso de este material influyó positivamente sobre la estabilidad de los compuestos bioactivos encapsulados en relación a los sistemas formados solo por ALG.

Además, se evaluó el comportamiento de las partículas durante los procesos de digestión gastrointestinal mediante la aplicación de un modelo de digestión *in vitro*. Se observó una adecuada retención de los compuestos bioactivos encapsulados durante la fase de digestión gástrica, lo cual es favorable para evitar su degradación. Por el contrario, se observó la liberación de los mismos durante la fase de digestión intestinal, lo que podría favorecer su posterior absorción. El contenido de compuestos bioactivos liberados fue elevado y similar para ambas partículas, siendo la velocidad de dicha liberación mayor para las partículas que contenían WPA. Ambos tipos de partículas mostraron un perfil de liberación sostenido, permitiendo una liberación controlada de los compuestos bioactivos. Se evaluó la lipólisis del aceite de chía, observándose un leve incremento tras la encapsulación del aceite, sin efecto del material de pared usado para formular las partículas. Asimismo, se evaluó la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos, la

cual no fue afectada por el tipo de material de pared utilizado en los sistemas de encapsulación, observándose valores similares a los de la oleoresina sin encapsular.

Finalmente se seleccionó al yogur como matriz alimentaria modelo para la fortificación con AX y ácidos grasos  $\omega$ -3 encapsulados en partículas 100ALG y 25WPA75ALG. A partir de la aplicación de un análisis sensorial con 101 potenciales consumidores, se pudo obtener información acerca de la aceptabilidad del producto y de las características que los consumidores asociaban al mismo. Se obtuvo un producto con buena aceptabilidad, siendo mayor para el yogur adicionado con partículas formuladas con ALG y WPA.

La adición de WPA en los geles de ALG (25WPA75ALG) influyó positivamente sobre el comportamiento integral de las partículas, mejorando la estabilidad de los compuestos encapsulados y contribuyendo a la aceptabilidad de alimento adicionado con este tipo de partículas. Los resultados del presente trabajo de Tesis mostraron que la encapsulación de compuestos lipofílicos en partículas formuladas a partir de la combinación de ALG y WPA, podría ser una buena alternativa para su incorporación en matrices alimentarias, contribuyendo al desarrollo de nuevos alimentos funcionales.

# 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>
- Adinepour, F., Pouramin, S., Rashidinejad, A., & Jafari, S. M. (2022). Fortification/enrichment of milk and dairy products by encapsulated bioactive ingredients. *Food Research International*, 157, 111212. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111212>
- Aguayo-Mendoza, M., Santagiuliana, M., Ong, X., Piqueras-Fiszman, B., Scholten, E., & Stieger, M. (2020). How addition of peach gel particles to yogurt affects oral behavior, sensory perception and liking of consumers differing in age. *Food Research International*, 134, 109213. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109213>
- Alamed, J., Chaiyasit, W., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2009). Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2969-2976. <https://doi.org/10.1021/jf803436c>
- Alavi, F., Emam-Djomeh, Z., Yarmand, M. S., Salami, M., Momen, S., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Cold gelation of curcumin loaded whey protein aggregates mixed with *k*-carrageenan: Impact of gel microstructure on the gastrointestinal fate of curcumin. *Food Hydrocolloids*, 85, 267-280. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.012>
- Alegría, A., Garcia-Llatas, G., & Cilla, A. (2015). Static digestion models: General introduction. In P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, & H. Wichers (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models* (1<sup>st</sup> ed., pp. 3-12). Springer.
- Alu'datt, M. H., Alrosan, M., Gammoh, S., Tranchant, C. C., Alhamad, M. N., Rababah, T., Zghoul, R., Alzoubi, H., Ghatasheh, S., Ghazlan, 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>
- Álvarez, R., Giménez, B., Mackie, A., Torcello-Gómez, A., Quintriqueo, A., Oyarzun-Ampuero, F., & Robert, P. (2022). Influence of the particle size of encapsulated chia oil on the oil release and bioaccessibility during *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food & Function*, 13(3), 1370-1379. <https://doi.org/10.1039/D1FO03688B>
- Anal, A. K., Boonlao, N., & Ruktanonchai, U. R. (2023). Emulsion systems stabilized with biopolymers to enhance oral bioaccessibility and bioavailability of lipophilic bioactive

- compounds. *Current Opinion in Food Science*, 50, 101001. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2023.101001>
- Anarjan, N., Nehdi, I., & Tan, C. (2013). Protection of astaxanthin in astaxanthin nanodispersions using additional antioxidants. *Molecules*, 18(7), 7699-7710. <https://doi.org/10.3390/molecules18077699>
- Ares G., Etchemendy E., Antúnez L., Vidal L., Giménez A., & Jaeger, S. R. (2014). Visual attention by consumers to Check-All-That-Apply questions: Insights to support methodological development. *Food Quality and Preference*, 32, 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.10.006>
- Ares, G., & Jaeger, S. R. (2015). Check-all-that-apply (CATA) questions with consumers in practice: Experimental considerations and impact on outcome. In J. Delarue, J. B., Lawlor, & M. Rogeaux (Eds.), *Rapid Sensory Profiling Techniques. Applications in New Product Development and Consumer Research* (pp. 539-555). Woodhead Publishing.
- Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2020). Importance of release and bioavailability studies for nanoencapsulated food ingredients. In S. M. Jafari (Ed.), *Release and Bioavailability of Nanoencapsulated Food Ingredients* (1<sup>st</sup> ed., pp. 1-24). Academic Press.
- Atencio, S., Maestro, A., Santamaría, E., Gutiérrez, J. M., & Gonzalez, C. (2020). Encapsulation of ginger oil in alginate-based shell materials. *Food Bioscience*, 37, 100714. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100714>
- Azad, A. K., Al-Mahmood, S. M. A., Chatterjee, B., Wan Sulaiman, W. M. A., Elsayed, T. M., & Doolaanea, A. A. (2020). Encapsulation of black seed oil in alginate beads as a pH-sensitive carrier for intestine-targeted drug delivery: *In vitro*, *in vivo* and *ex vivo* study. *Pharmaceutics*, 12(3), 219. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030219>
- Badui Dergal, S. (2016). *Química de los Alimentos*. Pearson Educación.
- Baker, M. T., Lu, P., Parrella, J. A., & Leggette, H. R. (2022). Consumer acceptance toward functional foods: A scoping review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(3), 1217. <https://doi.org/10.3390/ijerph19031217>
- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., & Liang, L. (2016). Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 143-182. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12179>
- Balabanova, T., Petkova, N., Ivanova, M., & Panayotov, N. (2020). Design of Labneh cheese fortified with alginate-encapsulated pepper (*Capsicum annuum*) extracts. *Emirates*



- Journal of Food and Agriculture*, 32(8), 559-566.  
<https://doi.org/10.9755/ejfa.2020.v32.i8.2132>
- Banwo, K., Olojede, A. O., Adesulu-Dahunsi, A. T., Verma, D. K., Thakur, M., Tripathy, S., Singh, S., Patel, A. R., Gupta, A. K., Aguilar, C. N., & Utama, G. L. (2021). Functional importance of bioactive compounds of foods with potential health benefits: A review on recent trends. *Food Bioscience*, 43, 101320. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101320>
- Barba, F. J. (2021). An integrated approach for the valorization of cheese whey. *Foods*, 10(3), 564. <https://doi.org/10.3390/foods10030564>
- Beaulieu, L., Savoie, L., Paquin, P., & Subirade, M. (2002). Elaboration and characterization of whey protein beads by an emulsification/cold gelation process: Application for the protection of retinol. *Biomacromolecules*, 3(2), 239-248. <https://doi.org/10.1021/bm010082z>
- Benavides, S., Cortés, P., Parada, J., & Franco, W. (2016). Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food Chemistry*, 204, 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.104>
- 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>
- Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Walter, P., & Weber, P. (2009). Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, 25(11-12), 1202-1205. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.023>
- 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*, 75, 107-113. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.031>
- Boonlao, N., Shrestha, S., Sadiq, M. B., & Anal, A. K. (2020). Influence of whey protein-xanthan gum stabilized emulsion on stability and *in vitro* digestibility of encapsulated astaxanthin. *Journal of Food Engineering*, 272, 109859. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109859>
- Boostani, S., & Jafari, S. M. (2020). Controlled release of nanoencapsulated food ingredients. In S. M. Jafari (Ed.), *Release and Bioavailability of Nanoencapsulated Food Ingredients* (1<sup>st</sup> ed., vol. 5, pp. 27-78). Academic Press.
- Boostani, S., & Jafari, S. M. (2021). A comprehensive review on the controlled release of encapsulated food ingredients; fundamental concepts to design and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 303-321. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.040>

- Bornhorst, G. M., Gouseti, O., Wickham, M. S., & Bakalis, S. (2016). Engineering digestion: Multiscale processes of food digestion. *Journal of Food Science*, *81*(3), R534-R543. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13216>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brazel, C. S., & Huang, X. (2004). The cost of optimal drug delivery: Reducing and preventing the burst effect in matrix systems. In S. Svenson (Ed.), *Carrier-Based Drug Delivery* (pp. 267-282). ACS Symposium Series.
- Brendler, T., & Williamson, E. M. (2019). Astaxanthin: How much is too much? A safety review. *Phytotherapy Research*, *33*(12), 3090-3111. <https://doi.org/10.1002/ptr.6514>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, *14*(4), 991-1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Cadena, R. S., Caimi, D., Jaunarena, I., Lorenzo, I., Vidal, L., Ares, G., Deliza, R., & Giménez, A. (2014). Comparison of rapid sensory characterization methodologies for the development of functional yogurts. *Food Research International*, *64*, 446-455. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.027>
- 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>
- Cercaci, L., Rodriguez-Estrada, M. T., Lercker, G., & Decker, E. A. (2007). Phytosterol oxidation in oil-in-water emulsions and bulk oil. *Food Chemistry*, *102*(1), 161-167. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.010>
- Cheng, C., Yu, X., Huang, F., Peng, D., Chen, H., Chen, Y., Huang, Q., & Deng, Q. (2021). Effect of different structural flaxseed lignans on the stability of flaxseed oil-in-water emulsion: An interfacial perspective. *Food Chemistry*, *357*, 129522. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129522>
- Código Alimentario Argentino (2010). Capítulo I: Disposiciones generales. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). En Internet: [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo\\_i\\_caa.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_i_caa.pdf)
- Código Alimentario Argentino (2021). Capítulo V: Normas para la rotulación y publicidad de los alimentos. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). En Internet:

[https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat\\_caa\\_capitulo\\_v\\_rotulacion\\_actua\\_liz\\_2021-09.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat_caa_capitulo_v_rotulacion_actua_liz_2021-09.pdf)

- Comunian, T. A., Chaves, I. E., Thomazini, M., Moraes, I. C. F., Ferro-Furtado, R., de Castro, I. A., & Favaro-Trindade, C. S. (2017). Development of functional yogurt containing free and encapsulated echium oil, phytosterol and sinapic acid. *Food Chemistry*, *237*, 948-956. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.071>
- Corstens, M. N., Berton-Carabin, C. C., Elichiry-Ortiz, P. T., Hol, K., Troost, F. J., Masclee, A. A., & Schroën, K. (2017). Emulsion-alginate beads designed to control *in vitro* intestinal lipolysis: Towards appetite control. *Journal of Functional Foods*, *34*, 319-328. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.003>
- da Silva Carvalho, A. G., da Costa Machado, M. T., de Freitas Queiroz Barros, H. D., Cazarin, C. B. B., Maróstica Junior, M. R., & Hubinger, M. D. (2019). Anthocyanins from jussara (*Euterpe edulis* Martius) extract carried by calcium alginate beads pre-prepared using ionic gelation. *Powder Technology*, *345*, 283-291. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.01.016>
- da Silva Stefani, F., de Campo, C., Paese, K., Stanisçuaski Guterres, S., Haas Costa, T. M., & Hickmann Flôres, S. (2019). Nanoencapsulation of linseed oil with chia mucilage as structuring material: Characterization, stability and enrichment of orange juice. *Food Research International*, *120*, 872-879. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.052>
- Dąbrowski, G., Konopka, I., & Czaplicki, S. (2018). Variation in oil quality and content of low molecular lipophilic compounds in chia seed oils. *International Journal of Food Properties*, *21*(1), 2016-2029. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1501699>
- de Campo, C., Queiroz Assis, R., Marques da Silva, M., Haas Costa, T. M., Paese, K., Stanisçuaski Guterres, S., de Oliveira Rios, A., & Hickmann Flôres, S. (2019). Incorporation of zeaxanthin nanoparticles in yogurt: Influence on physicochemical properties, carotenoid stability and sensory analysis. *Food Chemistry*, *301*, 125230. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125230>
- Di Giorgio, L., Salgado, P. R., & Mauri, A. N. (2019). Encapsulation of fish oil in soybean protein particles by emulsification and spray drying. *Food Hydrocolloids*, *87*, 891-901. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.024>
- Domínguez Díaz, L., Fernández-Ruiz, V., & Cámara, M. (2020). The frontier between nutrition and pharma: The international regulatory framework of functional foods, food supplements and nutraceuticals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(10), 1738-1746. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1592107>

- 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>
- Dordević, 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>
- Encina, C., Vergara, C., Giménez, B., Oyarzún-Ampuero, F., & Robert, P. (2016). Conventional spray-drying and future trends for the microencapsulation of fish oil. *Trends in Food Science & Technology*, *56*, 46-60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.014>
- Fakhri, S., Abbaszadeh, F., Dargahi, L., & Jorjani, M. (2018). Astaxanthin: A mechanistic review on its biological activities and health benefits. *Pharmacological Research*, *136*, 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.08.012>
- Falsafi, S. R., Karaca, A. C., Deng, L., Wang, Y., Li, H., Askari, G., & Rostamabadi, H. (2022). Insights into whey protein-based carriers for targeted delivery and controlled release of bioactive components. *Food Hydrocolloids*, *133*, 108002. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108002>
- FAO & FINUT (2012). Grasas y ácidos grasos en nutrición humana consulta de expertos. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT), 1014-2916.
- Farah, J. S., Araujo, C. B., & Melo, L. (2017). Analysis of yoghurts', whey-based beverages' and fermented milks' labels and differences on their sensory profiles and acceptance. *International Dairy Journal*, *68*, 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.12.008>
- Faraone, I., Sinisgalli, C., Ostuni, A., Armentano, M. F., Carmosino, M., Milella, L., Russo, D., Labanca, F., & Khan, H. (2020). Astaxanthin anticancer effects are mediated through multiple molecular mechanisms: A systematic review. *Pharmacological Research*, *155*, 104689. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104689>
- 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>
- Feng, W., Yue, C., Ni, Y., Wusigale, & Liang, L. (2018). Preparation and characterization of emulsion-filled gel beads for the encapsulation and protection of resveratrol and  $\alpha$ -

- tocopherol. *Food Research International*, 108, 161-171.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.035>
- Ferreira, D. M., Nunes, M. A., Santo, L. E., Machado, S., Costa, A. S. G., Álvarez-Ortí, M., Pardo, J. E., Oliveira, M. B. P. P., & Alves, R. C. (2023). Characterization of chia seeds, cold-pressed oil, and defatted cake: An ancient grain for modern food production. *Molecules*, 28(2), 723. <https://doi.org/10.3390/molecules28020723>
- Funami, T., & Nakauma, M. (2022). Instrumental food texture evaluation in relation to human perception. *Food Hydrocolloids*, 124, 107253.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107253>
- Gahruie, H. H., Eskandari, M. H., Mesbahi, G., & Hanifpour, M. A. (2015). Scientific and technical aspects of yogurt fortification: A review. *Food Science and Human Wellness*, 4(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.03.002>
- Gaze, L. V., Oliveira, B. R., Ferrao, L. L., Granato, D., Cavalcanti, R. N., Conte Júnior, C. A., Cruz, A. G., & Freitas, M. Q. (2015). Preference mapping of dulce de leche commercialized in Brazilian markets. *Journal of Dairy Science*, 98(3), 1443-1454.  
<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8470>
- 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>
- Giménez, M. A., Gámbaro, A., Miraballes, M., Roascio, A., Amarillo, M., Sammán, N., & Lobo, M. (2015). Sensory evaluation and acceptability of gluten-free Andean corn spaghetti. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 186-192.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.6704>
- Goyal, A., Sharma, V., Sihag, M. K., Singh, A. K., Arora, S., & Sabikhi, L. (2016). Fortification of dahi (Indian yoghurt) with omega-3 fatty acids using microencapsulated flaxseed oil microcapsules. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 2422-2433.  
<https://doi.org/10.1007/s13197-016-2220-1>
- Gowd, V., Xiao, J., Wang, M., Chen, F., & Cheng, K. W. (2021). Multi-mechanistic antidiabetic potential of astaxanthin: An update on preclinical and clinical evidence. *Molecular Nutrition & Food Research*, 65(24), 2100252. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100252>
- Grajzer, M., Szmalczel, K., Kuźmiński, Ł., Witkowski, M., Kulma, A., & Prescha, A. (2020). Characteristics and antioxidant potential of cold-pressed oils - Possible strategies to improve oil stability. *Foods*, 9(11), 1630. <https://doi.org/10.3390/foods9111630>

- Gruskiene, R., Bockuviene, A., & Sereikaite, J. (2021). Microencapsulation of bioactive ingredients for their delivery into fermented milk products: A review. *Molecules*, 26(15), 4601. <https://doi.org/10.3390/molecules26154601>
- Gumus, C. E., & Gharibzahedi, S. M. T. (2021). Yogurts supplemented with lipid emulsions rich in omega-3 fatty acids: New insights into the fortification, microencapsulation, quality properties, and health-promoting effects. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 267-279. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.016>
- Hébrard, G., Hoffart, V., Cardot, J. M., Subirade, M., & Beyssac, E. (2013). Development and characterization of coated-microparticles based on whey protein/alginate using the Encapsulator device. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39(1), 128-137. <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.660950>
- Honda, M., Kageyama, H., Hibino, T., Osawa, Y., Kawashima, Y., Hirasawa, K., & Kuroda, I. (2021). Evaluation and improvement of storage stability of astaxanthin isomers in oils and fats. *Food Chemistry*, 352, 129371. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129371>
- Hu, Y., Lin, Q., Zhao, H., Li, X., Sang, S., McClements, D. J., Long, J., Jin, Z., Wang, J., & Qiu, C. (2023). Bioaccessibility and bioavailability of phytochemicals: Influencing factors, improvements, and evaluations. *Food Hydrocolloids*, 135, 108165. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108165>
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- ISO. International Organization for Standardization (2002). Milk fat - Preparation of fatty acid methyl esters. ISO 15884-IDF 182:2002. Geneva, Switzerland: ISO.
- ISO. International Organization for Standardization (2007). Sensory analysis: General guidance for the design of test rooms. ISO Standard 8589. Geneva, Switzerland: ISO.
- Jain, S., Winuprasith, T., & Suphantharika, M. (2020). Encapsulation of lycopene in emulsions and hydrogel beads using dual modified rice starch: Characterization, stability analysis and release behaviour during *in-vitro* digestion. *Food Hydrocolloids*, 104, 105730. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105730>
- Jamshidi, A., Cao, H., Xiao, J., & Simal-Gandara, J. (2020). Advantages of techniques to fortify food products with the benefits of fish oil. *Food Research International*, 137, 109353. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109353>
- Jin, H., Wang, L., Yang, S., Wen, J., Zhang, Y., Jiang, L., & Sui, X. (2023). Producing mixed-soy protein adsorption layers on alginate microgels to controlled-release  $\beta$ -carotene. *Food Research International*, 164, 112319. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112319>

- Julio, L. M., Ixtaina, V. Y., & Tomás, M. C. (2022). Development of delivery systems of bioactive compounds using chia seed by-products. In R. Repo-Carrasco-Valencia & M. C. Tomás (Eds.), *Native Crops in Latin America* (1<sup>st</sup> ed., pp. 265-285). CRC Press.
- Julio, L. M., Ixtaina, V. Y., Fernández, M., Torres Sánchez, R. M., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2016). Development and characterization of functional O/W emulsions with chia seed (*Salvia hispanica* L.) by-products. *Journal of Food Science and Technology*, 53(8), 3206-3214. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2295-8>
- Jung, M. Y., & Min, D. B. (1990). Effects of  $\alpha$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -tocopherols on oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Science*, 55(5), 1464-1465. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb03960.x>
- Kamal-Eldin, A., & Appelqvist, L. Å. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31(7), 671-701. <https://doi.org/10.1007/BF02522884>
- Kapoor, B., Kapoor, D., Gautam, S., Singh, R., & Bhardwaj, S. (2021). Dietary polyunsaturated fatty acids (PUFAs): Uses and potential health benefits. *Current Nutrition Reports*, 10(3), 232-242. <https://doi.org/10.1007/s13668-021-00363-3>
- Kaur, S., & Das, M. (2011). Functional foods: An overview. *Food Science and Biotechnology*, 20(4), 861-875. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0121-7>
- Kharlamova, A., Nicolai, T., & Chassenieux, C. (2018). Calcium-induced gelation of whey protein aggregates: Kinetics, structure and rheological properties. *Food Hydrocolloids*, 79, 145-157. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.049>
- Kul, E., & Ackman, R. G. (2001). Protection of  $\alpha$ -tocopherol in nonpurified and purified fish oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(2), 197-203. <https://doi.org/10.1007/s11746-001-0243-x>
- Kumar, S., Kumar, R., Diksha, Kumari, A., & Panwar, A. (2022). Astaxanthin: A super antioxidant from microalgae and its therapeutic potential. *Journal of Basic Microbiology*, 62(9), 1064-1082. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100391>
- Lee, B. B., Ravindra, P., & Chan, E. S. (2013). Size and shape of calcium alginate beads produced by extrusion dripping. *Chemical Engineering & Technology*, 36(10), 1627-1642. <https://doi.org/10.1002/ceat.201300230>
- Li, C., Yu, W., Wu, P., & Chen, X. D. (2020). Current *in vitro* digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology*, 96, 114-126. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.015>

- 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>
- Liu, W., Wang, J., McClements, D. J., & Zou, L. (2018). Encapsulation of  $\beta$ -carotene-loaded oil droplets in caseinate/alginate microparticles: Enhancement of carotenoid stability and bioaccessibility. *Journal of Functional Foods*, 40, 527-535. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.046>
- 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>
- Liu, X., Xie, J., Zhou, L., Zhang, J., Chen, Z., Xiao, J., Cao, Y., & Xiao, H. (2023). Recent advances in health benefits and bioavailability of dietary astaxanthin and its isomers. *Food Chemistry*, 404, 134605. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134605>
- Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2018). *In vitro* digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International*, 107, 423-436. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.055>
- Lupo, B., Maestro, A., Gutiérrez, J. M., & González, C. (2015). Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms. *Food Hydrocolloids*, 49, 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.023>
- Mackie, A., Mulet-Cabero, A. I., & Torcello-Gómez, A. (2020). Simulating human digestion: Developing our knowledge to create healthier and more sustainable foods. *Food & Function*, 11(11), 9397-9431. <https://doi.org/10.1039/D0FO01981J>
- Malekjani, N., & Jafari, S. M. (2021). Modeling the release of food bioactive ingredients from carriers/nanocarriers by the empirical, semiempirical, and mechanistic models. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 3-47. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12660>
- 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-Delgado, A. A., Khandual, S., & Villanueva-Rodríguez, S. J. (2017). Chemical stability of astaxanthin integrated into a food matrix: Effects of food processing and methods for



- preservation. *Food Chemistry*, 225, 23-30.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.092>
- Mat, D. J., Le Feunteun, S., Michon, C., & Souchon, I. (2016). *In vitro* digestion of foods using pH-stat and the INFOGEST protocol: Impact of matrix structure on digestion kinetics of macronutrients, proteins and lipids. *Food Research International*, 88, 226-233.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.002>
- Mat, D. J., Souchon, I., Michon, C., & Le Feunteun, S. (2020). Gastro-intestinal *in vitro* digestions of protein emulsions monitored by pH-stat: Influence of structural properties and interplay between proteolysis and lipolysis. *Food Chemistry*, 311, 125946.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125946>
- McClements, D. J. (2012). Requirements for food ingredient and nutraceutical delivery systems. In N. Garti & D. J. McClements (Eds.), *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals* (1<sup>st</sup> ed., pp. 3-18). Woodhead Publishing.
- McClements, D. J., & Li, Y. (2010). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 159(2), 213-228. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.06.010>
- Mcdonald, R. E., & Hultin, H. O. (1987). Some characteristics of the enzymic lipid peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeletal muscle. *Journal of Food Science*, 52(1), 15-21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb13964.x>
- Meyners, M., & Castura, J. C. (2014). Check-All-That-Apply Questions. In P. Varela & G. Ares (Eds.), *Novel Techniques in Sensory Characterization and Consumer Profiling* (pp. 271-305). CRC Press.
- Meza, B. E., De Piante Vicin, D. A., Marino, F., Sihufe, G. A., Peralta, J. M., & Zorrilla, S. E. (2020). Characterisation of soluble aggregates from commercial whey protein concentrate suspensions: Effect of protein concentration, pH, and heat treatment conditions. *International Journal of Dairy Technology*, 73(2), 429-436.  
<https://doi.org/10.1111/1471-0307.12669>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... & Brodtkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - An international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113-1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Minj, S., & Anand, S. (2020). Whey proteins and its derivatives: Bioactivity, functionality, and current applications. *Dairy*, 1(3), 233-258. <https://doi.org/10.3390/dairy1030016>

- Mishra, S. K., Belur, P. D., & Iyyaswami, R. (2021). Use of antioxidants for enhancing oxidative stability of bulk edible oils: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(1), 1-12. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14716>
- Mohammadian, M., Salami, M., Momen, S., Alavi, F., & Emam-Djomeh, Z. (2019). Fabrication of curcumin-loaded whey protein microgels: Structural properties, antioxidant activity, and *in vitro* release behavior. *LWT*, 103, 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.076>
- Mohanani, A., Nickerson, M. T., & Ghosh, S. (2018). Oxidative stability of flaxseed oil: Effect of hydrophilic, hydrophobic and intermediate polarity antioxidants. *Food Chemistry*, 266, 524-533. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.117>
- Nadeem, M., & Imran, M. (2019). Chia (*Salvia hispanica*) oil. In M. F. Ramadan (Ed.), *Fruit Oils: Chemistry and Functionality* (1<sup>st</sup> ed., pp. 303-316). Springer International Publishing.
- Nicolai, T., Britten, M., & Schmitt, C. (2011).  $\beta$ -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1945-1962. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.006>
- Nieva-Echevarría, B., Goicoechea, E., & Guillén, M. D. (2020). Food lipid oxidation under gastrointestinal digestion conditions: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(3), 461-478. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1538931>
- Niizawa, I., Espinaco, B. Y., Zorrilla, S. E., & Sihufe, G. A. (2021). Astaxanthin production by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis*: A success story. In G. A. Ravishankar & A. Ranga-Rao (Eds.), *Global Perspectives on Astaxanthin* (1<sup>st</sup> ed., pp. 71-89). Academic Press.
- Niizawa, I., Sihufe, G. A., & Zorrilla, S. E. (2021). Design of whey protein aggregates towards microgel-stabilized emulsion generation. *LWT*, 152, 112324. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112324>
- Oroná, J. D., Niizawa, I., Espinaco, B. Y., Sihufe, G. A., Zorrilla, S. E., & Peralta, J. M. (2021). Mathematical modeling of the release of food active compounds from viscoelastic matrices. *Journal of Food Engineering*, 288, 110240. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110240>
- Ozel, B., Aydin, O., & Oztop, M. H. (2020). *In vitro* digestion of polysaccharide including whey protein isolate hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 229, 115469. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115469>
- Pascoviche, D. M., Goldstein, N., Fishman, A., & Lesmes, U. (2019). Impact of fatty acids unsaturation on stability and intestinal lipolysis of bioactive lipid droplets. *Colloids and*

- Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 561, 70-78.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.09.081>
- 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  $\omega$ -3/ $\omega$ -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>
- Peniche, C., Howland, I., Carrillo, O., Zaldívar, C., & Argüelles-Monal, W. (2004). Formation and stability of shark liver oil loaded chitosan/calcium alginate capsules. *Food Hydrocolloids*, 18(5), 865-871. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.02.001>
- Perdana, B. A., Chaidir, Z., Kusnanda, A. J., Dharma, A., Zakaria, I. J., Syafrizayanti, Bayu, A., & Putra, M. Y. (2021). Omega-3 fatty acids of microalgae as a food supplement: A review of exogenous factors for production enhancement. *Algal Research*, 60, 102542. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102542>
- Plaehn D. (2012). CATA penalty/reward. *Food Quality and Preference*, 24(1), 141-152. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2011.10.008>
- Polavarapu, S., Oliver, C. M., Ajlouni, S., & Augustin, M. A. (2011). Physicochemical characterisation and oxidative stability of fish oil and fish oil–extra virgin olive oil microencapsulated by sugar beet pectin. *Food Chemistry*, 127(4), 1694-1705. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.044>
- Prescha, A., Grajzer, M., Dedyk, M., & Grajeta, H. (2014). The antioxidant activity and oxidative stability of cold-pressed oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(8), 1291-1301. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2479-1>
- Pulvirenti, L., & Paterna, A. (2022). Introduction to functional foods and nutraceuticals. In S. Gopi & P. Balakrishnan (Eds.), *Advances in Nutraceuticals and Functional Foods. Concepts and Applications* (1<sup>st</sup> ed., pp. 1-28). Apple Academic Press.
- Rahiminezhad, Z., Gahruie, H. H., Esteghlal, S., Mesbahi, G. R., Golmakani, M. T., & Hosseini, S. M. H. (2020). Oxidative stability of linseed oil nano-emulsions filled in calcium alginate hydrogels. *LWT*, 127, 109392. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109392>
- Ramdhan, T., Ching, S. H., Prakash, S., & Bhandari, B. (2020). Physical and mechanical properties of alginate based composite gels. *Trends in Food Science & Technology*, 106, 150-159. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.002>
- Ramdhan, T., Ching, S. H., Prakash, S., & Bhandari, B. (2021). Effects of cold-renneted and pre-heated milk protein concentrates (MPCs) addition on the properties of alginate composite

- gels. *Food Research International*, 150, 110778.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110778>
- Ranga Rao, A., 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>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.  
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Ries, D., Ye, A., Haisman, D., & Singh, H. (2010). Antioxidant properties of caseins and whey proteins in model oil-in-water emulsions. *International Dairy Journal*, 20(2), 72-78.  
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.09.001>
- Ruiz-Capillas, C., & Herrero, A. M. (2021). Sensory analysis and consumer research in new product development. *Foods*, 10(3), 582. <https://doi.org/10.3390/foods10030582>
- Ryan, K. N., Zhong, Q., & Foegeding, E. A. (2013). Use of whey protein soluble aggregates for thermal stability - A hypothesis paper. *Journal of Food Science*, 78(8), R1105-R1115.  
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12207>
- 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>
- Saini, R. K., Prasad, P., Lokesh, V., Shang, X., Shin, J., Keum, Y. S., & Lee, J. H. (2022). Carotenoids: Dietary sources, extraction, encapsulation, bioavailability, and health benefits - A review of recent advancements. *Antioxidants*, 11(4), 795.  
<https://doi.org/10.3390/antiox11040795>
- Sampaio, G. L., Pacheco, S., Ribeiro, A. P. O., Galdeano, M. C., Gomes, F. S., & Tonon, R. V. (2019). Encapsulation of a lycopene-rich watermelon concentrate in alginate and pectin beads: Characterization and stability. *LWT*, 116, 108589.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108589>
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H. S., Alvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2010). Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, 43(1), 111-117.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.010>

- Sarkar, A., & Mackie, A. R. (2020). Engineering oral delivery of hydrophobic bioactives in real-world scenarios. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 48, 40-52. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.03.009>
- Saw, C. L. L., Yang, A. Y., Guo, Y., & Kong, A. N. T. (2013). Astaxanthin and omega-3 fatty acids individually and in combination protect against oxidative stress via the Nrf2–ARE pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 869-875. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.023>
- Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación (2019). Recuperación y valorización del lactosuero en PyMEs de la cuenca láctea argentina a través de la asociación público privada.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2005). Lipid oxidation: Measurement methods. In F. Shahidi (Ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (6<sup>th</sup> ed., vol. 6, pp. 357-385). John Wiley & Sons Inc.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2010). Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*, 39(11), 4067-4079. <https://doi.org/10.1039/b922183m>
- Shantha, N. C., & Decker, E. A. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77(2), 421-424. <https://doi.org/10.1093/jaoac/77.2.421>
- Sharif, N., Khoshnoudi-Nia, S., & Jafari, S. M. (2020). Confocal laser scanning microscopy (CLSM) of nanoencapsulated food ingredients. In S. M. Jafari (Ed.), *Characterization of Nanoencapsulated Food Ingredients* (vol. 4, pp. 131-158). Academic Press.
- Siepmann, J., & Siepmann, F. (2008). Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 364(2), 328-343. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.09.004>
- Singh, T. K., Øiseth, S. K., Lundin, L., & Day, L. (2014). Influence of heat and shear induced protein aggregation on the *in vitro* digestion rate of whey proteins. *Food & Function*, 5(11), 2686-2698. <https://doi.org/10.1039/C4FO00454J>
- Soares de Castro, R. J., Domingues, M. A. F., Ohara, A., Okuro, P. K., dos Santos, J. G., Brexó, R. P., & Sato, H. H. (2017). Whey protein as a key component in food systems: Physicochemical properties, production technologies and applications. *Food Structure*, 14, 17-29. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2017.05.004>
- Stone, H., & Sidel, J. L. (2004). *Sensory Evaluation Practices* (3<sup>rd</sup> ed.). Academic Press.
- Szczesniak, A. S. (1963). Classification of textural characteristics. *Journal of Food Science*, 28(4), 385-389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1963.tb00215.x>

- Tahergorabi, R., Adrah, K., & Abdollahi, M. (2021). Stability of astaxanthin during food processing and methods of preservation. In G. A. Ravishankar & A. Ranga-Rao (Eds.), *Global Perspectives on Astaxanthin* (1<sup>st</sup> ed., pp. 539-556). Academic Press.
- Tak, Y., Kaur, M., Kumar, R., Gautam, C., Singh, P., Kaur, H., Kaur, A., Bhatia, S., Jha, N. K., Gupta, P. K., & Amarowicz, R. (2022). Repurposing chia seed oil: A versatile novel functional food. *Journal of Food Science*, 87(7), 2798-2819. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16211>
- Taksima, T., Limpawattana, M., & Klaypradit, W. (2015). Astaxanthin encapsulated in beads using ultrasonic atomizer and application in yogurt as evaluated by consumer sensory profile. *LWT*, 62(1), 431-437. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.011>
- Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., & Nasirpour, A. (2014). EDTA and  $\alpha$ -tocopherol improve the chemical stability of astaxanthin loaded into nanostructured lipid carriers. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(8), 968-977. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300509>
- Tan, Y., & McClements, D. J. (2021). Plant-based colloidal delivery systems for bioactives. *Molecules*, 26(22), 6895. <https://doi.org/10.3390/molecules26226895>
- Tan, Y., Zhou, H., & McClements, D. J. (2022). Application of static *in vitro* digestion models for assessing the bioaccessibility of hydrophobic bioactives: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 122, 314-327. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.028>
- Tarrega, A., Marcano, J., & Fiszman, S. (2016). Yogurt viscosity and fruit pieces affect satiating capacity expectations. *Food Research International*, 89, 574-581. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.011>
- Tello, F., Falfan-Cortés, R. N., Martínez-Bustos, F., da Silva, V. M., Hubinger, M. D., & Grosso, C. (2015). Alginate and pectin-based particles coated with globular proteins: Production, characterization and anti-oxidative properties. *Food Hydrocolloids*, 43, 670-678. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.029>
- Torres, O., Murray, B., & Sarkar, A. (2016). Emulsion microgel particles: Novel encapsulation strategy for lipophilic molecules. *Trends in Food Science & Technology*, 55, 98-108. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.006>
- Tuberoso, C. I. G., Kowalczyk, A., Sarritzu, E., & Cabras, P. (2007). Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chemistry*, 103(4), 1494-1501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.014>
- Us-Medina, U., Ruiz-Ruiz, J. C., Quintana-Owen, P., & Segura-Campos, M. R. (2017). *Salvia hispanica* mucilage-alginate properties and performance as an encapsulation matrix for

- chia seed oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(6), e13270. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13270>
- Uyen, N. T. T., Hamid, Z. A. A., Tram, N. X. T., & Ahmad, N. (2020). Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 1035-1046. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.233>
- Velderrain-Rodríguez, G., Fontes-Candia, C., López-Rubio, A., Martínez-Sanz, M., Martín-Belloso, O., & Salvia-Trujillo, L. (2023). Polysaccharide-based structured lipid carriers for the delivery of curcumin: An *in vitro* digestion study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 227, 113349. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113349>
- Verkempinck, S. H. E., Salvia-Trujillo, L., Moens, L. G., Carrillo, C., Van Loey, A. M., Hendrickx, M. E., & Grauwet, T. (2018). Kinetic approach to study the relation between *in vitro* lipid digestion and carotenoid bioaccessibility in emulsions with different oil unsaturation degree. *Journal of Functional Foods*, 41, 135-147. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.030>
- Wanasundara, P. K. J. P. D., & Shahidi, F. (2005). Antioxidants: Science, technology, and applications. In F. Shahidi (Ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (6<sup>th</sup> ed., vol. 6, pp. 431–489). John Wiley & Sons Inc.
- Wen, J., Al Gailani, M., & Yin, N. (2018). Filled hydrogel particles. In S. Roohinejad, R. Greiner, I. Oey & J. Wen (Eds.), *Emulsion-based Systems for Delivery of Food Active Compounds: Formation, Application, Health and Safety* (1<sup>st</sup> ed., pp. 161-180). John Wiley & Sons, Ltd.
- Wichchukit, S., & O'Mahony, M. (2015). The 9-point hedonic scale and hedonic ranking in food science: Some reappraisals and alternatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95 (11), 2167-2178. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6993>
- Wichchukit, S., Oztop, M. H., McCarthy, M. J., & McCarthy, K. L. (2013). Whey protein/alginate beads as carriers of a bioactive component. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.013>
- Xavier, A. A., & Mariutti, L. R. (2021). Static and semi-dynamic *in vitro* digestion methods: State of the art and recent achievements towards standardization. *Current Opinion in Food Science*, 41, 260-273. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.08.002>
- Xu, J., Gao, H., Zhang, L., Chen, C., Yang, W., Deng, Q., Huang, Q., & Huang, F. (2014). A combination of flaxseed oil and astaxanthin alleviates atherosclerosis risk factors in high fat diet fed rats. *Lipids in Health and Disease*, 13(1), 63. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-63>

- Xu, J., Rong, S., Gao, H., Chen, C., Yang, W., Deng, Q., Huang, Q., Xiao, L., & Huang, F. (2017). A combination of flaxseed oil and astaxanthin improves hepatic lipid accumulation and reduces oxidative stress in high fat-diet fed rats. *Nutrients*, 9(3), 271. <https://doi.org/10.3390/nu9030271>
- Yang, L., Gu, J., Luan, T., Qiao, X., Cao, Y., Xue, C., & Xu, J. (2021). Influence of oil matrixes on stability, antioxidant activity, bioaccessibility and bioavailability of astaxanthin ester. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(4), 1609-1617. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10780>
- Ye, Z., Cao, C., Liu, Y., Cao, P., & Li, Q. (2018). Digestion fates of different edible oils vary with their composition specificities and interactions with bile salts. *Food Research International*, 111, 281-290. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.040>
- Ye, Z., Li, R., Cao, C., Xu, Y. J., Cao, P., Li, Q., & Liu, Y. (2019). Fatty acid profiles of typical dietary lipids after gastrointestinal digestion and absorption: A combination study between *in-vitro* and *in-vivo*. *Food Chemistry*, 280, 34-44. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.032>
- Yoshikiyo, K., Takahashi, M., Narumiya, Y., Honda, M., Iwasaki, K., Ishigaki, M., Nagato, E. G., Noothalapati, H., Shimizu, H., Murota, K., & Yamamoto, T. (2023). Co-ingestion with  $\gamma$ -cyclodextrin improves bioavailability of  $\alpha$ -linolenic acid in *Perilla frutescens* seed oil. *Food Hydrocolloids for Health*, 3, 100116. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2023.100116>
- Young, A. J., & Lowe, G. M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1), 20-27. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2149>
- 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>
- Zhang, Y., Zhang, T., Liang, Y., Jiang, L., & Sui, X. (2021). Dietary bioactive lipids: A review on absorption, metabolism, and health properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(32), 8929-8943. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01369>
- 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>
- Zuta, P. C., Simpson, B. K., Zhao, X., & Leclerc, L. (2007). The effect of  $\alpha$ -tocopherol on the oxidation of mackerel oil. *Food Chemistry*, *100*(2), 800-807. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.003>

# ANEXO

---

## ANEXO

**Tabla A1.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes al contenido de ALA en CO, CO+TF, CO+AX y CO+AX/TF almacenados a 25°C.

Tiempo (días)	Aceite	ALA (g/100g aceite)
0	CO	60,3±1,3
	CO+TF	57,5±1,9
	CO+AX	57,2±10,6
	CO+AX/TF	53,3±3,9
2	CO	57,5±1,9
	CO+TF	67,0±3,8
	CO+AX	59,8±1,0
	CO+AX/TF	51,9±6,7
7	CO	59,1±4,8
	CO+TF	55,3±5,4
	CO+AX	53,4±3,0
	CO+AX/TF	57,1±0,1
9	CO	60,2±12,3
	CO+TF	58,3±0,8
	CO+AX	57,6±2,4
	CO+AX/TF	61,3±3,3
14	CO	71,3±12,0
	CO+TF	55,1±2,3
	CO+AX	67,8±15,9
	CO+AX/TF	58,9±1,5
16	CO	66,2±6,0
	CO+TF	56,6±3,2
	CO+AX	61,0±8,3
	CO+AX/TF	64,6±0,9
21	CO	56,9±4,6
	CO+TF	55,9±0,7
	CO+AX	61,2±0,2
	CO+AX/TF	65,0±1,2
23	CO	56,3±0,9
	CO+TF	54,6±8,9
	CO+AX	60,9±0,7
	CO+AX/TF	61,6±3,0
30	CO	61,6±1,0
	CO+TF	57,4±3,2
	CO+AX	48,6±2,6
	CO+AX/TF	67,6±3,9

**Tabla A1. (cont.).** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes al contenido de ALA en CO, CO+TF, CO+AX y CO+AX/TF almacenados a 25°C.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Aceite</b>	<b>ALA (g/100g aceite)</b>
35	CO	53,7±0,2
	CO+TF	53,4±5,6
	CO+AX	48,3±9,2
	CO+AX/TF	62,3±5,2
<b>Tiempo</b>		NS
<b>Aceite</b>		NS
<b>Interacción</b>		NS

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. NS: Efecto no significativo ( $p > 0,05$ ).

**Tabla A2.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes al contenido de ALA en CO, CO+TF, CO+AX y CO+AX/TF almacenados a 45°C.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Aceite</b>	<b>ALA (g/100g aceite)</b>
0	CO	50,2±2,5
	CO+TF	50,6±1,8
	CO+AX	49,6±3,2
	CO+AX/TF	47,6±1,5
2	CO	54,4±2,4
	CO+TF	49,4±0,2
	CO+AX	50,8±2,3
	CO+AX/TF	47,2±0,9
7	CO	43,5±0,1
	CO+TF	44,3±1,1
	CO+AX	43,4±0,2
	CO+AX/TF	41,1±1,8
9	CO	36,9±0,1
	CO+TF	39,9±2,4
	CO+AX	41,0±1,5
	CO+AX/TF	38,8±0,9
14	CO	38,5±3,2
	CO+TF	41,0±1,1
	CO+AX	39,8±7,3
	CO+AX/TF	38,2±0,4
16	CO	38,2±5,1
	CO+TF	41,4±5,5
	CO+AX	41,2±3,4
	CO+AX/TF	40,5±8,4
<b>Tiempo</b>		*
<b>Aceite</b>		NS
<b>Interacción</b>		NS

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. NS: Efecto no significativo ( $p > 0,05$ ); \*: Efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A3.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes al contenido de ALA en CO, CO+TF, CO+AX y CO+AX/TF almacenados a 65°C.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Aceite</b>	<b>ALA (g/100g aceite)</b>
0	CO	60,5±3,1
	CO+TF	55,6±0,5
	CO+AX	54,9±1,1
	CO+AX/TF	54,0±1,5
1	CO	58,5±1,7
	CO+TF	62,6±1,7
	CO+AX	54,9±2,5
	CO+AX/TF	52,6±1,2
2	CO	60,8±1,2
	CO+TF	59,2±3,6
	CO+AX	54,0±1,4
	CO+AX/TF	57,8±5,1
3	CO	59,7±1,7
	CO+TF	58,4±4,6
	CO+AX	55,9±7,4
	CO+AX/TF	57,6±0,9
4	CO	56,5±4,6
	CO+TF	54,5±1,0
	CO+AX	49,2±6,5
	CO+AX/TF	48,4±4,8
<b>Tiempo</b>		*
<b>Aceite</b>		*
<b>Interacción</b>		NS

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. \*: Efecto significativo ( $p < 0,05$ ); NS: Efecto no significativo.

**Tabla A4.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes al contenido de AX en CO+AX y CO+AX/TF almacenados a 25°C.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Aceite</b>	<b>AX (µg/g aceite)</b>
0	CO+AX	394±13 <sup>fgh</sup>
	CO+AX/TF	404±16 <sup>gh</sup>
2	CO+AX	401±19 <sup>gh</sup>
	CO+AX/TF	386±22 <sup>fgh</sup>
7	CO+AX	409±10 <sup>h</sup>
	CO+AX/TF	394±17 <sup>fgh</sup>
9	CO+AX	387±14 <sup>fgh</sup>
	CO+AX/TF	387±19 <sup>fgh</sup>
14	CO+AX	400±14 <sup>gh</sup>
	CO+AX/TF	373±18 <sup>ef</sup>
16	CO+AX	385±27 <sup>fg</sup>
	CO+AX/TF	359±28 <sup>e</sup>
21	CO+AX	332±18 <sup>d</sup>
	CO+AX/TF	283±9 <sup>c</sup>
23	CO+AX	375±14 <sup>ef</sup>
	CO+AX/TF	330±10 <sup>d</sup>
30	CO+AX	291±7 <sup>c</sup>
	CO+AX/TF	251±16 <sup>b</sup>
35	CO+AX	291±12 <sup>c</sup>
	CO+AX/TF	219±5 <sup>a</sup>
<b>Tiempo</b>		*
<b>Aceite</b>		*
<b>Interacción</b>		*

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. \*: Efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A5.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes al contenido de AX en CO+AX y CO+AX/TF almacenados a 45°C.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Aceite</b>	<b>AX (µg/g aceite)</b>
0	CO+AX	382±1 <sup>f</sup>
	CO+AX/TF	402±17 <sup>g</sup>
2	CO+AX	328±5 <sup>e</sup>
	CO+AX/TF	313±4 <sup>d</sup>
7	CO+AX	181±10 <sup>c</sup>
	CO+AX/TF	180±13 <sup>c</sup>
9	CO+AX	107±13 <sup>b</sup>
	CO+AX/TF	112±6 <sup>b</sup>
14	CO+AX	23±1 <sup>a</sup>
	CO+AX/TF	21±1 <sup>a</sup>
16	CO+AX	ND
	CO+AX/TF	ND
<b>Tiempo</b>		*
<b>Aceite</b>		NS
<b>Interacción</b>		*

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. NS: Efecto no significativo ( $p>0,05$ ); \*: Efecto significativo ( $p<0,05$ ).



**Tabla A6.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes al contenido de AX en CO+AX y CO+AX/TF almacenados a 65°C.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Aceite</b>	<b>AX (µg/g aceite)</b>
0	CO+AX	371±15
	CO+AX/TF	372±7
1	CO+AX	310±6
	CO+AX/TF	308±2
2	CO+AX	225±17
	CO+AX/TF	215±12
3	CO+AX	148±6
	CO+AX/TF	161±8
4	CO+AX	84±11
	CO+AX/TF	90±6
<b>Tiempo</b>		*
<b>Aceite</b>		NS
<b>Interacción</b>		NS

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. NS: Efecto no significativo ( $p > 0,05$ ); \*: Efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A7.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes a IP y MDA en CO, CO+TF, CO+AX y CO+AX/TF almacenados a 25°C.

Tiempo (días)	Aceite	IP (mEq peróxido/Kg aceite)	MDA (mmol/Kg aceite)
0	CO	10,0±0,4 <sup>a</sup>	0,104±0,002 <sup>ab</sup>
	CO+TF	9,9±0,6 <sup>a</sup>	0,157±0,004 <sup>bcd</sup>
	CO+AX	10,0±0,6 <sup>a</sup>	0,068±0,007 <sup>a</sup>
	CO+AX/TF	10,4±0,7 <sup>a</sup>	0,113±0,022 <sup>abc</sup>
2	CO	10,6±0,5 <sup>a</sup>	0,145±0,043 <sup>bcd</sup>
	CO+TF	11,2±1,6 <sup>a</sup>	0,328±0,147 <sup>ijkl</sup>
	CO+AX	11,5±1,0 <sup>a</sup>	0,153±0,024 <sup>bcd</sup>
	CO+AX/TF	10,0±2,7 <sup>a</sup>	0,183±0,003 <sup>de</sup>
9	CO	12,4±3,0 <sup>abcd</sup>	0,162±0,019 <sup>cd</sup>
	CO+TF	20,8±0,8 <sup>gh</sup>	0,289±0,021 <sup>hij</sup>
	CO+AX	15,8±1,5 <sup>def</sup>	0,186±0,022 <sup>de</sup>
	CO+AX/TF	18,8±0,7 <sup>fg</sup>	0,232±0,026 <sup>efg</sup>
14	CO	12,3±1,2 <sup>abc</sup>	0,188±0,031 <sup>de</sup>
	CO+TF	24,5±1,9 <sup>ijk</sup>	0,354±0,029 <sup>klm</sup>
	CO+AX	16,4±0,9 <sup>ef</sup>	0,253±0,020 <sup>fgh</sup>
	CO+AX/TF	25,2±1,3 <sup>jk</sup>	0,394±0,017 <sup>m</sup>
16	CO	15,5±0,1 <sup>cdef</sup>	0,221±0,012 <sup>ef</sup>
	CO+TF	34,5±1,1 <sup>lm</sup>	0,376±0,028 <sup>lm</sup>
	CO+AX	22,6±0,4 <sup>hijk</sup>	0,269±0,007 <sup>fghi</sup>
	CO+AX/TF	32,6±3,3 <sup>l</sup>	0,453±0,019 <sup>n</sup>
21	CO	11,7±1,8 <sup>ab</sup>	0,280±0,018 <sup>ghij</sup>
	CO+TF	37,4±2,3 <sup>m</sup>	0,602±0,083 <sup>o</sup>
	CO+AX	16,1±2,6 <sup>ef</sup>	0,304±0,013 <sup>hijk</sup>
	CO+AX/TF	33,3±2,3 <sup>l</sup>	0,651±0,031 <sup>op</sup>
23	CO	15,0±0,8 <sup>bcde</sup>	0,288±0,019 <sup>ghij</sup>
	CO+TF	43,9±0,7 <sup>n</sup>	0,722±0,088 <sup>q</sup>
	CO+AX	25,7±2,1 <sup>k</sup>	0,356±0,009 <sup>klm</sup>
	CO+AX/TF	47,3±0,8 <sup>n</sup>	0,683±0,020 <sup>pq</sup>
30	CO	22,1±2,6 <sup>ghij</sup>	0,288±0,007 <sup>ghij</sup>
	CO+TF	69,9±7,3 <sup>o</sup>	0,800±0,065 <sup>r</sup>
	CO+AX	33,5±1,1 <sup>l</sup>	0,384±0,011 <sup>m</sup>
	CO+AX/TF	71,9±3,5 <sup>op</sup>	0,934±0,053 <sup>s</sup>
35	CO	21,7±1,4 <sup>ghi</sup>	0,321±0,034 <sup>ijkl</sup>
	CO+TF	92,0±7,2 <sup>q</sup>	0,987±0,020 <sup>s</sup>
	CO+AX	34,6±1,7 <sup>lm</sup>	0,462±0,053 <sup>n</sup>
	CO+AX/TF	74,8±4,5 <sup>p</sup>	1,115±0,087 <sup>t</sup>
<b>Tiempo</b>		*	*
<b>Aceite</b>		*	*
<b>Interacción</b>		*	*

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas. Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. \*: Efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A8.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes a IP y MDA en CO, CO+TF, CO+AX y CO+AX/TF almacenados a 45°C.

Tiempo (días)	Aceite	IP (mEq peróxido/Kg aceite)	MDA (mmol/Kg aceite)
0	CO	8,0±1,5 <sup>a</sup>	0,084±0,019 <sup>a</sup>
	CO+TF	7,9±0,4 <sup>a</sup>	0,094±0,006 <sup>a</sup>
	CO+AX	9,0±1,2 <sup>a</sup>	0,096±0,002 <sup>a</sup>
	CO+AX/TF	8,1±1,0 <sup>a</sup>	0,108±0,007 <sup>a</sup>
2	CO	16,6±2,4 <sup>b</sup>	0,227±0,031 <sup>b</sup>
	CO+TF	27,4±3,1 <sup>d</sup>	0,416±0,023 <sup>c</sup>
	CO+AX	21,3±1,7 <sup>bc</sup>	0,266±0,007 <sup>b</sup>
	CO+AX/TF	26,4±0,9 <sup>cd</sup>	0,421±0,051 <sup>cd</sup>
7	CO	40,9±0,9 <sup>ef</sup>	0,508±0,018 <sup>def</sup>
	CO+TF	48,0±4,2 <sup>h</sup>	0,585±0,040 <sup>f</sup>
	CO+AX	45,8±3,4 <sup>fgh</sup>	0,482±0,025 <sup>cde</sup>
	CO+AX/TF	56,0±6,5 <sup>i</sup>	0,723±0,008 <sup>gh</sup>
9	CO	39,6±1,9 <sup>e</sup>	0,569±0,107 <sup>ef</sup>
	CO+TF	46,4±5,7 <sup>gh</sup>	0,744±0,013 <sup>ghi</sup>
	CO+AX	42,2±2,4 <sup>efg</sup>	0,549±0,033 <sup>ef</sup>
	CO+AX/TF	49,5±6,3 <sup>h</sup>	0,781±0,052 <sup>ghij</sup>
14	CO	62,5±8,1 <sup>j</sup>	0,646±0,079 <sup>g</sup>
	CO+TF	77,1±3,4 <sup>l</sup>	0,875±0,080 <sup>jk</sup>
	CO+AX	68,4±5,9 <sup>k</sup>	0,851±0,010 <sup>jk</sup>
	CO+AX/TF	82,9±1,6 <sup>m</sup>	0,950±0,119 <sup>l</sup>
16	CO	69,2±3,5 <sup>k</sup>	0,663±0,025 <sup>gh</sup>
	CO+TF	88,7±2,8 <sup>n</sup>	0,916±0,032 <sup>kl</sup>
	CO+AX	80,8±3,7 <sup>lm</sup>	0,817±0,060 <sup>ijk</sup>
	CO+AX/TF	92,1±4,7 <sup>n</sup>	0,804±0,031 <sup>hijk</sup>
<b>Tiempo</b>		*	*
<b>Aceite</b>		*	*
<b>Interacción</b>		*	*

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas. Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. \*: Efecto significativo (p<0,05).

**Tabla A9.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes a IP y MDA para CO, CO+TF, CO+AX y CO+AX/TF almacenados a 65°C.

Tiempo (días)	Aceite	IP (mEq peróxido/Kg aceite)	MDA (mmol/Kg aceite)
0	CO	10,1±1,2 <sup>a</sup>	0,085±0,005 <sup>a</sup>
	CO+TF	9,8±1,5 <sup>a</sup>	0,101±0,006 <sup>a</sup>
	CO+AX	9,6±2,1 <sup>a</sup>	0,112±0,003 <sup>a</sup>
	CO+AX/TF	9,0±1,2 <sup>a</sup>	0,126±0,005 <sup>a</sup>
1	CO	20,0±1,3 <sup>b</sup>	0,338±0,048 <sup>b</sup>
	CO+TF	25,9±0,5 <sup>cd</sup>	0,439±0,083 <sup>cd</sup>
	CO+AX	23,6±2,0 <sup>bc</sup>	0,409±0,042 <sup>bc</sup>
	CO+AX/TF	39,4±2,5 <sup>fg</sup>	0,458±0,097 <sup>cd</sup>
2	CO	28,3±3,0 <sup>de</sup>	0,443±0,069 <sup>cd</sup>
	CO+TF	37,1±4,6 <sup>f</sup>	0,496±0,065 <sup>de</sup>
	CO+AX	30,6±1,1 <sup>e</sup>	0,508±0,016 <sup>de</sup>
	CO+AX/TF	38,8±3,4 <sup>fg</sup>	0,555±0,002 <sup>ef</sup>
3	CO	39,1±4,3 <sup>fg</sup>	0,586±0,106 <sup>f</sup>
	CO+TF	40,6±2,1 <sup>fg</sup>	0,500±0,073 <sup>de</sup>
	CO+AX	40,3±3,0 <sup>fg</sup>	0,541±0,027 <sup>ef</sup>
	CO+AX/TF	45,4±2,2 <sup>h</sup>	0,505±0,051 <sup>de</sup>
4	CO	42,5±5,9 <sup>gh</sup>	0,475±0,067 <sup>cde</sup>
	CO+TF	52,7±6,4 <sup>i</sup>	0,559±0,008 <sup>ef</sup>
	CO+AX	40,7±4,4 <sup>fg</sup>	0,515±0,097 <sup>def</sup>
	CO+AX/TF	53,2±3,2 <sup>i</sup>	0,507±0,033 <sup>def</sup>
<b>Tiempo</b>		*	*
<b>Aceite</b>		*	NS
<b>Interacción</b>		*	*

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas. Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. NS: Efecto no significativo ( $p > 0,05$ ); \*: Efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A10.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes al contenido de EPA y DHA en FO y FO+AX almacenados a 25°C.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Aceite</b>	<b>EPA (g/100g aceite)</b>	<b>DHA (g/100g aceite)</b>
0	FO	4,83±0,21	15,06±0,25
	FO+AX	4,75±0,23	15,00±0,65
16	FO	3,86±0,61	13,29±2,09
	FO+AX	3,10±0,04	10,61±0,02
30	FO	4,55±0,11	13,93±0,56
	FO+AX	4,65±0,14	14,16±0,76
<b>Tiempo</b>		*	*
<b>Aceite</b>		NS	NS
<b>Interacción</b>		NS	NS

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. NS: Efecto no significativo ( $p > 0,05$ ); \*: Efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A11.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes al contenido de EPA y DHA en FO y FO+AX almacenados a 45°C.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Aceite</b>	<b>EPA (g/100g aceite)</b>	<b>DHA (g/100g aceite)</b>
0	FO	4,83±0,21	15,06±0,25
	FO+AX	4,75±0,23	15,00±0,65
9	FO	4,34±0,53	13,98±1,68
	FO+AX	4,72±0,36	15,21±1,10
16	FO	2,48±0,01	8,65±0,00
	FO+AX	2,32±0,05	7,86±0,51
<b>Tiempo</b>		*	*
<b>Aceite</b>		NS	NS
<b>Interacción</b>		NS	NS

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. NS: Efecto no significativo ( $p > 0,05$ ); \*: Efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A12.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes al contenido de EPA y DHA en FO y FO+AX almacenados a 65°C.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Aceite</b>	<b>EPA (g/100g aceite)</b>	<b>DHA (g/100g aceite)</b>
0	FO	4,17±0,09	13,73±0,34
	FO+AX	3,87±0,29	12,76±0,90
2	FO	5,22±0,21	16,00±0,68
	FO+AX	4,47±0,48	14,05±1,80
4	FO	5,17±0,19	16,19±0,52
	FO+AX	4,90±0,94	14,78±1,75
<b>Tiempo</b>		*	NS
<b>Aceite</b>		NS	NS
<b>Interacción</b>		NS	NS

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. NS: Efecto no significativo ( $p > 0,05$ ); \*: Efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A13.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes al contenido de AX en FO+AX almacenado a 25°C.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>AX (µg/g aceite)</b>
0	362±19 <sup>e</sup>
2	391±18 <sup>f</sup>
7	368±10 <sup>e</sup>
9	357±9 <sup>e</sup>
14	315±14 <sup>d</sup>
16	298±12 <sup>d</sup>
21	263±8 <sup>c</sup>
23	253±12 <sup>c</sup>
28	191±10 <sup>b</sup>
30	168±17 <sup>a</sup>
<b>Tiempo</b>	*

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. La última fila muestra los resultados de ANOVA. \*: Efecto significativo ( $p < 0,05$ ).



**Tabla A14.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes al contenido de AX en FO+AX almacenado a 45°C.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>AX (µg/g aceite)</b>
0	362±19 <sup>f</sup>
2	338±10 <sup>e</sup>
7	246±6 <sup>d</sup>
9	202±18 <sup>c</sup>
14	110±10 <sup>b</sup>
16	61±6 <sup>a</sup>
<b>Tiempo</b>	*

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. La última fila muestra los resultados de ANOVA. \*: Efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A15.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes al contenido de AX en FO+AX almacenado a 65°C.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>AX (µg/g aceite)</b>
0	371±13 <sup>e</sup>
1	308±10 <sup>d</sup>
2	237±23 <sup>c</sup>
3	185±5 <sup>b</sup>
4	136 ±12 <sup>a</sup>
<b>Tiempo</b>	*

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. La última fila muestra los resultados de ANOVA. \*: Efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A16.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes a IP y MDA en FO y FO+AX almacenados a 25°C.

Tiempo (días)	Aceite	IP (mEq peróxido/Kg aceite)	MDA (mmol/Kg aceite)
0	FO	4,7±0,4 <sup>a</sup>	0,125±0,016 <sup>a</sup>
	FO+AX	4,1±0,8 <sup>a</sup>	0,145±0,035 <sup>a</sup>
2	FO	5,8±0,5 <sup>a</sup>	0,218±0,007 <sup>ab</sup>
	FO+AX	12,7±1,2 <sup>abc</sup>	0,352±0,032 <sup>bc</sup>
7	FO	11,1±1,5 <sup>ab</sup>	0,433±0,059 <sup>cd</sup>
	FO+AX	23,1±1,5 <sup>cd</sup>	0,774±0,029 <sup>e</sup>
9	FO	17,5±1,8 <sup>bc</sup>	0,536±0,021 <sup>d</sup>
	FO+AX	32,1±3,4 <sup>de</sup>	0,921±0,040 <sup>fg</sup>
14	FO	38,0±3,3 <sup>ef</sup>	0,813±0,131 <sup>ef</sup>
	FO+AX	60,7±5,3 <sup>g</sup>	1,368±0,072 <sup>i</sup>
16	FO	46,0±1,5 <sup>f</sup>	0,997±0,019 <sup>g</sup>
	FO+AX	70,6±7,2 <sup>gh</sup>	1,486±0,171 <sup>ij</sup>
21	FO	77,7±12,3 <sup>i</sup>	1,188±0,054 <sup>h</sup>
	FO+AX	87,1±8,1 <sup>ij</sup>	1,552±0,133 <sup>j</sup>
23	FO	76,5±8,8 <sup>hi</sup>	1,218±0,103 <sup>h</sup>
	FO+AX	89,8±5,9 <sup>j</sup>	1,724±0,130 <sup>k</sup>
28	FO	93,4±1,2 <sup>j</sup>	1,721±0,151 <sup>k</sup>
	FO+AX	111,6±8,8 <sup>k</sup>	2,670±0,131 <sup>l</sup>
30	FO	76,3±3,3 <sup>hi</sup>	1,535±0,152 <sup>j</sup>
	FO+AX	110,4±26,5 <sup>j</sup>	2,621±0,161 <sup>l</sup>
<b>Tiempo</b>		*	*
<b>Aceite</b>		*	*
<b>Interacción</b>		*	*

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas. Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. \*: Efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A17.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes a IP y MDA en FO y FO+AX almacenados a 45°C.

Tiempo (días)	Aceite	IP (mEq peróxido/Kg aceite)	MDA (mmol/Kg aceite)
0	FO	4,7±0,4 <sup>a</sup>	0,125±0,016
	FO+AX	4,1±0,8 <sup>a</sup>	0,145±0,035
2	FO	18,7±1,6 <sup>b</sup>	0,742±0,034
	FO+AX	21,9±1,3 <sup>b</sup>	0,766±0,071
7	FO	53,3±4,0 <sup>c</sup>	1,258±0,043
	FO+AX	60,8±5,3 <sup>d</sup>	1,504±0,088
9	FO	60,4±4,6 <sup>d</sup>	1,451±0,093
	FO+AX	61,1±2,1 <sup>d</sup>	1,629±0,065
14	FO	74,4±3,6 <sup>e</sup>	1,003±0,167
	FO+AX	72,9±5,0 <sup>e</sup>	1,295±0,181
16	FO	75,1±3,0 <sup>e</sup>	1,082±0,205
	FO+AX	94,7±12,9 <sup>f</sup>	1,264±0,237
<b>Tiempo</b>		*	*
<b>Aceite</b>		*	*
<b>Interacción</b>		*	NS

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas. Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. NS: Efecto no significativo ( $p > 0,05$ ); \*: Efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A18.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes a IP y MDA en FO y FO+AX almacenados a 65°C.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Aceite</b>	<b>IP (mEq peróxido/ Kg aceite)</b>	<b>MDA (mmol/ Kg aceite)</b>
0	FO	4,9±0,1	0,257±0,103
	FO+AX	5,4±0,3	0,275±0,035
1	FO	24,9±0,8	0,639±0,064
	FO+AX	23,3±0,6	0,813±0,093
2	FO	34,6±3,4	0,811±0,132
	FO+AX	34,6±2,6	1,035±0,149
3	FO	41,0±3,2	0,872±0,075
	FO+AX	39,8±1,8	0,950±0,037
4	FO	40,1±2,5	0,874±0,160
	FO+AX	37,3±5,8	0,903±0,179
<b>Tiempo</b>		*	*
<b>Aceite</b>		NS	*
<b>Interacción</b>		NS	NS

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. NS: Efecto no significativo ( $p > 0,05$ ); \*: Efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A19.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes al contenido de AX en las partículas y oleorresina almacenadas a 25°C.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Muestra</b>	<b>AX (% respecto al contenido inicial)</b>
0	100ALG	100±0,00 <sup>l</sup>
	25WPA75ALG	100±0,00 <sup>l</sup>
	Oleorresina	100±0,00 <sup>l</sup>
2	100ALG	90,73±0,96 <sup>ij</sup>
	25WPA75ALG	99,07±4,26 <sup>kl</sup>
	Oleorresina	100,55±1,80 <sup>l</sup>
7	100ALG	87,51±2,65 <sup>hij</sup>
	25WPA75ALG	95,23±1,69 <sup>ijkl</sup>
	Oleorresina	79,19±8,50 <sup>defg</sup>
9	100ALG	86,19±5,62 <sup>ghi</sup>
	25WPA75ALG	95,09±10,33 <sup>ijkl</sup>
	Oleorresina	84,95±2,04 <sup>fghi</sup>
14	100ALG	74,56±0,75 <sup>cde</sup>
	25WPA75ALG	91,91±5,69 <sup>ijk</sup>
	Oleorresina	89,51±6,84 <sup>ij</sup>
16	100ALG	42,33±0,13 <sup>a</sup>
	25WPA75ALG	81,43±3,91 <sup>efgh</sup>
	Oleorresina	80,30±0,72 <sup>efgh</sup>
21	100ALG	50,53±0,08 <sup>b</sup>
	25WPA75ALG	75,61±1,89 <sup>de</sup>
	Oleorresina	74,05±2,97 <sup>cde</sup>
23	100ALG	44,98±2,92 <sup>ab</sup>
	25WPA75ALG	77,97±4,08 <sup>def</sup>
	Oleorresina	77,32±3,89 <sup>def</sup>
28	100ALG	43,17±1,23 <sup>ab</sup>
	25WPA75ALG	74,11±1,42 <sup>cde</sup>
	Oleorresina	71,94±4,99 <sup>cd</sup>
30	100ALG	43,70±2,70 <sup>ab</sup>
	25WPA75ALG	75,84±5,00 <sup>de</sup>
	Oleorresina	66,60±3,21 <sup>c</sup>
<b>Tiempo</b>		*
<b>Muestra</b>		*
<b>Interacción</b>		*

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas. Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. \*: Efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A20.** Valores promedios y desviaciones estándares correspondientes al contenido de IP y MDA en las partículas y oleoresina almacenadas a 25°C.

Tiempo (días)	Muestra	IP (mEq peróxido/Kg aceite)	MDA (mmol/Kg aceite)
0	100ALG	10,38±0,61 <sup>abc</sup>	0,16±0,03 <sup>ab</sup>
	25WPA75ALG	7,12±0,06 <sup>a</sup>	0,09±0,03 <sup>a</sup>
	Oleoresina	8,14±1,24 <sup>ab</sup>	0,10±0,01 <sup>a</sup>
2	100ALG	35,25±5,46 <sup>hi</sup>	0,41±0,05 <sup>efghi</sup>
	25WPA75ALG	15,38±1,14 <sup>bcd</sup>	0,18±0,01 <sup>abc</sup>
	Oleoresina	11,20±3,43 <sup>abc</sup>	0,17±0,03 <sup>ab</sup>
7	100ALG	45,38±4,84 <sup>kl</sup>	0,79±0,00 <sup>l</sup>
	25WPA75ALG	20,39±2,29 <sup>def</sup>	0,33±0,06 <sup>cdefg</sup>
	Oleoresina	15,80±0,83 <sup>cd</sup>	0,22±0,02 <sup>abcd</sup>
9	100ALG	53,30±1,36 <sup>m</sup>	0,82±0,01 <sup>l</sup>
	25WPA75ALG	22,55±2,57 <sup>def</sup>	0,39±0,06 <sup>efghi</sup>
	Oleoresina	17,79±1,01 <sup>cde</sup>	0,31±0,07 <sup>bcde</sup>
14	100ALG	62,69±0,65 <sup>n</sup>	0,84±0,01 <sup>l</sup>
	25WPA75ALG	25,15±0,79 <sup>efg</sup>	0,38±0,05 <sup>efgh</sup>
	Oleoresina	27,03±2,95 <sup>fg</sup>	0,38±0,03 <sup>efghi</sup>
16	100ALG	93,46±1,21 <sup>p</sup>	1,36±0,24 <sup>n</sup>
	25WPA75ALG	36,11±11,98 <sup>hi</sup>	0,46±0,14 <sup>fghij</sup>
	Oleoresina	32,34±1,42 <sup>gh</sup>	0,47±0,03 <sup>ghij</sup>
21	100ALG	81,94±1,23 <sup>o</sup>	0,84±0,21 <sup>l</sup>
	25WPA75ALG	37,49±3,88 <sup>hij</sup>	0,38±0,03 <sup>efgh</sup>
	Oleoresina	38,85±2,07 <sup>hijk</sup>	0,51±0,02 <sup>hijk</sup>
23	100ALG	88,09±0,60 <sup>op</sup>	0,81±0,01 <sup>l</sup>
	25WPA75ALG	36,93±6,51 <sup>hi</sup>	0,32±0,03 <sup>cdef</sup>
	Oleoresina	41,60±0,42 <sup>ijk</sup>	0,55±0,06 <sup>ijk</sup>
28	100ALG	107,89±6,89 <sup>q</sup>	1,07±0,01 <sup>n</sup>
	25WPA75ALG	41,18±0,59 <sup>ijk</sup>	0,33±0,01 <sup>defg</sup>
	Oleoresina	52,47±0,77 <sup>lm</sup>	0,63±0,00 <sup>k</sup>
30	100ALG	108,28±7,13 <sup>q</sup>	1,36±0,08 <sup>n</sup>
	25WPA75ALG	44,69±4,83 <sup>ijk</sup>	0,54±0,08 <sup>ijk</sup>
	Oleoresina	52,87±0,35 <sup>m</sup>	0,86±0,05 <sup>l</sup>
<b>Tiempo</b>		*	*
<b>Muestra</b>		*	*
<b>Interacción</b>		*	*

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas. Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA. \*: Efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

**Estimado participante,**

Lo invitamos a participar en un estudio sobre percepción de YOGURES. Si está de acuerdo, por favor complete los siguientes datos:

Género: ..... | Edad: .....

.....  
Firma

Por favor pruebe la muestra 022 e **INDIQUE CUANTO LE GUSTA:**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Me disgusta muchísimo	Me disgusta mucho	Me disgusta poco	Me resulta indiferente	Me gusta poco	Me gusta	Me gusta	Me gusta mucho	Me gusta mucho	Me gusta mucho

**INDIQUE LAS SENSACIONES QUE SE LE VIENEN A LA MENTE:**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CREMOSO	FLÚIDO	PARTÍCULAS AGRADABLES	GRUMOSO	DULCE	GELATINOSO	PARA COLACIÓN	SALUDABLE	FÁCIL DE INGERIR	NOVEDOSO	PARA POSTRE
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
HOMOGÉNEO	LLAMATIVO	AGRADABLE	ÁSPERO	SABOR A POLVO	ÁCIDO	DESAGRADABLE	DIFÍCIL DE INGERIR	SABOR EXTRAÑO	ACEITOSO	SABOR AGRADABLE
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
AMARGO	PARTÍCULAS DESAGRADABLES	ESPESO	HETEROGÉNEO	SUAVE	TRADICIONAL	SABOR DESAGRADABLE				

Seguidamente, pruebe la muestra 401 e **INDIQUE CUANTO LE GUSTA:**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Me disgusta muchísimo	Me disgusta mucho	Me disgusta poco	Me resulta indiferente	Me gusta poco	Me gusta	Me gusta	Me gusta mucho	Me gusta mucho	Me gusta mucho

Por favor **INDIQUE LAS SENSACIONES QUE SE LE VIENEN A LA MENTE:**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CREMOSO	FLÚIDO	PARTÍCULAS AGRADABLES	GRUMOSO	DULCE	GELATINOSO	PARA COLACIÓN	SALUDABLE	FÁCIL DE INGERIR	NOVEDOSO	PARA POSTRE
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
HOMOGÉNEO	LLAMATIVO	AGRADABLE	ÁSPERO	SABOR A POLVO	ÁCIDO	DESAGRADABLE	DIFÍCIL DE INGERIR	SABOR EXTRAÑO	ACEITOSO	SABOR AGRADABLE
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
AMARGO	PARTÍCULAS DESAGRADABLES	ESPESO	HETEROGÉNEO	SUAVE	TRADICIONAL	SABOR DESAGRADABLE				

Finalmente, pruebe la muestra 774 e **INDIQUE CUANTO LE GUSTA:**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Me disgusta muchísimo	Me disgusta mucho	Me disgusta poco	Me resulta indiferente	Me gusta poco	Me gusta	Me gusta	Me gusta mucho	Me gusta mucho	Me gusta mucho

Por favor **INDIQUE LAS SENSACIONES QUE SE LE VIENEN A LA MENTE:**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CREMOSO	FLÚIDO	PARTÍCULAS AGRADABLES	GRUMOSO	DULCE	GELATINOSO	PARA COLACIÓN	SALUDABLE	FÁCIL DE INGERIR	NOVEDOSO	PARA POSTRE
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
HOMOGÉNEO	LLAMATIVO	AGRADABLE	ÁSPERO	SABOR A POLVO	ÁCIDO	DESAGRADABLE	DIFÍCIL DE INGERIR	SABOR EXTRAÑO	ACEITOSO	SABOR AGRADABLE
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
AMARGO	PARTÍCULAS DESAGRADABLES	ESPESO	HETEROGÉNEO	SUAVE	TRADICIONAL	SABOR DESAGRADABLE				

**¡¡MUCHAS GRACIAS POR PARTICIPAR!!**

**Figura A1.** Planilla presentada a los consumidores para la realización del análisis sensorial.