



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Química

Instituto de Tecnología de Alimentos

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral

para la obtención del Grado Académico de Doctor en Química

En el campo de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“Aplicación de emulsiones multicapa para la encapsulación de aceites con
alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados”**

Lic. Silvana Fioramonti

Director de tesis: **MSc. Liliana G. Santiago**

Co-director de tesis: **Dra Amelia C. Rubiolo**

Miembros del Jurado:

Dra. María del Pilar Buera

MSc. María Élide Pirovani

Dr. Francisco Speroni



2015

Agradecimientos

A Dios, por acompañarme siempre. Por mostrarme el camino y por brindarme la fuerza necesaria para continuar transitándolo.

A la mi directora Liliana Santiago y a mi codirectora Amelia Rubiolo por haberme brindado la oportunidad para realizar mi tesis doctoral abriéndome las puertas del laboratorio, por su orientación a lo largo de mi trabajo experimental, por sus consejos, por la confianza y por sus valiosos aportes que contribuyeron tanto a mi formación personal como profesional.

Al Dr. Carlos Carrara y al Ing. Oscar Andrich por su paciencia para responder todas mis consultas y por la contención y el cariño recibidos durante estos años.

A la MSc. Elena Aríngoli por su ayuda y colaboración con los análisis estadísticos de las experiencias.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Julia, Virginia, Adrián, Martina, Javier, Osvaldo, Romi, Vene, Paula, Juan Pablo, Beti, Eve y Ari. Gracias por tantas jornadas compartidas en el Instituto, por los almuerzos juntos, por los los viajes a congresos, por su calidez y por su constante estímulo.

A mis amigos del doctorado: Guille, Francesca, Pablo, Helena, Nico, Magda, Sol, Dani, por la buena onda, por los momentos compartidos durante el cursado de las materias y durante las juntadas para resolver guías de problemas que parecían imposibles, por las largas charlas de catarsis y mates intercambiados, por regalarme su amistad y por transmitirme buenas energías cuando más lo necesito.

A mi familia, a mis padres por ser mi respaldo, por haberme formado e incentivado siempre en todo lo que me he propuesto. A mis hermanos, por su apoyo constante, por su ayuda en los últimos tramos de escritura e impresión de la tesis, y sobretodo por distenderme y hacerme reír cuando estoy inaguantable por la cercanía de fechas límites. A Cristian, por su amor incondicional, por enseñarme a soñar en grande, por ser mi sostén, por acompañarme en todo lo que me propongo y por seguir eligiéndome para caminar juntos.

A mis amigas/os de toda la vida, por estar siempre.

Al grupo de “Coloides Alimentarios, Nanopartículas e Interacciones Biopoliméricas” por su cálido recibimiento y por su apoyo durante mi estadía en Buenos Aires para realizar las mediciones de tamaño de partícula y potencial zeta. Especialmente, agradezco a la Dra. Ana Pilosof por su predisposición para que el intercambio se lleve a cabo y a la colaboración conjunta de la Dra. María Julia Martínez y de la Dra. Carolina Arzeni, quienes me ayudaron y guiaron tanto en el manejo de los equipos como en la discusión de los resultados obtenidos.

Al Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA) de la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) dependiente de la Universidad Nacional (UNL) por brindarme el espacio para desarrollar mis actividades de investigación.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET), por el otorgamiento de las becas de posgrado que me permitieron realizar mi doctorado.

Al soporte económico de los siguientes proyectos de investigación de la UNL: CAI+D 2009-2011 tipo II PI 57-283, Proyecto Cambio de Escala 2012-2013 (Microencapsulación de aceites con alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados), y CAI+D PI 2011 (Estrategias de nano y microencapsulación de agentes bioactivos relevantes en salud humana).

A todos y cada uno de los miembros del Instituto de Tecnología de Alimentos, quienes de una forma u otra han colaborado y aportado su granito de arena para que pueda finalizar hoy con mi trabajo de investigación.

A todos ellos, gracias!!

“La educación es el arma más poderosa para cambiar el mundo”

Nelson Mandela

A mi abuela Mary

RESUMEN

Los ácidos grasos poliinsaturados son nutrientes esenciales que deben incorporarse con la dieta y reducen el riesgo cardiovascular. Sin embargo, son sensibles a la oxidación y deben diseñarse sistemas de recubrimiento para protegerlos e incorporarlos a alimentos.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el proceso microencapsulación de aceite lino por emulsiones multicapa O/W formando un film interfacial promovido por interacciones electrostáticas entre un aislado de proteínas del lactosuero (WPI) y alginato de sodio (AS).

En primer lugar, se estudió el comportamiento de interacción entre el WPI y el AS en fase acuosa. A valores de pH entre 3.3 - 4.5 se formaron complejos solubles, y esto dependió de la relación WPI:AS.

Luego, se estudió el efecto de la concentración de WPI, AS y del pH sobre el comportamiento de interacción de los biopolímeros en la interfase de emulsiones multicapa y se eligieron las condiciones que producían las emulsiones más estables. Seguidamente, se adicionó maltodextrina (MD) y se evaluó la estabilidad de las emulsiones frente al congelamiento (-18°C, -80°C). La MD ejerció un efecto crioprotector y mejoró la estabilidad de los sistemas.

Finalmente, se obtuvieron las microcápsulas por liofilización de las emulsiones, y se evaluó su estabilidad oxidativa en el tiempo a través del índice de peróxidos (IP) y del índice de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Si bien se lograron eficiencias de encapsulación superiores al 90%, se vio que el proceso de obtención de las emulsiones incrementó significativamente los niveles de peróxidos y radicales libres en el aceite.

Palabras clave: Microencapsulación – Emulsiones Multicapa – Ácidos grasos poliinsaturados – Proteínas lácteas – Alginato de sodio – Maltodextrina.

ABSTRACT

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are essential nutrients that have been related with prevention of cardiovascular disease and must be incorporated in the human diet. However, as they are sensitive to lipid oxidation, controlled delivery systems need to be designed to protect and incorporate them into food matrices.

The aim of this work was to study flaxseed oil microencapsulation process by designing O/W multilayer emulsions using a whey protein isolate (WPI) and sodium alginate (SA) to create self-assembled interfacial layers around lipid droplets by electrostatic deposition.

First, interaction behavior between WPI and SA in aqueous phase was studied. Soluble complexes formation, which was influenced by WPI:SA ratio, was observed at pH values between 3,3 – 4,5.

Secondly, interaction behavior between WPI and SA at the interface of multilayer emulsions was assessed at different pH, WPI and SA concentrations. Once the conditions that produced the most stable emulsions were chosen, maltodextrin (MD) was added to the systems and stability of emulsions during freeze storage (-18°C and -80°C) was studied. MD greatly improved emulsion stability after freeze-thawing acting as a cryoprotectant.

Finally, emulsions were freeze-dried and powdered microcapsules were obtained. Oxidative stability of flaxseed oil was examined by measuring peroxide values (PV) and thiobarbituric reactive substances (TBARS) of microcapsules through long-term storage. Although encapsulation efficiencies above 90% were obtained, mechanical and ultrasonic stirring contributed significantly to oxidation of the oil while preparing emulsions.

Keywords: Microencapsulation – Multilayer Emulsions – Polyunsaturated fatty acids – Milk proteins – Alginate – Maltodextrin.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ácidos grasos ω -3 en la alimentación	1
1.2. Oxidación lipídica.....	3
1.3. Microencapsulación.....	5
1.4. Material de pared o recubrimiento	11
1.4.1. Proteínas del suero lácteo	12
1.4.1.1. Composición del WPI.....	15
1.4.1.2. Propiedades funcionales de las proteínas lácteas	18
1.4.2. Alginatos.....	20
1.4.3. Maltodextrinas	21
1.5. Interacciones entre biopolímeros.....	23
1.5.1. Estudios de sistemas proteína-polisacárido en fase acuosa	25
1.6. Emulsiones	27
1.6.1. Emulsiones convencionales	27
1.6.2. Formación de una emulsión.....	28
1.6.3. Procesos de homogeneización	30
1.6.4. Dispositivos de homogeneización	35
1.6.4.1. Homogeneizadores de alta velocidad	35
1.6.4.2. Homogeneizadores de válvula de alta presión	36
1.6.4.3. Homogeneizadores ultrasónicos	38
1.6.5. Emulsiones multicapa.....	40
1.6.6. Estabilidad de emulsiones	42
1.6.6.1. Cremado	43
1.6.6.2. Floculación	46
1.6.6.3. Coalescencia	47
1.6.6.4. Consideraciones teóricas	50
1.7. Secado.....	54
1.7.1. Secado por aspersión	55
1.7.2. Liofilización	56
1.8. Antecedentes en encapsulación	57
1.9. Justificación de la investigación	60

2. OBJETIVOS	63
---------------------------	----

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales	64
3.2. SECCIÓN I: Estudio de las interacciones proteína-polisacárido en fase acuosa	64
3.2.1. Preparación de soluciones y mezclas.....	65
3.2.2. Comportamiento de interacción dinámico entre los biopolímeros en función del pH.....	65
3.2.2.1. Determinación de pH.....	66
3.2.2.2. Medición de Transmitancia	66
3.2.2.3. Construcción de curvas de Transmitancia (%) vs pH.....	68
3.2.3. Espectroscopía de absorción.....	69
3.2.4. Espectroscopía de fluorescencia	69
3.3. SECCIÓN II: Estudio de variables que afectan la formación y estabilidad de emulsiones	70
3.3.1. Preparación de emulsiones monocapa (emulsiones primarias).....	70
3.3.1.1. Efecto de la concentración de WPI y de las condiciones de sonicación	70
3.3.2. Preparación de emulsiones multicapa (emulsiones secundarias)	71
3.3.2.1. Influencia de la concentración de alginato de sodio y del pH.....	71
3.3.2.2. Influencia de la concentración de MDX y de la temperatura de congelamiento	72
3.3.3. Caracterización de emulsiones	72
3.3.3.1. Distribución de tamaños de gota	72
3.3.3.2. Determinación del potencial zeta	73
3.3.3.3. Determinación de biopolímeros no adsorbidos en la interfase aceite-agua	76
3.3.3.4. Microscopía óptica	77
3.3.3.5. Estabilidad de emulsiones	77
3.4. SECCIÓN III: Obtención y caracterización fisicoquímica de las microcápsulas en polvo	79
3.4.1. Obtención de microcápsulas en polvo.....	79
3.4.2. Determinación aceite superficial	80
3.4.3. Determinación de aceite total	80
3.4.4. Eficiencia de encapsulación.....	80

3.4.5. Determinación de actividad de agua.....	81
3.4.6. Estabilidad de las microcápsulas frente al almacenamiento.....	81
3.4.6.1. Determinación de peróxidos.....	81
3.4.6.2. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) .	82
3.5. Análisis estadístico de los datos	83

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SECCIÓN I: Estudio de las interacciones proteína-polisacárido en fase acuosa

4.1.1. Efecto de la relación WPI:AS en el comportamiento de interacción dinámico entre los biopolímeros en sistemas mixtos y en condiciones de pH variable	84
4.1.2. Efecto de la relación WPI:AS sobre la caracterización espectroscópica de los sistemas mixtos WPI/AS a pH 7 y a pH 4	92
4.1.3. Conclusiones.....	96

SECCIÓN II: Estudio de las variables que afectan la formación y estabilidad de emulsiones

4.2.1. Efecto de las condiciones de sonicación y de la concentración de WPI	97
4.2.2. Efecto del pH y de la concentración de alginato de sodio.....	108
4.2.2.1. Distribución de tamaños de gota	108
4.2.2.2. Potencial zeta.....	111
4.2.2.3. Biopolímeros no adsorbidos	114
4.2.2.4. Estabilidad de emulsiones	117
4.2.3. Efecto de la concentración de MDX y de la temperatura de congelamiento	130
4.2.3.1. Efecto de la concentración de MDX.....	131
4.2.3.2. Efecto de la temperatura de congelamiento.....	137
4.2.4. Conclusiones.....	146

SECCIÓN 3: Obtención y caracterización fisicoquímica de las microcápsulas en polvo

4.3.1. Efecto de la concentración de MDX sobre la eficiencia de encapsulación	147
4.3.2. Efecto de la concentración de MDX sobre la actividad de agua	149
4.3.3. Estabilidad de las microcápsulas frente a la oxidación	150
4.3.4. Conclusiones.....	159

5. CONCLUSIONES GENERALES.....161

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....163

Introducción

1.1. Ácidos grasos ω -3 en la alimentación

La idea de diseñar nuevos productos alimentarios con efectos beneficiosos para la salud es relativamente nueva y responde cada vez más al reconocimiento de la importancia de una dieta equilibrada para la prevención de enfermedades. En la actualidad, existe una creciente demanda en el mercado relacionada con la producción de alimentos saludables y con alto valor nutritivo, lo que ha llevado a la industria alimentaria a centrar su investigación en este tipo de productos (Carneiro y col., 2013). Dentro de los alimentos funcionales y de los productos nutracéuticos, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) ocupan un lugar destacado, ya que se les ha atribuido una larga lista de efectos beneficiosos sobre la salud (Rodea-González y col., 2012; Uauy & Dangour 2006). Los PUFAs son una familia de ácidos grasos que contienen más de un doble enlace en su cadena carbonada. Dentro de ellos, los ácidos grasos omega-3 (ω -3) son aquellos que poseen un doble enlace en el carbono 3, contado desde el grupo metilo terminal (Fig. 1.1)

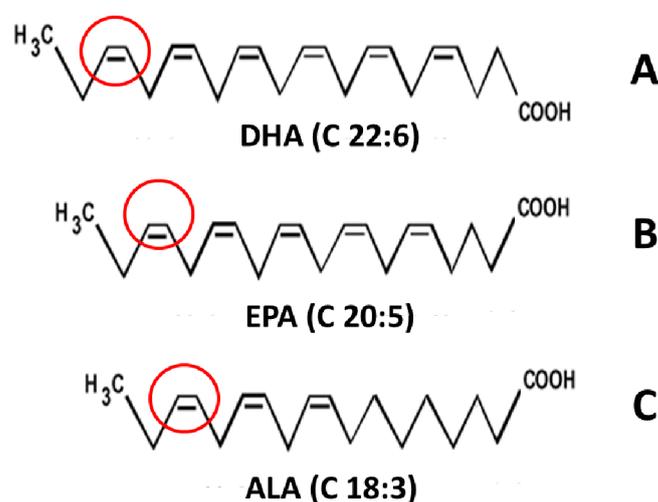


Figura 1.1. Estructura química de los ácidos grasos omega-3 más relevantes en nutrición: (A) Docosahexaenoico, (B) Eicosapentaenoico y (C) α -linolénico.

En particular, los ácidos grasos poliinsaturados ω -3 de cadena larga han sido relacionados con diversos mecanismos cardioprotectores, entre ellos, la reducción de la

concentración de triglicéridos y del colesterol en el suero sanguíneo (Harris y col., 2008). Varios estudios han demostrado los efectos positivos de los PUFAs sobre el desarrollo infantil temprano, enfermedades coronarias, hipertensión, obesidad, diabetes tipo II, y más recientemente, en enfermedades mentales, como la depresión, el trastorno de hiperactividad por déficit de atención y la demencia (Riediger y col., 2009; Simopoulos, 1999). Se han propuesto mecanismos que estarían relacionados con la incorporación de estos ácidos grasos en los fosfolípidos de las membranas, la alteración de la expresión génica, y la participación de estos compuestos en la síntesis de eicosanoides (Clandinin y col., 1994; Vanden Heuvel, 2012).

Debido a la larga lista de beneficios atribuidos al consumo de PUFAs ω -3, varios organismos han recomendado recientemente un incremento en la ingesta de estos ácidos grasos esenciales para la población en general (Abayasekara & Wathes, 1999). Los ácidos ω -3 más comunes de esta familia son el ácido α -linolénico (ALA) (C18:3), el eicosapentaenoico (EPA) (C20:5) y el docosahexaenoico (DHA) (C22:6) (Fig. 1.1). El ALA es precursor de EPA y DHA. Si bien el aceite por excelencia es el aceite de pescado, por su alto contenido de EPA y DHA, en nuestra región existen aceites vegetales ricos en ácidos grasos poliinsaturados, tales como el aceite de soja y de lino, entre otros. En particular, el aceite de lino es un aceite vegetal rico en ALA, donde este último representa aproximadamente el 57% de sus ácidos grasos totales.

Considerando los numerosos beneficios que se promoverían a partir de un incremento del consumo de ω -3, los PUFAs se convierten en excelentes candidatos para ser incorporados en matrices alimentarias. Sin embargo, la naturaleza altamente lipofílica y la baja estabilidad química de estos compuestos resulta no sólo en una escasa absorción y una palatabilidad deficiente, sino también en el deterioro oxidativo de estas sustancias (McClements y col., 2007), factores que limitan su uso en alimentos funcionales ya que podrían tener un efecto

negativo en las características sensoriales (off-flavors) y nutricionales del producto final. Esto conlleva a la existencia de numerosos desafíos en la producción, transporte y almacenaje de los alimentos funcionales enriquecidos con PUFAs (Zimet & Livney, 2009; Drusch & Berg, 2008; McClements & Decker, 2000). En este sentido, la microencapsulación de estos compuestos constituiría un excelente método de estabilización de los mismos (Heinzelmann y col., 2000; Garg y col. 2006).

1.2. Oxidación lipídica

La oxidación de los lípidos es una de las causas principales del deterioro de los alimentos. Las reacciones oxidativas rebajan su calidad nutritiva y generan ciertos productos de oxidación potencialmente tóxicos (Fenemma, 1996). Este fenómeno es conocido como autooxidación, y es un mecanismo que origina compuestos que, a su vez, mantienen y aceleran la reacción. El mayor problema de esta reacción es que, una vez iniciada, produce radicales libres y dispara una reacción en cadena con el aumento exponencial de la velocidad a medida que se propaga.

En la Fig. 1.2 se muestran las etapas más importantes de la autooxidación: iniciación, propagación y terminación.

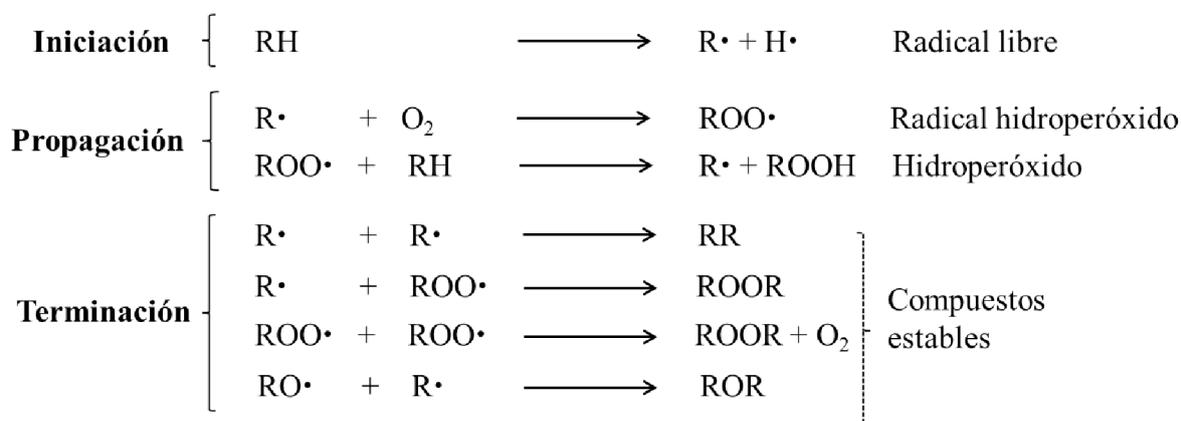


Figura 1.2. Mecanismo de oxidación de lípidos (Adaptado de Badui Dergal, 1999).

La reacción de autooxidación requiere de la presencia de catalizadores que la inicien, ya que el oxígeno en su estado normal de triplete (sus dos electrones más externos tienen el mismo spin) es muy poco electrófilo y no actúa por sí solo sobre los dobles enlaces. Se ha propuesto que la producción de los primeros radicales libres en la etapa de iniciación puede producirse mediante catálisis de la luz ultravioleta, del calor o de iones de metales pesados tales como el hierro y el cobre (Fennema, 1996).

Cabe señalar que durante la primera etapa de oxidación de los lípidos, se forman “compuestos primarios” llamados hidroperóxidos, cuya concentración va aumentando gradualmente a medida que transcurre el tiempo hasta alcanzar un máximo (Fig. 1.3).

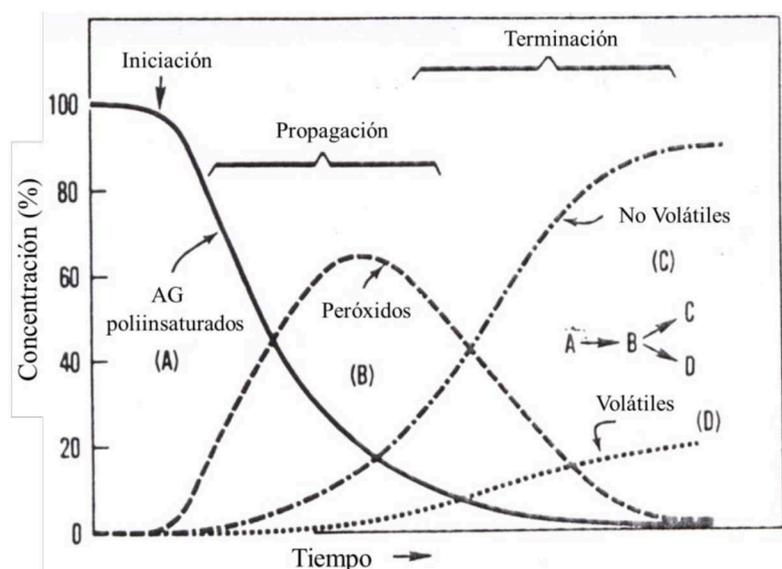


Figura 1.3. Autooxidación hipotética de un lípido poliinsaturado en función del tiempo (Adaptado de Sampels, 2013).

Estos compuestos primarios se detectan mediante la reacción del índice de peróxidos (IP). Luego la concentración de hidroperóxidos comienza a disminuir, ya que éstos se degradan para dar lugar a los llamados “compuestos secundarios” de la reacción oxidativa (aldehídos, cetonas, hidrocarburos), los cuales son los responsables de los aromas y sabores

desagradables desarrollados en los alimentos rancios. Estos compuestos secundarios son los que se detectan mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico.

1.3. Microencapsulación

El principal propósito de encapsular un compuesto es atrapar los componentes sensibles o lábiles dentro de un material llamado pared, de manera de aumentar la protección contra las condiciones del medio, reducir la evaporación, proteger de la acción de la luz, promover la fácil manipulación y controlar la liberación del mismo durante el momento de su aplicación (Baranauskiene y col., 2007). De esta forma pueden obtenerse microcápsulas que consisten de una membrana semipermeable, fuerte y delgada de un material polimérico que rodea y contiene a la sustancia de interés, denominada centro activo o núcleo (Fig. 1.4).

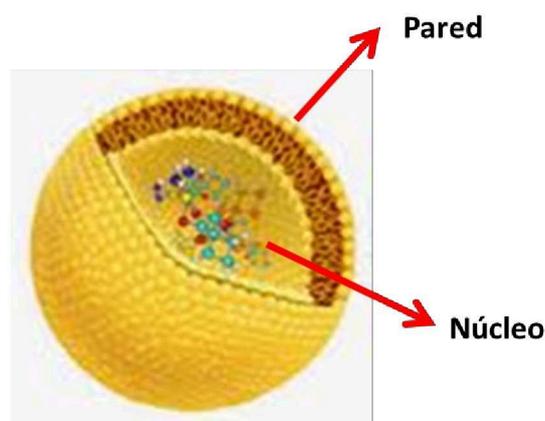


Figura 1.4. Representación esquemática de la estructura de una microcápsula.

La tecnología de microencapsulación ha sido ampliamente utilizada por el sector farmacéutico desde hace tiempo y, recientemente, se ha comenzado a promover su aplicación en la industria alimentaria. A partir del gran desarrollo y expansión de esta tecnología en los últimos años, han surgido nuevas estrategias de encapsulación para la protección de compuestos bioactivos de diversa naturaleza. En la actualidad, el número de técnicas de microencapsulación asciende a varios cientos y se espera que este número continúe creciendo

debido a la identificación de nuevos materiales para encapsular y a la aparición de nuevos principios bioactivos que requieren procesos de microencapsulación específicos. En la Tabla 1.1 se resumen algunos de los métodos de microencapsulación utilizados a nivel industrial (Lamprecht y Bodmeier, 2010).

Como se mencionó anteriormente, una microcápsula consiste de un núcleo o centro activo donde se encuentra el compuesto nutracéutico de interés, y de una pared o membrana que recubre a este núcleo y lo protege del medioambiente que lo rodea. Ese núcleo puede estar compuesto de un material cristalino, de una partícula con propiedades adsorbentes con forma irregular, de una emulsión, de una suspensión de sólidos o de una suspensión de microcápsulas más pequeñas. La microcápsula puede estar rodeada también por múltiples membranas (Gharsallaoui y col., 2007)

Tabla 1.1. Métodos de microencapsulación, naturaleza del material atrapado en el núcleo y tamaños de partícula. (Adaptada de Lamprecht y Bodmeier, 2010)

Técnica de Microencapsulación	Núcleo de la microcápsula	Tamaño de partícula (µm)
Coacervación (separación de fases)	Sólido/Líquido	2-1200
Polimerización interfacial	Sólido/Líquido	2-2000
Secado por aspersion	Sólido/Líquido	6-600
Evaporación por solventes	Sólido/Líquido	5-500
Extrusión centrífuga	Sólido/Líquido	1-5000
Suspensión en aire	Sólido	35-5000
Recubrimiento en lecho fluido	Sólido/Líquido	20-1500
Extrusión	Sólido/Líquido	1-5000
Polimerización in situ	Sólido/Líquido	2-2000
Disco rotatorio	Líquido	5-1500

La mayoría de las microcápsulas tienen forma de pequeñas esferas con diámetros comprendidos entre varios micrones y algunos milímetros. Sin embargo, existen microcápsulas que no poseen forma esférica. De hecho, tanto el tamaño como la forma de las micropartículas dependen del material y de los métodos utilizados para prepararlas. Los diferentes tipos de microcápsulas y microesferas son producidas a partir de una gran variedad de materiales de pared (monómeros y/o polímeros) y a través de distintos procesos de encapsulación, tales como: secado por aspersión, liofilización, extrusión, coacervación, recubrimiento en lecho fluido, extrusión centrífuga, encapsulación en liposomas, polimerización interfacial, inclusión molecular, etc. Dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del centro activo, del material de pared y de la técnica utilizada para la microencapsulación, se pueden obtener diferentes tipos de micropartículas (Fig. 1.5): esferas simples rodeadas por una membrana de espesor uniforme, partículas conteniendo un núcleo de estructura irregular, partículas embebidas en una matriz continua formada por el material de pared, múltiples partículas encerradas en el núcleo de una misma cápsula y/o microcápsulas con múltiples membranas interfaciales (Gharsalloui y col., 2007).

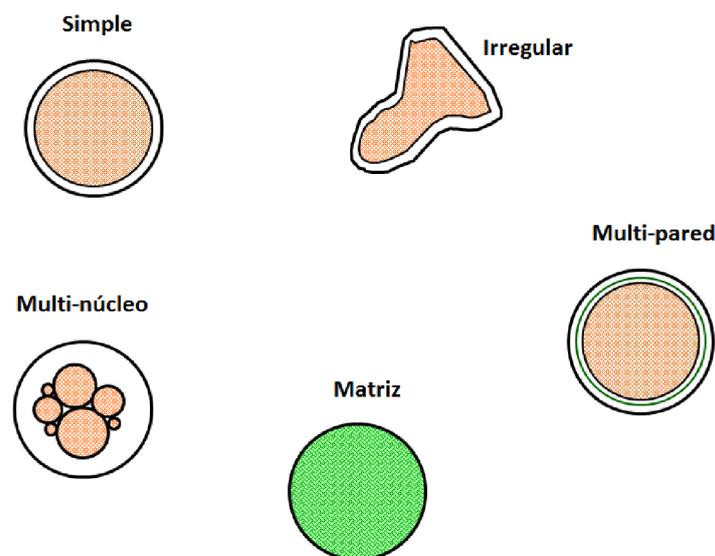


Figura 1.5. Morfología de diferentes tipos de microcápsulas
(Adaptado de Gharsalloui y col. 2007)

Hoy en día, gracias a la microencapsulación se ha ampliado el espectro de ingredientes capaces de ser incorporados en matrices alimentarias, que anteriormente eran difíciles de manipular debido a su sensibilidad al aire/oxígeno, el calor, la luz, el pH, otorgándoles mayor estabilidad y durabilidad. Otra de las ventajas que ofrece la tecnología de encapsulación es que permite enmascarar el sabor o el aroma indeseable de algunas sustancias utilizadas como aditivos en alimentos, como así también facilitar la manipulación del compuesto que se microencapsula, ya que mediante esta técnica se puede convertir un material líquido al estado sólido, mediante la obtención de un polvo fácilmente manipulable (Augustin & Hemar, 2008).

La selección del método para llevar adelante la microencapsulación está determinada por los costos, el tamaño y tipo de estructura que deberán tener las microcápsulas, el mecanismo de liberación del principio activo que se desee y las propiedades físicas y químicas del material de pared. Existe una gran variedad de diferentes tipos de sistemas de liberación que han sido desarrollados para encapsular agentes funcionales lipofílicos que incluyen coloides de asociación, emulsiones, matrices biopoliméricas, polvos, etc. Cada tipo de sistema de liberación posee ventajas y desventajas específicas, como así también su costo, regulaciones, facilidad de uso, biodegradabilidad, biocompatibilidad, etc. (McClements y col., 2007). Los lípidos bioactivos difieren ampliamente en sus propiedades moleculares (por ejemplo peso molecular, estructura, grupos funcionales, polaridad y carga) lo cual conduce a diferencias en las propiedades fisicoquímicas y fisiológicas (por ejemplo solubilidad, estado físico, reología, propiedades ópticas, estabilidad química, actividad superficial y bioactividad). Consecuentemente los sistemas de liberación deben ser diseñados de forma de tener en cuenta los requerimientos moleculares, fisicoquímicos y fisiológicos específicos de cada agente bioactivo.

En la actualidad, los consumidores muestran cada vez más su interés por los alimentos

funcionales – que acaparan gran parte del mercado de los productos denominados “saludables”. Es por ello que la industria alimentaria se ha propuesto encontrar mecanismos para incorporar ingredientes que proporcionen al consumidor algún beneficio para la salud más allá de la nutrición básica. Sin embargo, a pesar de la creciente demanda de este tipo de productos, los consumidores no están dispuestos a comprometer el sabor, la textura ni la calidad de los alimentos que ingieren. En este sentido, la microencapsulación es capaz de ofrecer soluciones a estas cuestiones, debido a su capacidad de enmascarar sabores u olores no deseables, prevenir la oxidación de componentes bioactivos y, al mismo tiempo, contribuir en la nutrición diferencial de poblaciones con requerimientos específicos.

Existen ciertos parámetros que los sistemas microencapsulados deberán cumplir para poder ser incorporados en alimentos:

- Grado alimenticio: Los sistemas deben ser fabricados en su totalidad con ingredientes permitidos por el Código Alimentario Argentino, mediante procesos de elaboración que se encuentren acreditados. Algunos de los ingredientes más utilizados para este propósito se muestran en la Tabla 1.2.
- Producción económica: El proceso de obtención de las microcápsulas tiene que ser económicamente factible, utilizando ingredientes de bajo costo. En este sentido, los beneficios obtenidos por la encapsulación del compuesto bioactivo (por ejemplo, incremento de la biodisponibilidad, aumento la vida útil, aumento del valor agregado del alimento que lo contiene) deberían superar a los costos adicionales asociados con el proceso de producción de las microcápsulas.
- Protección contra la degradación química: El sistema de liberación debe proteger al agente bioactivo de las condiciones ambientales adversas que contribuyan a su deterioro, tales como, oxidación, hidrólisis, etc. Además, el conocimiento de los mecanismos y de los factores implicados en el proceso de degradación del compuesto

encapsulado (por ejemplo, oxígeno, pH, luz, calor, presencia de iones pro-oxidantes) podría facilitar el diseño de un sistema más protector.

Tabla 1.2. Componentes estructurales de grado alimenticio que suelen utilizarse para la construcción de sistemas de liberación de lípidos bioactivos (Adaptado de McClements y col. 2007.)

Componente	Características relevantes	Ejemplos
Lípidos	Estabilidad química Grado de hidrofobicidad	<u>Grasas animales</u> : carne de res, cerdo, pollo <u>Aceites de pescado</u> : salmón, atún, hígado de bacalao <u>Aceites vegetales</u> : palma, coco, girasol, maíz, lino, soja <u>Aceites esenciales</u> : limón, naranja
Surfactantes	Solubilidad Concentración superficial en condiciones de saturación Geometría molecular Carga de grupos funcionales	<u>No iónicos</u> : Tween, Span <u>Aniónicos</u> : SDS, DATEM, CITREM <u>Catiónicos</u> : Arginato láurico <u>Anfotéricos</u> : proteínas, lecitina, fosfolípidos
Biopolímeros	Masa Molar Conformación espacial Densidad de carga Hidrofobicidad Flexibilidad	<u>Proteínas globulares</u> : lactosuero, soja, huevo <u>Proteínas flexibles</u> : gelatina, caseína <u>Polisacáridos no-iónicos</u> : almidón, dextranos, maltodextrinas, galactomananos, agar, celulosa

- Capacidad de carga y retención: Idealmente, las microcápsulas deberían incorporar la mayor cantidad posible de compuesto bioactivo por unidad de masa del material de pared y retenerlo eficientemente hasta que sea necesaria su liberación.
- Liberación controlada: Los sistemas encapsulados deben diseñarse de manera liberar el lípido bioactivo en el momento y en el sitio requerido, a una velocidad determinada o en respuesta a un estímulo específico (por ejemplo, pH, fuerza iónica, actividad enzimática o temperatura).

- Compatibilidad de la matriz alimentaria: Las microcápsulas tienen que ser compatibles con el entorno que las rodea una vez incorporadas al alimento. Esto significa que no deben ocasionar un impacto negativo en la apariencia, textura, sabor y/o estabilidad del producto final.
- Biodisponibilidad/bioactividad: El sistema de encapsulación debe aumentar (o al menos no afectar negativamente) la biodisponibilidad/bioactividad del agente bioactivo contenido en el interior. (McClements y col., 2007).

1.4. Material de pared o recubrimiento

La elección del material de pared es determinante al momento de evaluar la liberación de la sustancia que se desea encapsular ya que dependerá de la permeabilidad que presente el recubrimiento. Existe una amplia variedad de polímeros sintéticos y naturales, los cuales pueden mezclarse a fin de obtener propiedades de barrera y mecanismos de liberación específicos. Un material de recubrimiento ideal debería poseer sabor y aroma neutros, baja viscosidad a altas concentraciones, baja capacidad de absorción de agua atmosférica, bajo costo, no reaccionar con el material encapsulado y ser insoluble en él, ser soluble en la matriz alimentaria donde se adicionará finalmente, proporcionar máxima protección a la sustancia o principio activo que encierra (Madene y col., 2006; Augustin & Hemar, 2008).

Teniendo en cuenta que un único material de pared no puede satisfacer todos estos requerimientos, en la práctica se utilizan combinaciones de biopolímeros para la microencapsulación de compuestos bioactivos. En la Tabla 1.3. se presentan las características de los componentes más utilizados por la industria alimentaria como material de pared (Madene y col., 2006).

Tabla 1.3. Características de algunos materiales de recubrimiento usados en la microencapsulación de aditivos alimentarios (Adaptado de Madene y col., 2006)

Material de recubrimiento	Característica de interés
Maltodextrina	Formador de película
Sólidos de jarabe de maíz	Formador de película
Almidón modificado	Muy buen emulsionante
Goma arábiga	Emulsionante, formador de película
Celulosa modificada	Formador de película
Gelatina	Emulsionante, formador de película
Ciclodextrina	Emulsionante, encapsulante
Lecitina	Emulsionante
Proteína de suero	Buen emulsionante
Grasa hidrogenada	Barrera al oxígeno y humedad

En particular, las proteínas y los polisacáridos son biopolímeros ampliamente utilizados, ya que al ser biodegradables y biocompatibles se encuentran catalogados como sustancias GRAS (Generally Recognized As Safe) y pueden ser incorporados de manera segura en los alimentos (McClements, 2006; Neiryck y col., 2007).

A continuación se describe la importancia, obtención y principales características de los biopolímeros utilizados como material de recubrimiento para la microencapsulación de aceite de lino desarrollada en la presente tesis doctoral.

1.4.1. Proteínas del suero lácteo

Durante la última década se han producido más avances en la química de las proteínas del suero lácteo que en cualquier otra área de la química de la leche. Esto puede ser una consecuencia de la importancia comercial de sus proteínas, dado su alto valor nutricional

(Sava y col., 2005), ya sea en forma de concentrado (Whey Protein Concentrate, WPC) o de aislado proteico (Whey Protein Isolate, WPI).

El suero lácteo es el líquido remanente de la producción de queso o de la remoción de las caseínas y las grasas de la leche (de Wit, 2001), y contiene aproximadamente 0.6% de proteínas y 93% de agua (Foegeding y col., 2002). Dependiendo del tipo del método de elaboración de quesos, se distinguen dos tipos de suero: el suero dulce y el suero ácido. El suero dulce se obtiene a partir de la coagulación enzimática de la leche producida por acción del cuajo (quimosina o renina) sobre las micelas de caseína. Las enzimas catalizan la ruptura del enlace peptídico de la κ -caseína (entre Phe₁₀₅ y Met₁₀₆), lo que produce la desestabilización de las micelas con la consecuente precipitación de las caseínas. En cambio, el suero ácido, se obtiene de la coagulación ácida de las micelas de caseína – como en el caso del queso cottage – a nivel de su punto isoelectrico (pI=4.6). Este proceso conduce a una total desmineralización de las micelas y a la destrucción de la estructura micelar. El suero ácido es un suero muy mineralizado ya que contiene el 80% de los minerales de la leche de partida.

Las proteínas del lactosuero son proteínas globulares presentes en la leche y están compuestas principalmente por β -lactoglobulina (β -Lg), α -lactalbúmina (α -La), albúmina sérica bovina (BSA), inmunoglobulinas, y otras proteínas como polipéptidos y enzimas; tal y como se muestra en la Tabla 1.4.

El suero puede ser procesado para producir ingredientes simplemente por secado, o bien, su contenido proteico puede ser aumentado mediante la remoción de lípidos, minerales y lactosa. Para producir WPC (25-80% de proteína) y WPI (+90% de proteína) se necesitan remover grandes cantidades de compuestos no proteicos (Foegeding y col., 2002).

Tabla 1.4. Componentes proteicos del suero lácteo.

Componente	Cantidad (g/L)	
	Suero Dulce	Suero Ácido
β -lactoglobulina	3.5	3.5
α -lactalbúmina	1.3	1.3
Albúmina sérica	0.1	0.1
Inmunoglobulinas	0.4	0.4
Lipoproteínas	0.2	...
Proteosa peptona	0.2	0.2
Glicomacropéptido	1.0	...
Contenido total de proteínas	6.7	5.8

Tabla extraída de Oakenfull, Pearce & Burley (1997)

Los principios de obtención de los ingredientes del suero lácteo en los procesos industriales se esquematizan en la Fig. 1.6. Las membranas de filtración (A) permiten la separación de ingredientes con distintos tamaños moleculares. La microfiltración se utiliza para la remoción de bacterias y los glóbulos grasos de la leche; la ultrafiltración, para el fraccionamiento de las proteínas; la nanofiltración para el desalado y la ósmosis inversa para la separación de agua.

Posteriormente, para remover la lactosa se aprovecha la baja solubilidad de la misma en el suero concentrado, lo que resulta en la cristalización y la separación del disacárido del suero (B). La desmineralización consiste en la separación de los minerales y algunos ácidos orgánicos a través del intercambio iónico (C) o por electrodiálisis (D). A través de este proceso se logra obtener el WPC con distintos grados de contenido proteico, de acuerdo a las etapas atravesadas. Una separación específica de las proteínas esenciales del suero (β -Lg y α -La) puede realizarse a través de una cromatografía de intercambio iónico en lecho fijo (F) o

en lecho fluidizado (E). Un paso de ultrafiltración adicional es necesario para remover el exceso de sales, luego del cual se obtiene el WPI libre de lactosa y sales.

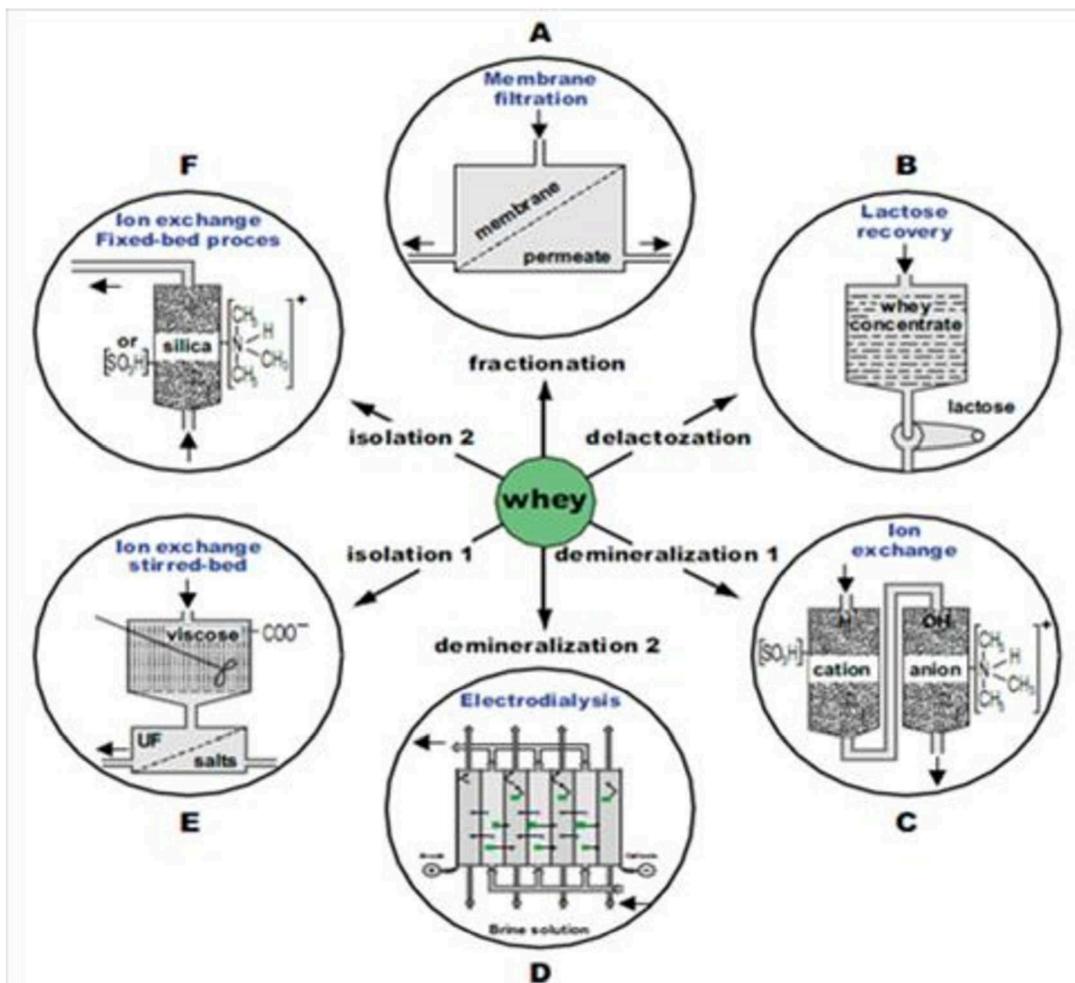


Figura 1.6. Esquema de los diferentes procesos utilizados para la recuperación de las proteínas del suero lácteo (Extraído de de Wit, 2001).

Una vez obtenidos, tanto el WPC como el WPI, son sometidos a procesos de evaporación y secado spray para reducir el contenido de humedad, y así mejorar el almacenamiento y el transporte de los mismos (de Wit, 2001).

1.4.1.1. Composición del WPI

Las principales proteínas presentes en el WPI son la α -La y la β -Lg. La α -La representa alrededor del 20% del total de proteínas del suero lácteo. Es una proteína pequeña compuesta

por 123 aminoácidos y posee un peso molecular de aproximadamente 14 kDa. Presenta una estructura secundaria poco organizada (30% de α -hélice y 9% de hoja plegada β), lo que le aporta una gran flexibilidad. Su estructura terciaria se mantiene debido a la presencia de 4 puentes disulfuro y a la presencia de un ión calcio (Fig. 1.7 A). Además, no posee grupos –SH libres (Cayot y Lorrient, 1997).

Por otro lado, la β -Lg (Fig. 1.7. B) es la más abundante de las proteínas del suero (56%-60% de las proteínas totales) (Galani & Owusu Apenten, 1999). Pertenece a la familia de las lipocalinas y ha sido muy estudiada debido a sus propiedades transportadoras, dado que es capaz de unir pequeñas moléculas hidrofóbicas (Loch et al 2012). Presenta una estructura globular compuesta por 162 aminoácidos, de los cuales los más hidrofóbicos se localizan en el interior de la molécula. Posee un peso molecular de 18.3 kDa y su punto isoeléctrico (pI) está en el rango de pH entre 4.7-5.2 (Fessas, Iametti, Schiraldi & Bonomi, 2001).

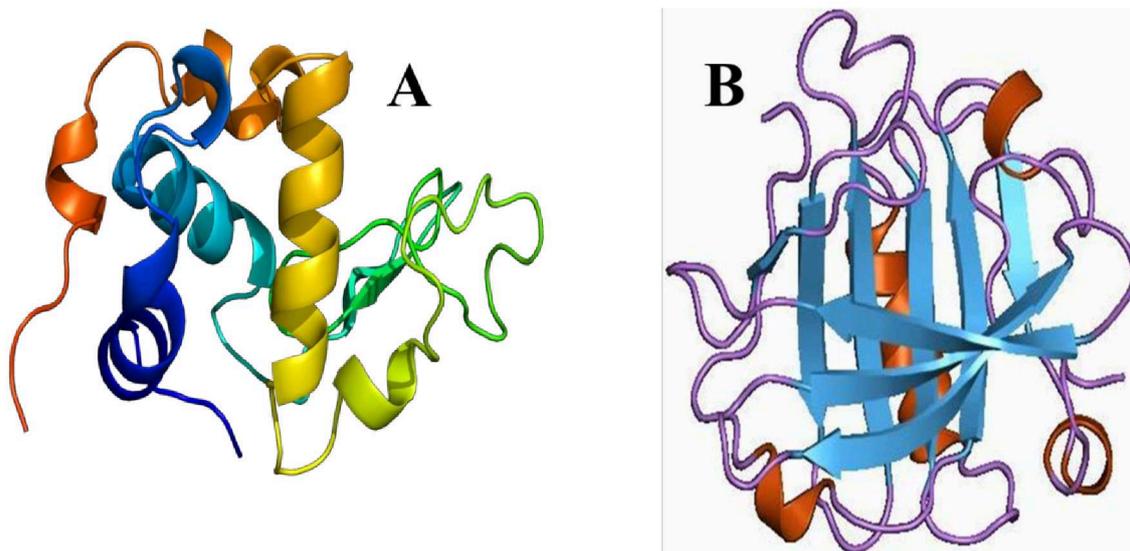


Figura 1.7. Estructura tridimensional de (A) α -lactalbúmina y (B) β -lactoglobulina.

A temperatura ambiente y a pH fisiológico la β -Lg se presenta como dímero (36.7 kDa). Una de las principales características de esta proteína es la presencia de cinco residuos de cisteína

(Cys) en su secuencia primaria: cuatro se encuentran formando puentes disulfuro intramoleculares (Cys₆₆-Cys₁₆₀; Cys₁₀₆-Cys₁₁₉), los cuales estabilizan la estructura terciaria de la proteína; y uno permanece con su grupo -SH libre (Cys₁₂₁) en el interior de la molécula.

Por otro lado, hay dos residuos triptófano (Trp) presentes en la proteína, los cuales le confieren propiedades fluorescentes. Uno de ellos se ubica en la posición 19 y el otro en la posición 61 de la secuencia primaria. Según Papiz y col. (1986) el Trp₁₉ estaría localizado en el interior hidrofóbico de la proteína, mientras que el Trp₆₁ se encontraría adyacente a un residuo de lisina en la posición 62, próximo al puente disulfuro establecido entre Cys₁₆₀-Cys₆₆, muy cerca de la superficie proteica. Sin embargo, se ha sugerido que la intensidad de fluorescencia del Trp₆₁ se vería considerablemente disminuida por un proceso de quenching (o apagamiento) ejercido por el puente disulfuro cercano (Bhattacharjee & Das, 2000). Por lo tanto, la fluorescencia intrínseca de la proteína estaría gobernada principalmente por el residuo Trp₁₉, mientras que el Trp₆₁ contribuiría sólo en menor medida.

Por su parte, la solubilidad del WPI estaría influenciada principalmente por la solubilidad de la β -Lg, dado que esta última constituye el componente mayoritario. En condiciones de neutralidad, la β -Lg se encuentra formando dímeros, mientras que a valores de pH menores a 3 y mayores a 7.5 existe como monómero. A valores de pH cercanos a su pI tiende a formar tetrámeros o incluso oligómeros de mayor tamaño, por lo que se ve disminuida su solubilidad. Las fuerzas de interacción que conducen a la formación de agregados alrededor del pI serían probablemente una combinación de interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals y posibles interacciones electrostáticas entre grupos con carga positiva presentes en algunas proteínas y grupos cargados negativamente presentes en otras (Bhattacharjee & Das, 2000; Harnsilawat y col., 2006).

1.4.1.2. Propiedades funcionales de las proteínas lácteas

Además de su función nutritiva, las proteínas desempeñan un papel importante en la expresión de los atributos sensoriales de los alimentos, tales como aroma, sabor y la textura, entre otros (Damodaran 1997). Kinsella (1982) definió a las propiedades funcionales como "aquellas propiedades físicas y químicas que afectan el comportamiento de las proteínas en los sistemas alimentarios durante el procesamiento, el almacenamiento, la preparación y el consumo".

Las propiedades funcionales de las proteínas del lactosuero incluyen emulsificación, espumado, gelificación, retención de agua, solubilidad, adsorción y retención de lípidos y flavors (de Wit y col., 2001). Estas propiedades están relacionadas con las características físicas, químicas y estructurales de las proteínas, tales como su tamaño, forma, composición, secuencia de aminoácidos, carga neta, distribución de cargas y carácter anfifílico (Damodaran, 1997). Por lo tanto, las propiedades funcionales son influenciadas, a su vez, por la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas, las uniones intra e intermoleculares, la rigidez/flexibilidad molecular en respuesta a los cambios de las condiciones del medio acuoso y por la naturaleza y extensión de las interacciones con otros componentes presentes en los alimentos.

Una de las propiedades funcionales de interés en el presente trabajo de investigación, son las propiedades interfaciales de las proteínas del suero lácteo, que muestran una fuerte tendencia a adsorberse sobre interfaces fluidas aceite-agua, lo que las convierte en excelentes emulsificantes. Esta propiedad es influenciada por factores tales como la concentración de proteína, el grado de desnaturalización y/o agregación, pH y fuerza iónica (Perez, 2011).

Las propiedades dinámicas superficiales de las proteínas del lactosuero, tales como la velocidad de adsorción interfacial y las características viscoelásticas de las películas adsorbidas, son importantes durante la formación y estabilización de emulsiones. La

formación de una emulsión está influenciada por el mecanismo de adsorción de proteínas sobre la interfase aceite-agua y por su capacidad de reducir la tensión superficial (McClements, 1999).

El cambio estructural que acompaña a la adsorción de las proteínas puede ser suficiente para provocar la desnaturalización de las mismas, ya que generalmente existe un plegamiento alternativo de la molécula para minimizar la energía libre hidrofóbica. De este modo, las cadenas de aminoácidos anfifílicos se ubican en contacto con la superficie mientras que los rulos y colas de aminoácidos hidrofílicos o hidrofóbicos se localizan alejados de las dos fases (Wilde y col., 2004).

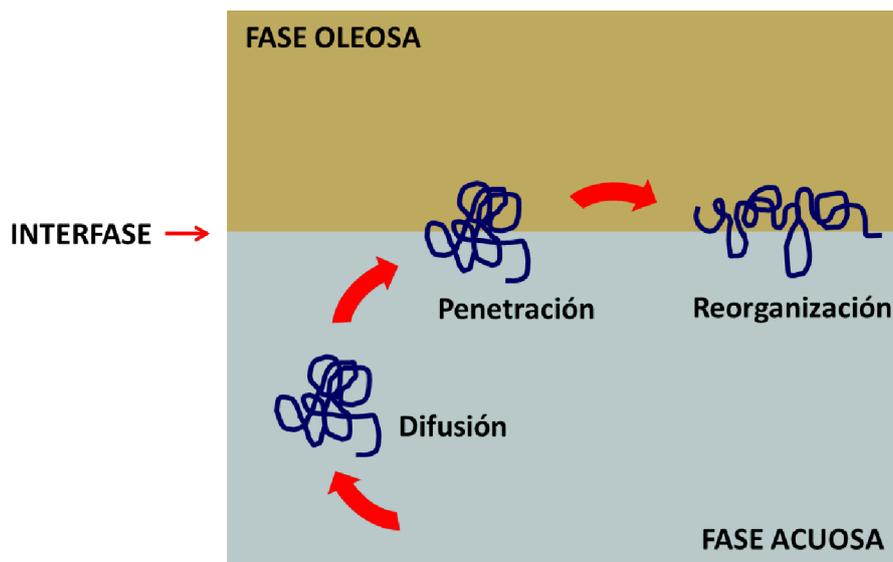


Figura 1.8. Mecanismo de adsorción de una proteína a la interfase aceite-agua.

En la Fig. 1.8 se muestra el mecanismo de adsorción de proteínas a una interfase aceite-agua. El mismo consta de tres etapas: (i) difusión de la proteína desde el seno de la solución acuosa hacia la interfase, (ii) penetración de la proteína en la interfase y (iii) desplegamiento y reordenamiento de los residuos aminoacídicos de la proteína adsorbida según su carácter hidrofílico/hidrofóbico (Rodríguez Patino y col., 2003). Este fenómeno resulta en la

formación de una membrana interfacial que rodea a las gotas de aceite en una emulsión y las estabiliza.

1.4.2. Alginatos

Los alginatos se encuentran presentes en las paredes celulares de las algas marrones o pardas del género Phaeophyta. Estas algas se encuentran principalmente a lo largo de las costas rocosas. En el Atlántico norte son recolectadas principalmente en Estados Unidos, Gran Bretaña, y Noruega.

La extracción de alginatos se inicia con el lavado de las algas con ácido para eliminar las impurezas y para convertirlos en su forma ácida. El alginato puede ser extraído con álcali para dar sales, que pueden ser separadas de otros materiales por filtración antes de la precipitación con ácido. El alginato puede neutralizarse con diferentes bases para dar lugar a una gran diversidad de sales solubles muy utilizadas en la industria alimentaria, principalmente sales de sodio, potasio y amonio (Perez, 2011).

Los alginatos son polímeros lineales formado por una co-polimerización β -1,4 de unidades de ácido D-manurónico y ácido L-gulurónico (Fig. 1.9).

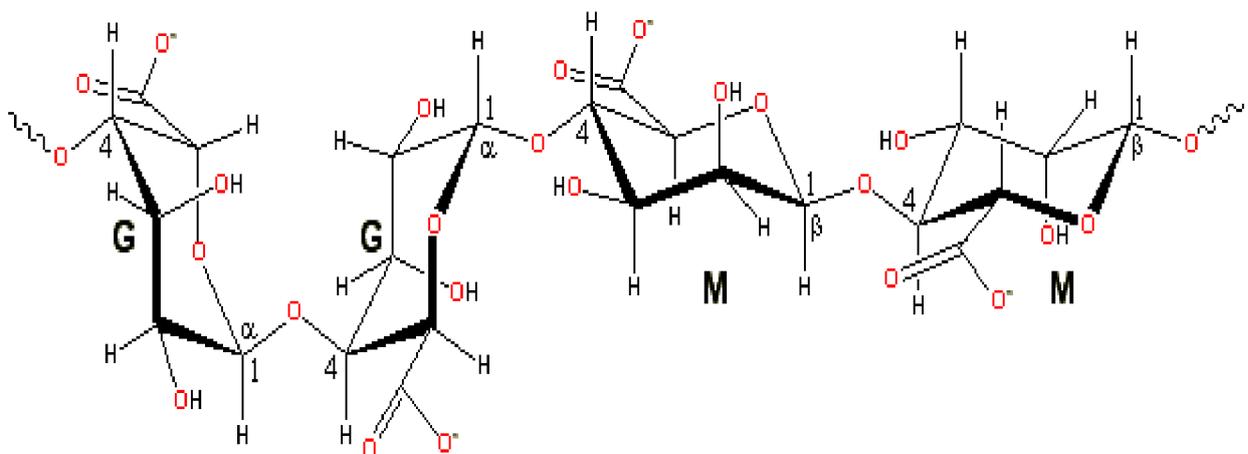


Figura 1.9. Estructura química del alginato de sodio.

Los residuos de M y G pueden encontrarse alternados a lo largo de la cadena (regiones G-M o M-G), pero comúnmente se asocian en estructuras de copolímero en bloques de regiones que contienen sólo G (G-G) y regiones con sólo M (M-M) (Dziezak, 1991). La relación M/G en la molécula de alginato depende en gran medida de la especie de la que fue extraído.

Las constantes de disociación del ácido manurónico y gulurónico son 3.38 y 3.65, respectivamente. Por este motivo, los alginatos tienden a poseer una densidad de carga neta negativa en un amplio rango de pH, la cual está dada por la ionización de los grupos carboxílicos (Pongsawatmanit y col., 2006).

En la industria alimentaria, los alginatos son ampliamente utilizados como espesantes, estabilizantes y agentes gelificantes, debido a que tienen la capacidad de aumentar la viscosidad de soluciones acuosas a bajas concentraciones. Se aplican a la fabricación de helados, postres, productos lácteos (bebidas y yogures) y salsas (Dziezak, 1991).

1.4.3. Maltodextrinas

Las maltodextrinas son polímeros derivados de la hidrólisis parcial del almidón, cuya estructura consiste en unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces α -1,4 (Fig 1.10) (Klinkesorn y col., 2004). Se presentan en forma de polvo blanco ó soluciones líquidas concentradas y son clasificadas como ingredientes GRAS según la Food and Drug Administration (FDA). En la industria, las maltodextrinas se obtienen a partir del almidón de maíz principalmente.

La hidrólisis de esta macromolécula puede realizarse por métodos químicos o enzimáticos, o bien, mediante una combinación de ambos (Lumdubwong & Seib, 2001). Durante hidrólisis ácida, la molécula de almidón es cortado al azar, lo que produce una mezcla no controlada de oligosacáridos y polisacáridos con diferentes pesos moleculares.

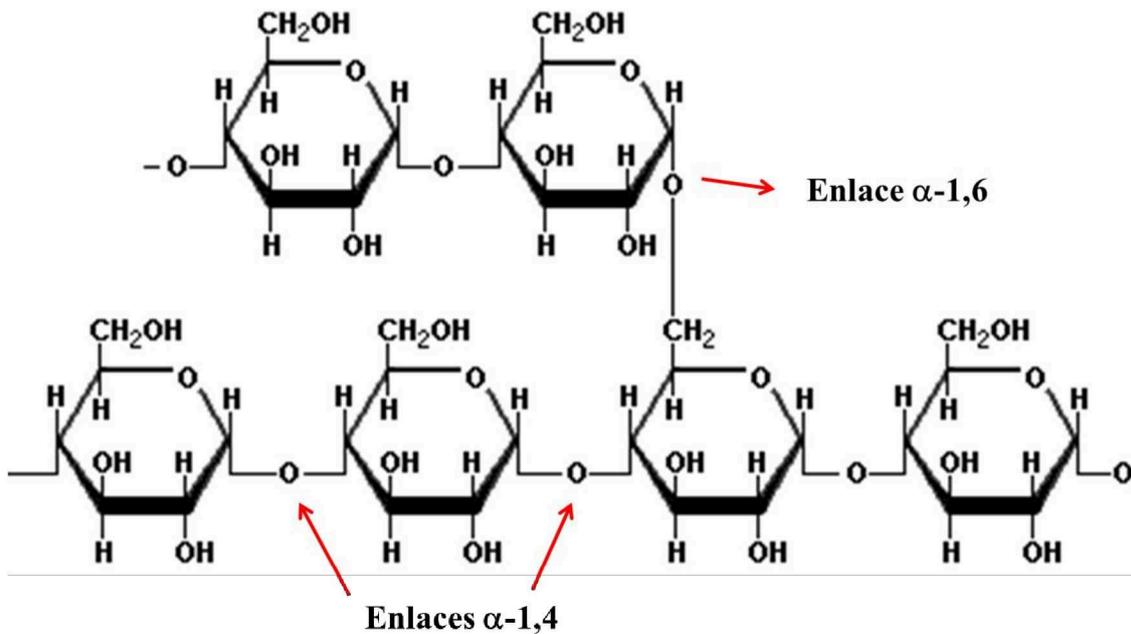


Figura 1.10. Estructura química del almidón.

La hidrólisis enzimática ha reemplazado gradualmente a los procesos de hidrólisis ácida debido a que es una reacción de mayor especificidad, donde se utilizan condiciones de hidrólisis más suaves (temperatura, presión, pH) y se puede controlar mejor el grado de hidrólisis deseado. Además, mediante esta técnica no se obtienen productos coloreados ni de sabor amargo, descartando las etapas de refinamiento para la eliminación estos subproductos (Wang & Wang, 2000).

Las maltodextrinas difieren en sus pesos moleculares y se clasifican comercialmente según el grado de dextrosa equivalente (DE). Esta clasificación de las maltodextrinas no es la más precisa, pero sí es la más utilizada en la industria debido a la rapidez y economía de su determinación.

El DE es una medida del poder reductor de los oligosacáridos/polisacáridos derivados de la hidrólisis del almidón, en comparación con la molécula de D-glucosa en base seca. El almidón tiene un DE=0 mientras que la glucosa tiene un DE=100 (Dokic y col., 1998). Normalmente, las maltodextrinas se definen como aquellos derivados de la hidrólisis del

almidón con un $DE < 20$, mientras que los oligosacáridos con $DE > 20$ se denominan jarabes.

Dependiendo del perfil de carbohidratos y del valor de DE, las maltodextrinas presentan diferentes propiedades fisicoquímicas y funcionales, incluyendo solubilidad, temperatura de congelamiento, viscosidad, etc. Sin embargo, las maltodextrinas con el mismo valor de DE pueden también presentar propiedades diferentes de acuerdo al método de hidrólisis empleado para su obtención, a la fuente de almidón (maíz, papa, arroz), y a la relación amilosa:amilopectina.

Son muy utilizadas en la industria alimentaria como agentes estabilizantes, espesantes, extensores, reemplazantes de grasas y aceites en aderezos para ensaladas, margarinas y postres congelados, agentes encapsulantes o vehículos para procesos de secado por aspersion de pigmentos naturales, aceites esenciales, sabores, etc. También ayudan a controlar la textura, la higroscopicidad y la densidad en algunos alimentos.

Dado que las maltodextrinas no tienen actividad superficial, su efecto estabilizador podría estar relacionado directamente con el aumento de la viscosidad de la fase continua que rodea las gotas de emulsión. Por este motivo, las emulsiones que contienen maltodextrina requieren, además, un agente emulsificante adicional para formular una emulsión estable.

Además, las características moleculares de las maltodextrinas empleadas en la formulación de emulsiones aceite en agua, tales como concentración y longitud de cadena, afectarán la reología y la estabilidad los sistemas. (Klinkesorn y col., 2004).

1.5. Interacciones entre biopolímeros

Cuando se tiene una mezcla de biopolímeros en solución, pueden existir entre ellos interacciones sinérgicas o antagónicas, que podrían promover la modificación de sus propiedades funcionales. El conocimiento del origen y la naturaleza de estas interacciones podría ser utilizado para el diseño de nuevas estructuras en matrices alimentarias.

La magnitud de las interacciones biopoliméricas en un sistema en particular depende del tipo de biopolímeros involucrados (peso molecular, densidad de carga versus pH, flexibilidad, hidrofobicidad), de la composición del medio que los rodea (pH, fuerza iónica) así también como de factores externos tales como la temperatura (McClements, 2006).

Cuando dos biopolímeros se mezclan en solución, por ejemplo, una solución de proteínas y otra de polisacáridos, pueden tener lugar algunos de los fenómenos representados esquemáticamente en la Fig. 1.11.

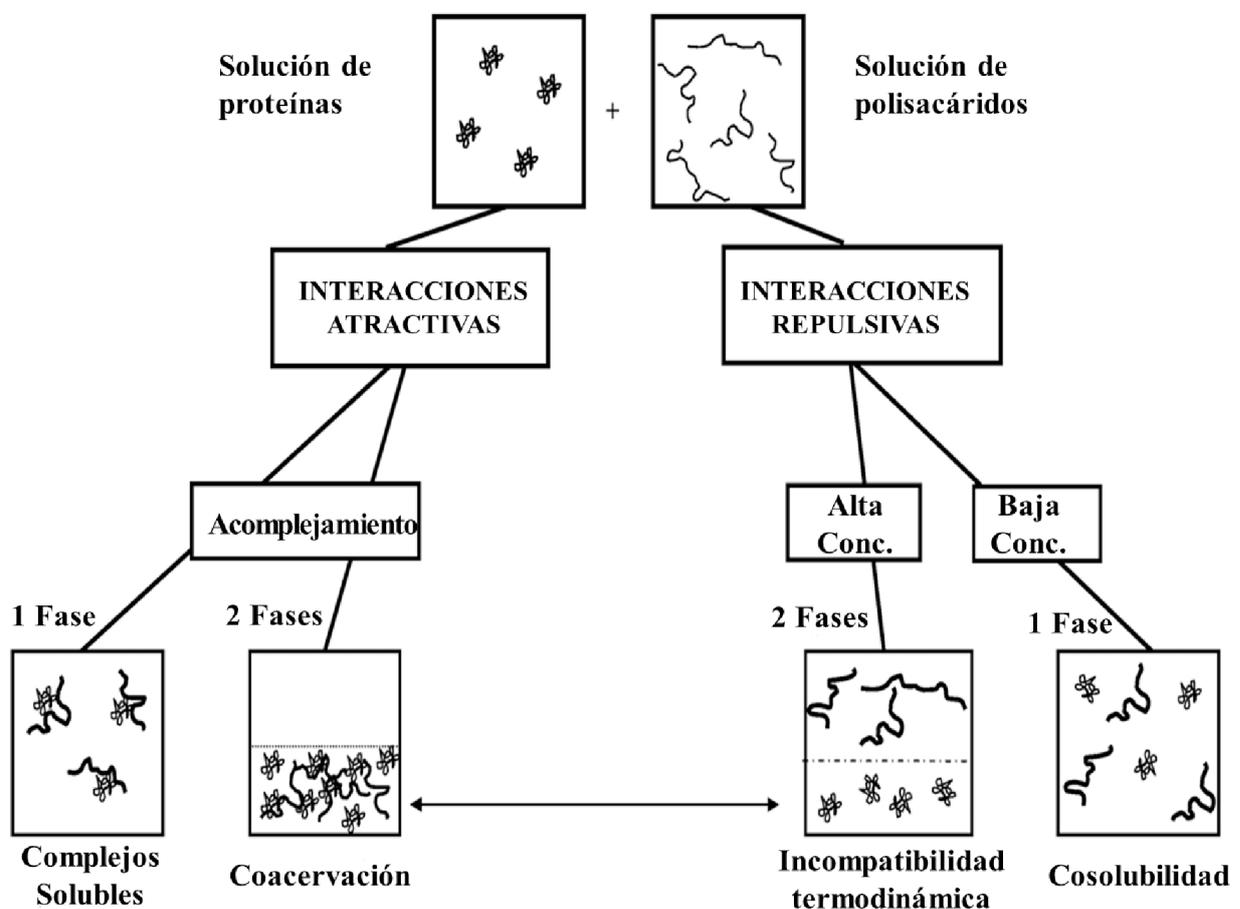


Figura 1.11. Ordenamientos moleculares estructurales que pueden ocurrir en mezclas de proteínas y polisacáridos (Adaptado de McClements, 2006).

Las interacciones entre ambos pueden ser de carácter segregativo (los biopolímeros se repelen mutuamente dando lugar a una incompatibilidad termodinámica) o asociativo (los biopolímeros se atraen entre sí y forman complejos) (Weinbreck, 2004).

Por un lado, si las proteínas y los polisacáridos muestran atracción neta - usualmente mediante interacciones electrostáticas, cuando poseen densidades de carga opuesta - dependiendo de la concentración relativa de los biopolímeros en solución y del pH, podría ocurrir la formación de complejos proteína-polisacárido solubles o una separación de fases asociativa (Fig. 1.11). Este último proceso es llamado coacervación compleja, denominado así por Bungenberg de Jong en 1949. En este caso, la mezcla se separa en dos fases: la fase inferior que contiene los complejos proteína-polisacárido, y la fase superior que contiene principalmente solvente (Weinbreck, 2004).

Por otro lado, en presencia de interacciones repulsivas entre los biopolímeros, por ejemplo en el caso de que presenten grupos con la misma carga eléctrica, pueden tenerse dos comportamientos diferentes. A bajas concentraciones, en soluciones muy diluidas, las proteínas y los polisacáridos pueden permanecer cosolubles, ya que la entropía de mezclado gobierna el sistema y este último presenta una sola fase homogénea. Al incrementar la concentración de los biopolímeros, el sistema puede volverse inestable, dando lugar a una separación de fases segregativa debido a la incompatibilidad termodinámica entre las macromoléculas. Por lo tanto, se produce una repulsión estérica entre los biopolímeros que conduce a una mezcla bifásica compuesta por una fase rica en proteínas y otra rica en polisacáridos.

1.5.1. Estudios de sistemas proteína-polisacárido en fase acuosa

Existen numerosos trabajos disponibles en la bibliografía respecto del estudio de las interacciones proteína-polisacárido en fase acuosa (Weinbreck, 2004; Zaho y col. 2009; Perez

y col., 2009; Beaulieu y col., 2005). A partir de los primeros estudios realizados por Bungenberg de Jong y Kruyt sobre mezclas de gelatina/goma arábica, han sido sometidos a investigación diversos sistemas proteína-polisacárido mediante la utilización de técnicas experimentales cada vez más sofisticadas (electroforesis, dispersión de luz, viscosimetría, turbidimetría, espectrofotometría, centrifugación, entre otras (Schmitt y col., 1998).

En la actualidad, una de las técnicas más ampliamente utilizadas en los campos de la bioquímica y la biofísica molecular es la espectroscopía de fluorescencia. A pesar de que las mediciones de fluorescencia no proveen información estructural detallada, la técnica se ha vuelto muy popular debido a su elevada sensibilidad para detectar los cambios estructurales y las propiedades dinámicas de biomoléculas y de complejos moleculares. En consecuencia, los espectrofluorómetros son utilizados de manera rutinaria para medir fenómenos de acomplejamiento y/o conformacionales de macromoléculas biológicas (Royer, 1995).

Las moléculas capaces de emitir fluorescencia se denominan fluoróforos. Los fluoróforos son moléculas pequeñas que pueden formar parte de una macromolécula (fluoróforos intrínsecos) o que pueden ser añadidas a una molécula (fluoróforos extrínsecos). Sus propiedades fluorescentes dependen del microentorno molecular en que se encuentran (Albani, 2004). Uno de los fluoróforos intrínsecos más estudiados entre las proteínas es el aminoácido Trp, dado que es el que presenta mayor intensidad de fluorescencia. La literatura contiene un importante número de trabajos acerca de la fluorescencia de las proteínas, especialmente vinculada con la presencia de residuos Trp. Todos estos estudios relacionan el origen de la fluorescencia con la estructura terciaria de las proteínas (Albani, 2004). Por esta razón, el análisis de la fluorescencia del Trp se ha convertido en una excelente herramienta para la caracterización molecular de sistemas que incluyen proteínas (Perez y col., 2009).

Además, las interacciones entre proteínas y polisacáridos pueden inducir perturbaciones o modificaciones en los parámetros de fluorescencia del Trp. Estas perturbaciones pueden ser utilizadas para determinar la naturaleza y el origen de las interacciones entre estos biopolímeros (Perez y col., 2009).

Por otro lado, el comportamiento dinámico de interacción de mezclas de proteínas del lactosuero y diversos polisacáridos (goma arábiga, carragenina, EPS B40) ha sido estudiado por Weinbreck (2004) a través de mediciones de turbidez y de DLS (Dynamic Light Scattering). Sin embargo, no se ha reportado en la literatura el estudio de la formación de complejos proteína-polisacárido mediante mediciones de Transmitancia empleando un analizador de estabilidad de sistemas coloidales (Turbiscan). Esta técnica de alta sensibilidad y alta reproducibilidad constituye una herramienta para el estudio de la estabilidad de soluciones, permitiendo el análisis tanto de la variación de tamaño como de la migración de las partículas durante el proceso de coacervación.

1.6. Emulsiones

1.6.1. Emulsiones convencionales

La tecnología de emulsiones es particularmente útil para diseñar sistemas de liberación controlada, ya que pueden producirse mediante operaciones simples (mezclado, homogeneización, sonicación) (McClements y col. 2007).

Las emulsiones son sistemas constituídos por dos líquidos inmiscibles (por lo general, aceite y agua), donde uno se encuentra disperso en forma de gotas (fase dispersa) en el otro (fase continua) (Fig. 1.12). Debido a la inmiscibilidad de los líquidos, una emulsión es un sistema termodinámicamente inestable y la llamada “estabilidad de la emulsión” se puede lograr únicamente de forma cinética.

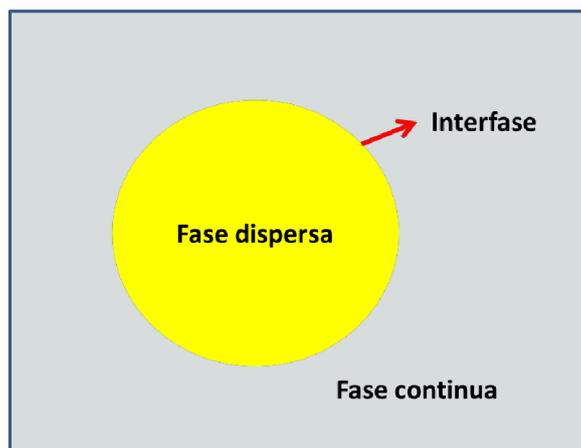


Figura 1.12. Los ingredientes en una emulsión se particionan entre la fase acuosa, oleosa y la región interfacial, de acuerdo a su concentración en el sistema y las interacciones con el medio que los rodea.

Por lo tanto, una emulsión estable es aquella con ningún cambio discernible en la distribución de tamaños de las gotas, en su estado de agregación o en su arreglo espacial dentro del volumen de la muestra, durante el tiempo de observación (Dickinson, 2001).

1.6.2. Formación de una emulsión

El proceso de conversión de dos líquidos inmiscibles en una emulsión se conoce como homogeneización. En la industria alimentaria, este proceso se lleva a cabo generalmente utilizando dispositivos mecánicos conocidos como homogeneizadores, donde los líquidos se someten a una intensa agitación mecánica, e.g., mezcladores de alta velocidad, homogeneizadores de válvulas de alta presión, molinos coloidales, etc.

Es posible formar una emulsión por homogeneización de aceite y agua, pero las dos fases por lo general tienden a separarse rápidamente. Esto es porque las gotas de aceite tienden a fusionarse cuando chocan, lo que finalmente conduce a la completa separación de fases. La fuerza impulsora para este proceso es el hecho de que el contacto entre las moléculas de aceite y agua es termodinámicamente desfavorable. Sin embargo, se pueden

obtener emulsiones que sean cinéticamente estables (metaestables) por un período de tiempo razonable mediante el empleo de emulsionantes (McClements, 1999).

Los emulsionantes son compuestos tensioactivos que se absorben sobre la superficie de las gotas recién formadas durante la homogeneización, formando una película interfacial protectora que impide que las gotas se acerquen. La mayoría de los emulsionantes son moléculas anfifílicas. Los emulsionantes más comunes utilizados en la industria alimentaria son los tensioactivos de bajo peso molecular, como los fosfolípidos, mono y diacilglicéridos, y tensioactivos de alto peso molecular como las proteínas. Las funciones más importantes de los emulsionantes durante el proceso de homogeneización son:

- Disminuir la tensión interfacial entre las fases de aceite y agua, reduciendo así la cantidad de energía necesaria para deformar y romper las gotas.
- Formar una película protectora alrededor de las gotas impidiendo la coalescencia.

Cuanto más baja sea la tensión interfacial, mayor será el grado de ruptura de las gotas durante la agitación mecánica o el flujo turbulento (Dickinson, 2001). Las proteínas son los agentes emulsionantes más comúnmente utilizados en la industria alimentaria (proteínas lácteas, de soja, de huevo), ya que son ingredientes naturales, económicos y están ampliamente disponibles. Las mismas, por su carácter anfifílico, actúan como tensioactivos macromoleculares y tienen la particularidad de adsorberse a la interfase formando una cubierta viscoelástica cuyas propiedades mecánicas influyen en la estabilidad del sistema coloidal.

Las proteínas tienen una morfología estructural compleja y el grado de adsorción a la interfase es afectado por su hidrofobicidad superficial, su carga, su flexibilidad, etc. El cambio que acompaña a la adsorción de la proteína puede ser suficiente para provocar la desnaturalización de la misma, ya que un plegamiento alternativo de la molécula para minimizar la energía libre hidrofóbica es posible. De este modo, cadenas de aminoácidos

anfifílicos se ubican en contacto con la superficie mientras que rulos y colas de aminoácidos hidrofílicos o hidrofóbicos se localizan alejados en cualquiera de las dos fases (Dickinson, 2001).

1.6.3. Procesos de homogeneización

Existen numerosas formas de producir una emulsión a partir de dos fases inmiscibles, pero tal proceso se realiza a través de la aplicación de energía mecánica. En primer lugar, la interfase se deforma de manera tal que se generan gotas. Estas gotas son, en su mayoría, demasiado grandes por lo que las mismas son subsecuentemente rotas hasta obtener partículas de menor tamaño. Por lo tanto, esta etapa de disrupción de las gotas es un paso crítico en el proceso de emulsificación.

El tamaño de las gotas producidas durante la homogeneización depende de un número de factores:

- a) Concentración tensioactivo: Debe haber suficiente emulsionante para cubrir completamente la superficie de las gotas formadas.
- b) Velocidad de difusión: Está relacionada con el tiempo requerido para que el emulsionante difunda desde el seno de la fase continua a la superficie de la gota. A mayor velocidad de difusión podrían obtenerse menores tamaños de gota, dado que la interfase creada se estabilizaría rápidamente.

En muchas operaciones industriales y estudios científicos la formación de una emulsión se realiza en dos pasos (Figura 1.11). Las fases separadas de aceite y agua se convierten en una emulsión gruesa que contiene gotas grandes mediante el empleo de un tipo de homogeneizador (e.g., un mezclador de alta velocidad), y luego el tamaño de las gotas se reduce mediante el uso de otro tipo de homogeneizador (e.g., un homogeneizador de válvula de alta presión).

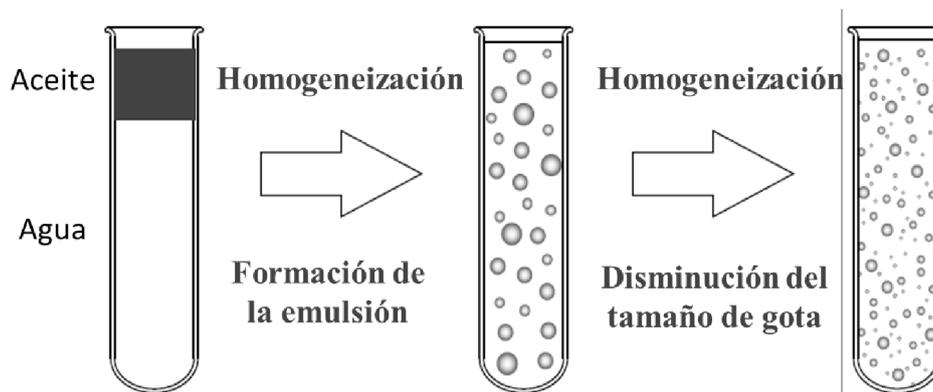


Figura 1.13. Procesos de homogeneización de una emulsión.

(Adaptado de McClements, 1999)

Muchas de las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de emulsiones dependen del tamaño de las gotas que contienen, incluyendo su estabilidad, textura, sabor, y apariencia. Por lo tanto, uno de los principales objetivos de la homogeneización es crear gotas de emulsión que caigan dentro de un intervalo de tamaño óptimo, para obtener un producto con los atributos de calidad deseados (McClements et al., 2007).

Para crear una emulsión es necesario suministrar energía con el fin de desestabilizar y entremezclar las fases de aceite y agua, lo que se consigue normalmente mediante agitación mecánica. Muchos procesos físicos ocurren simultáneamente durante la homogeneización (e.g., mezclado, disrupción y coalescencia de gotas). El tamaño de las gotas producidas por un homogeneizador depende de un equilibrio entre dos procesos físicos opuestos: la disrupción y la coalescencia de las gotas.

- Disrupción de gotas: La naturaleza precisa de los procesos físicos que ocurren durante la formación de la emulsión depende del tipo de homogeneizador utilizado, ya que esto determina el tipo de perfil de flujo de homogeneización. Sin embargo, hay algunos aspectos comunes que se aplican a la mayoría de los homogeneizadores. Las etapas

iniciales de homogeneización implican la ruptura y la mezcla de las fases inmiscibles y la formación de gotas grandes. Las etapas posteriores de homogeneización, implican la generación de gotas más pequeñas a partir de las más grandes. La ruptura de las gotas está determinada por un equilibrio entre las fuerzas interfaciales que tienden a mantener las gotas juntas y las fuerzas perturbadoras disruptivas generadas dentro del homogeneizador que tienden a separarlas.

a) Fuerzas interfaciales: Una gota de emulsión tiende a ser esférica, porque esta forma reduce al mínimo el área de contacto termodinámicamente desfavorable entre las fases de aceite y agua. Cambiar la forma de una gota, o dividirla en una serie de gotas más pequeñas, aumenta la zona de contacto y, por lo tanto, requiere una entrega de energía. La fuerza interfacial responsable de mantener una gota en una forma esférica se caracteriza por la presión de Laplace (ΔP_L), que actúa a través de la interfase aceite-agua hacia el centro de la gota de manera que existe una presión mayor dentro de la gota que en el exterior de ella:

$$\Delta P_L = \frac{4\gamma}{d} \quad (\text{Ec. 1.1})$$

donde γ es la tensión interfacial y d es el diámetro de gota. Esta ecuación indica que para deformar y romper una gota durante la homogeneización es necesario aplicar una fuerza externa que sea significativamente mayor que la fuerza interfacial. Así, la presión requerida para romper una gota aumenta a medida que aumenta la tensión interfacial o a medida que disminuye el tamaño de las gotas.

b) Fuerzas disruptivas: La naturaleza de las fuerzas que actúan sobre una gota durante la homogeneización depende de las condiciones de flujo (laminar o turbulento) y, por lo tanto, del tipo de homogeneizador. Para que una gota se rompa durante la homogeneización, las

fuerzas disruptivas deben exceder a las fuerzas interfaciales y su duración debe ser mayor que el tiempo requerido para la deformación de las gotas. La magnitud relativa de las fuerzas disruptivas e interfaciales es caracterizada por el número de Weber ($We = \text{fuerzas disruptivas} / \text{fuerzas interfaciales}$). Las gotas tienden a ser divididas cuando el número de Weber excede un valor crítico (alrededor de la unidad), que depende de las características físicas de las fases oleosa y acuosa (McClements, 1999).

La facilidad con la que una gota puede ser dividida durante la homogeneización aumenta cuando la tensión interfacial disminuye. Por lo tanto, en la homogeneización debería ser posible producir gotas con tamaños más pequeños en presencia de un emulsionante debido a que este también produce una reducción de la tensión interfacial. Sin embargo, hay una serie de otros factores que también determinan la eficiencia de los emulsionantes en cuanto a la reducción del tamaño de gota (Fig. 1.14). En primer lugar, se debe considerar la velocidad de adsorción de un emulsionante sobre la superficie de las gotas. Inmediatamente luego de la formación, las gotas tienen una baja concentración de emulsionante adsorbido en su superficie y, por lo tanto, son más difíciles de romper a causa de la relativamente alta tensión interfacial. Con el tiempo una mayor cantidad de emulsionante se adsorbe sobre la superficie, lo que disminuye la tensión interfacial y, por lo tanto, facilita la ruptura de las gotas. Por lo tanto, cuanto más rápido el emulsionante se adsorbe sobre la superficie de las gotas durante la homogeneización más pequeñas serán las gotas producidas. En segundo lugar, la capacidad de los emulsionantes para mejorar la reología interfacial (propiedades mecánicas) de las gotas dificulta la ruptura de las mismas, lo que conduce a tamaños de gotas más grandes que las que se espera.

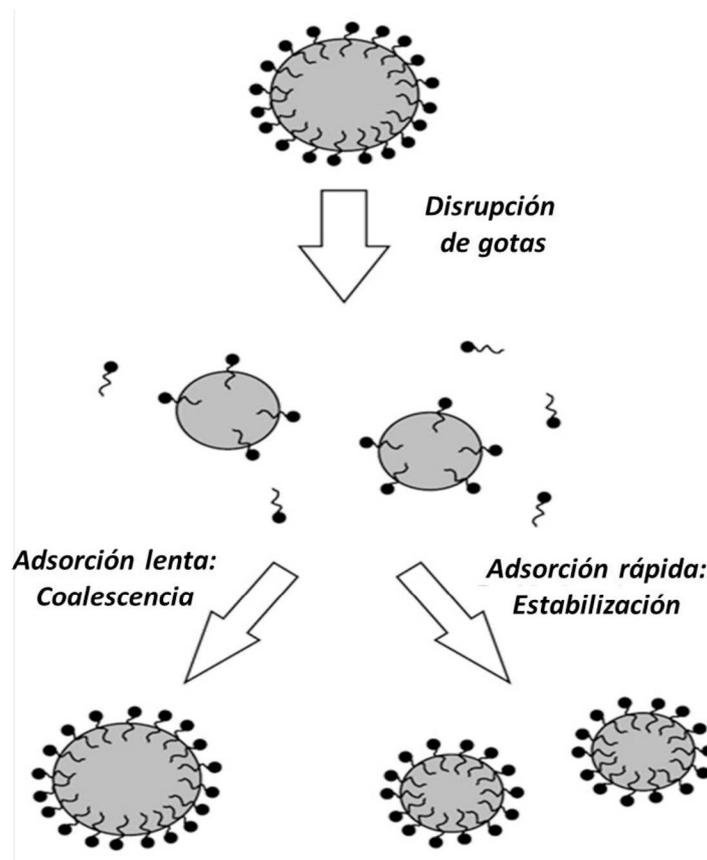


Figura 1.14. El tamaño de las gotas producidas durante el proceso de homogeneización depende del balance entre el tiempo de adsorción del emulsificante y el tiempo característico de las colisiones entre gotas (Adaptado de McClements, 1999).

Coalescencia: Las emulsiones son sistemas altamente dinámicos en los que las gotas se mueven continuamente alrededor y con frecuencia chocan unas con otras, debido al movimiento browniano, la gravedad, o por agitación mecánica. Las colisiones entre gotas son particularmente rápidas durante la homogeneización debido a la intensa agitación mecánica. Si las gotas no están suficientemente protegidas por la película interfacial tienden a unirse durante una colisión. Inmediatamente luego de la disrupción de una gota podría no haber suficiente emulsionante presente como para cubrir completamente la superficie de las gotas recién formadas y, por lo tanto, las nuevas gotas serían más propensas a unirse con sus vecinas durante una colisión. Para evitar la coalescencia es necesario contar con una película de emulsionante suficientemente concentrada alrededor de las gotas. El tamaño de las gotas

producidas durante la homogeneización, depende del tiempo requerido para que el emulsionante se adsorba sobre la superficie de las gotas (τ_{ADS}) respecto del tiempo requerido para que se produzcan colisiones entre las gotas (τ_{COL}). Estos tiempos dependen del perfil de flujo característico del proceso de homogeneización, así como de la naturaleza del emulsionante utilizado. Idealmente, es deseable minimizar la coalescencia de las gotas durante la homogeneización, garantizando que $\tau_{\text{ADS}}/\tau_{\text{COL}} \ll 1$.

1.6.4. Dispositivos de homogeneización

Diferentes tipos de dispositivos de homogeneización se han desarrollados para producir emulsiones en alimentos. Cada uno de estos dispositivos tiene sus propias ventajas y desventajas. La elección de un homogeneizador en particular depende del tipo de emulsión que se quiera realizar, del equipo disponible, del volumen de material que se necesita procesar, del rendimiento deseado, de la naturaleza de las materias primas y de la distribución del tamaño de gotas deseada.

1.6.4.1. Homogeneizadores de alta velocidad

Los homogeneizadores de alta velocidad son los más comúnmente utilizados en la industria de alimentos para mezclar directamente las fases oleosa y acuosa en un proceso batch. El aceite, el agua, y otros ingredientes pueden ser colocados en un recipiente y los componentes son agitados por una hélice que gira a alta velocidad ($\approx 3600 \text{ r.min}^{-1}$).

La rápida rotación del cabezal de mezcla genera una combinación de gradientes de velocidades longitudinales, de rotación y radiales en los líquidos, lo que interrumpe las interfases entre el aceite y el agua, hace que los líquidos se entremezclen y las gotas más grandes se rompan en otras más pequeñas. El proceso generalmente conduce a un aumento en la temperatura, porque parte de la energía mecánica se convierte en calor debido a la

disipación viscosa. Los mezcladores de alta velocidad son particularmente útiles para la preparación de emulsiones con viscosidades bajas o intermedias.

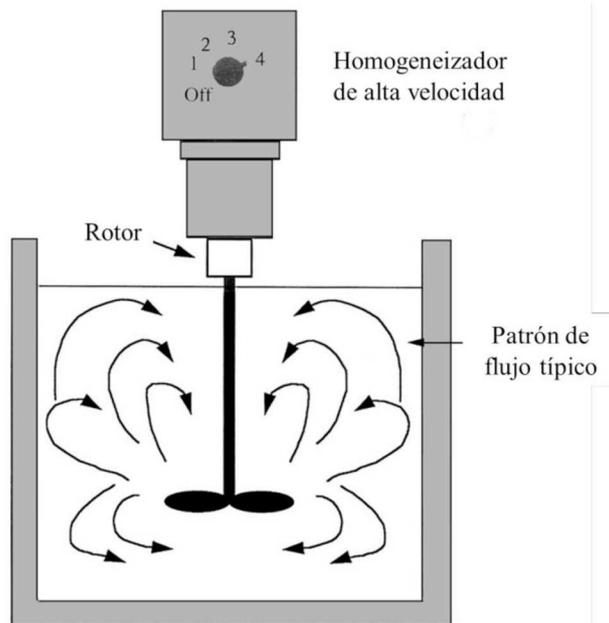


Figura 1.15. Representación esquemática de un homogeneizador de alta velocidad.

El tamaño de gota generalmente disminuye a medida que el tiempo de homogeneización o la velocidad de rotación del cabezal de mezcla se incrementa, hasta que se alcanza un límite inferior que depende de la naturaleza y la concentración de los ingredientes utilizados y la densidad de potencia del homogeneizador. Típicamente, las gotas producidas están en el rango de tamaño entre 2-10 μm de diámetro. Los homogeneizadores industriales se diseñan para evitar la incorporación excesiva de burbujas de aire durante el proceso, ya que esto puede tener un efecto adverso sobre las propiedades de muchos productos.

1.6.4.2. Homogeneizadores de válvula de alta presión

Los homogeneizadores de válvula de alta presión son probablemente los más comunes en la producción de emulsiones finas en la industria alimentaria. Son más eficientes en la

reducción del tamaño de las gotas a partir una emulsión pre-existente, que en la creación de una emulsión directamente a partir de dos líquidos inmiscibles. Una emulsión gruesa se produce por lo general utilizando un homogeneizador de alta velocidad y después se alimenta directamente a la entrada de la válvula de homogeneizador de alta presión.

El homogeneizador (Fig. 1.16) tiene una bomba que impulsa la emulsión hacia una cámara y allí fuerza su avance a través de una válvula estrecha en el extremo de la cámara. A medida que la emulsión gruesa pasa por la válvula experimenta una combinación de fuerzas disruptivas causando que las gotas más grandes se rompan en más pequeñas. La mayoría de los homogeneizadores comerciales utilizan válvulas estándar de resorte de modo que el hueco a través del cual pasa la emulsión se pueda variar (típicamente entre 15-300 μm).

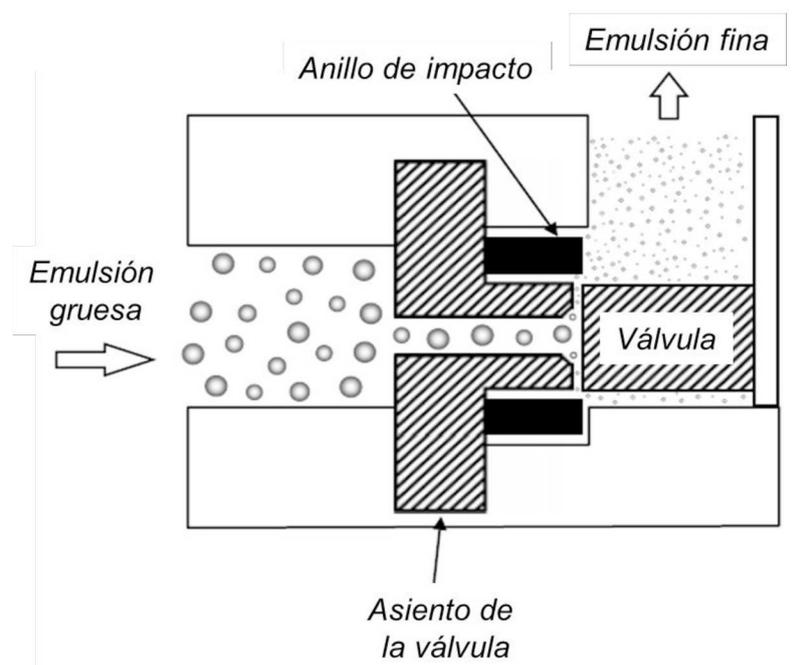


Figura 1.16. Esquematización de un homogeneizador de válvula de alta presión (Adaptado de McClements, 1999).

Disminuir el tamaño de brecha aumenta la caída de presión a través de la válvula, lo que provoca un mayor grado de reducción de la gota. Por otro lado, la disminución de la

medida de la ranura aumenta el consumo de energía requerido para formar una emulsión, lo que aumenta los costos de fabricación. Los caudales de homogeneizadores industriales varían típicamente entre 100-20.000 l.h⁻¹, mientras que las presiones de homogeneización varían entre 3-20 MPa.

Si las fases de aceite y agua se han mezclado antes de la homogeneización, a menudo es posible crear una emulsión con partículas submicrónicas en un único paso. Si se requieren gotas de emulsión muy finas, por lo general, es necesario pasar la emulsión a través del homogeneizador varias veces. Mediante este método, pueden producirse gotas de emulsión con diámetros menores a 1 µm, siempre que haya suficiente emulsionante presente para cubrir completamente la interfase aceite-agua formada y que el emulsionante se adsorba con suficiente rapidez para evitar la coalescencia de las gotas. El aumento de la temperatura en un homogeneizador a válvula de alta presión suele ser bastante pequeño, pero puede llegar a ser apreciable si la emulsión se recircula o si se utilizan presiones demasiado altas (McClements, 1999).

1.6.4.3. Homogeneizadores ultrasónicos

Los homogeneizadores ultrasónicos (sonicadores) utilizan ondas ultrasónicas de alta intensidad que generan gradientes de corte y presiones intensas dentro de un material lo que genera y reduce las gotas debido a efectos de cavitación y turbulencia. Los principales factores que determinan la eficiencia de homogeneizadores ultrasónicos son la intensidad, duración y la frecuencia de ondas ultrasónicas. En principio, las emulsiones pueden formarse utilizando ondas ultrasónicas con frecuencias tan altas como 5 MHz, pero la eficiencia de homogeneización disminuye con el aumento de la frecuencia. Por estas razones, la mayoría de los dispositivos comerciales utilizan ondas ultrasónicas con frecuencias entre 20-50 kHz. El tamaño de las gotas producido durante la homogeneización se puede disminuir, ya sea

aumentando la intensidad de la radiación ultrasónica o la longitud de tiempo de homogeneización. La Fig 1.17 presenta un esquema de un procesador ultrasónico comúnmente utilizado en laboratorios. Ellos son ideales para la preparación de pequeños volúmenes de emulsión (hasta 250 mL). El dispositivo consiste en un cristal piezoeléctrico contenido dentro de una carcasa metálica de protección, que por lo general, tiene forma cónica en el extremo. Una onda eléctrica de alta intensidad se aplica al transductor, lo que hace que el cristal piezoeléctrico en su interior oscile rápidamente y genere una onda ultrasónica.

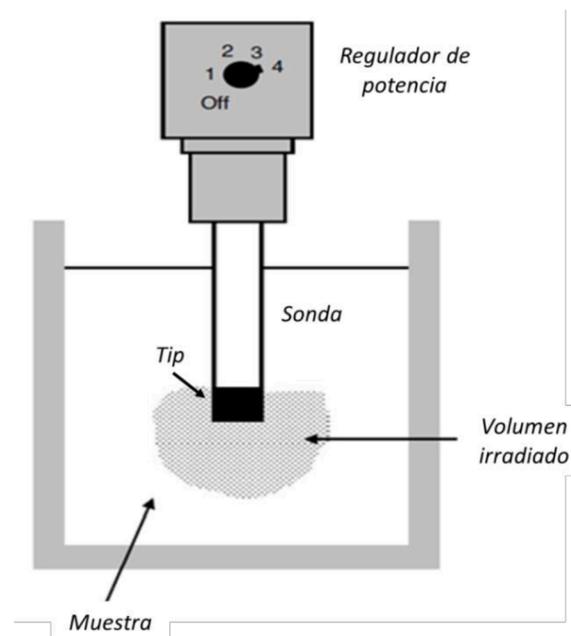


Figura 1.17. Esquemización de un procesador ultrasónico

La onda ultrasónica se dirige hacia la punta del transductor donde se irradia en los líquidos circundantes y genera una presión intensa y gradientes de corte (debido principalmente a los efectos de cavitación) haciendo que los líquidos se dividan en fragmentos más pequeños y entremezclen unos con otros. Para crear una emulsión estable es necesario irradiar una muestra con ultrasonido durante segundos o minutos.

En la bibliografía ha sido ampliamente estudiado el efecto de diferentes técnicas de emulsificación sobre la estabilidad de emulsiones, mediante la determinación de los tamaños de gota (Jafari y col., 2007; Kuhn & Cunha, 2012). Estos estudios se realizaron teniendo en cuenta que la obtención de una emulsión estable es un prerequisite para lograr una microencapsulación efectiva del compuesto bioactivo de interés (McClements, 2007).

1.6.5. Emulsiones multicapa

Existen ciertas limitaciones con respecto a las propiedades funcionales que pueden conseguirse mediante la aplicación de los métodos convencionales para crear emulsiones, dado que estas últimas, aún presentan estabilidad limitada frente a cambios de pH, concentración de sales, calentamiento, deshidratación, congelamiento, etc. Estas limitaciones han llevado a los científicos a centrar su investigación en la creación de métodos alternativos para mejorar la estabilidad de las emulsiones convencionales, a través del desarrollo de estrategias de emulsificación innovadoras.

Una de esas estrategias consiste en la obtención de emulsiones multicapa, donde distintos tipos biopolímeros se ubican alrededor de la interfase formando múltiples membranas alrededor de la gota de aceite, mediante una técnica conocida como “deposición electrostática capa sobre capa” (Fig. 1.18).

Las emulsiones multicapa aceite en agua (O/W) consisten en pequeñas gotas de aceite dispersas en un medio acuoso, recubiertas por una película interfacial formada por polímeros de carga opuesta, acomplejados mediante interacciones electrostáticas (McClements y col. 2007; Sagalowicz & Leser, 2010; Guzey & McClements, 2006). Esto se logra formando, en primer lugar, una emulsión primaria, donde el agente emulsificante (que debe ser un electrolito) se adsorba rápidamente a las gotas de aceite que se forman durante el proceso de homogeneización.

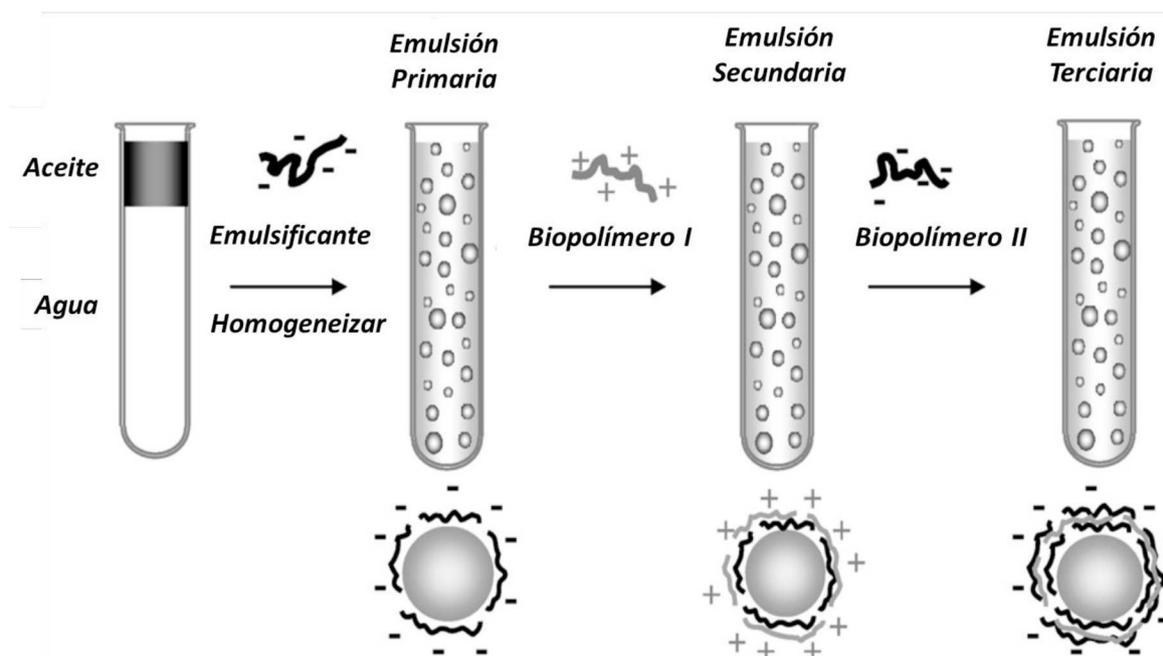


Figura 1.18. Utilización de la técnica “capa sobre capa” para la formación de emulsiones aceite en agua (Adaptado de McClements, 2007).

En segundo lugar, se añade un segundo polielectrolito (de carga opuesta) para que se adsorba a la superficie de las gotas cubiertas con el agente emulsificante, de manera de obtener una emulsión secundaria, con una bicapa biopolimérica formada alrededor de las gotas de aceite (Guzey & McClements, 2006). Este procedimiento puede repetirse para formar tres o más capas alrededor de las gotas de emulsión. Bajo ciertas circunstancias, se ha encontrado que las emulsiones multicapa suelen tener una mayor estabilidad frente a condiciones de estrés que las emulsiones aceite en agua monocapa convencionales.

Es por ello que este tipo de sistema constituiría una novedosa estrategia para diseñar un sistema de liberación controlada. Las emulsiones multicapa presentan, además, una ventaja adicional: permiten que las propiedades del film interfacial puedan ser diseñadas (composición, estructura, densidad de carga, espesor, permeabilidad, reología) (Decher & Schlenoff, 2003) a través de un cuidadoso control de la composición del sistema y de las condiciones de producción de estas emulsiones (tipo de homogeneizador, concentración de

emulsionante, tipo y concentración de polielectrolito, pH, fuerza iónica, orden de agregado de los ingredientes y condiciones de mezclado) (Guzey y col., 2004, 2006).

De esta manera, manipulando el espesor y la densidad de carga de la membrana interfacial, podría mejorarse la estabilidad de los PUFAs frente al deterioro oxidativo (McClements y col., 2007).

El control de las características de las emulsiones (concentración de gotas, distribución de tamaños, potencial zeta y propiedades interfaciales) podría permitir diseñar sistemas de liberación con performances funcionales específicas para diferentes tipos de compuestos lipofílicos y matrices alimenticias (McClements & Decker, 2000).

Como se mencionó anteriormente, el hecho de que estos sistemas deban ser comestibles, pone algunas limitaciones respecto al tipo de ingredientes y operaciones que se pueden utilizar durante los procesos para crear estas estructuras.

1.6.6. Estabilidad de emulsiones

El término "estabilidad" se refiere a la capacidad de una emulsión de resistir cambios en sus propiedades con el tiempo. Tal y como se mencionó anteriormente, una emulsión se considera estable cuando no presenta cambios discernibles en la distribución de tamaños de las gotas o en su estado de agregación durante el tiempo de observación (Dickinson, 2001).

Existe una serie de mecanismos a través de los cuales se produce el proceso de desestabilización de las emulsiones: cremado, sedimentación, floculación, coalescencia, maduración de Ostwald e inversión de fases (Fig. 1.19). La caracterización y el control de estos mecanismos son claves a la hora de lograr la estabilidad de las emulsiones en los procesos tecnológicos.

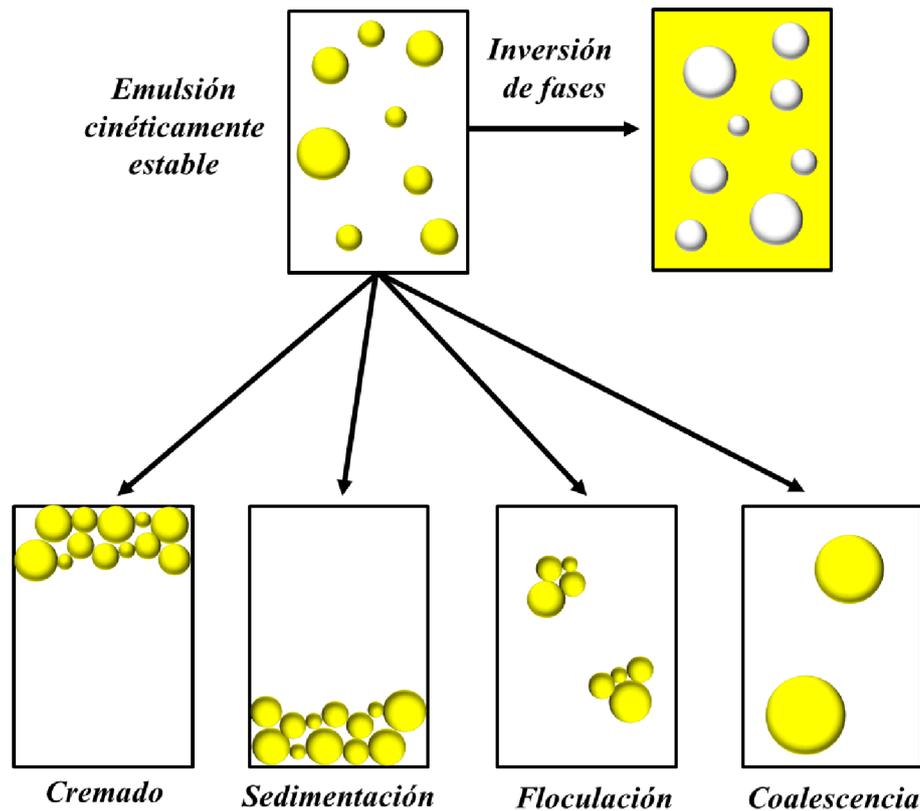


Figura 1.19. Mecanismos de destabilización de una emulsión.

A continuación se describirán brevemente los fenómenos de destabilización más relevantes en lo que respecta a producción de emulsiones multicapa para la microencapsulación del aceite de lino.

1.6.6.1. Cremado

En general, las gotas en una emulsión tienen una densidad diferente a la del líquido que los rodea, por lo que existe una fuerza neta gravitacional que actúa sobre ellas (Figura 1.20). Si las gotas tienen una densidad menor que la fase continua se moverán hacia arriba, lo que se conoce como cremado; por el contrario si tienen una densidad más alta se moverán hacia abajo, lo que se conoce como sedimentación.

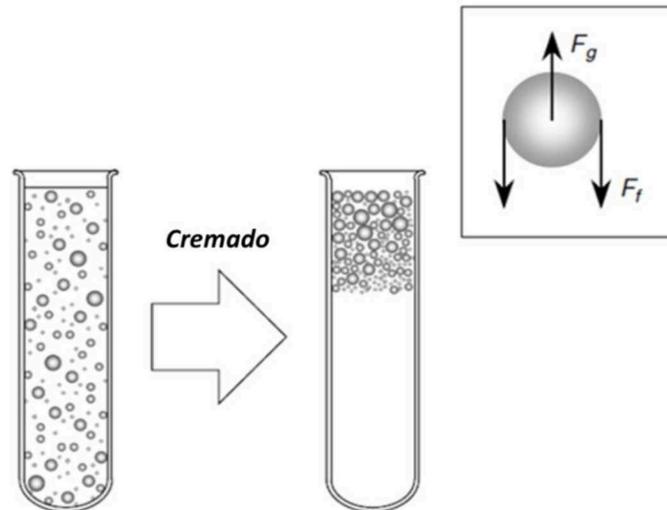


Figura 1.20. Desestabilización de una emulsión por cremado.

(Adaptado de McClements, 1999)

La velocidad a la que las gotas esféricas (aisladas rígidas) creman en un líquido ideal se determina por un equilibrio de fuerzas que actúa sobre ellas (Fig. 1.18). Cuando la partícula tiene una densidad menor que el líquido de la fase continua existe una fuerza gravitacional ascendente que actúa sobre ella:

$$F_g = -\frac{4}{3}\pi r^3(\rho_2 - \rho_1)g \quad (\text{Ec. 1.2})$$

donde r es el radio de la partícula, g es la aceleración debida a la gravedad, ρ es la densidad, y los subíndices 1 y 2 se refieren a las fases continua y dispersa, respectivamente. A medida que la partícula se mueve hacia arriba experimenta una fuerza de fricción hidrodinámica que actúa en dirección opuesta y, por lo tanto, retarda su movimiento:

$$F_f = 6\pi\eta_1rv \quad (\text{Ec. 1.3})$$

donde v es la velocidad de cremado y η es la viscosidad de la fase continua. La partícula alcanza rápidamente una velocidad constante, donde la fuerza hacia arriba debida a la gravedad equilibra la fuerza hacia abajo debido a la fricción ($F_g = F_f$). Combinando estas ecuaciones se obtiene la ecuación de ley de Stokes para la velocidad de cremado que

experimenta una partícula esférica aislada en una fase continua:

$$v_{\text{Stokes}} = - \frac{2gr^2(\rho_2 - \rho_1)}{9\eta_1} \quad (\text{Ec. 1.4})$$

El signo de v_{Stokes} determina si la gota se mueve hacia arriba o hacia abajo. Por lo general, una emulsión en la que la velocidad de cremado es inferior a 1 mm por día puede ser considerada estable frente al cremado.

En las etapas iniciales del cremado, las gotas se mueven hacia arriba y una capa pobre en gotas se observa en la parte inferior del recipiente (Fig. 1.21). Cuando las gotas alcanzan la parte superior se compactan formando la crema cuyo espesor depende fundamentalmente de la concentración inicial, el tamaño y la polidispersidad de las gotas.

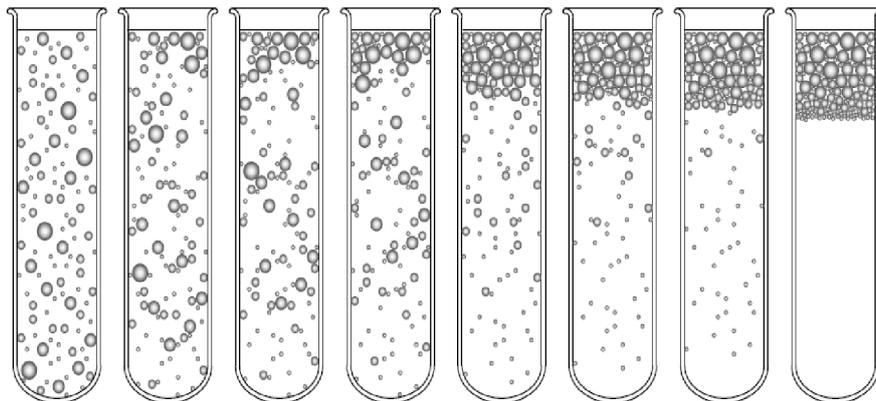


Figura 1.21. Proceso de cremado en función del tiempo de una emulsión O/W
(Adaptado de McClements).

Para reducir el cremado, la estrategia más simple es reducir la diferencia entre la fase continua y la fase dispersa. Esto puede lograrse ya sea eligiendo un sistema con densidades similares o bien, agregando agentes espesantes apropiados a alguna de las fases. La segunda mejor estrategia es reducir el tamaño de gota. Para una gota aislada en un medio muy diluido, la ley de Stokes establece que la velocidad de cremado se incrementa con el cuadrado del

diámetro. Además, a medida que el tamaño de las gotas se reduce, la velocidad de autodifusión se incrementa, hasta un punto tal que las gotas muy pequeñas pueden mantenerse sin cremar por mezclado difusional aunque haya una gran diferencia de densidad entre las dos fases (Robins & Hibberd, 1998, Santiago y col., 2002).

Cuando ninguna de las dos estrategias anteriores se puede aplicar, otra posibilidad es incrementar la viscosidad de la fase continua mediante la adición de algún polímero. Sin embargo, estos polímeros también podrían reducir la estabilidad del sistema ya que podrían promover el fenómeno de floculación por depleción, lo cual conduciría a un cremado más rápido.

1.6.6.2. Floculación

La floculación es un proceso reversible mediante el cual dos o más gotas se asocian entre sí manteniendo su integridad individual. El arreglo espacial de las gotas en agregados aislados o en estructuras similares a un gel sin interrupción de la capa estabilizadora de emulsionante en la interfase aceite-agua es una característica del estado floculado. La floculación acelera el cremado en emulsiones diluidas por lo que es generalmente indeseable debido a que reduce su vida útil. También puede provocar un aumento de la viscosidad de la emulsión, y puede incluso conducir a la formación de un gel (Fig. 1.22).

El proceso de floculación puede producirse por varios mecanismos. Uno de ellos es el fenómeno denominado “floculación por depleción”, que tiene lugar cuando en la fase continua existe una elevada concentración de biopolímeros no adsorbidos a la interfase aceite-agua. Bajo estas condiciones, existe una zona alrededor de las gotas de emulsión en la cual la concentración del polímero libre difiere de la concentración del mismo en el resto de la solución. Esto conlleva a la exclusión estérica de la macromolécula desde el espacio intersticial entre dos gotas hacia el seno de la solución, generándose un potencial atractivo

que produce la agregación de las gotas en forma de flóculos (Fig. 1.22).

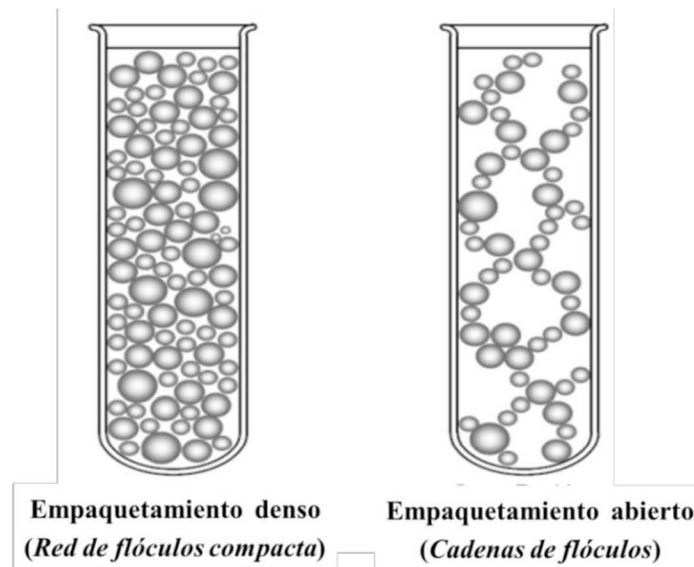


Figura 1.22. Representación esquemática del fenómeno de floculación en una emulsión (Adaptado de McClements, 1999).

Otro de los mecanismos es denominado “floculación por puentes”, y ocurre cuando la cantidad de proteína es insuficiente para cubrir el área interfacial creada. En este sentido, pueden producirse colisiones entre las gotas de modo tal que un área con proteína adsorbida encuentre un área libre de polímero en una segunda gota. Bajo estas circunstancias, la molécula de proteína ya adsorbida en una gota puede adsorberse en otra gota creando un puente entre ambas. La elasticidad del mismo mantiene las gotas a una corta distancia, es decir, floculadas (Dickinson, 1998, 2010).

1.6.6.3. Coalescencia

La coalescencia es un proceso irreversible mediante el cual dos o más gotas de líquido se fusionan para formar una única gota más grande (Fig. 1.23). Es el principal mecanismo por el cual una emulsión se mueve hacia su estado termodinámicamente más estable ya que

implica una disminución en el área de contacto entre las fases de aceite y agua. La coalescencia provoca que las gotas crezcan más rápidamente debido al aumento en su tamaño.

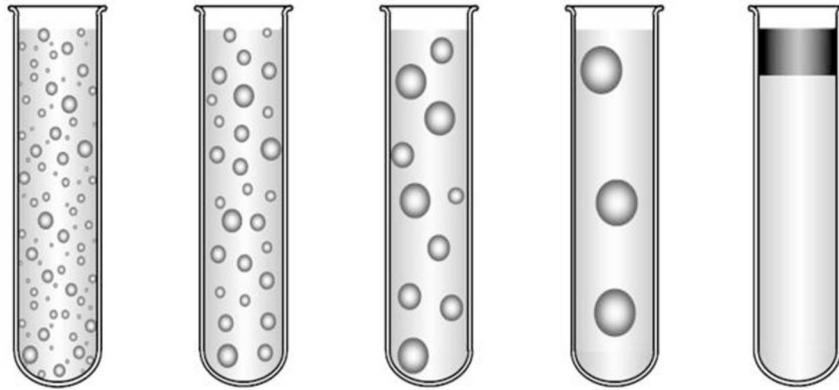


Figura 1.23. Mecanismo de desestabilización de una emulsión por coalescencia
(Adaptado de McClements, 1999).

La coalescencia es el resultado de que el líquido dentro de dos o más gotas entre en contacto. Este proceso sólo puede ocurrir cuando las gotas están muy cerca y la película interfacial delgada que los separa se rompe. El hecho de que las gotas estén en estrecho contacto significa que la coalescencia es mucho más dependiente de las fuerzas de corto alcance. La velocidad a la que procede de coalescencia y el mecanismo físico por el que se produce son altamente dependientes de la naturaleza del emulsionante utilizado para estabilizar el sistema.

En general, la susceptibilidad de las gotas a la coalescencia se determina por el mecanismo físico responsable de las colisiones entre gotas (movimiento browniano, turbulencia y gravedad), la naturaleza de las fuerzas que actúan sobre y entre las gotas y la resistencia de la película interfacial a la ruptura.

La velocidad a la que se produce la coalescencia es fuertemente dependiente de las

interacciones coloidales entre las gotas, así como también de las propiedades fisicoquímicas de las películas interfaciales que rodean a las mismas. Como consecuencia, las estrategias más adecuadas para el control de la coalescencia son altamente dependientes del tipo de emulsionante usado para estabilizar el sistema y de las condiciones ambientales. Estas estrategias pueden dividirse convenientemente en dos categorías: las que evitan el contacto de la gota y las que impiden la ruptura de las películas interfaciales que rodean las gotas.

- Prevención del contacto entre gotas: La velocidad de coalescencia se puede disminuir mediante la reducción del tiempo de contacto entre gotas. Este tiempo se puede reducir por diferentes maneras, incluyendo: (i) la disminución de la frecuencia de colisión y (ii) evitar la floculación, el cremado y el empaquetamiento de las gotas. La estabilidad frente a la coalescencia se puede mejorar asegurando que haya una interacción repulsiva suficientemente grande para evitar que las gotas entren en estrecho contacto (variando el tipo emulsionante, pH, fuerza iónica).
- Prevención de la ruptura de las películas interfaciales: La ruptura de la película interfacial depende de los cambios en su forma causados por la energía térmica o por fuerzas mecánicas aplicadas. La magnitud de estos cambios se rige por la tensión y reología interfacial. Cuanto menor es la elasticidad de la interfase más probable será formar un hueco que conduce a la ruptura de la película. Por otro lado, se esperaría que las gotas con películas más gruesas sean más estables a la coalescencia.

Cabe destacar que las proteínas son extremadamente eficaces en proporcionar protección contra la coalescencia. La razón principal es que las proteínas adsorbidas son capaces de producir emulsiones con tamaños pequeños de gotas y proporcionan fuertes fuerzas de repulsión entre las mismas (debido a una combinación de interacciones electrostáticas y estéricas), la tensión interfacial de sus películas es relativamente alta y además, forman películas altamente resistentes a la ruptura.

1.6.6.4. Consideraciones teóricas

El comportamiento global de una emulsión frente a la estabilidad podría ser discutido en términos de los potenciales de interacción atractivos y repulsivos que existen entre dos gotas próximas entre sí. Los modelos teóricos muchas veces realizan numerosas suposiciones para simplificar el tratamiento matemático y arribar a ecuaciones más sencillas que puedan describir el comportamiento de sistemas ideales. A pesar de que estas suposiciones no siempre se cumplen en los sistemas reales, el análisis de los diversos tipos de interacciones que actúan sobre las gotas de emulsión constituye una herramienta muy útil para comprender e interpretar los efectos producidos por distintos factores en muchas matrices alimentarias (McClements, 1999).

Si consideramos un sistema de dos gotas de emulsión esféricas de radio r , separadas entre sí por una distancia h , el potencial total de interacción (U_{TOTAL}) entre ellas va a ser la resultante de las contribuciones individuales de los distintos potenciales de interacción atractivos ($U_{\text{atractivo}}$) y repulsivos ($U_{\text{repulsivo}}$):

$$U_{\text{TOTAL}}(h) = U_{\text{atractivo}}(h) + U_{\text{repulsivo}}(h) \quad (\text{Ec. 1.4})$$

A continuación se describirán brevemente los potenciales de interacción más relevantes, para luego poder discutir el comportamiento de nuestros sistemas en base a las expresiones teóricas.

a) Potencial de Van der Waals

El potencial de interacción de Van der Waals (U_{WDV}) entre dos gotas de emulsión esféricas de igual radio r , separadas por una distancia h está dado por la siguiente expresión:

$$U_{VDW}(h) = \frac{-A}{6} \left[\frac{2r^2}{h^2 + 4rh} + \frac{2r^2}{h^2 + 4rh + 4r^2} + \ln \frac{h^2 + 4rh}{h^2 + 4rh + 4r^2} \right] \quad (\text{Ec. 1.5})$$

donde A es la constante de Hamaker (McClements, 1999). Si se considera que las gotas están separadas por distancias cortas ($h \ll r$), entonces la ecuación anterior se simplifica:

$$U_{VDW}(h) = \frac{-A}{12h} \quad (\text{Ec. 1.6})$$

El potencial de interacción de Van der Waals es siempre atractivo y promueve la agregación de las gotas de emulsión.

b) Potencial electrostático

El potencial de interacción electrostático está dado por:

$$U_{ELECT}(h) = 2\pi\epsilon_0\epsilon_R\Gamma\psi_z^2 \ln(1+\exp[-\kappa h]) \quad (\text{Ec. 1.7})$$

donde ϵ_0 es la constante dieléctrica del vacío, ϵ_R es la constante dieléctrica relativa de la solución que rodea las gotas, ψ_z es el potencial eléctrico en el plano de corte (conocido como potencial zeta), y κ es la inversa de la longitud de la doble capa eléctrica (Radford, & Dickinson, 2004). Este último parámetro está dado por:

$$\kappa^{-1} = \left[\frac{\epsilon k T (1 - \phi_{oil})}{2e^2 I N_A} \right]^{1/2} \quad (\text{Ec. 1.8})$$

donde k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, ϕ_{oil} es la fracción volumétrica de aceite, e es la carga de un electrón, I es la fuerza iónica y N_A es el número de Avogadro .

Las interacciones electrostáticas son repulsivas si las gotas poseen cargas similares y decrecen a medida que las gotas se alejan. A distancias cortas el potencial de atracción de Van der Waals es mucho más fuerte que el potencial de repulsión electrostática por lo que, en estas condiciones, prevalece el acercamiento de las gotas (McClements, 1999).

c) Potencial estérico

Las interacciones poliméricas estéricas surgen cuando las gotas de emulsión se acercan a una distancia tal que las capas interfaciales comienzan a solaparse.

Este tipo de interacción está dada por dos tipos de contribuciones:

$$U_{\text{STERIC}}(h) = U_{\text{mix}}(h) + U_{\text{elastic}}(h) \quad (\text{Ec. 1.9})$$

La contribución de mezcla (U_{mix}) está relacionada con la interpenetración de las colas de las macromoléculas poliméricas adsorbidas a la interfase, producto del acercamiento de las gotas, pero sin que tenga lugar la compresión de la película interfacial. McClements (1999) propone la siguiente ecuación para describir este potencial de interacción:

$$U_{\text{mix}}(h) = 4 \pi r k T m^2 N_A \frac{v_P^2}{V_S} \left(\frac{1}{2} - \chi \right) \left(1 - \frac{1}{2} \frac{h}{\delta} \right)^2 \quad (\text{Ec. 1.10})$$

donde m es la masa de las cadenas poliméricas por unidad de área, δ es el espesor de la capa interfacial, χ es el parámetro de Flory-Huggins, v_P es el volumen parcial específico de las cadenas poliméricas y V_S es el volumen molar del solvente. En un buen solvente ($\chi < 0.5$), como en el caso del agua, el incremento de la concentración de las cadenas poliméricas en la zona de interpenetración es termodinámicamente desfavorable ya que reduce el número de

interacciones polímero-solvente, y conduce a una interacción repulsiva entre las gotas de emulsión.

La contribución elástica (U_{elastic}) considera exclusivamente la compresión de la capa interfacial que existe cuando se acercan dos gotas, sin que haya interpenetración de cadenas poliméricas. Jackel (1964) propuso un modelo empírico para evaluar este tipo de interacción:

$$U_{\text{elastic}}(h) = 0.77E \left(\frac{1}{2} \delta - \frac{1}{2} h \right)^{5/2} (r + \delta) \quad h < \delta \quad (\text{Ec. 1.11})$$

$$U_{\text{elastic}}(h) = 0 \quad h \geq \delta \quad (\text{Ec. 1.12})$$

donde E representa el módulo elástico de la capa adsorbida a la interfase. La compresión de la película interfacial implica una disminución en la entropía configuracional de las moléculas adsorbidas a la interfase. Este fenómeno es energéticamente desfavorable, por lo que este tipo de interacción es siempre repulsiva.

Cabe destacar que a distancias cortas entre las gotas, el potencial de repulsión estérico es de mayor magnitud que el potencial de atracción de Van der Waals.

d) Potencial de depleción

El potencial de depleción surge en sistemas donde las gotas de emulsión están rodeadas por moléculas coloidales no adsorbidas a la interfase, que permanecen en la fase continua. Cuando dos gotas se aproximan a una distancia equivalente al radio hidrodinámico de la partícula coloidal, se genera una región de exclusión entre las gotas. La concentración del hidrocoloide en esta zona de exclusión tiende a cero, mientras que en la fase continua tiene un valor finito. Esto genera una diferencia de presión osmótica que impulsa el solvente desde la región de exclusión hacia el seno de la fase continua, conduciendo a la agregación de las gotas de emulsión (McClements, 1999). Este potencial está dado por:

$$U_{\text{DEP}}(h) = -\frac{2}{3}\pi r^3 P_{\text{OSM}} \left[2 \left(1 + \frac{r_c}{r}\right)^3 + \left(1 + \frac{h}{2r}\right)^3 - 3 \left(1 + \frac{r_c}{r}\right)^2 \left(1 + \frac{h}{2r}\right) \right] \quad (\text{Ec. 1.13})$$

donde P_{OSM} es la presión osmótica que surge de la exclusión de las partículas coloidales y r_c es el radio hidrodinámico de la partícula coloidal. La diferencia de presión osmótica está dada por:

$$P_{\text{OSM}} = \frac{CRT}{M} \left(1 + \frac{N_A C v}{2M} \right) \quad (\text{Ec. 1.14})$$

donde C , M y v son la concentración, la masa molar y el volumen de las partículas coloidales, respectivamente y R es la constante de los gases.

Como puede verse, este potencial de interacción es siempre atractivo y aumenta con el incremento de la concentración de las partículas coloidales en la fase continua.

e) Potencial de interacción total

El potencial total de interacción entre dos gotas de emulsión asumido para nuestros sistemas en estudio está dado por:

$$U_{\text{TOTAL}}(h) = U_{\text{VDW}}(h) + U_{\text{ELECT}}(h) + U_{\text{STERIC}}(h) + U_{\text{DEP}}(h) \quad (\text{Ec. 1.15})$$

1.7. Secado

Para la obtención de microcápsulas en polvo, las emulsiones multicapa que contienen el componente bioactivo deben deshidratarse mediante un proceso de secado, de manera de evaporar el contenido de agua de la fase continua. Las alternativas más utilizadas para las

operaciones de secado en la industria de alimentos son el secado por aspersión y el secado por liofilización. A continuación se describen brevemente estas dos técnicas.

1.7.1. Secado por aspersión

En un secadero por aspersión, un líquido o una suspensión se atomiza en una corriente de aire caliente para obtener una lluvia de finas gotas.



Figura 1.24. Esquema de un secadero por aspersión (o secadero spray).

El agua se evapora de dichas gotas con rapidez y se obtienen partículas secas de sólido que se separan de la corriente de aire, con el mismo tamaño y forma que las gotas atomizadas. El flujo de aire y de líquido de la cámara de aspersión puede ser a contracorriente, en paralelo, o una combinación de ambos.

Las gotas se forman al introducir el líquido en toberas de atomización o discos giratorios de rociado de alta velocidad en el interior de una cámara cilíndrica. Es necesario asegurarse de que las gotas o partículas húmedas del sólido no choquen ni se adhieran a las

superficies sólidas antes de que hayan secado. Por consiguiente, se emplean cámaras bastante grandes. Los sólidos secos salen por el fondo de la cámara a través de un transportador de tornillo. Los gases de escape fluyen hacia un separador de ciclón para filtrar las partículas muy finas. Las partículas que se obtienen son muy ligeras y bastante porosas (Geankoplis, 1998).

El proceso de secado spray ha sido desarrollado en conexión con la producción de leche en polvo y actualmente es muy utilizado por la industria alimentaria para la obtención de ingredientes sólidos (Gharsallaoui y col., 2007).

1.7.2. Liofilización

Algunos productos alimenticios que no deben calentarse, ni siquiera a temperaturas moderadas para un secado común, se secan por liofilización. Por lo general, la sustancia que va a secarse se congela exponiéndola a aire muy frío. En la liofilización por congelación, el agua se elimina como vapor por sublimación del material congelado en una cámara al vacío. Después de que la humedad se sublima como vapor, éste se extrae con bombas de vacío mecánicas o eyectores de chorro de vapor (Dalglish, 1990).

La liofilización da lugar a productos alimenticios de mayor calidad que con cualquier método de secado, dado que tiene la ventaja de que las temperaturas bajas que se emplean reducen al mínimo las reacciones de degradación que casi siempre ocurren en los procesos comunes de secado. Sin embargo, el secado por congelación es una forma de deshidratación bastante costosa, debido a la velocidad lenta de secado y a la necesidad de usar vacío. Puesto que la presión de vapor del hielo es bastante pequeña, la liofilización exige presiones muy bajas o un alto vacío. Este proceso usualmente se realiza en cámaras de vacío mantenidas a 100-1500 μHg (Ramírez-Navas, 2006).

Desde el punto de vista del procesamiento, la liofilización puede ser considerada como una secuencia de tres operaciones:

- 1) Congelación a temperaturas por debajo del punto de congelación.
- 2) Secado por sublimación, a una presión más baja que la correspondiente al punto triple y desorción del agua ligada.
- 3) Almacenamiento, que debe ser llevado a cabo en condiciones controladas y paquetes opacos.

Durante la etapa de secado se distinguen, además, dos sub-etapas:

- Secado primario: es caracterizado por la presencia de agua congelada, la que mayoritariamente es removida por sublimación.
- Secado secundario: aparece una vez que no hay más agua congelada en la matriz porosa y la zona seca se extendió a todo el producto. Entonces el mecanismo de remoción de agua es por eliminación de agua ligada (mediana y débilmente ligada).

Dentro de las ventajas de esta técnica para la deshidratación de alimentos se pueden citar: la utilización de temperaturas de secado bajas (se minimiza el daño térmico), la buena retención de sabores y aromas volátiles y la fácil rehidratación del producto seco. Por otro lado, también existen algunas desventajas, relacionadas con el elevado costo de la técnica, la probabilidad de que puedan producirse daños en la matriz alimentaria durante la congelación y el hecho de que algunos productos deshidratados por liofilización pueden poseer un mayor grado de fotosensibilidad (Lombraña, 2009).

1.8. Antecedentes en encapsulación

Diversos componentes lipofílicos, tales como aceites de pescado, fitoesteroles y limoneno, han recibido una creciente atención en el ámbito científico debido a los beneficios que estos compuestos podrían aportar a la salud. (Chen y col., 2013).

Las emulsiones aceite en agua (O/W) convencionales han sido utilizadas como sistemas de liberación controlada para encapsular PUFAs e incorporarlos a diferentes productos lácteos tales como leche, helados, yogurts y hamburguesas (McClements & Decker, 2000; Chee y col., 2005; Lee y col., 2006). Varios autores han desarrollado microcápsulas a base de emulsiones proteicas (Chuan-He & Xin-Rong, 2013; Millqvist-Fureby y col., 2001; Mis Solval, 2011; Taneja y col., 2013) y se ha reportado que las proteínas del lactosuero serían eficaces como material de pared para la encapsulación de grasa de leche anhidra y de compuestos volátiles (Kiokias y col., 2007; McCrae y col., 1999). Sin embargo este tipo de emulsiones son termodinámicamente inestables cuando se las expone a ciertas condiciones de stress (calentamiento, enfriamiento, congelado, secado, pH extremos y altas concentraciones de minerales) (McClements y col. 2007).

Por otro lado, los hidratos de carbono, especialmente azúcares, como la glucosa y la sacarosa, y polisacáridos como el almidón, maltodextrinas, pectinas y alginato, también se han utilizado como materiales de pared en la obtención de microcápsulas (Krishnan y col., 2005; Kenyon, 1995). Recientemente, el quitosano ha sido empleado para la encapsulación de fármacos lipofílicos, vitaminas y extractos de aceite de oliva (Ribeiro y col., 1999; Shi y Tan, 2002; Kosaraju y col., 2006). No obstante, los hidratos de carbono no se pueden utilizar como materiales de pared sin la presencia de un componente tensioactivo, ya que generalmente no poseen propiedades emulsionantes (Bangs & Reineccius, 1988).

Por todo lo expuesto, existe una creciente tendencia a utilizar mezclas de biopolímeros que permitan aumentar la eficiencia de encapsulación y la vida útil de las microcápsulas, a través del diseño de emulsiones multicapa (McClements y col., 2007). Este tipo de emulsiones consiste en pequeñas gotas de aceite dispersas en un medio acuoso, rodeadas por una nanopelícula interfacial compuesta por un agente emulsificante y una o varias capas sucesivas de polímeros ensambladas por interacciones electrostáticas (McClements & Li,

2010). La posibilidad de poder controlar racionalmente las propiedades de estos recubrimientos interfaciales biopoliméricos aplicando herramientas de diseño e ingeniería, proporciona un amplio margen para mejorar la funcionalidad y estabilidad de los mismos. Además, debido al efecto directo de la composición de la película interfacial sobre la eficiencia de encapsulación, la estabilidad de las cápsulas y la protección del compuesto bioactivo; la selección del material de pared constituye un paso muy importante en el proceso de microencapsulación (Pérez-Alonso y col., 2003).

Klein y col. 2010 reportó que las emulsiones O/W de aceite de canola obtenidas mediante el empleo de mezclas de goma arábica-WPI mostraron un aumento significativo de la estabilidad frente al incremento del tamaño de gota que la aportada por cada uno de los biopolímeros por separado. Por su parte, Klinkesorn y col. 2005 demostró que las microcápsulas obtenidas a través de emulsiones multicapa O/W preparadas con lecitina y quitosano exhibieron una mayor estabilidad frente al deterioro oxidativo que las obtenidas por el empleo de emulsiones monocapa con lecitina sola. Además, se ha evidenciado que la adición de carbohidratos de bajo peso molecular a las emulsiones multicapa formuladas, podría mejorar la estabilidad de las mismas frente a los procesos de deshidratación aplicados para la obtención de las microcápsulas. Ciertos estudios han demostrado que la combinación de proteína de suero lácteo con lactosa limita de manera significativa la difusión del material del núcleo a través de la pared, lo que conduce a una alta eficiencia de microencapsulación (Rosenberg & Sheu, 1996; Moreau & Rosenberg, 1996). Las maltodextrinas y las dextrinas cíclicas altamente ramificadas en combinación con proteínas de suero se han utilizado como materiales de pared para la microencapsulación de aceite de pescado (Kagami y col., 2003).

En la bibliografía existe una gran variedad de sistemas propuestos para encapsular agentes bioactivos lipofílicos, empleando distintas mezclas de materiales biopoliméricos. Sin embargo, la mayoría de los trabajos se ha centrado en la encapsulación de aceites de pescado,

como principal fuente de omega-3, mientras que los reportes acerca de la encapsulación de aceites vegetales ricos en PUFAs, tales como el aceite de lino, son escasos. A pesar de que ambos aceites son ricos en ácidos grasos poliinsaturados, no poseen la misma composición. Algunos trabajos encontrados en la literatura han reportado un contenido de hasta un 33% de omega-3 en aceites de pescado (Aghbashlo y col., 2012; Drusch y col., 2008), mientras que el aceite de lino está compuesto por una fracción mayor al 50% de ácido alfa-linolénico. Si bien el comportamiento de estos aceites frente a la microencapsulación podría mostrar tendencias similares, no es posible asegurar que presentarán el mismo comportamiento durante el almacenamiento de las cápsulas. Esta observación constituye la principal motivación del presente proyecto de investigación.

1.9. Justificación de la investigación

Con el fin de obtener microcápsulas de aceite de lino formuladas como un aditivo en polvo, el presente trabajo de tesis plantea el estudio sistemático del comportamiento fisicoquímico de interacción de los biopolímeros y de los procesos de emulsificación para poder diseñar sistemas de encapsulamiento y liberación eficientes y con una relación costo/beneficio adecuada. Desde un punto de vista nutricional y tecnológico, las proteínas de suero lácteo brindan la posibilidad de satisfacer el requerimiento creciente de la incorporación de nuevos ingredientes funcionales en el ámbito de la producción de alimentos. Estos productos se comercializan bajo la forma de concentrados (WPC 35, 50, 70, 80) y aislados proteicos (WPI 90). La producción de WPC por parte de industrias regionales y nacionales ha tenido un aumento creciente en los últimos años. Se estima que en Argentina existen aproximadamente doce importantes plantas procesadoras de sueros de lechería, la mayor parte localizadas en la zona pampeana. Las dos firmas más importantes por su capacidad de procesamiento son AFISA (Sociedad formada entre Sancor y la cooperativa

danesa Arla Foods Ingredients), con una planta en la localidad cordobesa de Porteña; y Remotti, con plantas en Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires. Otras son: Mastellone Hnos., Milkaut, García Hnos., Sobrero y Cagnolo, Cotapa, Arcolen, Williner, Saputo, Cooperativa de James Craik y Lácteos Conosur. Sin embargo, en Argentina no se produce actualmente WPI. Los avances en el desarrollo de nuevos ingredientes a partir de las proteínas del lactosuero podrían diversificar y aumentar su utilización ya que, en plena cuenca lechera, los volúmenes de suero lácteo que se generan como remanente de la industria quesera siguen siendo muy grandes. Es por eso que las industrias lácteas deberían invertir cada vez más en plantas de recuperación de suero, de producción de WPI y de obtención de las distintas fracciones proteicas que posee el lactosuero.

En este contexto, se propuso la utilización de las proteínas del suero lácteo como sistema proteico de estudio, ya que presentan muchas cualidades que las hacen muy versátiles para ser utilizadas en la formulación de alimentos, entre las cuales se destacan su alto valor nutricional (aporte de aminoácidos esenciales), y sus excelentes propiedades funcionales (capacidad de estabilizar emulsiones y espumas, formar geles) y organolépticas. (Foegeding y col. 2002, Molina Ortiz y col., 2004; Dalgleish y col., 1997).

A nivel mundial, se ha desarrollado la microencapsulación de aceite de pescado (como principal fuente de ω -3) y se han obtenido productos en polvo, internacionalmente conocidos como DMFO (dried microencapsulated fish oil). El método industrial más utilizado por distintas empresas (BASF, Roche y Clover) es la preparación de una emulsión aceite en agua (O/W) que luego es secada por aspersion. Existe otra tecnología que, aunque menos difundida, reivindica la obtención de productos con contenidos de aceite encapsulado mayores (entre el 50 y el 80%). Este método comprende la aplicación de la tecnología de emulsiones multicapa, un proceso más versátil en cuanto al tipo de producto obtenido, empleada por la empresa Ocean Nutrition (Canadá), líder en la producción de concentrados

de ω -3 de aceite de pescado. Las emulsiones son luego secadas por aspersión para la obtención de un producto en polvo. Algunos alimentos disponibles en el mercado mundial que ya se han enriquecido con DMFO son: pan, cereales, pastas, yogures, polvos dietéticos, galletitas, tortas, jugos en polvo, entre otros.

El desarrollo de estos ingredientes funcionales se debió principalmente a que la dieta habitual en los países occidentales suele ser baja en omega-3. Los factores más relevantes involucran el alto costo del pescado, la bioacumulación de Hg en esta especie y la existencia de sectores en la población que descartan el consumo de pescado ya sea porque les desagrada su sabor o porque eligen una dieta vegana (Walker y col., 2014).

Por otro lado, la utilización del aceite de lino como suplemento nutricional aún no ha sido explotada, aunque en este último el contenido de PUFAs representa un porcentaje mayor (57%) que en el aceite de pescado. Si bien este aceite ha sido ampliamente utilizado para la fabricación de pinturas y barnices, su uso en la producción de alimentos funcionales aún se encuentra limitado debido a su elevada tasa de oxidación. En este sentido, el desarrollo de nuevas técnicas de encapsulación contribuiría enormemente a la revalorización del cultivo de lino en Argentina, que en los últimos años ha sido marginado por la siembra de soja. Además, esta tecnología podría ser transferida para la encapsulación de otros tipos de aceites

Por lo expuesto aquí, la presente tesis propone una estrategia alternativa para realizar innovaciones en esta área, abordando el diseño de emulsiones multicapa para la obtención de microcápsulas de aceite de lino que, a futuro, puedan ser incorporadas en distintas matrices alimentarias. Esta tecnología, contribuiría al desarrollo de la región, incrementando el valor agregado de materias primas locales (proteínas lácteas y aceites vegetales), y promoviendo además la inserción y el posicionamiento dentro del mercado de los alimentos funcionales.

Objetivos

En la presente tesis doctoral se propone como **Objetivo general**:

Estudiar del proceso de microencapsulación de aceite de lino, utilizando el método de emulsificación multicapa a través de la formación de un film interfacial promovido por interacciones electrostáticas entre una proteína y un polisacárido, con el fin de obtener un aditivo en polvo a escala laboratorio.

Además, se proponen como **Objetivos específicos**:

- ✓ Estudiar las interacciones macromoleculares entre proteínas del suero lácteo y polisacáridos en el seno de solución acuosa a través del efecto de las modificaciones del medio acuoso (pH, concentración total de biopolímeros, relación proteína-polisacárido) sobre estos fenómenos.
- ✓ Estudiar los factores que afectan la estabilidad de emulsiones multicapa (pH, concentración de proteína, concentración de alginato de sodio, concentración de maltodextrina y temperatura de congelamiento)
- ✓ Estudiar las características fisicoquímicas y la estabilidad oxidativa de las microcápsulas en polvo obtenidas por liofilización.

Materiales y Métodos

3.1. Materiales

Se utilizó un aislado de proteínas de suero lácteo (WPI) provisto por Davisco Food Internacional Inc. (Minnesota, Estados Unidos) como sistema modelo, ya que el aislado contiene una mayor concentración de proteínas y menor cantidad de impurezas (lactosa, sales, grasa) que el concentrado proteico (WPC). La composición centesimal informada del WPI es: 96.18% de proteínas en base seca, 0.2% de grasa, 1.9% de cenizas y 5.57% de humedad. La muestra comercial de alginato de sodio (AS) (PM 135 kDa) fue provista por Cargill (Buenos Aires, Argentina), siendo su composición: 73.25% de carbohidratos en base seca, 14% de humedad, 23% de cenizas (9300 mg/100 g de Na⁺ y 800 mg/100 g de K⁺). La muestra de maltodextrina (DE 15) fue provista por Productos de Maíz SRL.

En los estudios de las interacciones macromoleculares proteína-polisacárido en fase acuosa, se utilizó glucono- δ -lactona (GDL) comercial obtenida en Sigma Aldrich (St. Louis, Estados Unidos), con una pureza mínima de 99.9% (PM 178.14 g/mol).

Para los ensayos preliminares se utilizó aceite de girasol comercial. El aceite de lino fue adquirido en Sigma Aldrich (St. Louis, Estados Unidos) y fue utilizado sin purificación (densidad: 0.93, índice de refracción: 1.48).

Para evaluar la estabilidad oxidativa del aceite de lino en el tiempo, se utilizaron reactivos de alta pureza adquiridos en MERCK (cloroformo, metanol, isopropanol, sulfato de hierro, tiocianato de amonio, ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico).

Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

3.2. SECCIÓN I: Estudio de las interacciones proteína-polisacárido en fase acuosa

En esta primera sección se prepararon sistemas mixtos WPI/AS y se estudió el comportamiento de interacción macromolecular en solución de los biopolímeros en condiciones de pH variable y a distintas relaciones WPI:AS, mediante mediciones de

Transmitancia y espectroscopía de absorción y fluorescencia.

3.2.1. Preparación de las soluciones y mezclas

La preparación de todas las soluciones madre (AS y WPI) se realizó utilizando agua ultrapura Milli-Q a la cual se le agregó azida sódica al 0.01% p/p para evitar el desarrollo microbiano. Posteriormente, las mismas se conservaron a 4°C hasta el día de su utilización. Además, todas las soluciones se prepararon con un día de anticipación previo a la realización de las mediciones, para promover la hidratación completa de los biopolímeros.

La muestra de AS fue dispersada en agua con agitación a 800 rpm y 70°C durante 35 min, hasta disolución completa. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 7 con HCl o NaOH 0.1 M, según correspondiera.

Las soluciones de WPI fueron preparadas a partir de la disolución de la muestra en polvo en agua Milli-Q, agitando a 800 rpm a temperatura ambiente (25-27°C) durante 1 h, hasta disolución completa. Luego se ajustó el pH a 7 con HCl y/o NaOH 0.1 M.

Por otra parte, los sistemas mixtos de WPI/AS fueron preparados en distintas relaciones WPI:AS (2:1, 4:1 y 6:1) mezclando volúmenes apropiados de cada solución de manera de mantener una concentración total de biopolímeros de 0.3% p/p, la cual fue constante para todos los sistemas. Una vez obtenidas las mezclas de biopolímeros se ajustó el pH a 7 (o a 4, según correspondiera) con HCl y/o NaOH 0.1 M. A estas mezclas se le realizaron determinaciones de absorbancia UV-Vis y de fluorescencia tanto intrínseca como extrínseca, tal y como se detalla en las secciones 3.2.3 y 3.2.4.

3.2.2. Comportamiento de interacción dinámico entre los biopolímeros en función del pH

Para estudiar el comportamiento dinámico de interacción entre los biopolímeros frente a cambios de pH, se adicionó GDL (0.35% p/p) a los sistemas mixtos WPI/AS (inicialmente

a pH 7) y se realizaron, en simultáneo, mediciones de Transmitancia a 850 nm (Turbiscan TM 2000, France) y de pH (Sper Scientific, USA) en función del tiempo. La GDL normalmente sufre una hidrólisis parcial a ácido glucónico cuando se disuelve en un medio acuoso, y se van liberando protones (H^+) que van produciendo una disminución gradual del pH en el tiempo.

3.2.2.1. Determinación de pH

Las mediciones de pH se realizaron con un pH-metro Sper Scientific (Estados Unidos), equipado con una sonda de temperatura y un electrodo de pH Broadley James (calomel). Los datos se registraron cada dos minutos y el rango de pH sobre el que se trabajó fue de 7 a 3.2 (aproximadamente). Los ensayos se realizaron al menos por duplicado.

3.2.2.2. Medición de Transmitancia

En paralelo a la determinación de pH, se realizaron mediciones Transmitancia de las mezclas WPI/AS en función del tiempo. Para ello se utilizó un analizador vertical de dispersiones coloidales Turbiscan TMA 2000 (Formulacion, Toulouse, Francia).

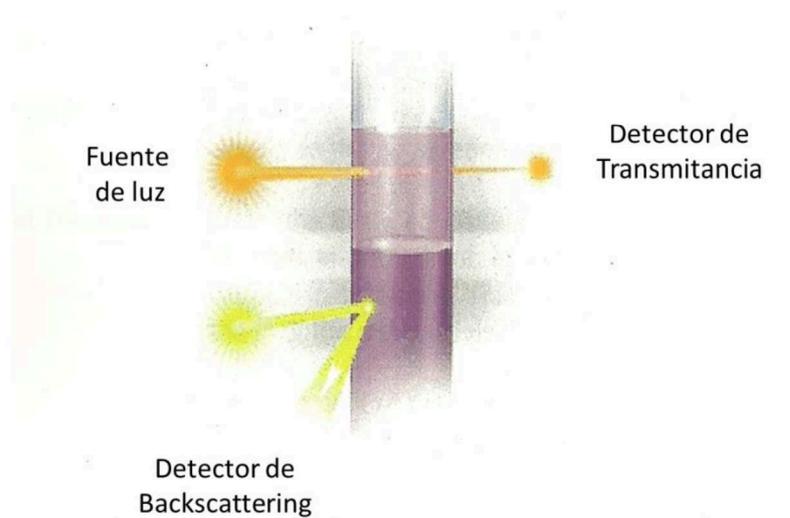


Figura 3.1. Principio de medición del analizador vertical de dispersiones

La muestra a analizar (7 mL) se coloca en una celda cilíndrica de vidrio y, para cada tiempo, es escaneada en toda su longitud por un cabezal óptico cuya fuente de luz es un diodo electro luminiscente en el infrarrojo cercano ($\lambda=850$ nm). Simultáneamente, dos sensores ópticos sincronizados registran respectivamente la luz transmitida a través de la muestra (180° de la luz incidente), y la luz retrodispersada (45° de la radiación incidente) (Fig. 3.1) cada $40 \mu\text{m}$ a lo largo de la celda, en una longitud máxima de 80 mm. Los datos fueron registrados cada 2 min para cada sistema, durante un período de 24 h.

Estos datos se representan mediante el software del equipo, en curvas de Transmitancia (T%) y/o Backscattering (BS%) en función de la altura de la muestra (mm).

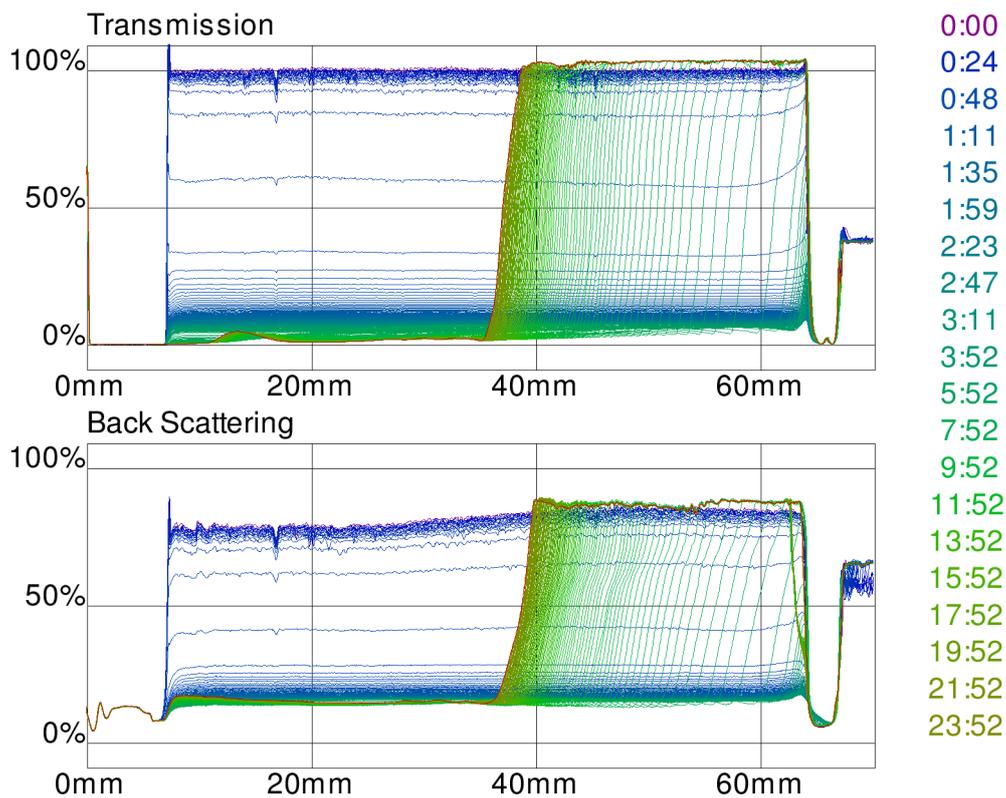


Figura 3.2. Perfiles de Transmitancia y de Backscattering de luz en función de la altura del tubo, obtenidos por el equipo Turbiscan para una mezcla WPI:AS en relación 6:1. Cada curva corresponde a una medición tomada a un determinado tiempo. Las curvas azules corresponden a los primeros tiempos, luego siguen las curvas verdes y, finalmente, la curva roja corresponde a la última medición.

Los escaneos se repiten a lo largo del tiempo, cada uno proveyendo una curva, y todas las curvas se superponen en una misma gráfica para mostrar la desestabilización del sistema. Este modo de análisis completo permite la detección de los fenómenos de migración y de variación de tamaño promedio de partículas. En la Fig. 3.2 se presenta un perfil de desestabilización típico obtenido para un sistema mixto WPI/AS.

Dado que todos los sistemas mixtos WPI/AS evaluados fueron translúcidos, en esta etapa experimental se trabajó con los perfiles de Transmitancia arrojados por el Turbiscan.

3.2.2.3. Construcción de curvas de Transmitancia (%) vs pH

De los perfiles de Transmitancia en función de la longitud del tubo, obtenidos para cada sistema mixto WPI/AS, se determinó un valor promedio del %T registrado a lo largo de toda la muestra para cada tiempo. Para ello se empleó el software del equipo y se obtuvieron curvas de Transmitancia en función del tiempo. Con estos datos y los obtenidos en el apartado 3.2.2.1, se construyeron curvas de Transmitancia en función del pH para cada mezcla WPI/AS, tal y como se muestra en la Fig. 3.3.

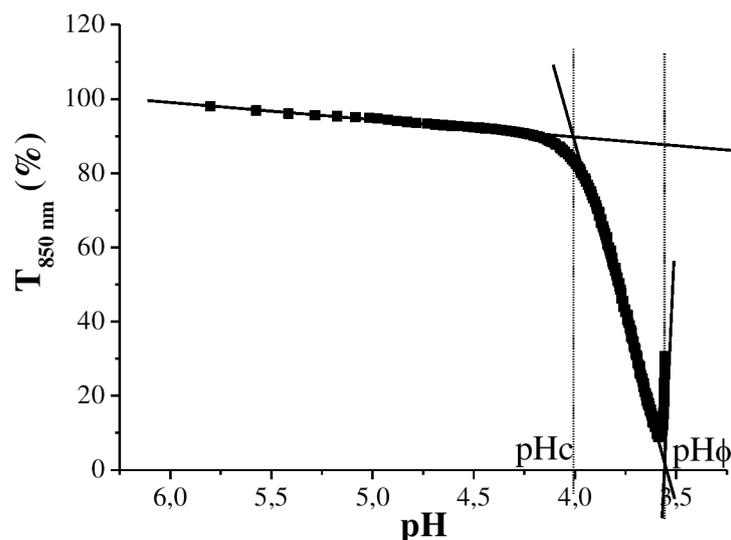


Figura 3.3. Curva típica de Transmitancia (%) a 850 nm en función del pH de una mezcla 0.2% p/p WPI y 0.1% p/p AS.

3.2.3. Espectroscopía de absorción

Se utilizó la espectroscopia de absorción UV/Vis a una longitud de onda de 400 nm, como una medida de la Turbidez de los sistemas mixtos WPI-AS preparados a pH 7 y a pH 4, respectivamente (Vardhanabhuti y col., 2009). Las muestras fueron colocadas en cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico y se analizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Lambda-20 Perkin-Elmer (Norwalk, Estados Unidos). Los datos de densidad óptica se registraron a temperatura ambiente y, al menos, por duplicado.

3.2.4. Espectroscopía de fluorescencia

Los estudios de fluorescencia tanto intrínseca como extrínseca de los sistemas mixtos WPI/AS en distintas relaciones WPI:AS (2:1, 4:1 y 6:1) se realizaron en un espectrofluorómetro F2000 (Hitachi, Japón) equipado con una cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Para las mediciones de intensidad de fluorescencia intrínseca del Triptófano (Trp) se utilizó una longitud de onda de excitación de 295 nm (Albani, 2004), para evitar la excitación de los residuos de Tirosina presentes en las proteínas. Los espectros de emisión se registraron en el rango 250-450 nm, y de allí se identificó la máxima intensidad de emisión de fluorescencia (IF_{Trp}) y la longitud de onda correspondiente al máximo de emisión (λ_{Trp}). Las mediciones de fluorescencia extrínseca se determinaron con la sonda hidrofóbica ácido anilino-8-naftalen-sulfónico (ANS), de acuerdo al método descrito por Perez y col., 2009. Los espectros de emisión se registraron en el rango 400-600 nm, de los cuales se identificó la máxima intensidad de emisión de fluorescencia (IF_{ANS}) y la longitud de onda correspondiente al máximo de emisión (λ_{ANS}).

3.3. SECCIÓN II: Estudio de las variables que afectan la formación y estabilidad de emulsiones

Para estos estudios se prepararon, por un lado, emulsiones monocapa (emulsión primaria con WPI) y se evaluó el efecto de la concentración de proteína y de las condiciones de sonicación sobre la estabilidad de las mismas. Por otro lado, una vez elegida la concentración de WPI y las mejores condiciones de sonicación, se prepararon emulsiones multicapa (emulsión secundaria WPI-AS) y se evaluó su estabilidad frente a distintos pH y concentraciones de AS. Finalmente, se seleccionó la concentración de AS y el valor de pH que producían las emulsiones más estables y se prepararon emulsiones secundarias WPI-AS con el agregado de MDX (un polisacárido neutro que permanece en solución en la fase continua), para estudiar el efecto crioprotector de esta macromolécula frente al congelamiento de las emulsiones a distintas temperaturas. A continuación se detallan las técnicas utilizadas para cada estudio.

3.3.1. Preparación de emulsiones monocapa (emulsiones primarias)

3.3.1.1. Efecto de la concentración de WPI y de las condiciones de sonicación

En estos ensayos preliminares, se utilizó aceite de girasol como de fase oleosa para la puesta a punto de la concentración de proteína y de las condiciones de sonicación. El aceite de girasol fue elegido para esta primera etapa dado que necesitábamos disponer de un aceite que tuviera una producción constante y que posea propiedades físicas similares al aceite de lino (densidad, índice de refracción, viscosidad).

En primer lugar, se prepararon emulsiones primarias mezclando 10% de fase oleosa (aceite de girasol) y 90% de una solución acuosa de WPI (1, 1.5 y 2% m/m) a pH 7, mediante agitación en un Waring Blender (2 min) a la máxima velocidad. Para disminuir el tamaño de gota, estas pre-emulsiones fueron luego sometidas a un paso de sonicación en un procesador

ultrasónico Vibra Cell Sonics, modelo VCX 750 (frecuencia 20 kHz) (Connecticut, USA), variando las condiciones de amplitud (AMP) y tiempo: 50% AMP-150 s; 75% AMP-150 s; 100% AMP-100 s. Para este último paso, se empleó una sonda de aleación de titanio de 13 mm de diámetro. Las emulsiones fueron sonicadas a temperatura controlada por un baño de hielo. Este procedimiento para la obtención de las emulsiones se eligió dado que se pretendía alcanzar un tamaño de gota similar al obtenido por un homogeneizador de válvula a alta presión, ya que éste es uno de los equipos más utilizados por la industria alimentaria. Sin embargo, dado que no se contaba con un homogeneizador como éste que trabajara a escala laboratorio, se optó por utilizar una combinación de equipos (Waring Blender + Sonicador) para alcanzar el tamaño de gota deseado.

Todas las emulsiones fueron preparadas al menos por duplicado y fueron evaluadas inmediatamente luego de ser preparadas. Las mismas fueron caracterizadas mediante microscopía óptica (3.3.3.4), determinación de proteína remanente en fase acuosa (3.3.3.3) y estudios de estabilidad coloidal realizados mediante el empleo del equipo Turbiscan (3.3.3.5).

3.3.2. Preparación de emulsiones multicapa (emulsiones secundarias)

3.3.2.1. Influencia de la concentración de AS y del pH

Se prepararon emulsiones primarias mezclando 20% de fase oleosa (aceite de lino) y 80% de una solución acuosa de WPI al 2% p/p, mediante agitación en un Waring Blender (2 min) a la máxima velocidad, seguida de un paso de sonicación (75% AMP-150 s) en un procesador ultrasónico Vibra Cell Sonics, modelo VCX 750 (frecuencia 20 KHz) (Connecticut, USA). Seguidamente, los sistemas resultantes se diluyeron mediante el agregado de una solución de AS, ajustándose el pH a distintos valores (7, 6, 5, 4) mediante el agregado de HCl 2N. De esta manera, se obtuvieron emulsiones secundarias con la siguiente composición final: 10% aceite, 1% WPI, 0.125-0.25% AS. Todas las emulsiones fueron

preparadas al menos por duplicado y fueron evaluadas inmediatamente luego de ser preparadas de acuerdo a las técnicas detalladas en el apartado 3.3.3.

3.3.2.2. Influencia de la concentración de MDX y de la temperatura de congelamiento

En este apartado se incorporó MDX a la formulación de emulsiones, para evaluar su efecto crioprotector durante el congelamiento. En primer lugar, se prepararon soluciones mixtas de 2% WPI y 0-40% MDX a pH 7. Las emulsiones primarias se obtuvieron mezclando 20% de aceite de lino con 80% de una solución acuosa mixta de WPI-MDX, en las mismas condiciones descriptas anteriormente. Luego del paso de sonicación, los sistemas se diluyeron con el agregado de una solución de AS y se ajustó el pH a 5 con HCl 2N. La composición final de las emulsiones secundarias fue: 10% aceite, 1% WPI, 0.25% AS y 0-20% MDX. Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de estos sistemas, los mismos se almacenaron durante 7 días a -18°C y a -80°C. Transcurrido ese período, se incubaron durante 2 h en un baño a 20°C, e inmediatamente fueron evaluados mediante determinación de tamaños de gota (3.3.3.1), potencial zeta (3.3.3.2), estabilidad coloidal (3.3.3.5) y observación al microscopio óptico (3.3.3.4).

3.3.3. Caracterización de emulsiones

3.3.3.1. Distribución de tamaños de gota

Se realizaron determinaciones de distribución de tamaños de gota por dispersión de luz estática (SLS) en un equipo de difracción láser Mastersizer 2000 con una unidad de dispersión Hydro 2000MU, provisto con un láser He-Ne (633 nm) (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra). Para realizar las correspondientes diluciones de los sistemas a analizar, se empleó agua bidestilada libre de partículas. La velocidad de la bomba se varió entre 900 -1500 rpm y para las mediciones se utilizaron los índices de refracción de la fase

dispersa (1.478) y de la fase continua (1.33). El rango de medición del equipo varía entre 0.1-1000 μm . El tamaño de gota se reporta mediante el diámetro medio de la distribución de partículas en volumen ($D_{43}=\Sigma n_i d_i^4 / \Sigma n_i d_i^3$) y el diámetro medio de Sauter ($D_{32}=\Sigma n_i d_i^3 / \Sigma n_i d_i^2$) que tiene la misma relación superficie/volumen que toda la población de gotas, donde n_i es el número de gotas de diámetro d_i (Camino y col., 2012). Los parámetros de polidispersidad y de área superficial específica (SSA) que se obtuvieron mediante el software también se reportaron. La polidispersidad representa el ancho de la distribución y se calculó como:

$$\text{Polidispersidad} = (D_{0.9}-D_{0.1}) / D_{0.5} \quad (\text{Ec. 2.1})$$

donde 90, 10 y 50% es el porcentaje de gotas con diámetros menores o iguales a $D_{0.9}$, $D_{0.1}$ y $D_{0.5}$ respectivamente.

El área superficial específica (SSA) se calculó mediante el parámetro D_{32} , utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{SSA} = \frac{6 \phi}{D_{32}} \quad (\text{Ec. 2.2})$$

donde ϕ representa la fracción de aceite en la emulsión. Las mediciones de tamaño de partícula se informaron como el promedio y la desviación estándar de diez mediciones.

3.3.3.2. Determinación del potencial zeta

Para determinar la carga neta superficial de las gotas de emulsión, se realizaron mediciones de potencial zeta a un ángulo fijo de 17° . Para ello, se empleó un equipo Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra). La emulsión fue previamente diluida 1/1000 con agua bidestilada y luego fue inyectada en una celda capilar provista de dos

electrodos a cada lado (Fig. 3.4) para medición de movilidad electroforética.

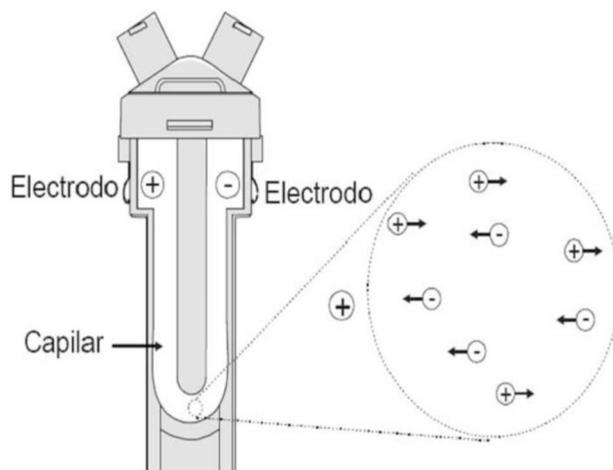


Figura 3.4. Celda capilar con electrodos a cada lado (Malvern Instruments Ltd. 2013)

El potencial zeta se determinó midiendo la dirección y velocidad de las partículas al aplicar un campo eléctrico a 25°C. Las mediciones de potencial zeta se informan como el promedio y la desviación estándar de cinco determinaciones.

Fundamento teórico

Cuando se aplica un campo eléctrico a la muestra diluida contenida en la celda, las partículas cargadas migrarán hacia el electrodo con carga opuesta. Durante este movimiento, la resistencia viscosa del medio se opondrá a la fuerza del campo eléctrico que actúa sobre las partículas cargadas. Cuando se alcanza el equilibrio entre estas fuerzas opuestas, las partículas se mueven a una velocidad constante. Esta velocidad se denomina movilidad electroforética (U_E), la que está relacionada con el potencial zeta, mediante la ecuación de Henry:

$$U_E = \frac{2 \varepsilon \zeta f(ka)}{3\eta} \quad (\text{Ec. 2.3})$$

donde ϵ es la constante dieléctrica, ζ es el potencial zeta, $f(ka)$ es la función de Henry y η es la viscosidad. En medio acuoso y con baja concentración de electrolitos, se usa una aproximación de $f(ka) = 1.5$ (aproximación de Smoluchowsky).

El desarrollo de una carga neta en la superficie de una partícula afecta la distribución de iones de la región interfacial circundante. Esto resulta en un aumento de la concentración de iones de carga opuesta a la partícula que están cercanos a la superficie. Así, una doble capa eléctrica se genera alrededor de cada partícula (Figura 3.5).

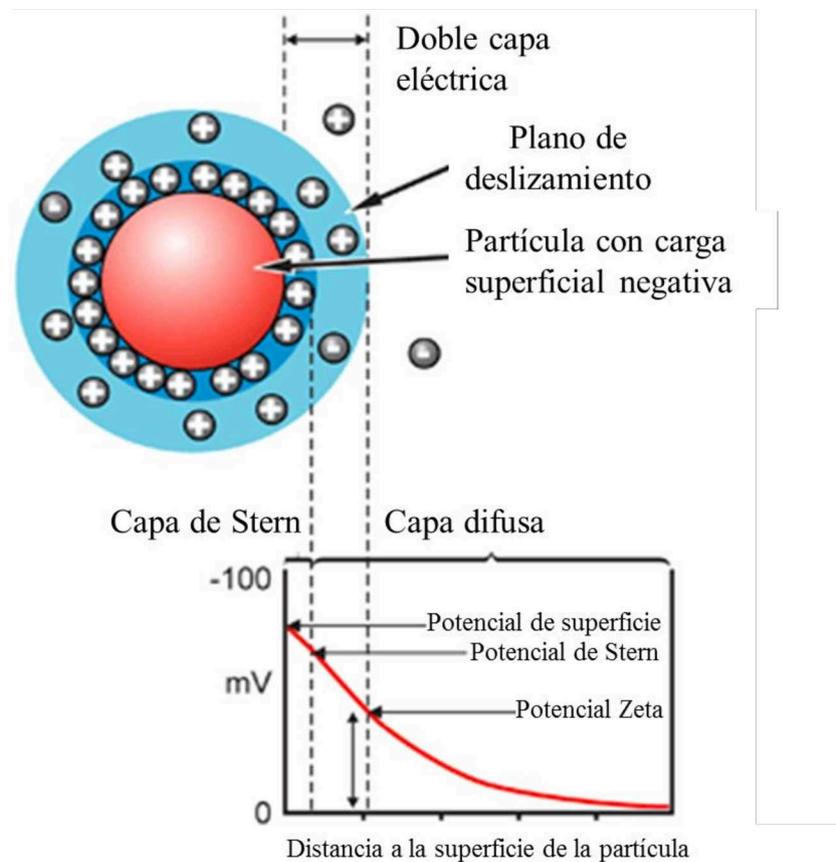


Figura 3.5. Esquema de una partícula cargada y de la doble capa que la rodea.

La capa de líquido que rodea a la partícula está comprendida por dos partes: una región interna (capa de Stern) donde los iones están fuertemente ligados, y una región externa (capa difusa) donde los iones están ligados más débilmente. Existe un límite imaginario que

termina en la capa difusa, donde los iones y la partícula forman una entidad estable (doble capa eléctrica).

Cuando una partícula se mueve, lo hace con los iones que conforman la capa de Stern y la difusa, pero los iones que se encuentran fuera del límite no se mueven con la partícula. El potencial correspondiente a este límite (superficie de cizallamiento hidrodinámico) se conoce como potencial zeta (Figura 3.5).

La magnitud del potencial zeta es un indicador de la estabilidad del sistema coloidal en estudio. Las partículas con potencial zeta más positivos que +30 mV o más negativos que -30 mV se consideran estables (Malvern Instruments Ltd., 2014).

3.3.3.3. Determinación de biopolímeros no adsorbidos en la interfase aceite-agua

Transcurrido un período de 24 h de almacenamiento a temperatura ambiente, las emulsiones se centrifugaron a 20000 g y 10°C durante 30 min (Heal Force, Neofuge 18R, China). A la fracción de suero recuperada, se le determinó: (i) concentración de proteína remanente en la fase acuosa (no adsorbida en la interfase aceite-agua) mediante absorbancia UV a 280 nm (Aitken & Learmonth, 1996), a partir de la correspondiente curva de calibrado, y (ii) concentración de polisacárido remanente en solución a través del método del fenol-sulfúrico utilizado por Dubois y col. (1956) para azúcares reductores. Para esta última técnica, a una cantidad de 60 a 70 µg de polisacárido (2 mL de fase acuosa diluida), se agregaron 50 µL de fenol al 80% p/p, luego 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y se dejó reposar durante 20 min. Luego se midió la absorbancia de la muestra a 485 nm y la concentración de alginato de sodio se determinó mediante una curva de calibrado realizada con soluciones del polisacárido de concentraciones conocidas.

3.3.3.4. Microscopía óptica

Los sistemas se agitaron adecuadamente antes de realizar la microscopía, para garantizar la homogeneidad de la muestra. Luego se colocó una gota de emulsión fresca entre un porta y un cubreobjetos y se observó en un microscopio óptico convencional en un aumento 40X (Leica Microsystems, Alemania). Durante la observación de los sistemas, se seleccionaron varios campos y se tomaron fotografías de los más representativos.

3.3.3.5. Estabilidad de emulsiones

Para evaluar la estabilidad de las emulsiones y detectar fenómenos de migración y de variación del tamaño promedio de gota, se utilizó el equipo Turbiscan TMA 2000 (Formulacion, Tolouse, Francia). De manera similar a la descrita anteriormente, 7 mL de emulsión fueron transferidos a un tubo de vidrio, y se registraron medidas de Backscattering y de Transmitancia en función del tiempo, durante un período de 7 días. Los perfiles de Backscattering permiten evaluar el movimiento de las gotas de emulsión desde el tiempo inicial ($t=0$), mientras que los perfiles de Transmitancia proporcionan información acerca de la separación de fases macroscópica entre el suero y la crema (Huck-Iriart y col., 2013). Para visualizar mejor los cambios producidos en los sistemas evaluados, es conveniente trabajar en modo de referencia ($\Delta\%BS$ o $\Delta\%T$), donde los valores de la primera curva (curva de referencia a $t=0$) se sustraen de las subsiguientes (Fig 3.6). De esta manera pueden analizarse mejor las variaciones producidas en relación al estado inicial.

Los perfiles obtenidos para cada sistema se analizaron empleando el software del equipo y de allí se obtuvo:

(i) El índice de cremado, expresado como:

$$\text{Índice de cremado} = H_S/H_T * 100 \quad (\text{Ec. 2.4})$$

donde H_S : altura de la fase suero, H_T : altura total de la emulsión (Gu y col., 2007), como un parámetro de la desestabilización global de las emulsiones luego de 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente. H_S fue obtenido de los perfiles de Transmitancia, midiendo el ancho del último pico (ubicado en la zona de clarificación) al 50% de la altura total del pico. En el caso de que no se observara Transmitancia transcurrido los 7 días de análisis, se consideró $H_S=0$. H_T también se obtuvo de los perfiles de Turbiscan, midiendo la altura total de la emulsión al tiempo inicial ($t=0$).

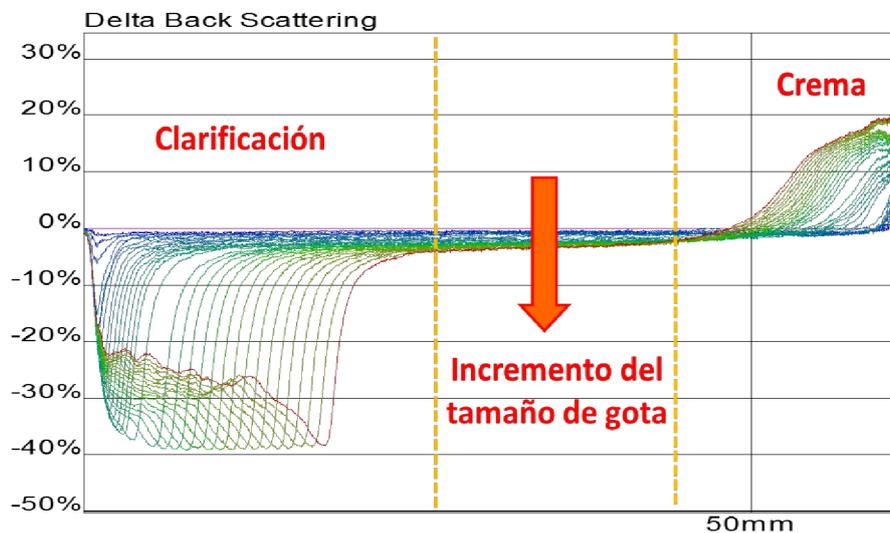


Figura 3.6. Perfil de Backscattering obtenido en el equipo Turbiscan (en modo referencia), correspondiente a la desestabilización de una emulsión 10% aceite, 1% WPI 0.125% AS pH 7. Cada curva de color corresponde a una medición realizada a un determinado tiempo.

- (ii) La variación del valor promedio del $\Delta\%BS$ en la zona media de los perfiles (25-35 mm) en función del tiempo, como una medida de la variación del tamaño de gota (Fig. 3.6).
- (iv) La variación del ancho de pico de clarificación del perfil de Backscattering en función del tiempo, como una medida de la cinética de migración de las gotas.
- (iii) El tiempo de retardo, correspondiente al periodo de latencia que precede a la separación de fases (Lizarraga y col., 2008).

Determinación de coalescencia

Transcurrido un período de 24 h de almacenamiento a temperatura ambiente, las emulsiones se centrifugaron a 20000 g y 10°C durante 30 min. (Heal Force, Neofuge 18R, China). En la parte superior de la fase crema se determinó la cantidad de aceite liberado por pesada. El porcentaje de aceite separado se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Coalescencia} = (m_1/m_2) \cdot 100 \quad (\text{Ec. 2.5})$$

donde m_1 : masa de aceite separado luego de la centrifugación y m_2 : masa de aceite adicionada a la emulsión (Santiago y col., 2005).

3.4. SECCIÓN III: Obtención y caracterización fisicoquímica de las microcápsulas en polvo

En esta sección se obtuvieron las microcápsulas de aceite de lino por liofilización de las emulsiones multicapa previamente estudiadas, a las cuales se les evaluaron los siguientes parámetros: eficiencia de encapsulación (3.4.4), actividad de agua (3.4.5) y estabilidad oxidativa frente a distintas condiciones de almacenamiento (3.4.6).

3.4.1. Obtención de microcápsulas en polvo

Para la obtención de las microcápsulas en polvo, se seleccionaron las condiciones que promovieron la mayor estabilidad de los sistemas emulsionados. La composición final de estos sistemas fue: 10% aceite 1% WPI 0.25% AS pH 5 y también se varió el contenido de MDX en un rango 0-20%. A una alícuota de las emulsiones se le realizaron determinaciones de oxidación (3.4.6). El resto se congeló en un freezer a -18°C y luego fue secado por liofilización en un equipo Heto FD 25 (China). La elección de esta técnica de secado se realizó teniendo en cuenta que la producción de las microcápsulas de aceite de lino se realizó a escala laboratorio (pequeños volúmenes), y en ese momento no contábamos con un

secadero spray de pequeña escala

3.4.2. Determinación de Aceite Superficial

Se extrajeron 2.5 g de muestra con 7.5 mL de hexano y la mezcla se homogeneizó en un shaker orbital durante 5 min. Luego se centrifugó a 5000 g (Heal Force, Neofuge 18R, China) durante 10 min, y el sobrenadante se pasó a través de un papel de filtro MUNKTEL 00R, y se recuperó en un balón de destilación. Finalmente, el hexano se evaporó en un evaporador rotatorio a 70°C y el extracto libre de solvente se secó en estufa a 105°C, hasta pesada constante. El contenido de aceite libre se determinó por gravimetría (Klinkesorn y col., 2006).

3.4.3. Determinación de Aceite Total

Se pesó 1 g de muestra en polvo y se reconstituyó la emulsión agregado agua Milli-Q al pH correspondiente (pH=5) y homogeneizando en vortex durante 1 min. La emulsión se extrajo luego con 25 mL de una mezcla hexano/isopropanol (3:1) durante 15 min con agitación constante a 160 rpm en un shaker orbital automático. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 5000 g durante 15 minutos. La fase orgánica se recuperó y la fase acuosa se volvió a extraer con la mezcla de solventes. Finalmente, la fase orgánica recuperada se evaporó en un evaporador rotatorio a 70°C y el extracto libre de solvente se secó en estufa a 105°C, hasta pesada constante. El contenido de aceite total se determinó por gravimetría (Klinkesorn y col., 2006).

3.4.4. Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación se calculó a partir de las determinaciones realizadas anteriormente, mediante la siguiente fórmula:

$\%EE = [\text{Aceite total (g/100g polvo)} - \text{Aceite libre (g/100g polvo)}] / [\text{Aceite total (g/100g polvo)}]$

3.4.5. Determinación actividad de agua

Se determinó actividad de agua de las muestras en polvo en un equipo Aqualab Systems (Washington, Estados Unidos) a temperatura ambiente (25°C).

3.4.6. Estabilidad de las microcápsulas frente al almacenamiento

Se estudió la estabilidad de las microcápsulas frente a la degradación oxidativa por un período de 8 semanas, en distintas condiciones de temperatura (-18, 4 y 32°C). Estas temperaturas se eligieron de manera de abarcar las condiciones de almacenamiento de diferentes tipos de alimentos (helados, yogures, panificados). Para ello, una determinada cantidad de las microcápsulas se conservó en envases adecuados, sellados herméticamente y sometidos a las distintas temperaturas. Semanalmente se retiró un set de cada uno de ellos y fueron analizados en ese momento. El grado de oxidación se analizó mediante la determinación de (i) hidroperóxidos presentes en la muestra y (ii) sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

3.4.6.1. Determinación de peróxidos

La determinación de peróxidos se realizó de acuerdo al método descrito en Kuhn & Cunha (2012). Para ello 0.3 mL de emulsión reconstituída se extrajeron con 1.5 mL de isooctano/isopropanol (3:2), la mezcla se homogeneizó en un vortex durante 30 s, y se centrifugó durante 2 min a 3400 g. Luego, 0.2 mL de la fase orgánica superficial se agregaron a 2.8 mL de cloroformo/metanol (7:3), seguido por la adición de 15 µL de tiocianato de amonio 3.94 M y 15 µL de una solución ferrosa. La mezcla se homogeneizó en un vortex y

luego de 10 min de incubación, se registró la absorbancia de los sistemas a 500 nm. La concentración de hidroperóxidos se determinó utilizando una curva de calibrado de Fe^{3+} , considerando que la presencia de hidroperóxidos en las microcápsulas promoverían la oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} , y este último formaría un compuesto coloreado con el tiocianato que podría determinarse por espectrofotometría (Hornero-Méndez y col., 2001).

El índice de peróxidos (IP) se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{IP} = \frac{[(A_s - A_b) \times m]}{[55.84 \times m_0 \times 2]} \text{ (meq peróxido/Kg aceite)} \quad (\text{Ec. 3.6})$$

donde A_s : absorbancia de la muestra, A_b : absorbancia del blanco, m : pendiente de la curva de calibrado, m_0 : masa de aceite total, 55.84: peso molecular del hierro, y el factor de división 2 es necesario para expresar el índice de peróxidos como miliequivalentes de peróxido en vez de miliequivalentes de oxígeno.

3.4.6.2. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para esta determinación se siguió el protocolo descrito en Klinkesorn y col. (2005). En primer lugar, se preparó una solución de reactivos mezclando 15 g de ácido tricloroacético (TCA), 0.375 g de ácido tiobarbitúrico (TBA), 1.76 mL de HCl 12 N y 82.9 mL de agua ultrapura. Posteriormente, a 1 mL de emulsión (previamente diluida 1/10) se agregaron 2 mL de la solución TCA-TBA, la mezcla homogeneizó en un vortex y se incubó en un baño de agua a 90°C durante 15 min. Luego, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugaron a 8000 g durante 15 min. La absorbancia del sobrenadante se registró a 532 nm y se determinó la concentración de TBARS mediante una curva de calibrado construida a partir de diluciones de 1,1,3,3-tetraetoxipropano.

3.5. Análisis estadístico de los datos

Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por duplicado y con su correspondiente repetición. Los valores promedio y sus desviaciones estándar fueron calculados y presentados en tablas y gráficas como pares de coordenadas acompañadas por su correspondiente barra de error. Para determinar diferencias significativas entre las distintas condiciones de ensayos se aplicó el test de Análisis de la Varianza (ANOVA) con un nivel de significancia $\alpha=0.05$ (Montgomery y Runger, 2003). En los casos donde no se pudo aplicar ANOVA – cuando se violaba uno de los supuestos, como la homogeneidad de varianzas – se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y los gráficos de caja y bigotes para determinar diferencias entre las muestras (Statgraphics Centurion XV).

Resultados

Sección I

Estudio de las interacciones proteína-polisacárido en fase acuosa

4.1.1. Efecto de la relación WPI:AS en el comportamiento de interacción dinámico entre los biopolímeros en sistemas mixtos y en condiciones de pH variable

En esta primera sección se abordó el estudio del comportamiento de interacción entre el WPI y el AS en fase acuosa, con el objeto de utilizar luego estos conocimientos para el diseño de la bicapa biopolimérica interfacial alrededor de las gotas de aceite de lino en las emulsiones multicapa. Teniendo en cuenta que las interacciones proteína-polisacárido dependen tanto de la densidad de carga de ambos biopolímeros como de su concentración relativa en solución, y que el pH juega un rol fundamental en la formación de complejos biopoliméricos autoensamblados (Weinbreck, 2004; Santipanichwong y col., 2008), en este apartado se analizó el efecto de la relación WPI:AS sobre el comportamiento dinámico de interacción de sistemas mixtos WPI/AS en condiciones de pH variable.

La formación de complejos electrostáticos entre proteínas y polisacáridos ha sido ampliamente estudiada en la bibliografía (Chen & Subirade, 2006; Dubin y col., 1994; McClements, 2006; Schmitt & Turgeon, 2011). Algunos estudios previos realizados sobre interacciones entre distintas proteínas (gelatina, proteínas del lactosuero) y polisacáridos (goma arábica, quitosán, pectinas) en condiciones de pH variable, han demostrado que el proceso de formación de complejos electrostáticos proteína-polisacárido ocurre en dos etapas, y puede monitorearse a través de mediciones de viscosidad, turbidez, dispersión de luz dinámica, potenciometría, etc. (Plashchina y col., 2001; Girard y col., 2002; Tuinier y col., 2002; Weinbreck y col., 2003).

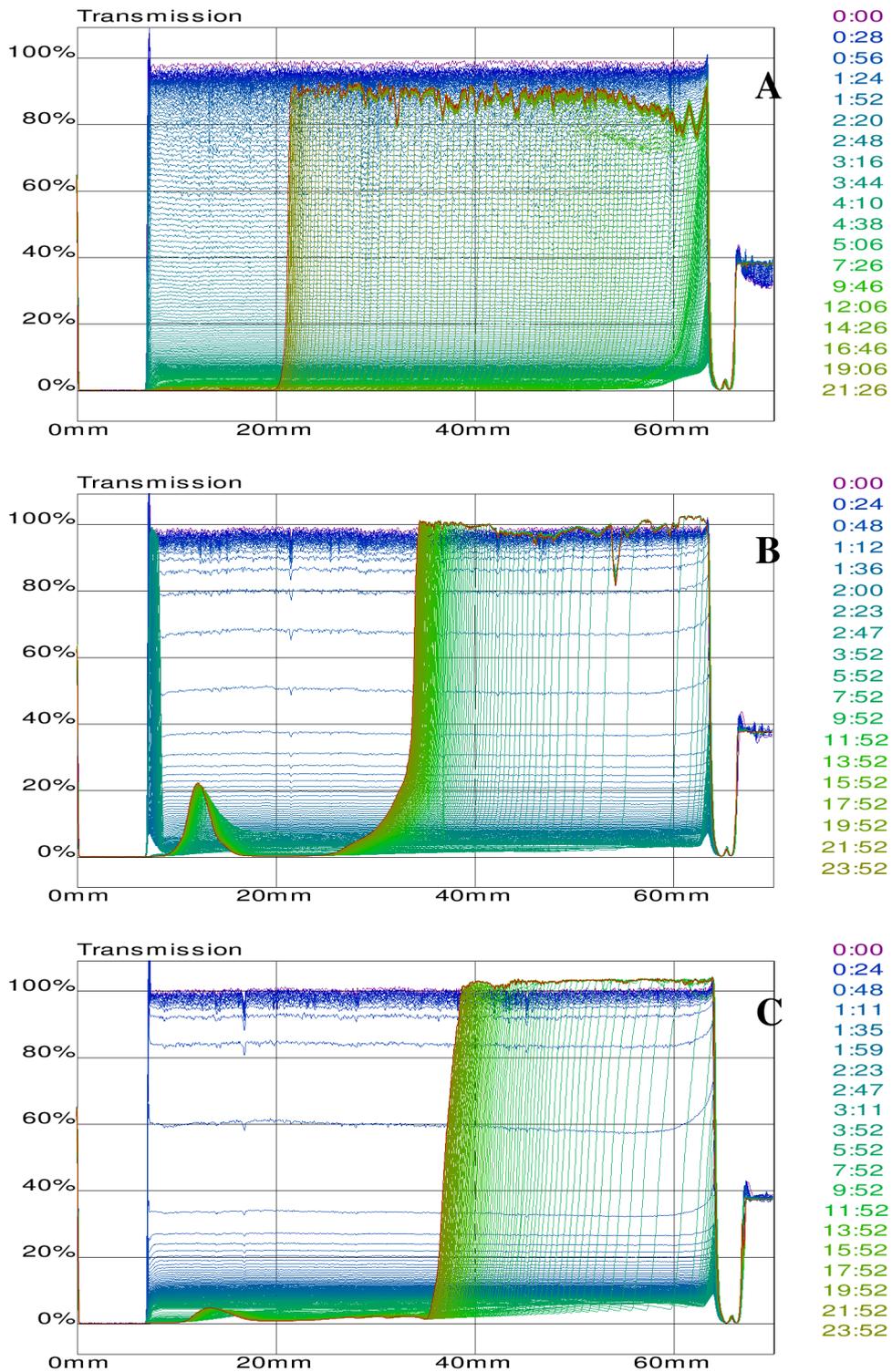


Figura 4.1. Perfiles de Transmitancia obtenidos para sistemas mixtos WPI/AS en función del tiempo, en condiciones de pH variable, en las siguientes relaciones WPI:AS (A) 2:1, (B) 4:1, (C) 6:1.

En particular, Weinbreck (2004) ha descrito el comportamiento de interacción entre proteínas del lactosuero y varios polisacáridos (goma arábica, carragenina y EPS B40) en función de mediciones de turbidez y dispersión de luz dinámica. Sin embargo, a diferencia de lo ya estudiado, en el desarrollo del presente trabajo analizamos el proceso de complejación entre los biopolímeros a través de mediciones de Transmitancia, en lugar de turbidez, basándonos en ensayos experimentales previos que demostraron la validez de esta técnica para estudiar este fenómeno con el cambio de pH.

En la Fig. 4.1. se presentan los perfiles de Transmitancia (T, %) en función de la longitud del tubo obtenidos para los sistemas mixtos WPI/AS en las distintas relaciones WPI:AS. Las curvas horizontales y paralelas de T (%) indican un cambio en el tamaño de promedio de las partículas coloidales, mientras que las curvas verticales están relacionadas con la separación de fases debido al fenómeno de migración de las partículas.

Tal y como se describió en el apartado Materiales y Métodos, se empleó el análisis del valor medio para sintetizar la información aportada por los perfiles de Transmitancia obtenidos para cada sistema WPI/AS. Estos cálculos son útiles para visualizar fenómenos de variación de tamaño. Con estos datos y los de pH, se construyeron curvas de Transmitancia en función del pH. La Fig. 4.2 muestra la evolución de T (%) con el descenso del pH en los sistemas mixtos WPI/AS a diferentes relaciones WPI:AS. Se observó que en condiciones de pH cercano a la neutralidad, los valores de T (%) fueron elevados. Esto sugeriría una escasa interacción entre los biopolímeros en estas condiciones debido a que ambos tipos de macromoléculas poseerían una densidad de carga neta negativa, promoviendo mayormente la repulsión electrostática entre ellas (cosolubilidad).

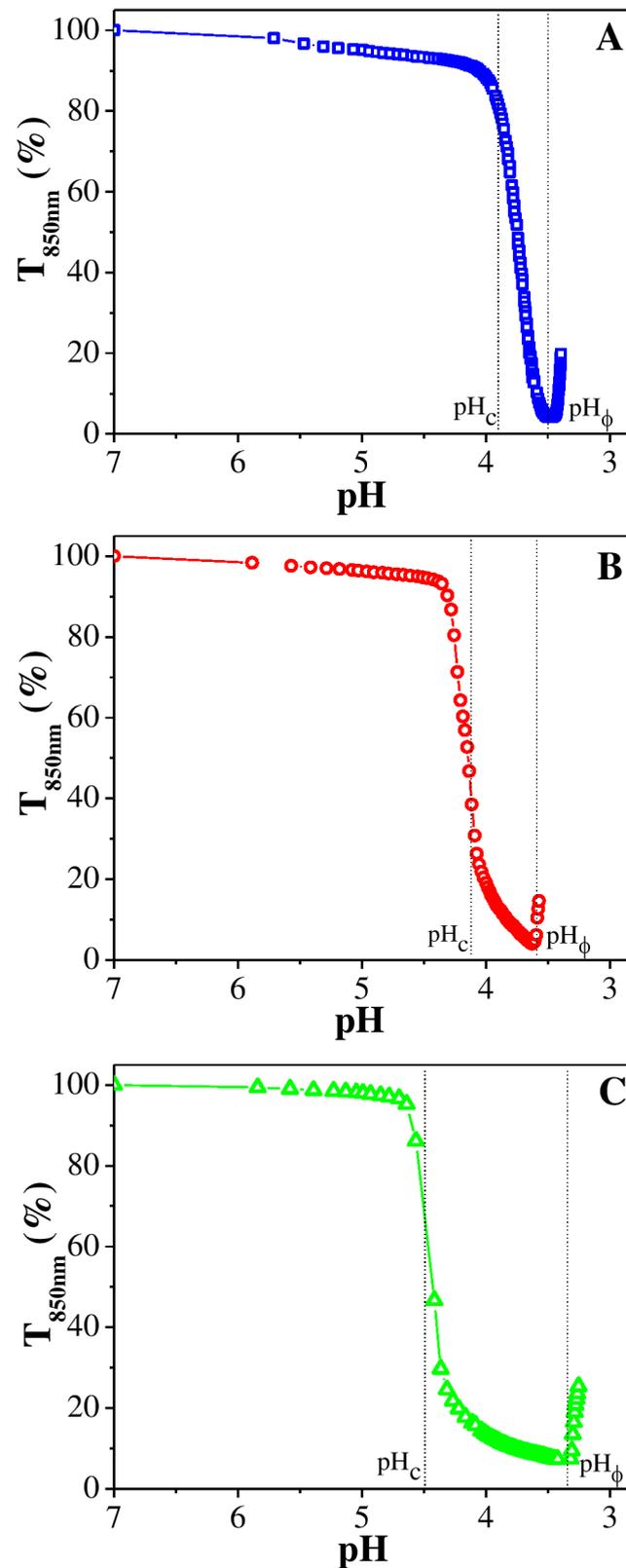


Figura 4.2. Efecto de la relación WPI:AS, 2:1 (A) 4:1 (B) 6:1 (C), sobre la Transmitancia ($T\%$) de sistemas mixtos WPI/AS en función del pH.

A medida que el pH comenzó a descender, se observó una disminución gradual de la T (%), hasta un valor de pH en donde esta disminución fue más pronunciada. Este fenómeno podría relacionarse con un incremento en la atracción electrostática entre el WPI y el AS, con la consecuente formación de complejos solubles proteína-polisacárido (WPI-AS).

A partir de las zonas de inflexión de las curvas de la Fig. 4.2. se obtuvieron los valores de pH de transición, pH_c y pH_ϕ . Al primer punto de inflexión (de izquierda a derecha) se lo denominó pH_c y al segundo punto de inflexión se lo denominó pH_ϕ (Weinbreck, 2004). Según Weinbreck (2004), a valores de $pH > pH_c$ existiría una región de cosolubilidad entre los biopolímeros, a valores de $pH_c > pH > pH_\phi$ se encontraría la región de formación de complejos WPI-AS solubles y a valores de $pH < pH_\phi$ se estaría promoviendo la separación de fases asociativa o coacervación.

Sin embargo, la formación de complejos electrostáticos solubles WPI-AS podría comenzar a valores de pH ligeramente por encima del pH_c característico de cada sistema mixto WPI/AS (Fig. 4.2). A pesar de la densidad de carga neta negativa que presentan las moléculas de WPI a valores de pH ligeramente por encima de su pI (5.2-4.7), la presencia de grupos con carga positiva expuestos en su superficie promovería la interacción con los grupos carboxilo cargados negativamente de las moléculas de AS, lo que se vería más favorecido a valores de pH cercanos al pH_c .

En este sentido, el proceso de formación de los complejos proteína-polisacárido podría involucrar varios pasos, tales como (i) la formación de complejos solubles WPI-AS intrapoliméricos en las cercanías del pH_c , (ii) la aparición de complejos interpoliméricos solubles e insolubles en la región comprendida entre $pH_c > pH > pH_\phi$, y (iii) la separación de fases macroscópica a $pH < pH_\phi$ debido a la agregación de los complejos WPI-AS promovida por la neutralización de las cargas y su consecuente precipitación (coacervación).

En la Tabla 4.1, se resumen los valores de pH_c y pH_ϕ derivados de la Fig. 4.2 (A, B y

C), donde se puede observar que el aumento de la relación WPI:AS produjo un incremento en los valores de pH_c de los sistemas mixtos WPI/AS. Este comportamiento podría estar relacionado con la neutralización de las cargas en los complejos proteína-polisacárido formados, que se vería más favorecida a mayores relaciones WPI:AS. La cantidad relativa de moléculas de WPI disponibles por cadena de AS jugaría un rol importante en la formación de complejos electrostáticos dependiendo del pH del medio acuoso y de la relación WPI:AS para la cual se alcanza la electroneutralidad de los complejos (Weinbreck, 2004).

Tabla 4.1: Valores de pH de transición característicos para cada sistema WPI/AS.

Relación WPI:AS	pH_c	pH_f
2:1	3.88 ± 0.04a	3.50 ± 0.07d
4:1	4.25 ± 0.08b	3.55 ± 0.10d
6:1	4.49 ± 0.12c	3.33 ± 0.12e

Las letras distintas representan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

Debido a que las proteínas del suero son macromoléculas globulares más pequeñas que la cadena de AS (Mleko & Foegeding, 1999), se necesitaría una mayor cantidad de WPI en solución para neutralizar las cargas negativas del polisacárido. En nuestro caso, encontramos que tras el aumento de la relación WPI:AS podrían existir más moléculas de WPI disponibles (más cargas positivas) para neutralizar las cargas negativas del AS.

Esto favorecería tanto la formación de complejos electrostáticos WPI-AS como la neutralización de las cargas en esos complejos a valores de pH más elevados (Fig. 4.3, Tabla 4.1).

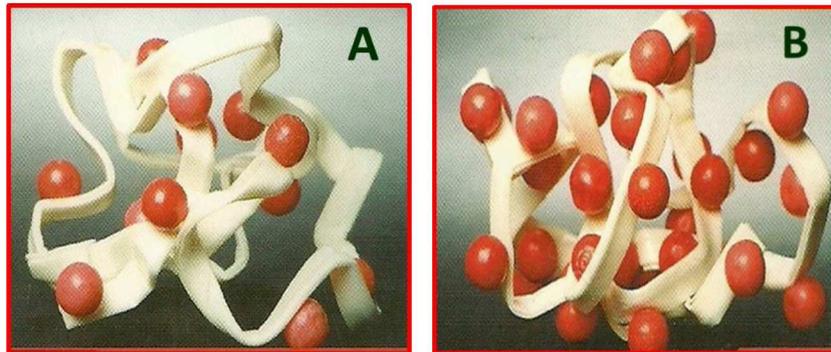


Figura 4.3. Representación esquemática de complejos electrostáticos WPI-AS (WPI: esferas rojas, AS: cinta blanca) a (A) menores y (B) mayores relaciones WPI:AS (Extraído de Weinbreck, 2004).

Por otro lado, los valores de pH_ϕ no se vieron influenciados significativamente por la relación WPI:AS, excepto en los sistemas mixtos en relación 6:1, donde la separación de fases asociativa tuvo lugar a un pH ligeramente menor que en los otros casos. Considerando que a mayores relaciones WPI:AS se favorecería una mayor tendencia a la neutralización de las cargas en los complejos WPI-AS, se hubiera esperado que en los sistemas WPI/AS en relación 6:1, el pH_ϕ se alcanzara a valores de pH ligeramente más elevados que en los demás sistemas mixtos. Sin embargo, el comportamiento observado fue el opuesto. Y esto podría estar relacionado con la concentración relativa de los biopolímeros en solución. Este último parámetro es muy importante ya que, existe una relación óptima entre los biopolímeros en sistemas mixtos que corresponde a una cantidad equivalente de cada uno de ellos para lograr la electroneutralidad en los complejos proteína-polisacárido. Cuando una de las macromoléculas se encuentra en exceso, el proceso de coacervación podría retardarse o suprimirse debido al escaso interés energético por concentrar los biopolímeros en una sola fase, si la concentración de uno de ellos en la fase acuosa ya es elevada (Weinbreck, 2004).

Diagrama de fases

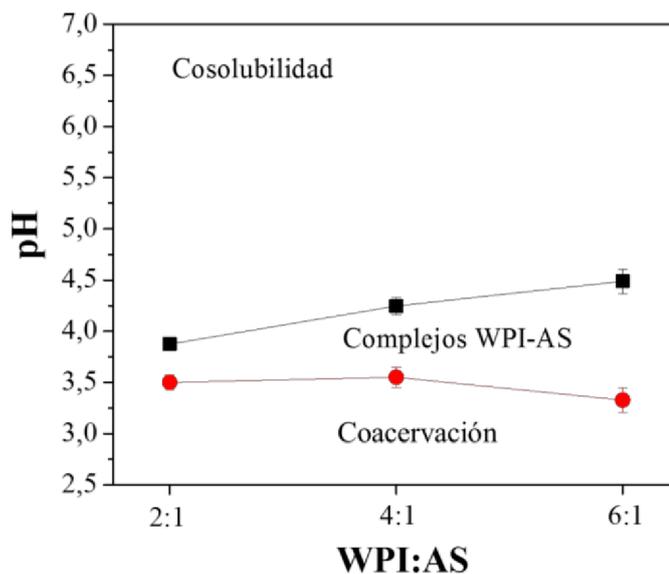


Figura 4.4. Diagrama de fases para los sistemas WPI/AS (■ pH_c , ● pH_ϕ).

Con los valores de los pH de transición de cada sistema mixto WPI/AS, se construyó un diagrama de fases (pH vs. Relación WPI:AS) que se presenta en la Fig.4.4. El método experimental empleado permitió establecer (i) una región de cosolubilidad, donde la interacción entre ambos biopolímeros sería escasa, (ii) una región donde se favorecería la formación de complejos solubles WPI-AS y (iii) una región a partir de la cual se produciría la separación de fases asociativa o coacervación.

Además, en la Fig. 4.4 se puede observar que a medida que se incrementó la relación WPI:AS, aumentó el área de la región comprendida entre pH_c y pH_ϕ (correspondiente a la formación de complejos WPI-AS).

De acuerdo a estos resultados, se seleccionaron dos valores de pH para llevar a cabo la caracterización espectroscópica de los sistemas mixtos WPI/AS: (i) pH 7, que corresponde a la zona en donde los biopolímeros se encontrarían cosolubles y (ii) pH 4, que estaría comprendido en la zona de formación de complejos electrostáticos proteína-polisacárido para

todas las relaciones WPI:AS.

4.1.2. Efecto de la relación WPI:AS sobre la caracterización espectroscópica de los sistemas mixtos WPI/AS a pH 7 y pH 4

En esta sección se evaluó la incidencia del pH y de la relación WPI:AS sobre el comportamiento de los sistemas mixtos WPI/AS en solución. La Fig. 4.5 presenta el efecto de la relación WPI:AS sobre la turbidez de los sistemas mixtos, a los dos valores de pH evaluados.

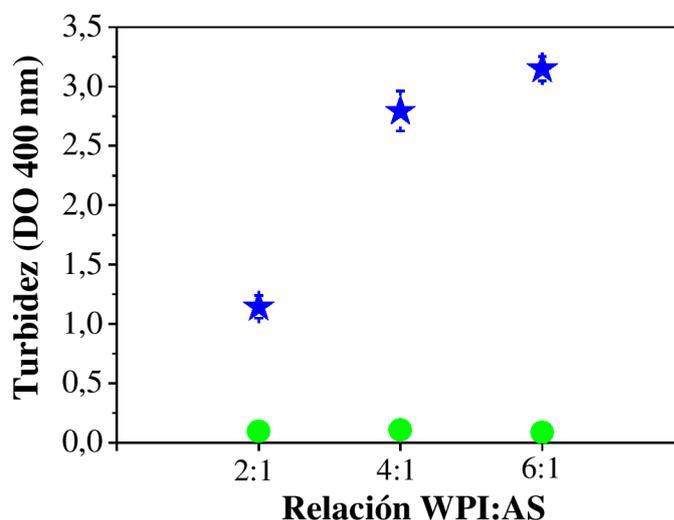


Figura 4.5. Efecto de la relación WPI:AS sobre la DO (400 nm) de sistemas mixtos WPI/AS a pH 7 (●) y pH 4 (★).

Por un lado, a pH 7, los sistemas mixtos WPI/AS presentaron valores de DO muy bajos, y no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a la relación WPI:AS. Este comportamiento estaría relacionado con la escasa interacción que existe entre los biopolímeros en soluciones diluidas y a valores de pH cercanos a la neutralidad. En estas condiciones, tanto el WPI como las moléculas de AS poseerían una densidad de carga neta

negativa y, debido a la existencia de una elevada repulsión electrostática entre ellos, ambos biopolímeros estarían excluyéndose mutuamente (Weinbreck y col., 2003; Weinbreck, 2004; Harnsilawat y col., 2006).

Por otro lado, a pH 4 se observaron valores de DO muy superiores a los correspondientes a pH 7. Esto se relacionaría con la formación de complejos electrostáticos autoensamblados a través de un proceso de interacción asociativa entre el WPI y el AS en estas condiciones (McClements, 2006; Weinbreck y col., 2003; Vardhanabhuti y col., 2009), como se discutió en el apartado 4.1.1.

Además, en estos sistemas se observó un incremento de la DO con el incremento de la relación WPI:AS, lo que sugeriría un aumento del tamaño de las partículas biopoliméricas autoensambladas tras el incremento de la relación WPI:AS, debido a una mayor neutralización de las cargas.

La Fig.4.6 muestra el efecto de la relación WPI:AS sobre la IF_{Trp} (A) y sobre la IF_{ANS} (C) de los sistemas mixtos WPI/AS, evaluados a pH 7 y a pH 4. Para analizar los cambios sobre el microentorno de los residuos Trp y del sitio de unión del ANS, en la Fig. 4.6 se incorporaron las longitudes de onda correspondientes a los valores máximos de IF_{Trp} e IF_{ANS} , λ_{Trp} (B) y λ_{ANS} (D), respectivamente, como funciones de la relación WPI:AS.

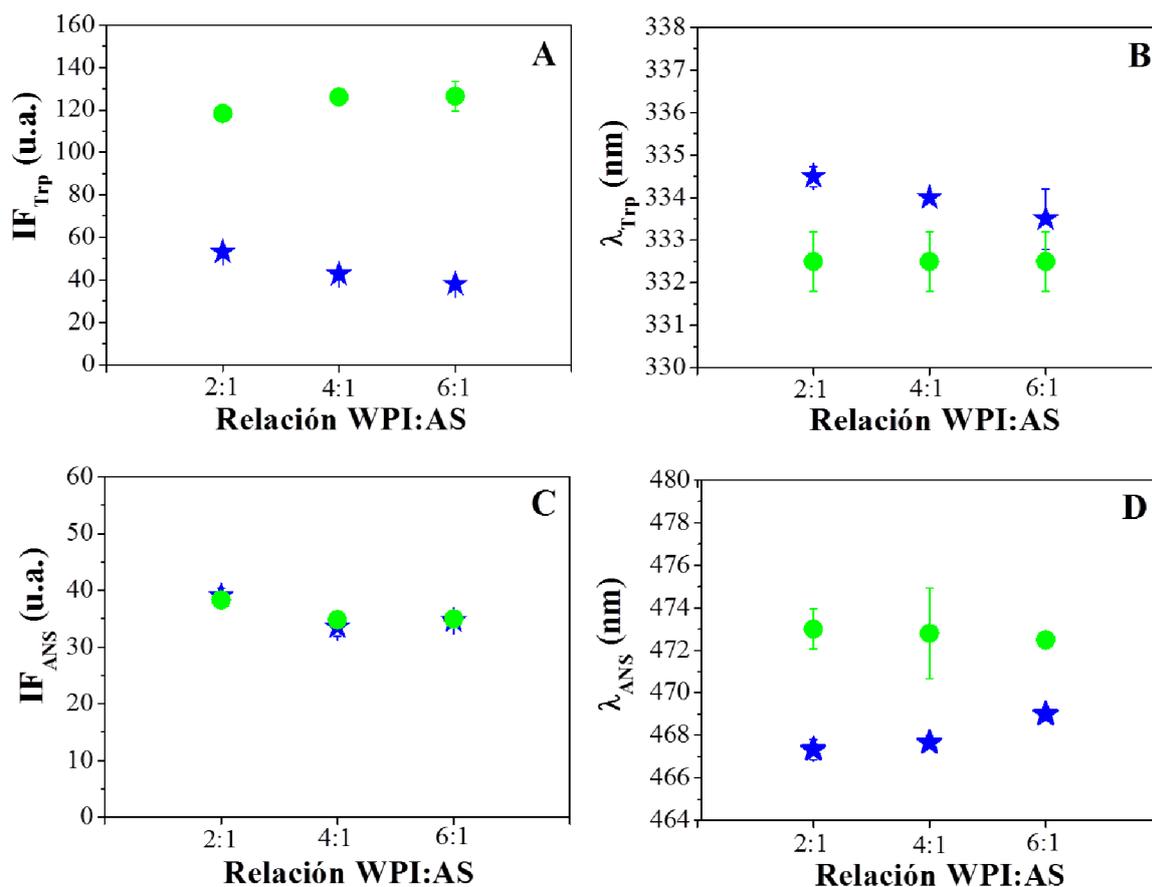


Figura 4.6. Efecto de la relación WPI:AS sobre la Intensidad de Fluorescencia del Trp (A) y del ANS (C) de los sistemas mixtos WPI/AS a pH 7 (●) y pH 4 (★); y sobre las longitudes de onda correspondientes a los máximos de emisión del Trp (B) y del ANS (D).

En las Fig. 4.6 A y B se observa que la relación WPI:AS no influyó significativamente sobre la IF_{Trp} ni sobre la λ_{Trp} de los sistemas mixtos WPI/AS evaluados a pH 7, debido a la escasa interacción entre los biopolímeros en estas condiciones (McClements, 2006; Weinbreck 2004).

Sin embargo, a pH 4, se observa una leve tendencia a la disminución gradual, tanto de la IF_{Trp} como de la λ_{Trp} de los sistemas mixtos WPI/AS, con el incremento de la relación WPI:AS. Este comportamiento sugeriría una mayor oclusión de residuos de Trp en los complejos WPI-AS, que se orientarían hacia ambientes menos polares (corrimiento hacia el azul) a mayores relaciones WPI:AS. Si ahora comparamos la IF_{Trp} de los sistemas evaluados

a los distintos pH, podemos ver que los valores correspondientes a pH 4 son menores que los que presentaron los sistemas mixtos a pH 7. Esto estaría revelando la interacción electrostática entre las moléculas de WPI y AS a pH 4, donde el polisacárido podría estar promoviendo un efecto de “quenching” sobre los residuos de Trp ubicados en la estructura de la proteína (Albani, 2004)

Por otro lado, en la Fig. 4.6 C se observó que ni la relación WPI:AS ni el pH de los sistemas mixtos tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la IF_{ANS} . Esto estaría indicando que a pH 7, los sitios hidrofóbicos del WPI estarían ocluidos dentro de la estructura proteica. Y la interacción atractiva de la proteína con el polisacárido a pH 4 para formar complejos electrostáticos, probablemente no interferiría con la ubicación de estos sitios. Sin embargo, el corrimiento hacia el azul de las λ_{ANS} de los sistemas evaluados a pH 4, con respecto a los analizados a pH 7 (Fig. 4.6 D), sugeriría que estos sitios hidrofóbicos estarían rodeados por un microambiente más apolar, probablemente debido a las interacciones proteína-polisacárido que promoverían una mayor oclusión de estos segmentos hidrofóbicos en las partículas autoensambladas.

4.1.3. Conclusiones

Del estudio de las interacciones macromoleculares entre WPI y AS realizado en este apartado, se pudo evidenciar la formación de complejos electrostáticos WPI-AS solubles a valores de pH cercanos al pH_c y por encima del pH_ϕ de cada sistema. Este rango estaría comprendido entre $4.5 < pH < 3.3$ y es dependiente de la relación WPI:AS para cada sistema. Además, se observó que el incremento de la relación WPI:AS favoreció la neutralización de las cargas en los sistemas mixtos y ejerció una influencia sobre la estructura molecular de los complejos WPI-AS solubles

Sección II

**Estudio de las variables que afectan la
formación y estabilidad de emulsiones**

4.2.1. Efecto de las condiciones de sonicación y de la concentración de WPI

Efecto de las condiciones de sonicación

El primer paso para lograr una adecuada microencapsulación del aceite de lino consiste en la formulación de una emulsión estable. Las proteínas del suero lácteo son muy versátiles para estabilizar emulsiones (Dalglish, y col., 1997) ya que poseen excelentes propiedades funcionales. Su naturaleza anfifílica les permite adsorberse rápidamente a la interfase aceite-agua, generando una membrana elástica y resistente alrededor de la gota de aceite (Taherian y col., 2011). Cabe destacar que la cantidad de agente emulsionante adicionada a la emulsión debe ser suficiente como para saturar la interfase y cubrir completamente la superficie de las gotas de aceite, previniendo así la desestabilización a través del mecanismo de floculación por puentes. Sin embargo, la concentración del emulsionante remanente en fase acuosa (no adsorbido a la interfase) no debe ser demasiado elevada para no promover el fenómeno de floculación por depleción.

Por otro lado, el área interfacial creada durante la homogeneización de las fases inmiscibles que da lugar a la formación de gotas de emulsión depende no sólo de la cantidad de agente emulsionante presente en la mezcla, sino también de la energía total aportada al sistema (McClements, 1999). Esta última está inicialmente determinada por el equipo utilizado para preparar la emulsión.

En este sentido, en primer lugar, se pusieron a punto las condiciones de homogeneización de emulsiones primarias (10% de aceite de girasol y 1% de WPI en fase acuosa), que permitieran lograr tamaños de gota adecuados para mejorar la estabilidad de los sistemas en el tiempo.

Para ello, se prepararon emulsiones en un agitador mecánico Waring blender, a las que se les realizaron mediciones de estabilidad en función del tiempo. Dado que nuestros

sistemas fueron opacos y el haz de luz del equipo Turbiscan no podía atravesar la muestra para llegar al detector de transmitancia, se trabajó con el análisis de los perfiles de Backscattering (BS) en función de la longitud del tubo, tal y como se muestra en la Fig. 4.7.

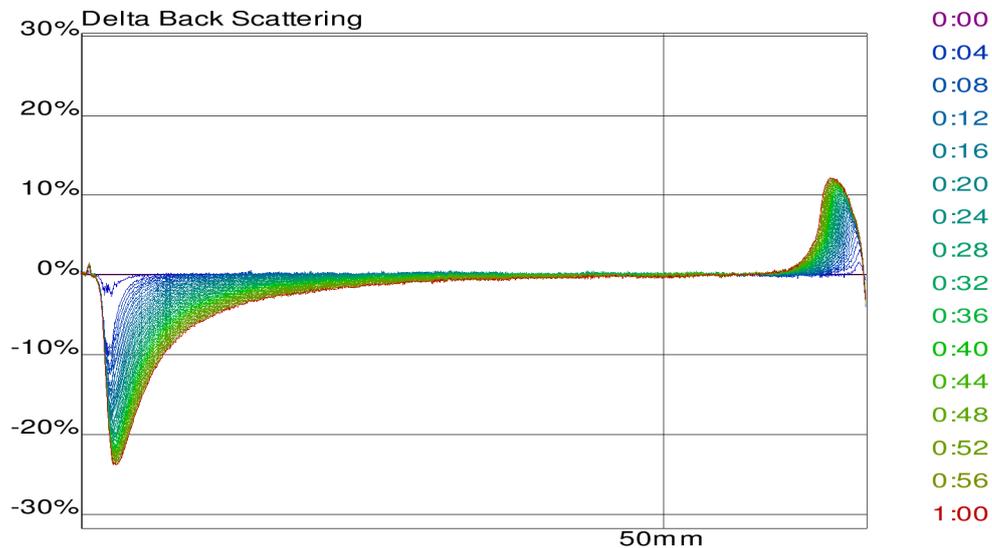


Figura 4.7. Perfil de desestabilización de emulsión 10% aceite 1% WPI pH 7, preparadas mediante agitación en Waring Blender.

Estos perfiles constituyen una huella macroscópica de la emulsión a un tiempo determinado (Mengual y col., 1999) y permiten estudiar el fenómeno de migración de gotas en estos sistemas.

Para visualizar mejor los cambios producidos en las emulsiones evaluadas, fue conveniente trabajar en modo de referencia ΔBS (%), donde los valores de la primera curva (curva de referencia a $t=0$) fueron sustraídos de las subsiguientes ($\Delta BS = BS_t - BS_{t=0}$). Este modo facilita el análisis y permite estudiar las variaciones producidas en relación al estado inicial. La intensidad de la luz retrodispersada está relacionada con el número de gotas presentes en la muestra a una longitud dada en el tubo. En nuestro caso, una reducción del ΔBS (%) representa una disminución en el número de gotas, mientras que un aumento del ΔBS (%) describe el comportamiento opuesto (Wulff-Pérez y col., 2009).

En la Fig. 4.7 se muestra el perfil de desestabilización de la emulsión obtenida por agitación en el blender, donde se puede apreciar el cremado como principal mecanismo de desestabilización. Allí se observa (i) una disminución del BS_t en el fondo del tubo, relacionado a una disminución de la concentración de gotas en esta parte de la muestra (clarificación) y (ii) un concomitante incremento del BS_t en la parte superior del tubo, relacionada con un aumento de la concentración de gotas de emulsión y la formación de una fase crema.

En la Fig 4.9 A se pueden observar los tamaños de gota, de manera cualitativa, correspondientes a estos sistemas. El cremado es un fenómeno de desestabilización relacionado con el movimiento ascendente de las gotas debido a la diferencia de densidades de la fase dispersa y la fase continua. La ley de Stokes establece que la velocidad de cremado de una gota aislada en un medio diluido se incrementa con el cuadrado de su radio y es inversamente proporcional a la diferencia de densidades entre la fase dispersa y la fase continua.

Por lo tanto, para reducir el cremado, una estrategia es reducir el tamaño de gota. A medida que el tamaño de las gotas se reduce, la velocidad de auto-difusión se incrementa hasta un punto tal que las gotas muy pequeñas pueden mantenerse sin cremar por mezclado difusional (Robins, 2000; Manoj y col., 1998).

Dado que en estos primeros ensayos se generaron tamaños de gota superiores a los 10 μm , se decidió realizar una modificación en el proceso de obtención de las emulsiones con el fin de lograr disminuir el tamaño de las gotas. Para ello, se realizaron pre-emulsiones mediante el procedimiento anterior, que luego se sometieron a un paso de sonicación en un procesador ultrasónico.

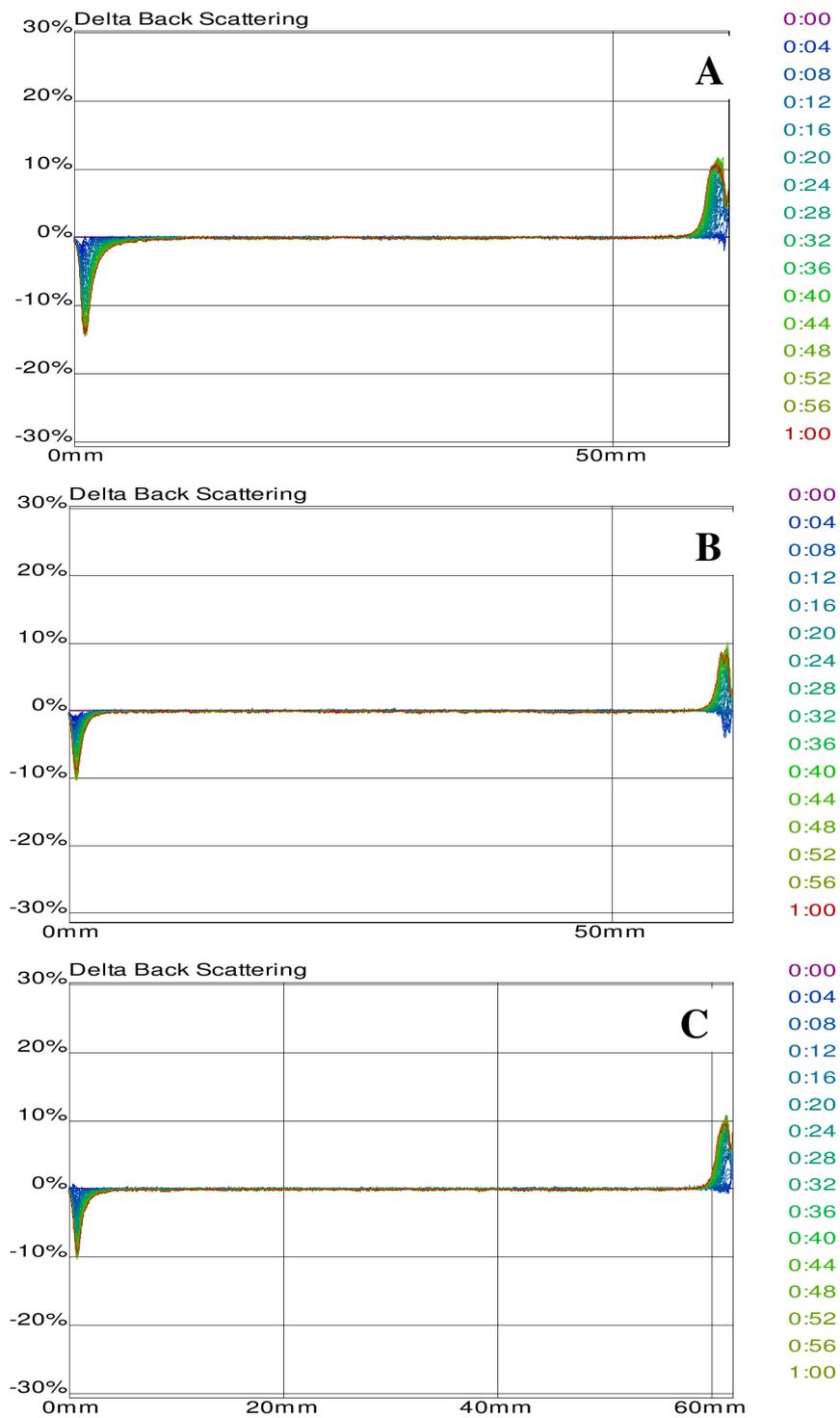


Figura 4.8. Perfiles de desestabilización de emulsiones 10% aceite 1% WPI pH 7, preparadas mediante agitación en Waring Blender, seguida de un paso de sonicación de (A) 50% AMP-150 s; (B) 75% AMP-150 s; (C) 100% AMP-100 s.

Como en el laboratorio contamos con un transductor piezoeléctrico ultrasónico que trabaja a una frecuencia constante de 20 kHz, y permite variar la amplitud (AMP) de la longitud de la onda ultrasónica y el tiempo de sonicación, se propusieron tres condiciones de AMP (%) – Tiempo (s) para evaluar luego el comportamiento de las emulsiones resultantes: 50% AMP-150 s, 75% AMP-150 s y 100% AMP-100 s.

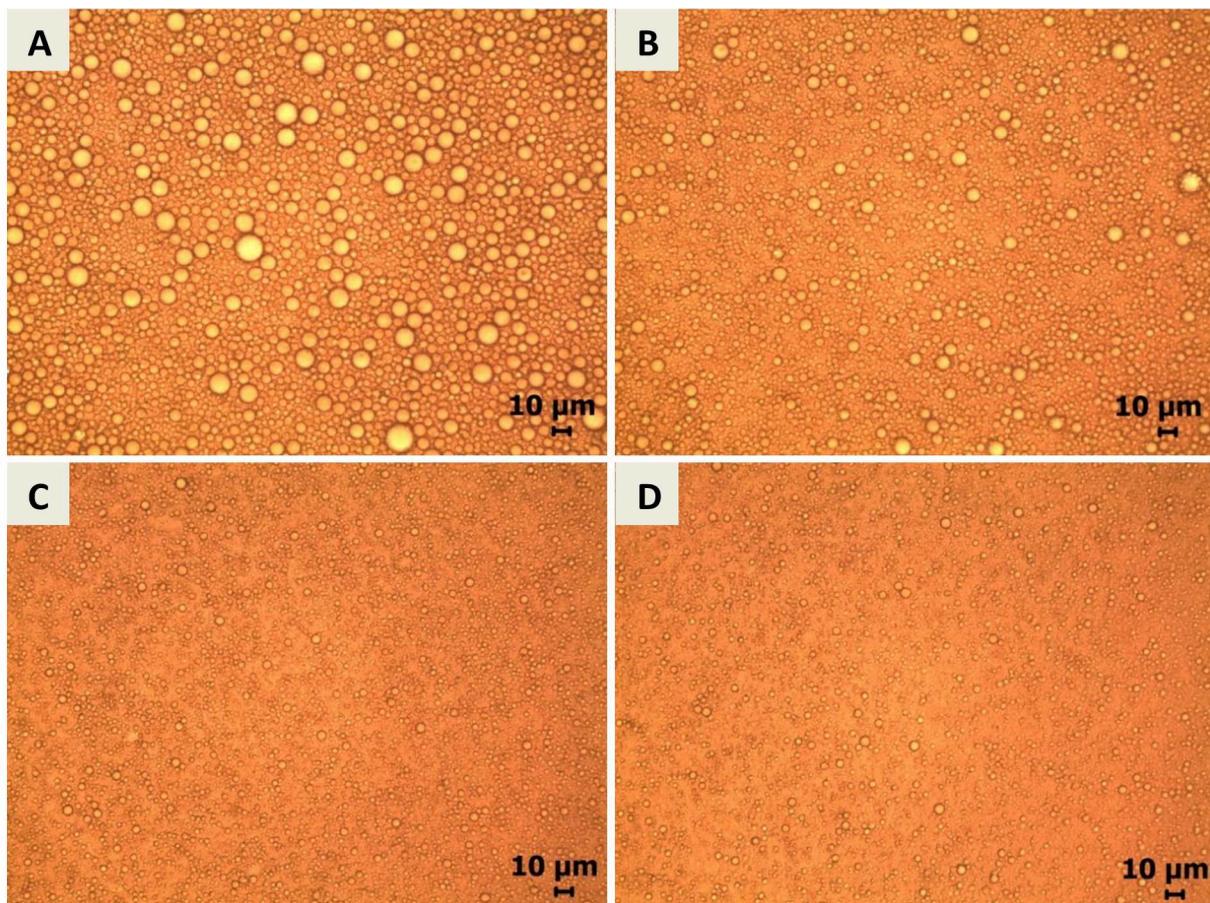


Figura 4.9. Micrografías de emulsiones 10% aceite 1% WPI pH 7 preparadas mediante agitación en Waring Blender (A), seguida de un paso de sonicación de (B) 50% AMP-150 s; (C) 75% AMP, 150 s; (D) 100% AMP-100 s.

La Fig. 4.8 muestra los perfiles de desestabilización obtenidos en el equipo Turbiscan para las emulsiones sonicadas. En primer lugar, se observó que el fenómeno de desestabilización por cremado fue claramente menor en las emulsiones sonicadas que en las obtenidas solamente por homogeneización en el Waring Blender (Fig. 4.7). Esto se

relacionaría con la disminución de los tamaños de gota al final de la etapa de sonicación en los tres sistemas evaluados, que se observa cualitativamente en la Fig. 4.9 B, C y D. Por otro lado, las emulsiones obtenidas en la condición 50% AMP-150 s, presentaron un mayor grado de desestabilización que las producidas a 75% AMP-150 s y 100% AMP-100 s (Fig. 4.8). Este comportamiento es consistente con la presencia de gotas de mayores tamaños en estos sistemas (Fig 4.9. B) en comparación con los observados en las emulsiones restantes (Fig 4.9 C y D), lo que derivaría en un mayor cremado.

A partir de los perfiles de Backscattering correspondientes a las emulsiones sonicadas, se analizó la cinética de migración de las partículas durante el cremado, la cual fue evaluada registrando la variación del ancho del pico de Δ BS (%) en función del tiempo (Fig. 4.10). De la observación de la Fig. 4.10, se puede inferir que las emulsiones preparadas en las condiciones 50% AMP-150 s cremaron más rápidamente que aquellas preparadas a 75% AMP-150 s y 100% AMP-100 s. Estos resultados son consistentes con los discutidos anteriormente.

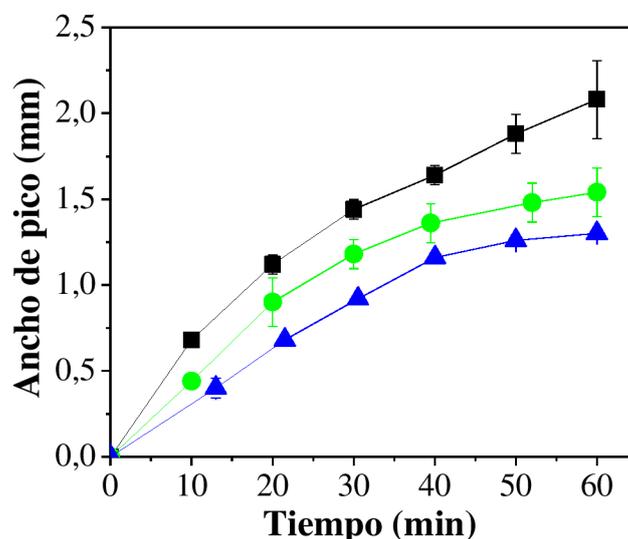


Figura 4.10. Efecto de las condiciones de sonicación sobre la desestabilización de emulsiones por cremado: 50% AMP-150 s (■), 75% AMP-150 s (▲) y 100% AMP-100 s (●).

De estos ensayos preliminares, se eligieron las condiciones de sonicación 75% AMP-

150 s y 100% AMP-100 s para continuar con el estudio de la influencia de la concentración del WPI en fase acuosa, dado que estos sistemas presentaron distribuciones de tamaños de gota más homogéneas y en el rango esperado (alrededor de 1 μm). Cabe destacar que, en esta instancia de la tesis doctoral, aún no se contaba con un equipo disponible para medir distribuciones de tamaños de gota, por lo que se utilizó la microscopía óptica a modo de obtener una estimación aproximada de este parámetro.

Efecto de la concentración de WPI

En segundo lugar, se analizó el efecto de la concentración inicial de WPI en fase acuosa sobre la estabilidad de las emulsiones. Para ello, se evaluaron tres concentraciones diferentes de WPI y se analizó el comportamiento de los sistemas resultantes. La Tabla 4.2 muestra la energía total aportada en la etapa de sonicación para cada emulsión y la concentración de WPI remanente en fase acuosa (proteína no adsorbida a la interfase aceite-agua).

Tabla 4.2. Efecto de la concentración inicial de WPI y de las condiciones de ultrasonido sobre la energía total aportada a emulsiones 10% aceite pH 7 durante la sonicación y la concentración de WPI remanente en fase acuosa.

Condición AMP (%) - Tiempo (s)	WPI inicial (%m/m)	Energía aportada (J)	WPI final (%m/m)
75-150	1	11252a	0,126b
	1,5	11509a	0,138b
	2	11799a	0,137b
100-100	1	11686a	0,126b
	1,5	11875a	0,156b
	2	11473a	0,159b

Las letras distintas representan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

Se observó que la energía aportada por el procesador ultrasónico fue la misma para todas las emulsiones, no existiendo diferencias significativas entre las mismas ($p < 0.05$). Además, tampoco se observaron diferencias significativas en la concentración de WPI remanente en fase acuosa.

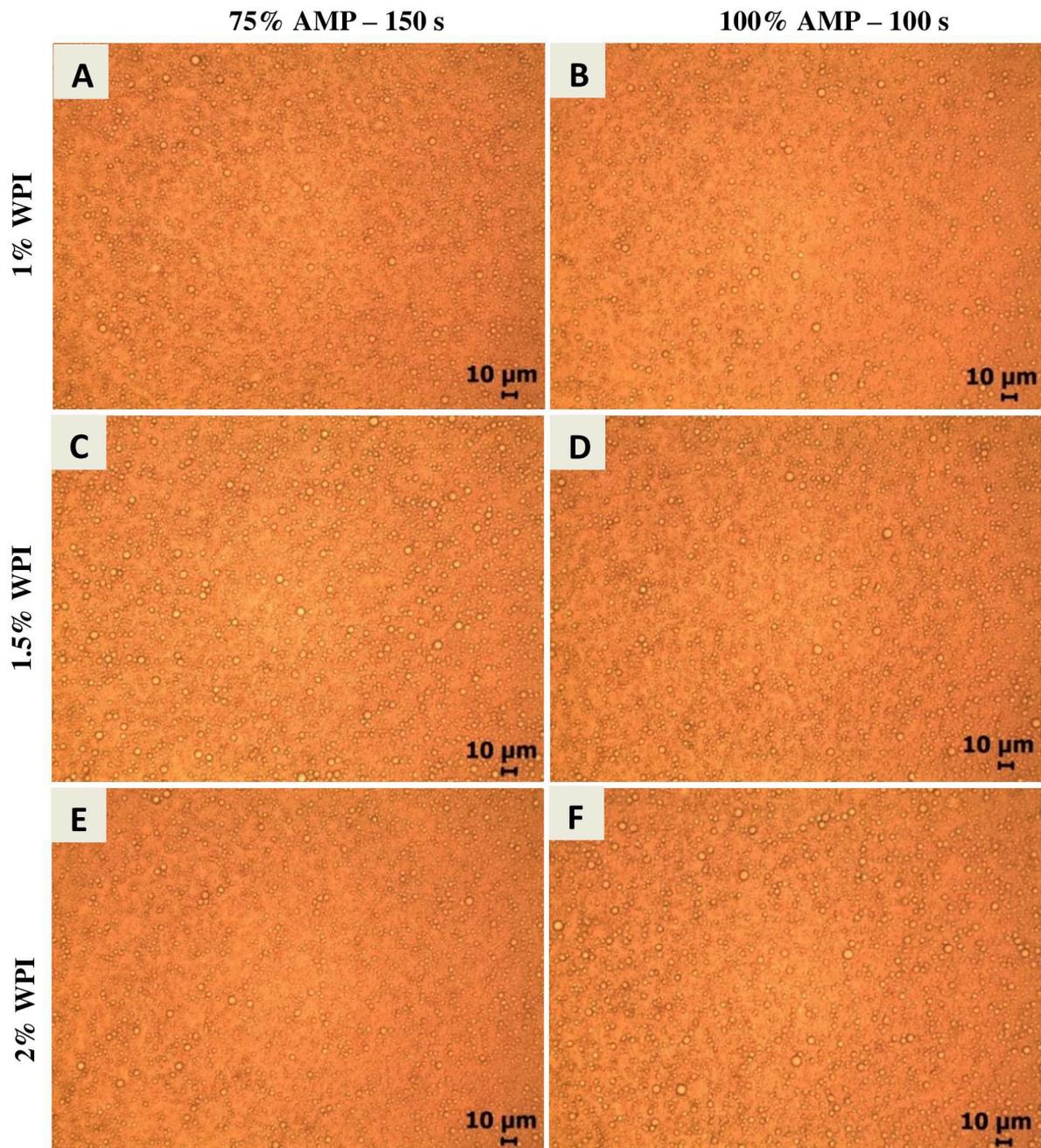


Figura 4.11. Micrografías de emulsiones 10% aceite a pH 7 con distintas concentraciones (%p/p) de WPI (1%: A y B, 1.5% C y D, 2%: E y F) preparadas mediante agitación en Waring Blender, seguido de un paso de sonicación: 75% AMP-150 s (A, C, E); 100% AMP-100 s (B, D, F).

Este último resultado sugeriría que en los sistemas preparados con mayores concentraciones iniciales de WPI, una mayor cantidad de proteína podría haberse adsorbido a la interfase aceite-agua. Sin embargo, la técnica empleada para la determinación de proteína remanente en fase acuosa podría no ser un método muy sensible para detectar diferencias en la concentración de WPI. Por lo tanto, la discusión de estos resultados debería realizarse con cierta prudencia teniendo en cuenta las limitaciones de la técnica.

En la Fig. 4.11 se muestran las micrografías correspondientes a cada una de las emulsiones evaluadas. En general, no se logra distinguir una diferencia entre los tamaños de gota obtenidos para cada sistema mediante el empleo de la microscopía.

Por otro lado, la estabilidad de las emulsiones también se evaluó mediante el equipo Turbiscan. Los perfiles de desestabilización obtenidos se muestran en la Fig. 4.12. A partir de estos perfiles, se analizó la cinética de migración de las partículas durante el cremado mediante la variación del ancho del pico de ΔBS (%) en función del tiempo (Fig. 4.13).

De la observación de la Fig. 4.13, se puede inferir que las emulsiones preparadas en las condiciones 100% AMP-100 s cremaron ligeramente más rápido que aquellas preparadas a 75% AMP-150 s. Este comportamiento podría explicarse teniendo en cuenta que a la mayor amplitud de sonicación (100%) podrían existir procesos de recoalescencia durante la formación de las gotas de emulsión, probablemente debido a un sobreprocesamiento de los sistemas. Jafari y col. (2008) sostienen que en los procesadores ultrasónicos, cuanto mayor es la potencia entregada al sistema, se tiene un flujo más turbulento. Esto promovería un incremento en las colisiones de las gotas de aceite que se forman debido al fenómeno de cavitación, lo que conllevaría fenómenos de recoalescencia con el consecuente aumento del tamaño de gota.

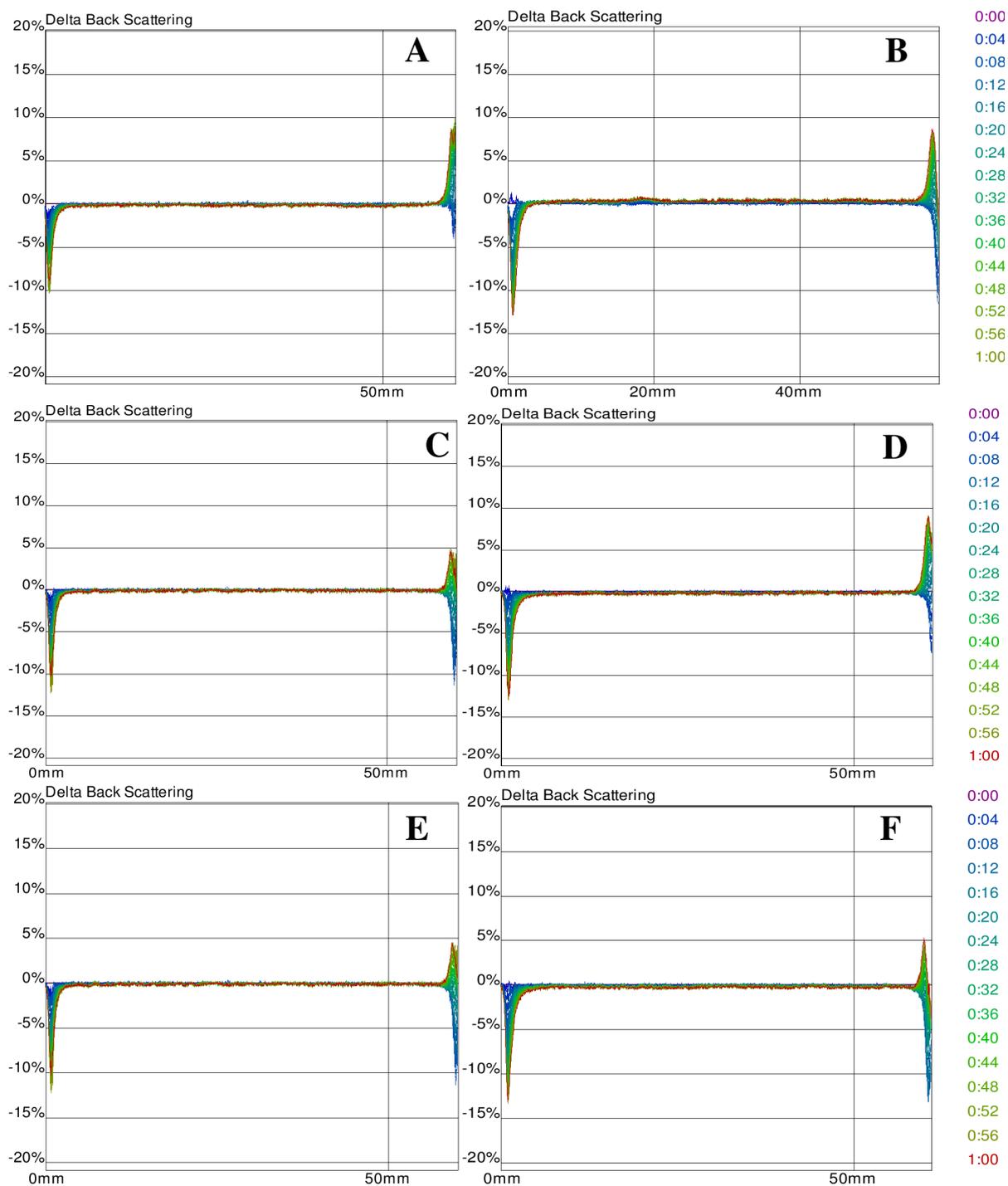


Figura 4.12. Perfiles de desestabilización de emulsiones 10% aceite a pH 7, preparadas mediante agitación en Waring Blender, seguida de un paso de sonicación de 75% AMP - 150 s (A, C y E) y 100% AMP – 100 s; a diferentes concentraciones (%p/p) de WPI: 1% (A, B), 1.5% (C, D) y 2% (E, F).

Por otra parte, la concentración de WPI inicial en la fase acuosa de los sistemas tratados a 75% AMP-150 s parece no haber tenido un efecto relevante en la estabilidad de los mismos frente al cremado (Fig. 4.13). En la bibliografía, muchos trabajos han reportado el uso de una relación Aceite:Proteína 10:1 en la formulación de emulsiones aceite en agua estabilizadas con proteínas del lactosuero (Taherian y col., 2011; Chee y col., 2005; Xu y col., 2013; Pongsawatmanit y col., 2006; Kuhn & Cunha, 2012).

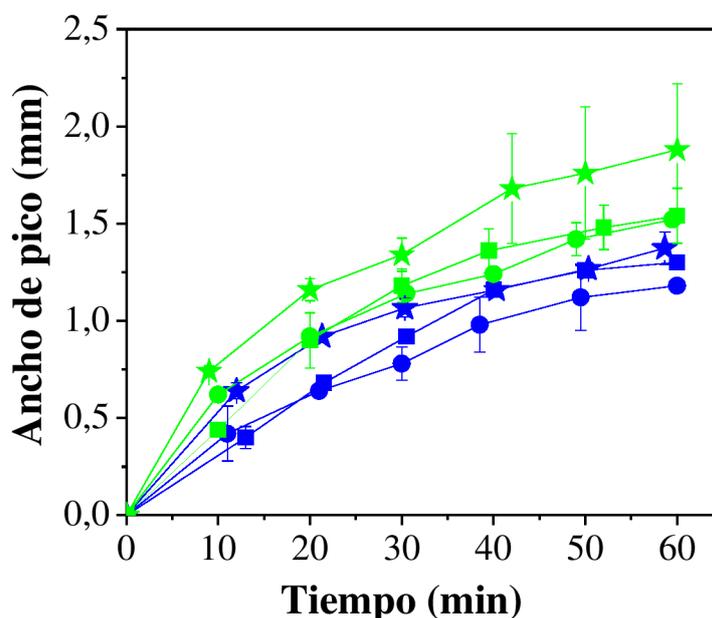


Figura 4.13. Efecto de las condiciones de sonicación y de la concentración de WPI sobre la desestabilización de emulsiones por cremado: 75%AMP-150 s (azul), 100%AMP-100s (verde); 1% WPI (cuadrado), 1,5% WPI (círculo), 2% WPI (estrella).

En este contexto, la concentración de WPI 1% podría ser suficiente para saturar la superficie interfacial creada durante la homogeneización de las emulsiones, dado que las mayores concentraciones de WPI (1,5% y 2%) no mejoraron la estabilidad frente al cremado ni parecen haber disminuido el tamaño de las gotas.

Por lo tanto, de los resultados de esta sección, se eligió la condición 75% AMP-150 s y la concentración inicial de WPI 1% para la producción de las emulsiones multicapa que se

evaluarán a continuación.

4.2.2. Efecto del pH y de la concentración de alginato de sodio

La formación de una bicapa polimérica alrededor de la gota de emulsión consiste en la obtención de una emulsión primaria, con la proteína estructurada en la interfase, seguida del agregado de un polisacárido de carga opuesta, de manera de promover interacciones electrostáticas atractivas entre los biopolímeros para formar una emulsión secundaria (McClements y col., 2007). Tal y como se discutió en la Sección I, tanto el pH como la relación WPI:AS influyen en la carga neta de los complejos proteína-polisacárido formados mediante interacciones electrostáticas. Sin embargo, estos estudios se realizaron en el seno de solución acuosa. Dado que la proteína sufre cambios conformacionales cuando migra y se estructura en la interfase aceite-agua, el comportamiento de interacción entre el WPI y el AS no sería el mismo que el observado en los estudios previos. Es por ello que en esta sección se estudiará la tanto la influencia del pH como de la concentración de AS en la formación de la bicapa interfacial alrededor de las gotas de emulsión por interacción electrostática WPI-AS. Tanto las concentraciones de AS como los valores de pH a ensayar fueron seleccionados de experiencias previas.

4.2.2.1. Distribución de tamaños de gota

En primer lugar, a las emulsiones se les realizaron mediciones de tamaños de gota en función del pH (7, 6, 5, 4) y de la concentración de alginato de sodio (0.125% - 0.25%) (Fig. 4.14). La distribución de tamaños de gota se determinó mediante dispersión de luz estática (también llamada difracción láser). El método de difracción láser utilizado por el equipo Malvern genera una distribución de tamaños de gota ponderada en volumen con la información recogida por los detectores, que puede ser luego transformada en una

distribución de tamaños de gota ponderada en número, mediante la aplicación de algoritmos específicos utilizados por el software del equipo. Para caracterizar las emulsiones, se utilizó el diámetro promedio ponderado en volumen (D_{43}) y el diámetro promedio ponderado en superficie (D_{32}), ambos parámetros derivados de la distribuciones de tamaños de gota. El D_{43} se utiliza de manera frecuente para la detección de gotas de gran tamaño, mientras que el D_{32} es más sensible a la presencia de gotas pequeñas, dado que estas últimas poseen una mayor área superficial.

En la Tabla 4.3 se presentan los valores de los parámetros característicos de la distribución en volumen (D_{43} , D_{32} , área superficial específica y polidispersidad) para cada uno de los sistemas evaluados.

Tabla 4.3. Diámetro de gota promedio ponderado en volumen D_{43} y en superficie D_{32} , índice de polidispersidad y área superficial específica (SSA) de emulsiones 10% aceite 1 % WPI preparadas con diferentes concentraciones de AS y a distintos pH.

Emulsión	D_{43} (μm)	Polidispersidad	D_{32} (μm)	SSA (m^2/g)
0,125% SA pH 7	$1,32 \pm 0,01^a$	$2,47 \pm 0,01^a$	$0,66 \pm 0,01^a$	$9,88 \pm 0,13^a$
0,125% SA pH 6	$1,31 \pm 0,02^a$	$2,39 \pm 0,15^a$	$0,67 \pm 0,02^a$	$9,80 \pm 0,28^a$
0,125% SA pH 5	$2,03 \pm 0,26^a$	$1,90 \pm 0,03^a$	$1,16 \pm 0,00^b$	$5,62 \pm 0,02^b$
0,125% SA pH 4	$29,29 \pm 2,13^b$	$15,42 \pm 0,16^b$	$2,86 \pm 0,05^c$	$2,28 \pm 0,04^c$
0,25% SA pH 7	$1,17 \pm 0,00^a$	$2,50 \pm 0,02^a$	$0,59 \pm 0,00^d$	$11,05 \pm 0,07^d$
0,25% SA pH 6	$1,47 \pm 0,02^a$	$2,31 \pm 0,05^a$	$0,75 \pm 0,00^e$	$8,65 \pm 0,01^e$
0,25% SA pH 5	$2,41 \pm 0,07^a$	$2,56 \pm 0,06^a$	$0,88 \pm 0,01^f$	$7,40 \pm 0,06^f$
0,25% SA pH 4	$13,66 \pm 2,09^c$	$10,79 \pm 1,36^c$	$1,20 \pm 0,04^b$	$5,45 \pm 0,18^b$

Las letras distintas representan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

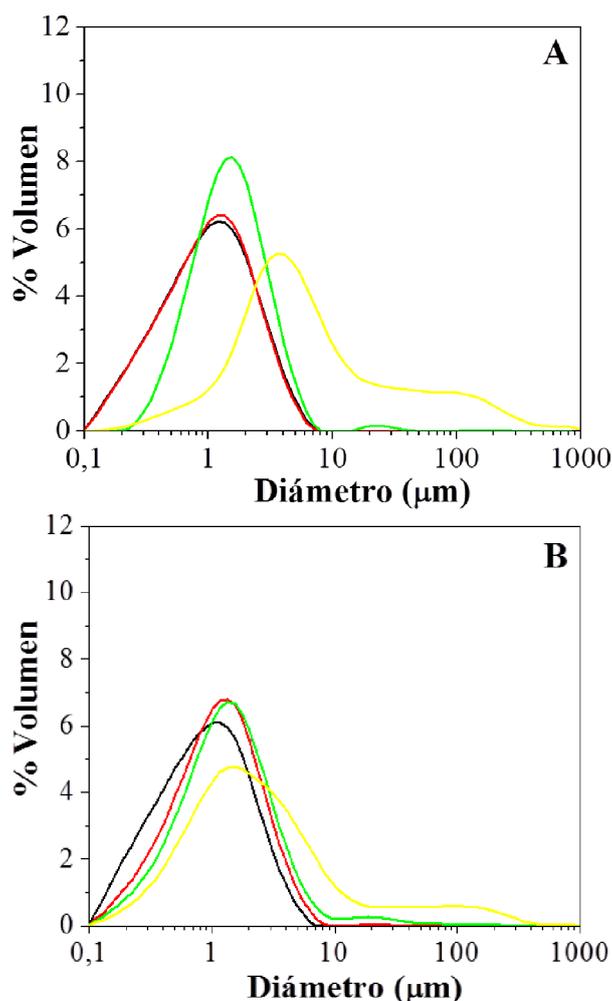


Figura 4.14. Influencia del pH (—7, —6, —5, —4) en la distribución de tamaños de gota de emulsiones 10% aceite 1% WPI conteniendo 0.125% AS (A) ó 0.25% AS (B).

Se observó que las emulsiones preparadas a pH 5, 6 y 7, para ambas concentraciones de AS, presentaron una distribución monomodal (Fig. 4.14), con valores de D_{43} en el rango de 1-2,5 μm (Tabla 4.3). Sin embargo, las emulsiones evaluadas a pH 4 exhibieron distribuciones de tamaño más polidispersas y, a diferencia de los sistemas anteriores, se observó la aparición un pico correspondiente a poblaciones de gotas de tamaños superiores a 100 μm . Este fenómeno también pudo evidenciarse a través de los valores de D_{43} y de polidispersidad, que fueron muy superiores a los de las emulsiones evaluadas a pH 5, 6 y 7.

Si se observan los valores de D_{32} – relacionados con la relación superficie/volumen de

las gotas – se puede notar que los sistemas preparados a pH 6 y 7 (a ambas concentraciones de AS) presentaron los menores diámetros y el mayor SSA (Tabla 4.3). A pH 5, se observó una disminución gradual del D_{32} , para ambas concentraciones de AS, que estaría relacionada con la aparición de un pequeño pico correspondiente a una población de gotas de mayores tamaños (Fig. 4.14). Finalmente, a pH 4 los sistemas mostraron los mayores valores de D_{32} , que evidencian la presencia de una menor SSA.

Teniendo en cuenta que la técnica empleada para medir distribuciones de tamaños de gota implicó realizar una dilución previa de los sistemas para lograr entrar en el rango de medición, el comportamiento de las emulsiones a pH 4 podría deberse a la existencia de un fenómeno de agregación de las gotas que no fue reversible frente a la dilución. Cabe destacar que a este valor de pH, los sistemas preparados con 0.125% AS presentaron una mayor polidispersidad, un mayor valor de D_{43} y una menor SSA que los preparados con 0.25% AS, lo que sugeriría que podrían estar formándose agregados de mayor tamaño que los correspondientes a los sistemas preparados con 0.25% AS.

4.2.2.2. Potencial Zeta

En segundo lugar, se realizaron medidas de potencial zeta para evaluar la deposición electrostática del polisacárido sobre la película interfacial proteica formada alrededor de las gotas de emulsión (Fig. 4.15).

Del análisis de la Fig. 4.15 se puede observar que la carga superficial de las gotas de emulsiones primarias (en ausencia de AS) fue de -70 y -11 mV a pH 7 y 5, respectivamente. Esta variación en el potencial zeta con la disminución del pH podría ser atribuida a la carga neta de las moléculas de WPI adsorbidas en la superficie de las gotas, la cual se aproximaría a valores cada vez más cercanos a la neutralidad en las proximidades del punto isoeléctrico de la proteína (5.2 - 4.7) (Pongsawatmanit y col., 2006).

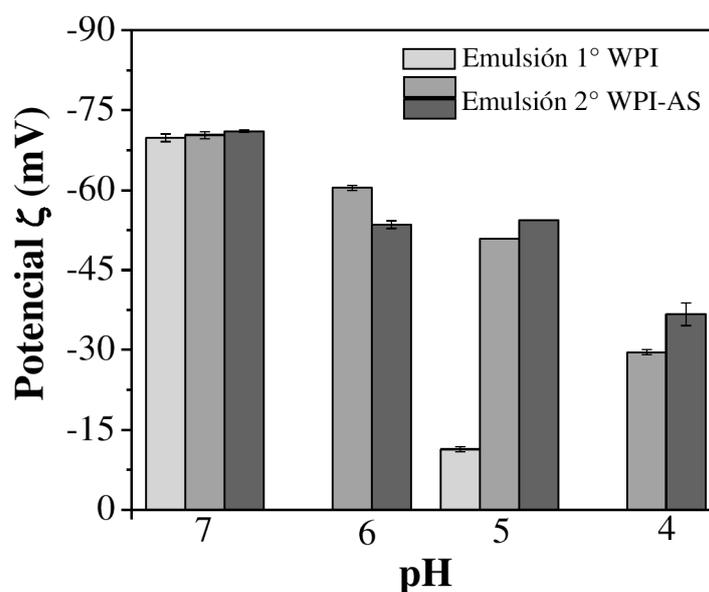


Figura 4.15. Efecto del pH sobre el potencial zeta de emulsiones primarias 10% aceite 1%WPI (gris claro); y de emulsiones secundarias 10% aceite 1% WPI conteniendo 0.125%AS (gris) y 0.25%AS (gris oscuro).

Por su parte, el potencial zeta de las emulsiones secundarias (interfase WPI-AS) varió desde -70 a -30 mV a medida que el pH descendió de 7 a 4. Tal y como se reporta en la literatura, la magnitud de las interacciones electrostáticas entre las moléculas de proteína y polisacárido depende tanto de la densidad como de la distribución de las cargas en cada uno de los biopolímeros, a un valor de pH determinado (Gu y col., 2005).

A pH 7, la carga neta superficial de las gotas de emulsiones primarias y secundarias fue la misma para todos los sistemas evaluados (-70 mV). Este fenómeno podría explicarse teniendo en cuenta que, a valores de pH cercanos a la neutralidad, tanto las moléculas de proteína como las de polisacárido poseen una densidad de carga neta negativa y se excluyen mutuamente por repulsión electrostática (Rodríguez Patino & Pilosof, 2011; Weinbreck, 2004). Por ello, dada la escasa interacción entre los biopolímeros en estas condiciones, las moléculas de AS no se adsorberían al film proteico estructurado en la interfase y la carga neta superficial de las gotas estaría gobernada por los restos aminoacídicos presentes en el WPI.

Sin embargo, a medida que el pH desciende y se acerca al punto isoelectrico de la proteína, la carga neta negativa del WPI disminuiría gradualmente y se aproximaría a cero. En estas condiciones, en la superficie proteica podrían exponerse segmentos o “patches” con carga positiva que podrían interactuar con los grupos con carga negativa presentes en las cadenas de AS (Jones & McClements, 2011; de Kruif y col., 2004).

En la Fig. 4.15 se observa que a pH 5, la carga neta superficial de las gotas de emulsiones secundarias (-51 y -54 mV) fue mucho mayor que la correspondiente a emulsiones primarias (-11 mV), lo que sugeriría la adsorción del polisacárido sobre el film interfacial proteico formado alrededor de las gotas de aceite. Este comportamiento podría ser atribuido a las interacciones electrostáticas que se promoverían entre los grupos carboxilo aniónicos presentes en las moléculas de AS y los clusters de aminoácidos con carga positiva expuestos en la superficie de la proteína, a valores de pH ligeramente mayores al punto isoelectrico del WPI.

A pH 4, se observa un comportamiento similar al descrito previamente. En estas condiciones, la proteína se encontraría por debajo de su punto isoelectrico y poseería una densidad de carga neta positiva (Pongsawatmanit y col., 2006). No obstante, las gotas de emulsiones secundarias presentaron un valor de potencial zeta negativo, aunque de menor magnitud que el correspondiente a pH 5. En este caso, también se evidenciaría la adsorción del polisacárido a la película interfacial proteica para formar una bicapa alrededor de las gotas de emulsión, promoviéndose una mayor neutralización de las cargas entre los biopolímeros, en comparación con los sistemas evaluados a pH 5, debido a la mayor densidad de patches positivos expuestos en la superficie de la proteína a pH 4. Esta mayor neutralización de cargas contribuiría al acercamiento de las gotas y a la formación de flóculos de mayor tamaño (Fig. 4.14).

Además, las emulsiones secundarias preparadas con 0.125% AS a pH 4 y 5,

presentaron un valor de potencial zeta ligeramente menor que el observado en los respectivos sistemas preparados con 0.25% AS (Fig. 4.15). Dado que en estas condiciones se evidenció la interacción electrostática entre el polisacárido y la proteína adsorbida en la interfase aceite-agua, este fenómeno podría atribuirse a una mayor neutralización de cargas en las emulsiones formuladas con 0.125% AS, promovida por la mayor relación proteína:polisacárido (8:1) presente en estos sistemas.

4.2.2.3. Biopolímeros no adsorbidos

La capacidad de las proteínas de formar una membrana interfacial que sea resistente a la ruptura juega un papel importante en la estabilización de las gotas de aceite contra la floculación y la coalescencia durante los almacenamientos a largo plazo (McClements, 2004). Sin embargo, las moléculas de biopolímeros que no se adsorben en la interfase aceite-agua y quedan remanentes en la fase continua podrían provocar (i) la formación de complejos proteína-polisacárido, cuya precipitación dependería del pH y formaría un coacervado (ii) la desestabilización de los sistemas, a través del mecanismo de floculación por depleción (Dickinson, 2010). De allí, la importancia de la determinación de la concentración de biopolímeros no adsorbidos (Fig. 4.16). Por un lado, en la Fig. 4.16 A se puede observar que, para ambas concentraciones de AS, la concentración de proteína soluble disminuye a medida que desciende el valor de pH de las emulsiones.

A pH 5, 6 y 7, la concentración de proteína en fase acuosa permaneció constante, y esta fracción representó aproximadamente un 20% de la concentración proteica inicial.

Además, a estos valores de pH no se observaron diferencias entre las emulsiones preparadas con distintas concentraciones iniciales de AS. Sin embargo, a pH 4, la concentración de proteína soluble disminuyó.

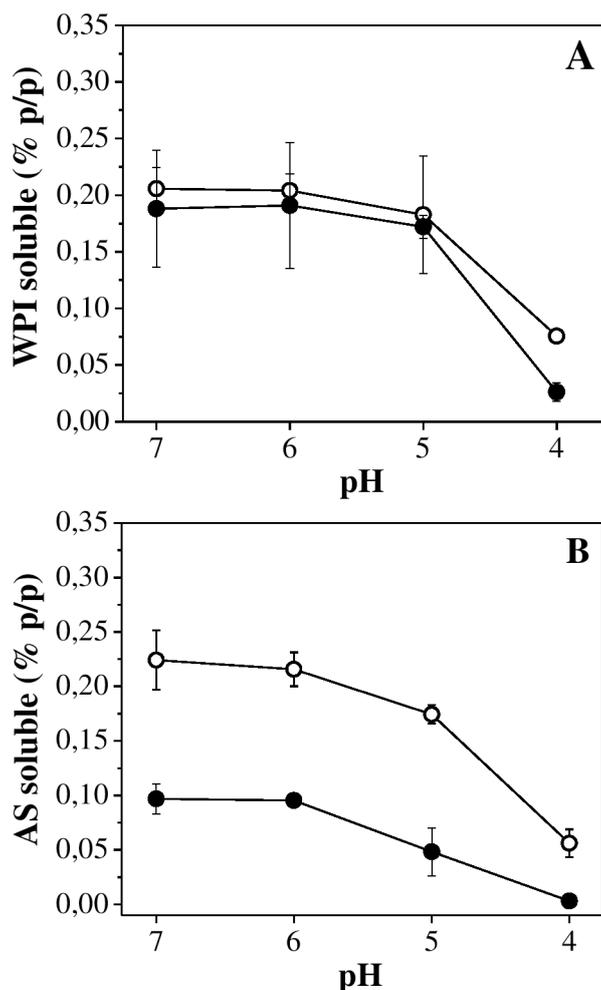


Figura 4.16. Efecto del pH sobre la concentración de WPI (A) y AS (B) no adsorbidos a la interfase aceite-agua, remanentes en la fase continua de emulsiones 10% aceite 1%WPI pH 5, conteniendo 0.125% AS (●) ó 0.25%AS (○).

Por su parte, la Fig. 4.16 B muestra las concentraciones de AS remanente en fase acuosa. Se observó que a los mayores valores de pH (6 y 7), la concentración de AS soluble se mantuvo constante y cercana a la concentración inicial del polisacárido en fase acuosa en cada uno de los sistemas evaluados, mientras que a valores de pH más bajos (4 y 5), la concentración de AS comenzó a disminuir. Cabe destacar que en las emulsiones formuladas a pH 5 y pH 4 se observó la formación de un precipitado en el fondo de los tubos sometidos a centrifugación, con excepción del sistema 0.25%AS pH 5, donde no tuvo lugar este fenómeno (datos no mostrados).

Por un lado, la cantidad de WPI adsorbida en la interfase aceite-agua estaría directamente relacionada con el método de preparación de las emulsiones y con la energía total aportada al sistema para generar el área interfacial (Jafari y col., 2008). Por otro lado, dado que a pH 6 y 7 la interacción entre los biopolímeros es escasa debido a las fuerzas de repulsión electrostática, la concentración de AS remanente en solución permanece cercana a la concentración inicial de polisacárido en fase acuosa, y la concentración de WPI soluble se mantiene constante. Sin embargo, a medida que el pH de la emulsión se acerca valores cercanos al punto isoeléctrico de la proteína, las moléculas de polisacárido cargadas negativamente comenzarían a interactuar con los patches positivos expuestos en la superficie proteica, tal y como se discutió anteriormente. De esta manera, podrían producirse dos fenómenos en simultáneo: (i) la deposición electrostática del polisacárido sobre la película de WPI adsorbida en la interfase para formar una bicapa alrededor de la gota de aceite y (ii) la formación de complejos electrostáticos entre las moléculas de WPI y AS remanentes en solución. Ambos fenómenos se verían más favorecidos a pH 4, ya que a este valor de pH la proteína poseería una mayor densidad de carga positiva, lo que promovería una mayor interacción con las moléculas de polisacárido. Además, los complejos proteína-polisacárido formados por la interacción de los biopolímeros en fase acuosa precipitarían al ser sometidos a la elevada fuerza centrífuga utilizada en la técnica para la determinación de AS y WPI no adsorbidos en la interfase, con la consecuente formación de un coacervado en el fondo del tubo (de Kruif y col., 2004). Esto contribuiría a la disminución de la concentración de WPI y de AS en la fase continua.

De particular interés, es el fenómeno que ocurre en el sistema 0.25% AS pH 5, donde no se observó la formación de coacervado luego de la centrifugación y, por lo tanto, la disminución de la concentración de polisacárido remanente en fase acuosa podría deberse exclusivamente a la deposición electrostática de las moléculas de AS sobre la película

interfacial proteica que rodea a las gotas de aceite, para formar una segunda capa biopolimérica.

Por otro lado, las emulsiones preparadas con 0.125% AS a pH 4 mostraron una mayor disminución del contenido proteico en fase acuosa respecto de las preparadas con 0.25% AS, lo que podría ser debido a la formación de una mayor cantidad de coacervado en estos sistemas, luego de la centrifugación. Este comportamiento podría explicarse teniendo en cuenta la relación inicial WPI:AS en las emulsiones preparadas. Dado que el sistema que contenía una concentración inicial de AS de 0.125% presentaba una mayor relación proteína:polisacárido (8:1) con respecto al sistema que contenía 0.25% AS (4:1), al disminuir el pH, en el primer caso se habría promovido una mayor neutralización entre las cargas de las moléculas de WPI y AS de los complejos electrostáticos formados en fase acuosa, lo que habría provocado la mayor formación de coacervado. Estos resultados son consistentes con los discutidos en la Sección I.

4.2.2.4. Estabilidad de emulsiones

La estabilidad de las emulsiones se analizó en el equipo Turbiscan cada 2 min durante las primeras 2 h, y luego se realizó una medida puntual a las 24 h.

En la Fig. 4.17 se presentan los perfiles de ΔT (%) y ΔBS (%) correspondientes a los sistemas preparados con 0.125% AS. En estas emulsiones, se observó que aquellas preparadas a pH 6 y 7, comenzaron a exhibir una separación de fases macroscópica en el transcurso de las primeras 2 horas de análisis, dado que en este periodo aparecieron picos en el perfil de Transmitancia (0-20 mm). Finalmente, a las 24 h, se observó una separación de fases completa. En estas condiciones, el límite entre la fase crema y el suero se observó a una altura de 50 mm a pH 7 (Fig. 4.17 A), y 48 mm a pH 6 (Fig. 4.17 B).

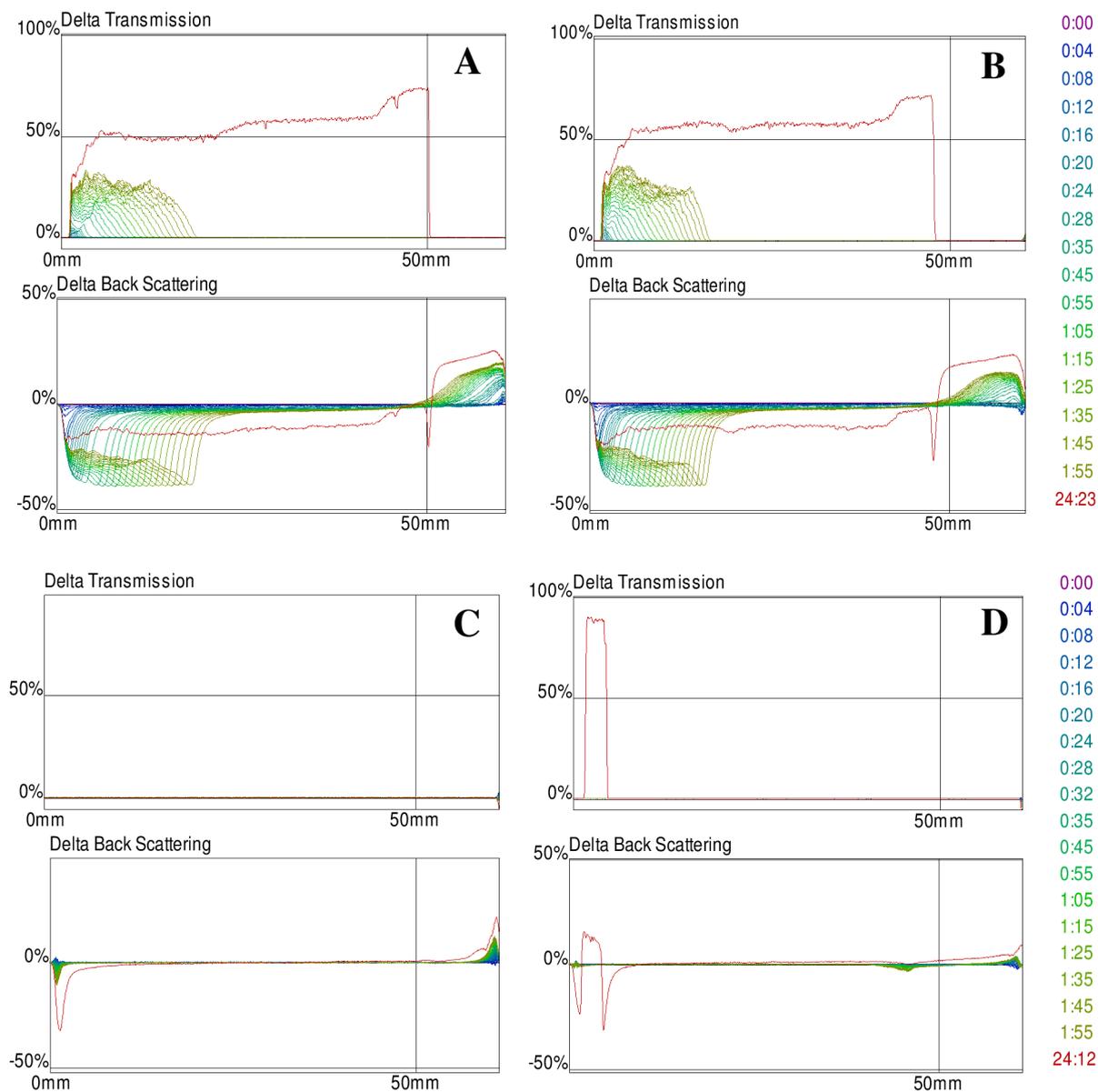


Fig. 4.17. Perfiles de desestabilización (Transmitancia y Backscattering) de emulsiones 10% aceite 1%WPI 0.125% AS a distintos valores de pH: 7 (A), 6 (B), 5 (C) y 4 (D). La curva roja corresponde a la última medición puntual realizada a las 24 h.

Por otro lado, a pH 5, las emulsiones fueron prácticamente estables al cremado durante las primeras 2 h de análisis, ya que en el perfil de Δ BS se observan picos pequeños tanto en el fondo (clarificación) como en la parte superior del tubo (crema). Además estos sistemas no presentaron una separación de fases macroscópica luego de las 24 h de análisis, ya que no se registraron picos de Transmitancia (Fig. 4.17 C).

Finalmente, las emulsiones a pH 4 fueron estables al cremado durante las primeras 2 hs, y luego presentaron una pequeña separación de fases a las 24 h de análisis (Fig. 4.17 D).

También se muestran los perfiles de desestabilización correspondientes a los sistemas conteniendo 0.25% AS (Fig. 4.18).

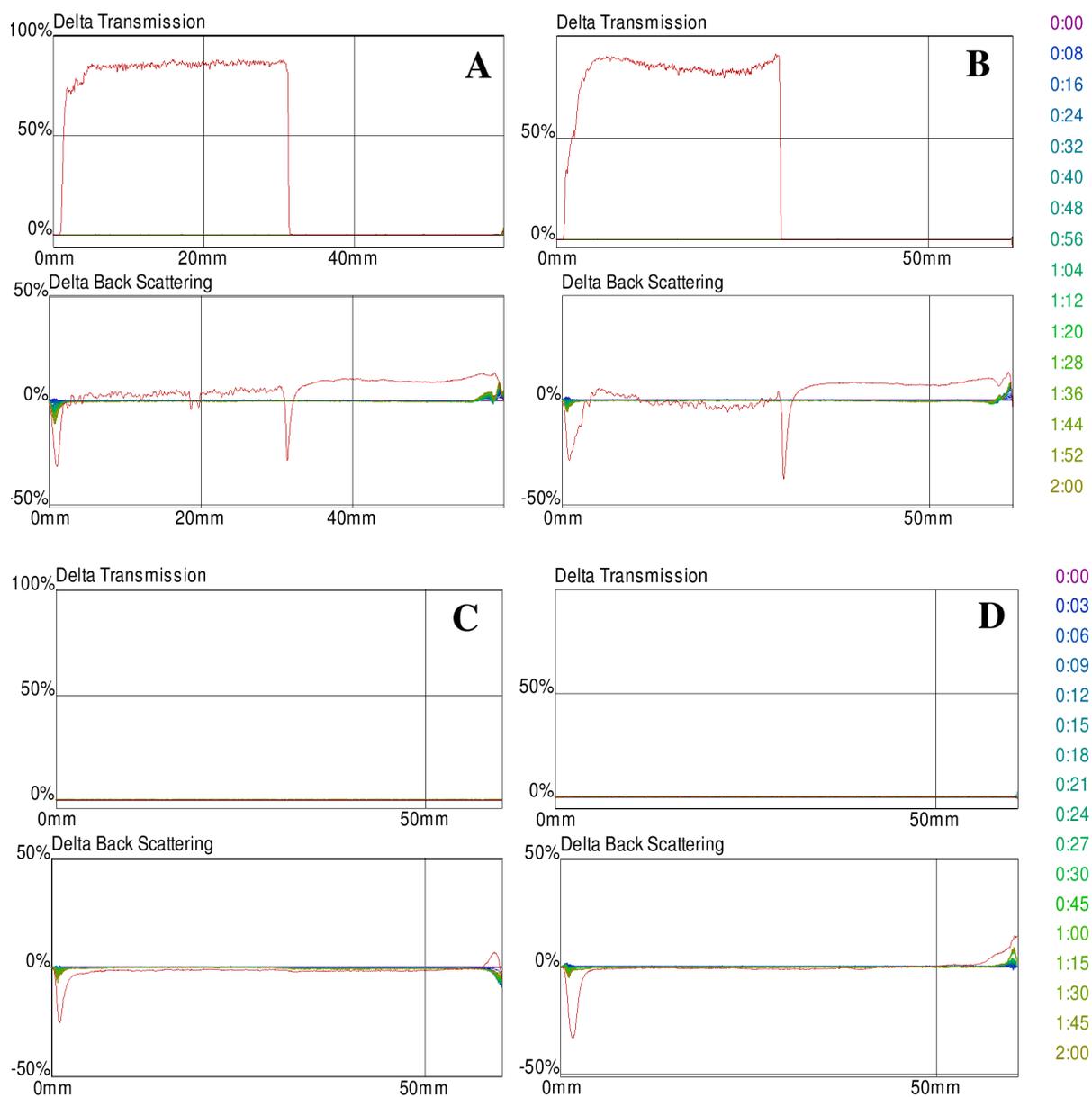


Fig. 4.18. Perfiles de desestabilización (Transmitancia y Backscattering) de emulsiones 10% aceite 1%WPI 0.25% AS a distintos valores de pH: 7 (A), 6 (B), 5 (C) y 4 (D). La curva roja corresponde a la última medición puntual realizada a las 24 h.

Las Fig. 4.18 A y B muestran el comportamiento de las emulsiones preparadas a pH 7 y pH 6, respectivamente. A diferencia de los sistemas preparados con 0.125% AS, estas emulsiones fueron estables al cremado durante las primeras 2 h de análisis y sólo se evidenció la separación de fases macroscópica a las 24 hs de medición.

Por su parte, las emulsiones preparadas con 0.25% AS a y pH 4 y pH 5, no presentaron una separación de fases, siendo la última, la más estable frente a cremado (Fig. 4.18 C y D).

Desestabilización por floculación y/o coalescencia

La estabilidad de las emulsiones frente a la floculación/coalescencia se evaluó analizando los perfiles de retrodispersión de luz ($\Delta\%BS$) presentados en las Fig. 4.17 y 4.18. De estos perfiles, se calculó para cada sistema el valor promedio del ΔBS (%) en la zona media de los tubos (20-35 mm) para cada tiempo, tal y como se describió en la sección Materiales y Métodos.

La Fig. 4.19 muestra la evolución del valor promedio del ΔBS (%) en función del tiempo, como una medida de la variación del tamaño de gota promovida por fenómenos de floculación/coalescencia durante la primera hora de medición. La intensidad de luz retrodispersada se relaciona con la cantidad de gotas presentes en la emulsión. En nuestro caso, una reducción del ΔBS (%) representaría una disminución del número de gotas presentes en la emulsión, promovida por un aumento del tamaño de las partículas, ya sea por floculación o coalescencia. La coalescencia es un proceso irreversible ya que implica la ruptura de la película interfacial para dar lugar a la fusión de dos gotas de emulsión. Mientras que la floculación es un proceso que conduce a la agregación de las gotas para formar flóculos, pero manteniendo la integridad de la membrana interfacial que las rodea (McClements, 1999). Ambos fenómenos conducen a un incremento del tamaño de partícula,

que puede ser registrado por el Turbiscan. Sin embargo, el equipo no es capaz de discriminar a cuál de estos dos mecanismos de desestabilización corresponde el aumento del tamaño de gota.

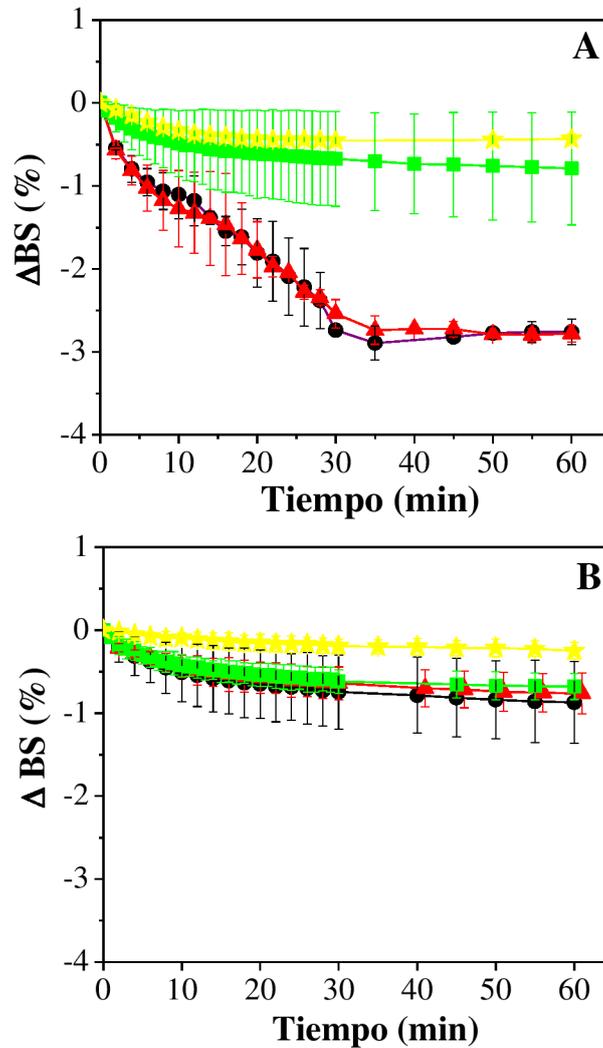


Figura 4.19. Efecto del pH (\bullet 7, \blacktriangle 6, \blacksquare 5, \star 4) sobre los perfiles de luz retrodispersada (ΔBS) de emulsiones 10% aceite 1% WPI conteniendo 0.125% AS (A) ó 0.25% AS (B), como una medida de la variación del tamaño de gota promedio. Los valores promedio para cada sistema fueron calculados en la zona media del tubo (de 25mm a 35mm).

Cabe destacar que la centrifugación de las emulsiones no produjo liberación de aceite (coalescencia) en la superficie de la fase crema, resaltando las excelentes propiedades

funcionales de las proteínas lácteas para formar una película interfacial suficientemente elástica y con buenas propiedades mecánicas. Es por ello que las variaciones en el tamaño de gota que se presentan en la Fig.4.19 podrían atribuirse exclusivamente a fenómenos de floculación.

En la Fig. 4.19 A se puede observar que los sistemas preparados con 0.125%AS a pH 6 y 7 mostraron un marcado descenso del $\Delta\%BS$, indicando un incremento en el tamaño de gota; mientras que en los sistemas evaluados a pH 4 y 5, el ΔBS (%) permaneció constante, lo que sugeriría que el tamaño de gota no varió.

Por su parte, las emulsiones preparadas con 0.25% AS (Fig. 4.19 B) presentaron un comportamiento similar al anterior para pH 4 y 5. Sin embargo, a pH 6 y 7, la disminución del $\Delta\%BS$ no fue tan notoria como en los sistemas preparados con 0.125% AS, indicando una leve variación en el tamaño de gota.

En las micrografías presentadas en la Fig. 4.20, puede observarse claramente la formación de cadenas de flóculos en los sistemas estudiados a pH 6 y 7, a ambas concentraciones de AS. Como se discutió anteriormente, a valores de pH cercanos a la neutralidad, tanto la proteína como el polisacárido presentan una densidad de carga neta negativa y existe una repulsión electrostática entre ellos. Varios autores sugieren que la presencia de moléculas poliméricas no adsorbidas a la membrana interfacial, promoverían un incremento de las fuerzas de atracción entre las gotas de emulsión a través de un proceso osmótico asociado a la exclusión del polímero de la región comprendida entre dos gotas muy próximas entre sí (McClements, 1999; Guzey y col., 2006; Radford & Dickinson, 2004). Este fenómeno se denomina floculación por depleción y aceleraría la destabilización de los sistemas, a través de la formación de flóculos que poseerían un tamaño mayor al de las gotas de emulsión aisladas.

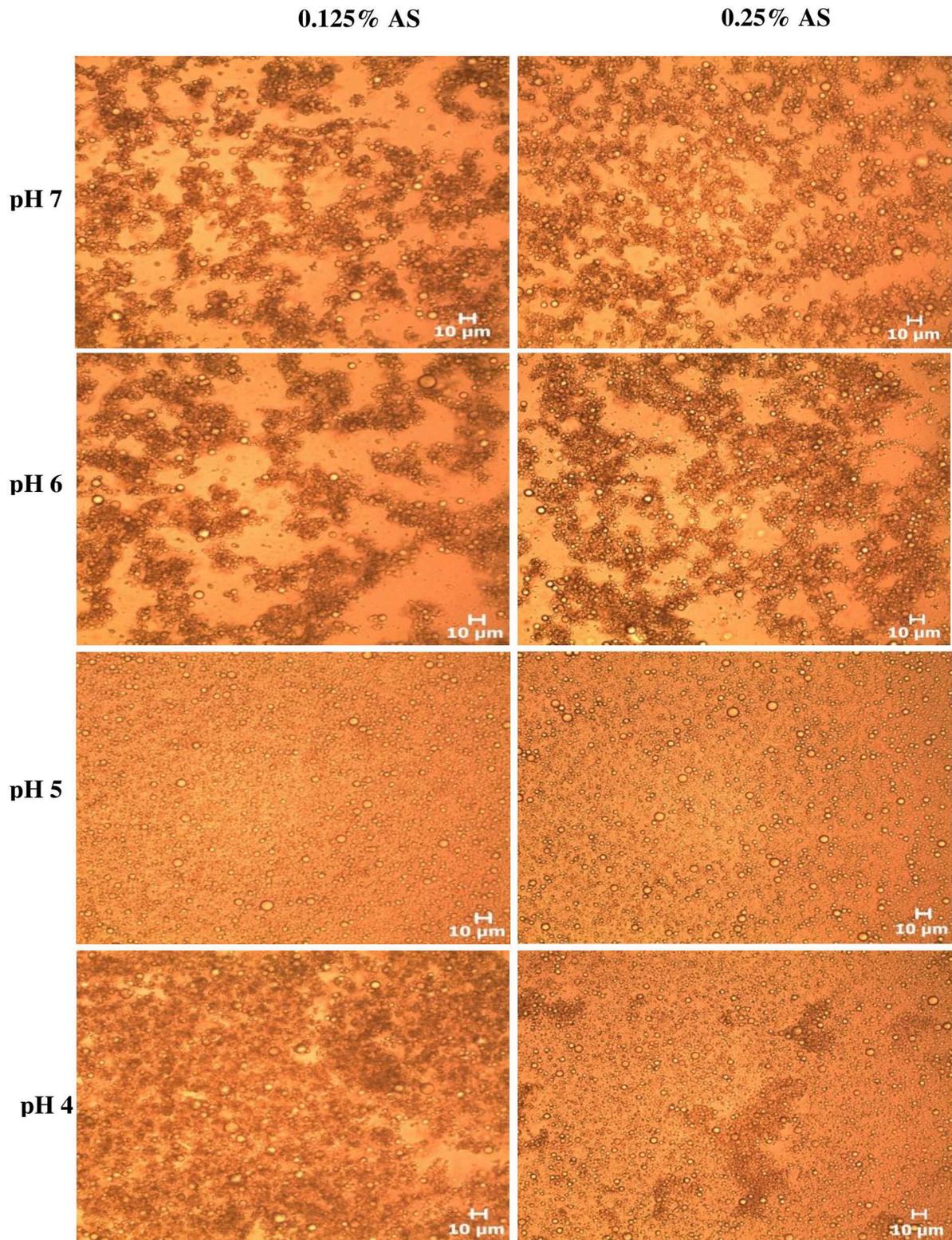


Figura 4.20. Efecto del pH y de la concentración de AS en la microestructura de emulsiones 10% aceite 1% WPI.

Si realizamos un análisis teniendo en cuenta los potenciales de interacción teóricos,

las cadenas de flóculos observadas a pH 7 (Fig. 4.20) estarían indicando que el U_{TOTAL} (Ec. 1.15) entre las gotas de emulsión resultó siendo atractivo. En estas condiciones, las moléculas de polisacárido que no se adsorbieron en la interfase proteica y quedaron remanentes en la fase continua (Fig. 4.16) podrían haber generado un U_{DEP} (Ec. 1.13) entre las gotas de emulsión. En consecuencia, la diferencia de presión osmótica, que constituye la principal fuerza motriz de este potencial, habría favorecido el movimiento del solvente desde la zona de exclusión del polisacárido hacia el seno de la solución, promoviendo así el acercamiento de las gotas. Además, dado que a distancias cortas el efecto atractivo del U_{VDW} (Ec. 1.6) predominaría sobre el efecto repulsivo del U_{ELECT} (Ec. 1.7), se generaría un U_{TOTAL} netamente atractivo que sería el responsable del estado de agregación de las gotas. Sin embargo, también se debería considerar la contribución repulsiva del U_{STERIC} (Ec. 1.9) que prevalecería sobre el U_{VDW} a distancias muy cortas ($h \ll \delta$), preservando así la integridad de la membrana interfacial y evitando la desestabilización del sistema por coalescencia.

El comportamiento de las emulsiones a pH 6, para ambas concentraciones de AS, podría analizarse de modo similar. En este caso, al disminuir el pH, la repulsión electrostática entre las gotas sería menor que la observada a pH 7, debido a la disminución del potencial zeta en estos sistemas (Fig. 4.15); y además, seguiría existiendo un U_{DEP} (Ec. 1.13) atractivo, ya que la concentración de biopolímeros no adsorbidos remanentes en fase acuosa fue similar a la observada a pH 7 (Fig. 4.16). Por lo tanto, el U_{TOTAL} (Ec. 1.15) seguiría siendo atractivo y las gotas de emulsión continuarían floculadas.

Muchos autores afirman que una mayor concentración de polisacárido no adsorbido en la interfase promovería un mayor grado de floclación por depleción (McClements, 2000; Perrechil & Cunha, 2013). Sin embargo, las emulsiones preparadas con 0.25% AS podrían presentar una velocidad de floclación más lenta que la correspondiente al sistema con 0.125% AS (Fig. 4.19), dado el incremento de la viscosidad de la fase continua con el

aumento de la concentración del polisacárido (Manoj y col., 1998).

Por su parte, en los sistemas evaluados a pH 5 (a ambas concentraciones de AS) no se evidenció la formación de flóculos, y las gotas de emulsión permanecieron separadas unas de otras (Fig. 4.20). A diferencia de los sistemas anteriores, la estabilidad de estas emulsiones estaría gobernada por la existencia de un U_{TOTAL} repulsivo entre las gotas (Ec. 1.15). Por un lado, en estos sistemas, la contribución repulsiva debida al U_{ELECT} (Ec. 1.7) sería menor que la observada a pH 7, debido a la disminución del potencial zeta con el descenso del pH (Fig. 4.15). Sin embargo, a pH 5 se pudo comprobar la adsorción del polisacárido a la interfase proteica para formar una bicapa alrededor de la gota de emulsión y este fenómeno conllevaría a (i) una disminución de la concentración de AS en la fase continua (Fig. 4.16), lo que disminuiría la magnitud atractiva del U_{DEP} (Ec. 1.13), y (ii) un aumento del espesor de la capa interfacial (δ), que promovería un incremento del U_{STERIC} de repulsión (Ec. 1.9), tanto a nivel de la contribución de mezcla (U_{mix}) como de la elástica ($U_{elastic}$). Además, este U_{STERIC} de mayor magnitud probablemente predominaría sobre el U_{VDW} atractivo (Ec. 1.6) a distancias cortas entre las gotas. En este sentido, las contribuciones repulsivas predominarían sobre las contribuciones atractivas, generando un U_{TOTAL} repulsivo, favoreciendo la estabilidad de las emulsiones.

Un aspecto interesante para evaluar es el comportamiento observado en las emulsiones a pH 4, ya que mostraron una estructura microscópica diferente dependiendo de la concentración de AS utilizada (Fig. 4.20). Por un lado, los sistemas preparados con 0.125% AS presentaron una estructura donde las gotas de emulsión estaban completamente floculadas, formando un entramado o red de flóculos (que se diferencia de las cadenas de flóculos observadas a pH 6 y 7), indicando que el U_{TOTAL} (Ec. 1.15) originado entre las gotas fue de carácter atractivo (Fig. 4.20). En estos sistemas el U_{ELECT} (Ec. 1.7) se vería aún más disminuido que a pH 5, debido a la mayor neutralización de las cargas entre los biopolímeros

acomplejados en la interfase aceite-agua (Fig. 4.15). La Fig. 4.16 muestra que prácticamente no quedó polisacárido soluble en la fase acuosa. Sin embargo, dado que la centrifugación de estos sistemas produjo un coacervado, los complejos proteína-polisacárido formados en la fase continua, probablemente, podrían haber inducido un U_{DEP} atractivo entre las gotas, ya que se comportarían como especies no adsorbidas a la interfase (McClements, 1999). Además, si las moléculas de AS disponibles no fueran suficientes para saturar completamente la interfase proteica (i) el δ sería menor que el observado a pH 5 y, por lo tanto, la contribución repulsiva del U_{STERIC} (Ec. 1.9) se vería disminuida, y (ii) se promovería el fenómeno de floculación por “puentes” (o bridging), donde una única molécula de polisacárido se adsorbería a la superficie de dos gotas de emulsión (Gu y col., 2005; Dickinson, 2011), lo que aproximaría las gotas a distancias más cortas, y la contribución atractiva del U_{VDW} (Ec. 1.6) cobraría importancia. En consecuencia, el U_{TOTAL} originado por la suma de todas estas contribuciones sería de carácter atractivo.

Por otro lado, en las micrografías de los sistemas preparados con 0.25% AS a pH 4 (Fig. 4.20) se observa la presencia de algunos flóculos aislados que coexisten con una población de gotas de emulsión no floculadas. Esta disminución en el grado de agregación de las gotas, producida por el aumento de la concentración del polisacárido, podría atribuirse a una mayor cantidad de moléculas de AS adsorbidas en la interfase proteica, lo que promovería una mayor repulsión tanto electrostática (Fig. 4.15) como estérica entre las gotas de emulsión. En este último sistema, el análisis de las contribuciones individuales de los distintos potenciales de interacción entre las gotas resultaría más complejo debido a la coexistencia de gotas agregadas en pequeños flóculos y de gotas no floculadas.

Desestabilización por cremado

Para cada emulsión se determinó un índice de cremado a los 7 días de análisis, como un parámetro de la estabilidad global de los sistemas en un intervalo de tiempo prolongado. Estos valores se representan en la Fig. 4.21, donde se observa que las emulsiones evaluadas a pH 6 y 7 fueron las más inestables al cremado, independientemente de la concentración de AS, mientras que las evaluadas a pH 5 fueron las más estables.

En la Tabla 4.4 se presentan los tiempos de retardo (t_R) para cada sistema, que corresponden al período de latencia que precede al comienzo de la separación de fases (Lizarraga y col., 2008). Este parámetro se relaciona con el grado de floculación de las emulsiones y muchos autores sugieren que el t_R aumenta con el incremento de la concentración de polímeros no adsorbidos presentes en la fase continua, (Parker y col., 1995; Santiago y col., 2002; Lizarraga y col., 2008).

Tabla 4.4. Efecto de la concentración de AS y del pH en los tiempos de retardo (t_R) de emulsiones 10% aceite 1% WPI.

Emulsión	Tiempo de retardo (t_R) (h)
0,125 % AS pH 7	0.28
0,125 % AS pH 6	0.26
0,125 % AS pH 5	Estable
0,125 % AS pH 4	2
0,25 % AS pH 7	$24 > t_R > 2$
0,25 % AS pH 6	$24 > t_R > 2$
0,25 % AS pH 5	Estable
0,25 % AS pH 4	Estable

En primer lugar, las emulsiones preparadas a pH 6 y 7 con 0.125% AS exhibieron un mayor índice de cremado (Fig. 4.21 A) y un menor t_R (Tabla 4.4) que aquellas preparadas con

0.25%AS. Además, en la Fig. 4.21 B se observa que los sistemas preparados con 0.25% AS presentaron un suero remanente totalmente claro y límpido, mientras que los que contenían una menor concentración del polisacárido mostraron un suero turbio blanquecino.

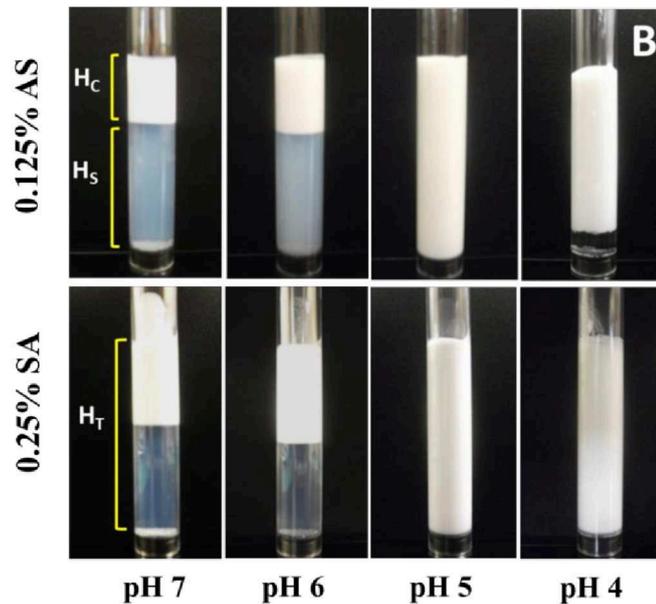
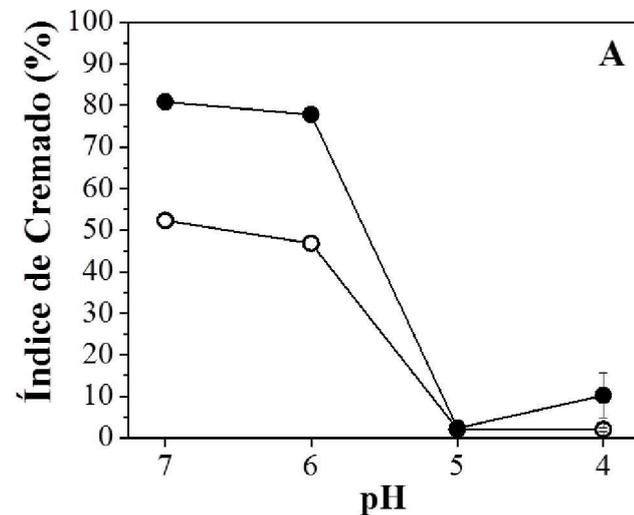


Figura 4.21. (A) Efecto de la concentración de AS (● 0.125%, ○ 0.25%) y del pH sobre el índice de cremado de emulsiones 10% aceite 1% WPI, luego de un período de 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente. (B) Apariencia visual de las emulsiones analizadas en (A).

Estos resultados son consistentes con los reportados por Manoj y col. (1998), donde se observó un comportamiento similar al aumentar la concentración de polisacárido en la fase continua de emulsiones O/W de hexadecano.

La concentración correspondiente a 0.125% AS podría no ser suficiente para flocular completamente las gotas a estos valores de pH y, en estas condiciones, coexistirían dos fases en los sistemas: una fracción de gotas floculadas y un grupo de gotas no floculadas. Estas últimas serían las responsables de la turbidez exhibida en la fase suero, ya que las gotas individuales cremarían más lentamente que la fracción de gotas floculadas. Por lo tanto, el color turbio del suero en estos sistemas se debería a la presencia de gotas de emulsión no floculadas en suspensión.

Por otro lado, las emulsiones preparadas con la mayor concentración de AS estarían completamente floculadas. En estos sistemas, se promovería la formación de una estructura floculada más expandida que en el caso anterior, debido al alto grado de floculación. Estos flóculos formarían una red estructurada con canales internos por donde difundiría la fase continua. En este caso, la naturaleza más viscosa de la fase continua, dada por el aumento en la concentración de AS, podría contribuir a la reducción de la velocidad de floculación, incrementando así el t_R en estos sistemas (Tabla 4.4).

Sin embargo, transcurrido ese periodo de latencia, el cremado ocurriría rápidamente luego del repentino colapso de esa estructura floculada, dando lugar a un suero remanente claro y transparente debido a la ausencia de gotas de emulsión residuales (Manoj y col., 1998).

El espesor de la fase crema (H_C) también estuvo relacionado con la concentración de polisacárido con la que se prepararon los sistemas a pH 6 y 7 (Fig. 4.21 B). A mayores concentraciones de AS se obtuvieron cremas con un espesor mayor. Esto podría deberse a que el polisacárido aumentaría la resistencia a la compresión de la estructura floculada,

obteniéndose cremas más compactas a las menores concentraciones de AS.

En segundo lugar, las emulsiones preparadas a pH 5 (a ambas concentraciones de AS) fueron las más estables y no se evidenció la separación de fases luego de 7 días de análisis. Lo mismo ocurrió con el sistema preparado a pH 4 con 0.25% AS. No obstante, la emulsión preparada a pH 4 con 0.125% AS presentó una pequeña separación de fases, con un suero remanente claro y límpido, lo que estaría dando un indicio de que el sistema se encontraba completamente floculado. Estos resultados son consistentes con los observados anteriormente en las micrografías, donde se evidenció la existencia de una emulsión altamente floculada (Fig. 4.20). A pH 4, el principal obstáculo para el cremado podría haber sido la formación de una estructura tipo gel de flóculos interconectados entre sí (Meller & Stavans, 1996). El colapso de esta estructura, una vez transcurrido el tiempo de retardo, habría llevado a la separación de fases.

De los resultados de este apartado, las emulsiones 10% aceite 1% WPI 0.25% AS pH 5 fueron seleccionadas para continuar con los estudios para el diseño de un sistema de encapsulación, ya que fueron las más estables que se obtuvieron. En particular, no presentaron fenómenos de floculación ni coalescencia y, además, no se evidenció la formación de coacervado cuando las emulsiones fueron sometidas a centrifugación.

4.2.3. Efecto de la concentración de MDX y de la temperatura de congelamiento

Una vez seleccionadas las mejores condiciones para producir emulsiones multicapa estables (10% aceite 1% WPI 0.25% AS pH 5), se decidió agregar a la formulación MDX, un polisacárido neutro, para evaluar su efecto crioprotector durante la etapa de congelamiento previa al paso de liofilización. Para ello, se partió de soluciones acuosas mixtas WPI/MDX que se mezclaron con la fase oleosa durante los pasos de homogeneización (Blender +

Sonicador) para la obtención de la emulsión primaria. Dado que la MDX es un polisacárido neutro y no posee actividad superficial, se considera que no migra a la interfase aceite-agua, sino que permanece en la fase acuosa. Luego de la obtención de la emulsión primaria (monocapa de WPI) conteniendo MDX, se agregó el AS y se bajó el pH a 5 para promover las interacciones electrostáticas WPI-AS, tal y como se describió en la sección Materiales y Métodos.

En este apartado, se evaluará la influencia de la concentración de MDX y de la temperatura de congelamiento sobre la estabilidad de las emulsiones multicapa.

4.2.3.1. Efecto de la concentración de MDX

Distribución de tamaños de gota

Las distribuciones de tamaños de gota de las emulsiones conteniendo diferentes concentraciones de MDX se presentan en la Fig. 4.22, mientras que en la Tabla 4.5 se muestran los parámetros correspondientes a estas distribuciones.

Del análisis de los tamaños de gota ponderados en volumen (Fig. 4.22 A) se puede observar que los sistemas con 0 y 10% de MDX exhibieron una población principal con tamaños alrededor de 1 μm .

La misma tendencia fue observada para las emulsiones con 15 y 20% MDX, donde el pico correspondiente a la población principal de gotas presentó un desplazamiento hacia la izquierda (menores tamaños de gota), y cuyo máximo se ubicó alrededor de 1.02 y 0.45 μm , respectivamente.

El D_{43} de las emulsiones no mostró una tendencia clara cuando se compararon los sistemas con diferentes concentraciones de MDX (Tabla 4.5). Sin embargo, dado que este parámetro representa un promedio de los tamaños de gota presentes en una emulsión en particular, no resulta adecuado para describir el comportamiento de sistemas que no son

monomodales.

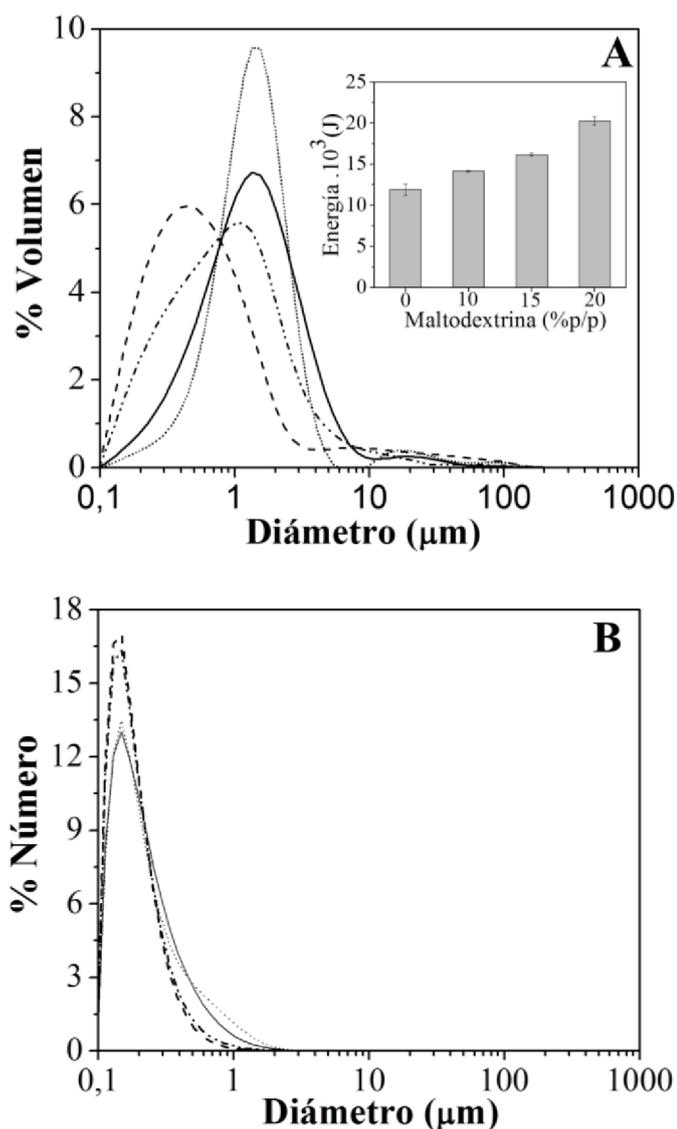


Figura 4.22. Efecto de la concentración de MDX (0% —, 10% ····, 15% -·-·-·, 20% ----) en la distribución de tamaños de gota ponderada en volumen (A) y en número (B) de emulsiones 10% aceite 1% WPI 0.25% AS pH 5.

Por su parte, las emulsiones con 20% MDX resultaron ser los sistemas más polidispersos, tal y como lo refleja el índice de polidispersidad en la Tabla 4.5. Además, se observó que la adición de MDX a partir de 15% produjo un incremento gradual del SSA (Tabla 4.5). Estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta el procesador ultrasónico utilizado para la preparación de emulsiones primarias fue diseñado para entregar una

amplitud de onda constante.

Tabla 4.5. Diámetro de gota promedio ponderado en volumen (D_{43}) y en superficie (D_{32}), índice de polidispersidad, y área superficial específica (SSA) de emulsiones 10% aceite 1% WPI 0.25% AS pH 5 preparadas con diferentes concentraciones MDX.

MDX (%p/p)	$D_{4,3}$ (μm)	Polidispersidad	$D_{3,2}$ (μm)	SSA (m^2/g)
0	2.41 ± 0.07^a	2.56 ± 0.06^a	0.88 ± 0.01^a	7.40 ± 0.06^a
10	2.78 ± 0.07^b	1.67 ± 0.07^b	1.04 ± 0.07^b	6.28 ± 0.42^b
15	1.96 ± 0.86^a	3.30 ± 0.20^c	0.52 ± 0.05^c	11.60 ± 0.99^c
20	$2.68 \pm 0.39^{a,b}$	4.73 ± 1.94^c	0.42 ± 0.02^d	15.65 ± 0.64^d

Las letras distintas representan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$)

En este sentido, cuanto mayor sea la resistencia al movimiento de la sonda debido al aumento de viscosidad del medio, mayor será la potencia entregada al sistema para mantener la amplitud de la onda ultrasónica constante (Fig. 4.22 A inserto). En consecuencia, durante la etapa de sonicación se estaría entregando una mayor cantidad de energía a los sistemas con mayores concentraciones de MDX. Este exceso de energía promovería la generación de una mayor SSA (Tabla 4.5) que derivaría en la producción de tamaños de gota más pequeños, tal y como se refleja en el D_{32} (Tabla 4.5), favoreciendo la estabilidad de los sistemas preparados con 15% y 20% de MDX. Klinkesorn y col., 2004 encontraron que la adición de 10% de MDX (DE 15) a emulsiones de aceite de girasol estabilizadas con Tween-80, no era suficiente para aumentar considerablemente la viscosidad relativa de estos sistemas. Teniendo esto en cuenta, podría sugerirse que esta podría ser una de las razones por la cual las emulsiones conteniendo 0% y 10% de MDX presentaron tamaños de gota similares (Fig. 4.22 A, Tabla 4.5).

Cuando la distribución de tamaños de gota en volumen se transformó a una

distribución en número, apareció un patrón monomodal para cada sistema evaluado (Fig. 4.22 B). A pesar de que la conversión de una distribución ponderada en volumen a una ponderada en número supone una magnificación del error inherente a la técnica de medición, aún sirve para comparar la importancia relativa de las distintas poblaciones de gota en la población total. Con este criterio de análisis, se encontró que la población principal de gotas observada en la Fig. 4.22 B correspondía a tamaños pequeños ($<1\mu\text{m}$), con un máximo alrededor de $0.15\ \mu\text{m}$ para todas las emulsiones. Cabe destacar que las distribuciones de tamaño ponderadas en número se encuentran desplazadas hacia la izquierda respecto de las ponderadas en volumen. Esto ocurre porque cuando se calculan los diámetros ponderados en número, las partículas pequeñas son las que cobran mayor importancia, mientras que para diámetros ponderados en volumen, las partículas más grandes adquieren relevancia ya que se relacionan con el d^3 .

En la Fig. 4.22 B también se puede apreciar un mayor número de gotas de tamaños pequeños en las emulsiones con 15% y 20% de MDX, lo cual es consistente con la mayor SSA creada en estos sistemas (Tabla 4.4).

Potencial zeta

Se realizaron medidas de potencial zeta para evaluar el efecto del agregado de MDX sobre la deposición electrostática de las moléculas de AS sobre el film interfacial proteico alrededor de las gotas de emulsión preparadas con 10% aceite y 1% WPI (Fig. 4.23).

Tal y como se demostró anteriormente, en ausencia de MDX, el valor del potencial zeta de las emulsiones secundarias (-54 mV) fue más negativo que el observado para emulsiones primarias (-11 mV), lo que estaría indicando la adsorción del AS a las moléculas de WPI estructuradas en la interfase aceite-agua. El agregado de 10% de MDX a las emulsiones produjo una disminución del valor absoluto del potencial zeta ($|\zeta|$) hasta un valor

de -33.5 mV, lo que sugeriría que un menor número de moléculas de AS se habrían adsorbido a la interfase proteica alrededor de la gota (Pongsawatmanit y col., 2006).

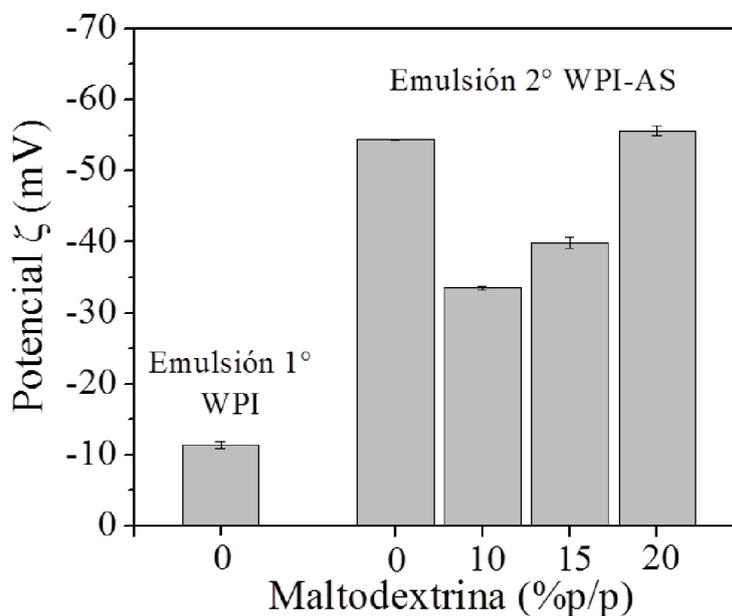


Figura 4.23. Efecto de la concentración de MDX sobre el potencial zeta de emulsiones 10% aceite 1% WPI pH 5, conteniendo 0% AS (emulsión primaria) y 0.25% AS (emulsión secundaria).

Sin embargo, resulta interesante observar que a mayores concentraciones de MDX, el potencial zeta volvió a ser gradualmente más negativo, hasta alcanzar un valor de -55 mV en los sistemas conteniendo 20% MDX, similar al observado para emulsiones sin MDX. A pesar de que este comportamiento pueda parecer contradictorio, una posible explicación para este fenómeno podría estar relacionada con la incompatibilidad termodinámica entre las moléculas de AS y de MDX en la fase continua, cuando su concentración supera un nivel crítico (Tolstoguzov, 2006). Por un lado, el AS es una macromolécula de alto peso molecular (135000 g/mol) y, a pH 5, sus grupos carboxilo podrían estar ejerciendo una repulsión electrostática entre ellos, forzando a la molécula a adoptar una conformación lineal extendida (tipo rod-like), maximizando su volumen de exclusión, para minimizar las interacciones

repulsivas. Por otro lado, las moléculas de MDX son moléculas neutras de menor peso molecular (DE 15, PM 1200 g/mol), y presentarían un menor volumen efectivo en solución en comparación con las moléculas de AS. Zhong y col. (2010) estimaron un radio de giro (R_g) para las moléculas de AS de 370 nm, mientras que este parámetro fue estimado alrededor de 1.7 nm para las moléculas de MDX (Klinkesorn y col., 2004).

En este contexto, ambos polisacáridos podrían permanecer cosolubles en la fase acuosa de las emulsiones conteniendo 10% MDX. Sin embargo, la presencia de un mayor número de moléculas de MDX neutras (en relación a la cantidad de moléculas de AS) en la fase, podría haber incrementado ligeramente la viscosidad, dificultando la difusión de las moléculas de AS hacia la superficie de las gotas de emulsión, disminuyendo así la adsorción del polisacárido aniónico para la formación de la bicapa interfacial.

A mayores concentraciones de MDX (15% y 20%), podría producirse un fenómeno de incompatibilidad termodinámica entre ambos biopolímeros, debido a efectos de los volúmenes de exclusión y la competencia de las moléculas por el espacio en la fase acuosa (Perez y col., 2010). En consecuencia, podría estar promoviéndose la difusión de las moléculas de AS cargadas negativamente hacia la interfase proteica con cargas positivas, a través de un mecanismo segregativo (Perez y col., 2009). Así, un mayor número de moléculas de AS se adsorberían a la superficie de las gotas, produciendo un aumento de la magnitud del potencial zeta.

Además, tal y como se discutió anteriormente, las emulsiones con 20% de MDX mostraron una mayor proporción en número de gotas de tamaños pequeños (Fig. 4.22 B) con una mayor área superficial específica creada (Tabla 4.4) que las observadas para emulsiones con 10% MDX. En consecuencia, las moléculas de AS podrían haber tenido una mayor chance de encontrarse con la superficie de las gotas de emulsión y una mayor probabilidad de unirse mediante interacciones electrostáticas a la proteína estructurada en la interfase.

Cabe destacar que todas las emulsiones secundarias presentaron valores de potencial zeta superiores a -30 mV (en valor absoluto), sugiriendo que la repulsión electrostática entre las gotas sería suficiente para generar un sistema coloidal estable (Guzey & McClements, 2004).

4.2.3.2. Efecto de la temperatura de congelamiento

Estabilidad de las emulsiones congeladas

En este apartado se evaluará la influencia de la concentración de MDX sobre la estabilidad de emulsiones 10% aceite 1% WPI 0.25% AS pH 5 sometidas a diferentes temperaturas de congelamiento (-18°C y -80°C).

En la Fig. 4.24 se muestra la apariencia de emulsiones congeladas a -18°C , donde se observa una clara diferencia de color entre los sistemas sin MDX y con MDX. La emulsión congelada sin MDX exhibió un color amarillo fuerte, lo que podría deberse a la desestabilización inmediata de la emulsión, una vez sometida al congelamiento, con la consecuente liberación del aceite encapsulado. La apariencia de las emulsiones congeladas a -80°C fue similar a la observada en los sistemas congelados a -18°C .

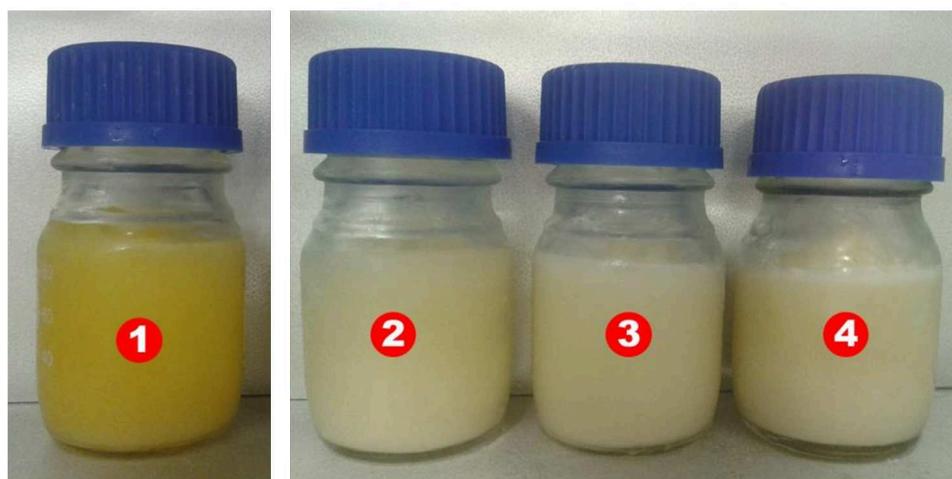


Figura 4.24. Apariencia de emulsiones 10% aceite 1% WPI 0.25% AS pH 5 (1) sin MDX, (2) con 10% MDX, (3) con 15% MDX y (4) con 20% MDX, congeladas a -18°C .

La estabilidad de las emulsiones antes y después del congelamiento se evaluó analizando los perfiles de ΔBS (%) obtenidos en el equipo Turbiscan (Fig. 4.25).

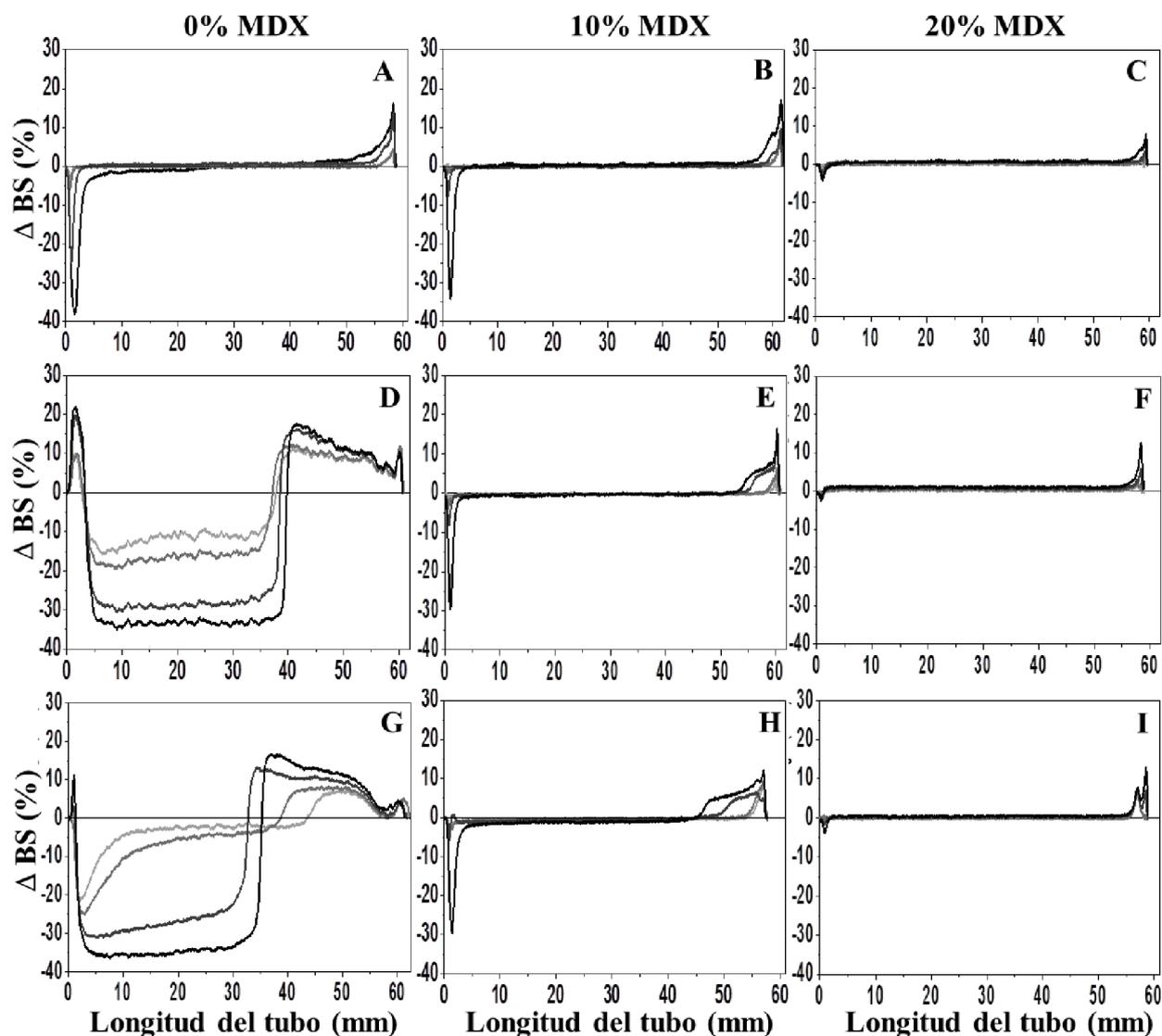


Figura 4.25. Perfiles de retrodispersión de luz (BS %) de emulsiones 10% aceite 1% WPI 0.25% AS pH 5, a distintos tiempos de desestabilización: 1 h (gris claro), 2 h (gris), 24 h (gris oscuro) y 7 días (negro); conteniendo 0% MDX (A, D, G), 10% MDX (B, E, H) y 20% MDX (C, F, I); almacenadas a -18°C (D, E, F), -80°C (G, H, I) y no congeladas (A, B, C).

En primer lugar, se observó que el agregado de 10% MDX mejoró la estabilidad de las emulsiones no congeladas, ya que en la Fig. 4.25 B el pico correspondiente a la zona de clarificación parece ser menor al observado para los sistemas sin MDX (Fig. 4.25 A).

Las principales diferencias se pueden observar en las dos primeras horas de medición y a las 24 h de almacenamiento. Este aumento de la estabilidad observado para las emulsiones con 10% MDX podría estar relacionado con un ligero incremento de la viscosidad de la fase continua, lo que retardaría el movimiento ascendente de las gotas.

Las emulsiones más estables fueron las que contenían 20% MDX, tal y como se muestra en la Fig. 4.25 C. En este caso, la estabilidad estaría promovida no sólo por el incremento de la viscosidad de la fase continua, sino también por el menor tamaño de gota observado en estos sistemas (Fig. 4.25 A, 4.25 B, Tabla 4.5), lo que disminuiría aún más la velocidad de cremado de la fase dispersa. En realidad, el incremento de la concentración de MDX podría haber aumentado la diferencia de densidades entre las fases dispersa y continua (Ley de Stokes), lo que aceleraría el cremado. Sin embargo, este fenómeno podría haber estado equilibrado por el aumento de la viscosidad de la fase continua, promoviendo así la estabilidad de los sistemas.

En segundo lugar, se estudió la influencia de la temperatura de congelamiento sobre la estabilidad de los sistemas. Las emulsiones sin MDX conservadas a -18°C y -80°C se desestabilizaron rápidamente una vez descongeladas (Fig. 4.25 D y 4.25 G). Las almacenadas a -18°C fueron las más inestables y mostraron una separación de fases macroscópica casi inmediata, tal y como se observa en la Fig 4.25 D. Estas emulsiones también exhibieron la formación de un sedimento en el fondo del tubo, lo que se relacionaría con los valores de ΔBS (%) positivos entre 0-4 mm. Por su parte, en la Fig. 4.25 G se puede observar que las emulsiones conservadas a -80°C presentaron una menor velocidad de desestabilización durante las primeras horas de medición y una menor cantidad de sedimento formado hacia el fondo del tubo, en comparación con las congeladas a -18°C .

La baja estabilidad de estas emulsiones podría atribuirse a la cristalización tanto de la fase oleosa como de la fase acuosa. Ghosh & Coupland (2008) sugieren que cuando se

forman cristales de hielo, las gotas de emulsión son forzadas a juntarse debido a la concentración de solutos en la fase acuosa con el descenso de la temperatura (crioconcentración). Estos cristales podrían penetrar en las gotas causando la ruptura de la membrana interfacial que las rodea y haciéndolas más propensas a coalescer una vez descongelada la emulsión.

La formación de un cristal de hielo es un proceso que ocurre en dos etapas: (i) nucleación, que se produce lentamente y comprende la orientación correcta de las primeras moléculas de agua para dar lugar a pequeños núcleos, y (ii) crecimiento, donde los cristales de hielo crecen rápidamente a partir de los núcleos formados (Vanapalli y col., 2002; Ghosh & Rousseau, 2009).

El fenómeno por el cual la emulsión sin MDX congelada a -18°C se desestabilizó más rápidamente que la congelada a -80°C , podría estar relacionado con la velocidad de formación de cristales en la fase acuosa. Las velocidades de enfriamiento lentas (en nuestro caso, las correspondientes a -18°C) promoverían la formación de cristales de hielo de mayor tamaño, dado que existiría más tiempo para favorecer las etapas de nucleación y de crecimiento de los cristales. Esto conduciría a un mayor grado de interrupción de las membranas interfaciales y de oiling off. Además, la separación de hielo durante la congelación ocasionaría no sólo la crioconcentración de los solutos sino también la disminución de agua no congelada presente en la fase continua (Martínez-Navarrete y col., 1998). Esto último, podría producir la alteración de la conformación de los biopolímeros adsorbidos en la interfase, ya que no habría suficiente agua libre para hidratarlos. En consecuencia, los complejos proteína-polisacárido podrían desorberse de la superficie de las gotas y precipitarían una vez descongelada la emulsión (Fig. 4.25 D).

Resulta interesante destacar que la congelación del agua en muchas matrices alimentarias ocurre en un intervalo de temperaturas bastante amplio, entre 0 y 40°C ,

dependiendo de la composición. Por lo tanto, el almacenamiento usual a -18°C no asegura, en la mayoría de los casos, el estado vítreo de fase acuosa, que se alcanza sólo a temperaturas de almacenamiento por debajo de la temperatura de transición vítrea (T_g) del sistema (Martínez-Navarrete y col., 1998). Por consiguiente, cuanto más alejada se encuentre la temperatura de almacenamiento de la T_g , más susceptible será el sistema de experimentar procesos de recristalización y de crecimiento progresivo de los cristales, ya que no estaría garantizada la inmovilización total de las moléculas de agua. Este fenómeno podría contribuir a la formación de cristales de hielo de mayor tamaño en las emulsiones almacenadas a -18°C .

Por otro lado, si la velocidad de enfriamiento es rápida (como en el caso de las emulsiones sometidas a -80°C) la cinética de formación de cristales se vería restringida y, en consecuencia, se formarían cristales de hielo más pequeños. De esta manera, se vería reducida tanto la deshidratación de los biopolímeros estructurados en la interfase (Fig. 4.25 G) como la coalescencia de las gotas producidas por la disrupción del film interfacial. Además, sería muy probable que los sistemas almacenados a 80°C se encuentren en estado vítreo (por debajo de su T_g). Si este fuera el caso, las moléculas de agua presentarían un grado de inmovilidad similar al de los sólidos cristalinos, con lo que se verían restringidos los procesos de recristalización.

Por su parte, las emulsiones formuladas con MDX, a ambas concentraciones, no mostraron diferencias relevantes en sus perfiles de desestabilización luego de ser descongeladas, en comparación con los sistemas no congelados (Fig. 4.25 E, 4.25 F, 4.25 H y 4.25 I). Estos resultados son similares a los reportados por Mun y col. (2008), y ponen de manifiesto el efecto crioprotector que tuvo la MDX sobre las emulsiones durante el congelamiento.

La presencia de MDX en la fase continua podría retardar la formación de cristales de hielo mediante diversos mecanismos. Por un lado, es bien conocido que los polisacáridos

tienen la capacidad de unir moléculas de agua (Radosta & Schierbaum, 1990), disminuyendo su disponibilidad para la formación de hielo. Por otro lado, el incremento de la viscosidad producido por la presencia de MDX, dificultaría la difusión de las moléculas de agua en el seno de solución acuosa, retardando así la velocidad de formación de hielo. En consecuencia, existiría una mayor cantidad de moléculas de agua disponible para hidratar los biopolímeros adsorbidos en la interfase, promoviendo la estabilidad de los sistemas. (Magnusson y col., 2011; Ghosh y col., 2006). Además, la MDX funcionaría como una matriz de separación entre las gotas de emulsión, evitando así la fusión entre ellas mediante el fenómeno de coalescencia.

Otro factor a tener en cuenta es que la adición de solutos de alto peso molecular a la fase acuosa de emulsiones (como la MDX), conllevan a un aumento de la T_g . Esto constituiría una excelente alternativa para garantizar la vitrificación completa del sistema congelado sin necesidad de alcanzar temperaturas excesivamente bajas (como -80°C) para evitar los procesos de recristalización, lo que supondría un alto coste. Sin embargo, sería necesario realizar estudios más específicos para determinar la influencia de la concentración de MDX sobre la T_g de emulsiones multicapa de aceite de lino.

En la Fig. 4.26, se muestran los índices de cremado correspondientes a cada uno de las emulsiones evaluadas. Allí se observa que sólo los sistemas congelados en ausencia de MDX fueron inestables al cremado, exhibiendo una separación de fases significativa (Fig. 4.26 B).

Por su parte, las emulsiones congeladas en presencia de MDX y las no congeladas (control) fueron estables al cremado durante los 7 días de análisis (Fig. 4.26 A y 4.26 B).

Finalmente, en la Fig. 4.27 se presentan las micrografías correspondientes a los distintos sistemas estudiados. De la observación cualitativa de las emulsiones control (sin congelar), se podría inferir que aquellas que contienen MDX exhibirían un tamaño de gota ligeramente menor que las que no contienen MDX.

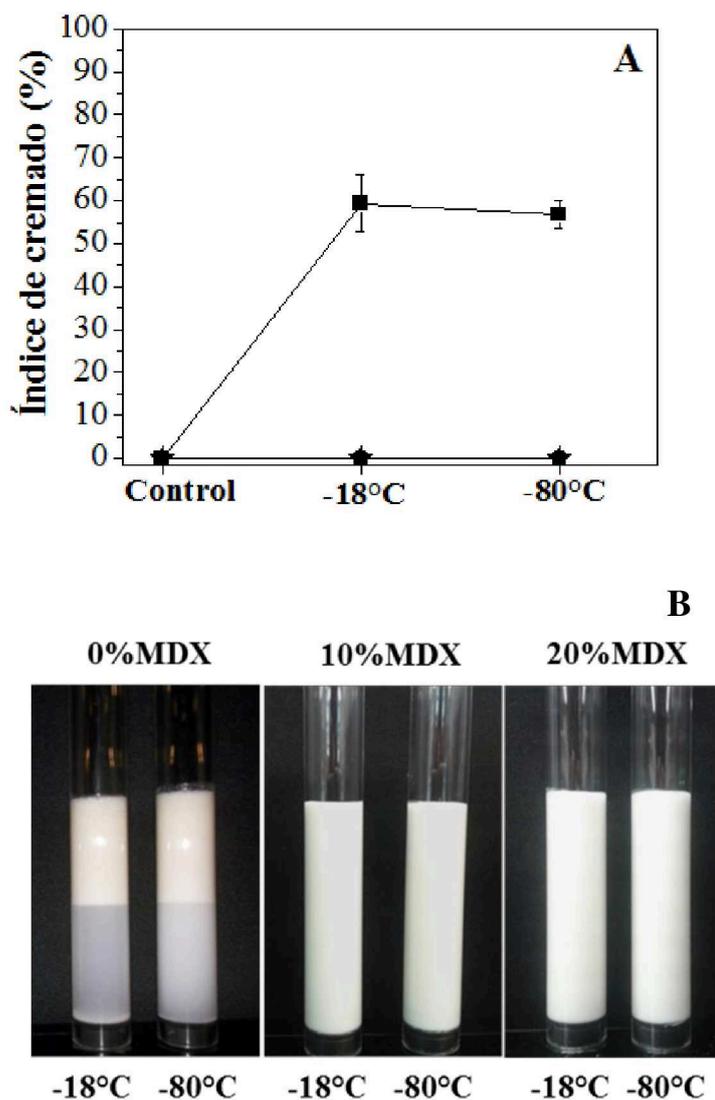


Figura 4.26. (A) Efecto de la concentración de MDX (0% ■, 10% ●, 20% ★) y de la temperatura de congelamiento sobre el índice de cremado de emulsiones 10% aceite 1%WPI 0.25% AS pH 5 tras 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente. (B) Apariencia visual de emulsiones 10% aceite 1%WPI 0.25% AS pH 5 descongeladas, luego de una semana de almacenamiento a 25°C.

Por otra parte, en los sistemas congelados sin MDX se puede observar gotas de aceite de gran tamaño, producto de la coalescencia ocasionada por la cristalización de la fase acuosa. Se pueden distinguir claramente gotas de menores tamaños en las emulsiones almacenadas a -80°C en relación a las almacenadas a -18°C. En estos dos sistemas también se pueden identificar ciertas regiones oscuras, que podrían corresponder probablemente a los

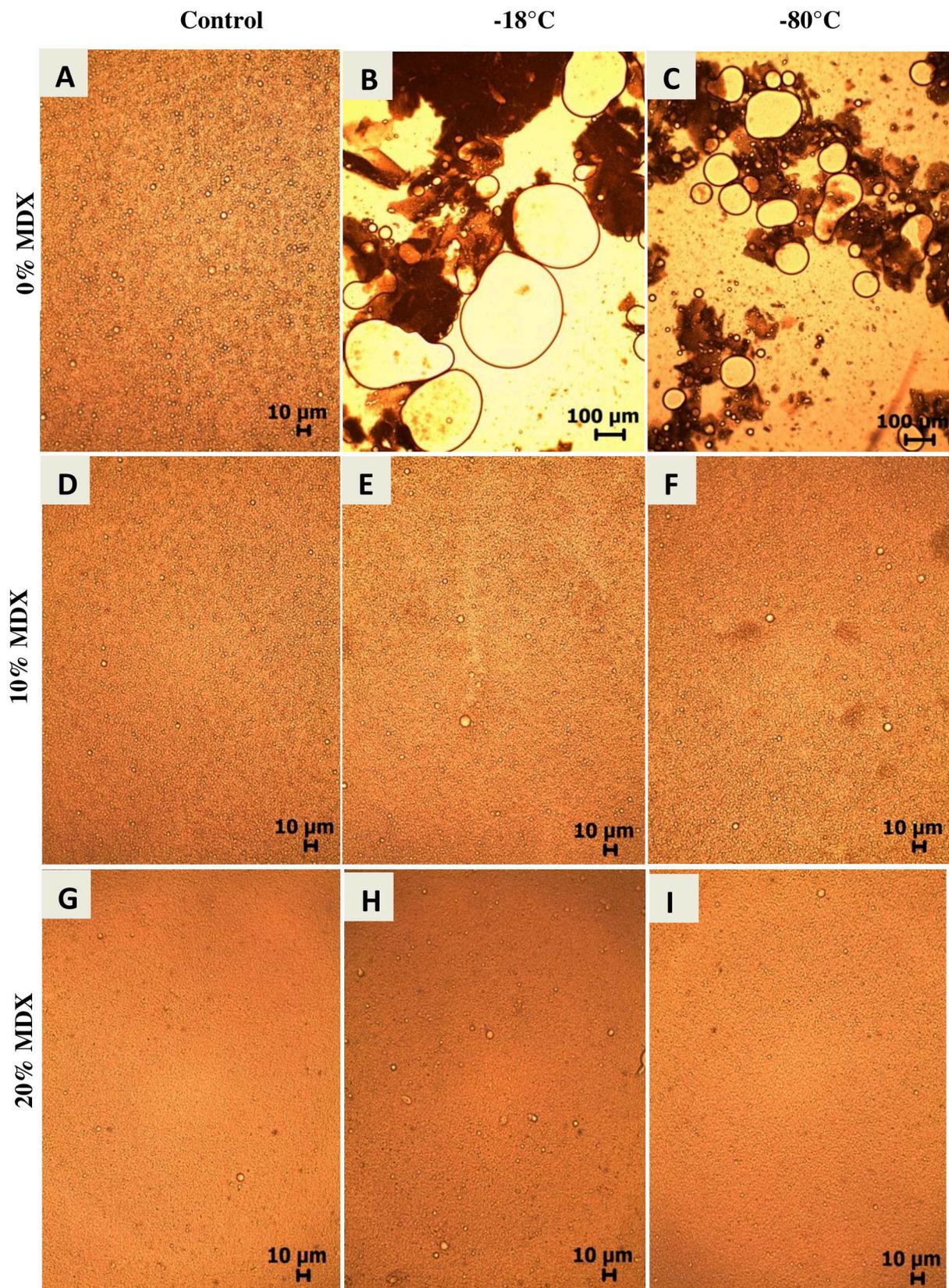


Figura 4.27. Efecto de la concentración de maltodextrina y de la temperatura de congelamiento sobre la microestructura de emulsiones 10% aceite, 1% WPI, 0,25% AS pH 5.

complejos proteína-polisacárido desorbidos de la interfase que precipitaron como un sedimento una vez descongeladas las emulsiones.

Sin embargo, las emulsiones con MDX parecen no haber presentado una variación en el tamaño de gota luego del congelamiento. Estos resultados son consistentes con los discutidos anteriormente, y demuestran que la presencia de MDX ejerció un efecto crioprotector sobre los sistemas estudiados.

4.2.4. Conclusiones

En esta sección se estudió el efecto de distintas variables (condiciones de sonicación, concentración de WPI, concentración de AS, pH, concentración de MDX, temperatura de congelamiento) sobre la estabilidad de emulsiones monocapa y multicapa de aceite de lino.

En primer lugar, se analizó la influencia de las condiciones de sonicación y de la concentración inicial de WPI sobre la estabilidad de emulsiones primarias. Según los resultados obtenidos se seleccionó la condición 75% AMP-150 s para producción de emulsiones primarias, ya que se obtuvieron los menores tamaños de gota y las menores velocidades de cremado. Debido a que no se observaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones iniciales de WPI utilizadas, se seleccionó la concentración 1% de acuerdo a bibliografía.

Cuando se agregó el AS (0.125 y 0.25%) para la obtención de emulsiones secundarias, se evidenció que la bicapa interfacial sobre la gota de emulsión se formó a pH 4 y 5. Sin embargo, a pH 5 se obtuvieron las emulsiones más estables frente a la coalescencia, floculación y cremado. Por otro lado, se encontró que a este valor de pH, en condiciones de 0.25% AS, no se producía la precipitación de un coacervado.

Finalmente, la adición de MDX mejoró en gran medida la estabilidad de las emulsiones frente al congelamiento, actuando como un crioprotector. Además, el agregado de MDX a la fase continua podría haber promovido un aumento de la T_g de los sistemas, por lo que los mismos podrían congelarse a temperaturas de -18°C para asegurar el estado vítreo y evitar los procesos de recristalización.

Sección III

Obtención y caracterización fisicoquímica de las microcápsulas en polvo

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Sección II, se seleccionaron las emulsiones multicapa de aceite de lino con la siguiente composición: 10% aceite 1% WPI 0.25% AS pH 5 conteniendo 0, 10 y 20% MDX. Las mismas se congelaron a -18°C , luego se liofilizaron y se obtuvieron las microcápsulas en polvo. A estas microcápsulas se les realizaron determinaciones de eficiencia de encapsulación, actividad de agua y estabilidad frente a la degradación oxidativa en el tiempo.

4.3.1. Efecto de la concentración de MDX sobre la eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación se determinó para evaluar el grado de protección del aceite dentro de la microcápsula liofilizada. En la Tabla 4.6 se presentan los valores de aceite libre (A_L), aceite total (A_T) y eficiencia de encapsulación (EE) para cada sistema.

Tabla 4.6. Aceite libre (A_L), aceite total (A_T) y eficiencia de encapsulación (EE) de microcápsulas preparadas con diferentes concentraciones de MDX.

MDX (%)	A_L (g oil/100 g polvo)	A_T (g oil/100 g polvo)	EE (%)
0	60.29 ± 4.16^a	82.64 ± 5.45^a	27.01 ± 0.88^a
10	18.51 ± 1.15^b	49.97 ± 1.41^b	63.70 ± 2.24^b
20	2.07 ± 0.99^c	31.21 ± 2.67^c	93.54 ± 2.69^c

Las letras distintas representan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$)

Se observó que la EE dependió en gran medida del contenido de MDX. Las microcápsulas sin MDX presentaron altos niveles de A_L y una baja EE, inferior al 30%. Sin embargo, con el agregado de 10% MDX, los niveles de A_L disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) y se logró una EE del 63%. Finalmente, la mayor EE se obtuvo en los sistemas formulados con 20% de MDX, donde se alcanzó un valor superior al 90%. Este

comportamiento estaría relacionado con el contenido de sólidos totales en la formulación de emulsiones que, al incrementarse, promoverían un aumento en la EE del aceite (Tabla 4.6). Estos resultados son consistentes con los discutidos por Gharsallaoui y col. (2007), quienes sugieren que la EE podría incrementarse aumentando la concentración sólidos totales en las emulsiones, ya que los mismos luego pasan a formar parte de la estructura de pared de las microcápsulas en polvo, funcionando como una matriz de soporte que las recubre.

Apariencia de las microcápsulas

La apariencia de las microcápsulas liofilizadas se muestra en la Fig. 4.28, donde se puede observar claramente que el polvo obtenido en los sistemas sin MDX presentó una consistencia aceitosa de color amarillo intenso, con la formación de aglomerados de textura “esponjosa”.



Figura 4.28. Apariencia visual de microcápsulas liofilizadas, preparadas con diferentes concentraciones (%p/p) de MDX: 0% (A), 10% (B) y 20% (C).

Además, cabe destacar que no fue posible reconstituir la emulsión hacia su estado inicial a partir de la rehidratación de estos polvos, ya que resultaron ser un material muy hidrofóbico debido a la cantidad de aceite no encapsulado (A_L). Estos defectos se

relacionarían con la desestabilización de la emulsión durante el paso de congelamiento previo a la liofilización.

Sin embargo, el agregado de MDX, mejoró notablemente la apariencia de los polvos liofilizados. En la Fig. 4.28, se observa la desaparición gradual del color amarillento a medida que se aumentó la concentración de MDX. Además, en estos sistemas se logró reconstituir la emulsión original fácilmente durante la hidratación de los polvos.

4.3.2. Efecto de la concentración de MDX sobre la actividad de agua

Dado que el agua es uno de los principales componentes en los alimentos y juega un papel predominante en sus propiedades físico-químicas y en la estabilidad de los mismos frente al almacenamiento, resulta importante conocer la actividad de agua (a_w) de las microcápsulas formuladas como un aditivo en polvo. Este parámetro tiene en cuenta, no sólo el contenido de agua sino también su interacción con los componentes de la matriz alimentaria en condiciones de equilibrio termodinámico (Wolti-Chanes & Vergara-Balderas, 1997). Además, es muy utilizado en la industria como parámetro indicador de cómo se está controlando el agua dentro de los alimentos, ya que se ha demostrado que existe un intervalo aleatorio óptimo de humedad correspondiente a un amplio intervalo de a_w , donde los productos muestran una estabilidad máxima a procesos deteriorativos (oxidación, reacciones enzimáticas, reacciones de oscurecimiento) (Leung, 1987).

La mayoría de las reacciones químicas y el crecimiento microbiano se ven reducidos considerablemente cuando se disminuye a_w . Sin embargo, la reacción de oxidación de los lípidos insaturados tiene un comportamiento particular con respecto a la tendencia descripta. En este caso, la velocidad de reacción aumenta a valores de a_w muy bajos (menores a 0.2) debido a la actividad catalítica de iones metálicos cuando se remueve el agua de la esfera de hidratación que rodea a estos iones (St. Angelo y col., 1996).

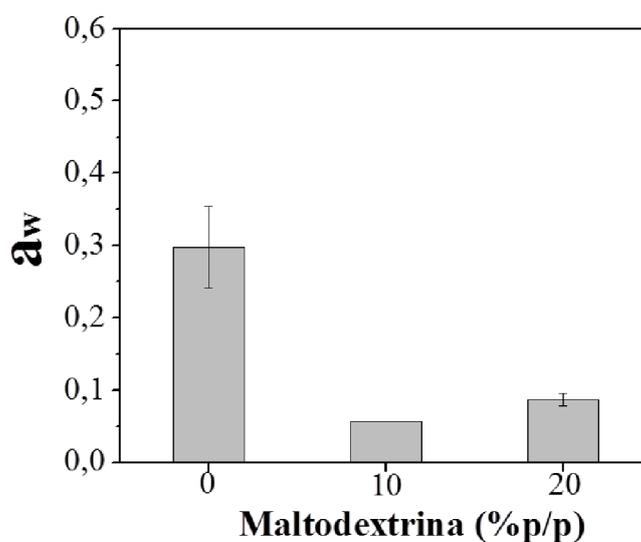


Figura 4.29. Actividad de agua (a_w) de microcápsulas en polvo formuladas con diferentes concentraciones de maltodextrina.

La Fig. 4.29 muestra los valores de a_w correspondientes a las microcápsulas obtenidas con distintas concentraciones de MDX. En general, se obtuvieron valores bajos de a_w y se observó que el agregado de MDX produjo una disminución del a_w de las microcápsulas. Este comportamiento podría estar relacionado con la reducción de la cantidad de agua libre disponible en presencia de MDX, ya que los polisacáridos poseen la capacidad de ligar e inmovilizar moléculas de agua.

4.3.3. Estabilidad de las microcápsulas frente a la oxidación

Finalmente, se estudió la estabilidad del aceite de lino encapsulado en distintas condiciones de almacenamiento. Para ello, tanto la microcápsulas liofilizadas como el aceite de lino sin encapsular, se almacenaron a distintas temperaturas (-18, 4 y 32°C) y se evaluó su estabilidad oxidativa en el tiempo a través de la determinación del índice de peróxidos (IP) – para determinar compuestos primarios de oxidación - y del índice de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) – para la determinación de compuestos secundarios de

oxidación.

Oxidación inicial del aceite de lino y de las emulsiones antes del congelamiento

La Fig. 4.32 muestra los valores de IP y TBARS iniciales del aceite de lino, antes y después de ser utilizado en la preparación de emulsiones con distintas concentraciones de MDX. Se puede observar que el aceite presentó un bajo IP inicialmente (1.33 meq/kg aceite) (Fig. 4.32 A), el cual se encuentra dentro del rango de valores permitidos para aceites comestibles (5 a 20 meq/kg aceite), según el Código Alimentario Argentino (CCA).

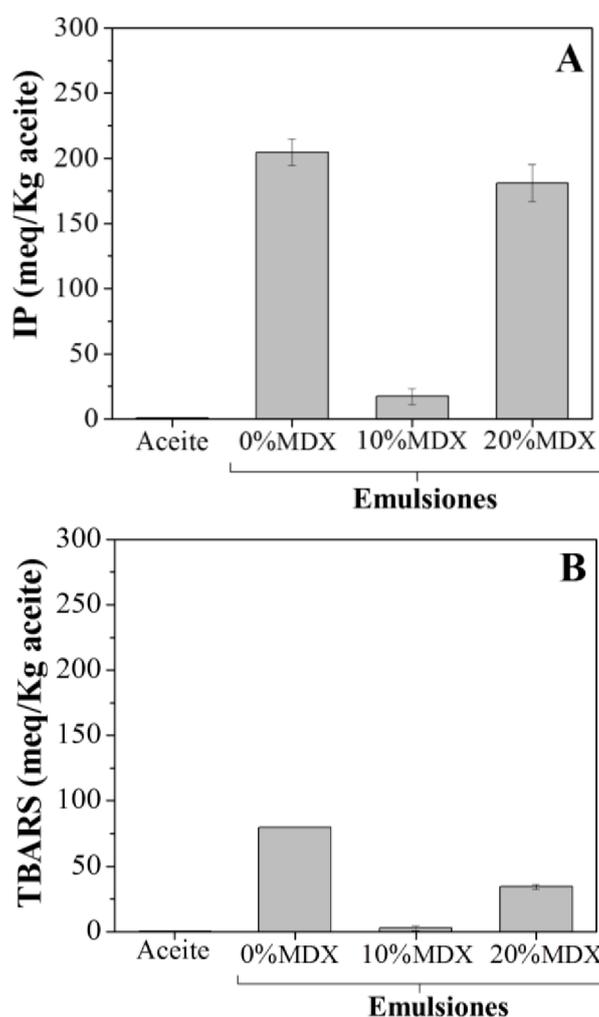


Figura 4.32. Índice de peróxidos (IP) inicial del aceite de lino y de las emulsiones con diferentes concentraciones de MDX, previo al paso de congelación para luego liofilizarlas

También presentó bajos valores de TBARS (0.19 meq MDA/kg aceite) (Fig. 4.32 B), lo que demuestra que el aceite de lino no se encontraba oxidado al comienzo de los experimentos.

Sin embargo, el proceso de obtención de las emulsiones sin MDX, parece haber contribuido significativamente al incremento de la oxidación del aceite. Probablemente, la energía aportada a los sistemas durante la agitación mecánica en el Waring blender y en la etapa de sonicación, podría haber favorecido la incorporación de oxígeno y la generación de gradientes de temperatura en el seno de las emulsiones, favoreciendo la degradación oxidativa del aceite.

Por su parte, la adición de 10% MDX parece haber ejercido un efecto protector en la oxidación del aceite, lo que podría deberse quizás al ligero incremento de la viscosidad de la fase continua que podría retardar la difusión del O₂ atmosférico durante los pasos de homogeneización. No obstante, en las emulsiones con 20% MDX este efecto parece haber sido revertido. Esto podría deberse al mayor aporte de energía durante la etapa de sonicación (Fig. 4.22 A), lo que habría derivado en un aumento de la generación de gradientes de temperatura en el seno de la dispersión, favoreciendo así un incremento en la tasa de oxidación lipídica (Fig. 4.32 A). Cabe destacar que en todos los sistemas se alcanzaron valores de IP superiores a los permitidos en alimentos por el CAA.

Con respecto a los valores iniciales de TBARS de las emulsiones preparadas con distintas concentraciones de MDX, se observó un comportamiento similar (4.32 B).

Oxidación del aceite de lino en función del tiempo para distintas temperaturas

La Fig. 4.33 A muestra la evolución del índice de peróxidos (IP) del aceite de lino no encapsulado almacenado a distintas temperaturas en función del tiempo.

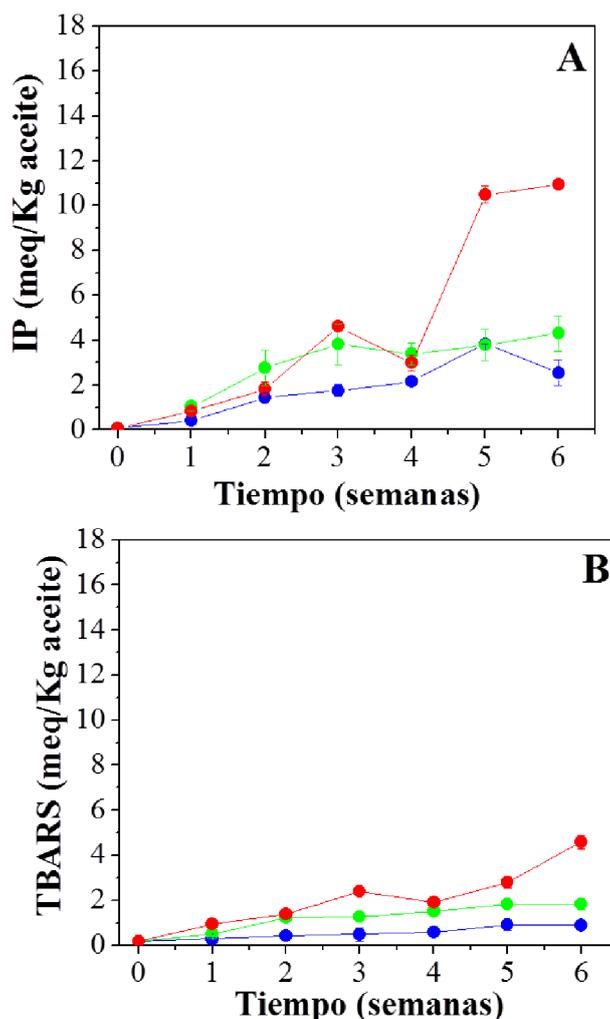


Figura 4.33. Índice de peróxidos (A) y de TBARS (B) del aceite de lino sin encapsular almacenado a distintas temperaturas: -18°C (●), 4°C (●), 32°C (●) en función del tiempo.

En esta gráfica se puede observar un incremento del IP con el aumento del tiempo de almacenamiento, lo que estaría relacionado con la aparición de hidroperóxidos como consecuencia de la degradación oxidativa.

Por su parte, el aceite conservado a -18°C fue el más estable frente a la oxidación, ya que presentó los menores valores de IP. Durante la primera semana de almacenamiento, los valores de IP fueron similares para las tres temperaturas evaluadas. Sin embargo, con el paso del tiempo, el aceite conservado a 32°C mostró un mayor grado de desestabilización que los demás, y esta diferencia fue muy significativa entre las semanas 5 y 6, presentando valores casi tres veces más grandes que el aceite almacenado a -18°C y 4°C. Estos resultados son

similares a los reportados por Zuta y col. (2007), quienes estudiaron la estabilidad oxidativa del aceite de caballa en función de la temperatura de almacenamiento (-40, 4 y 30°C) y observaron los mayores valores de IP a la mayor temperatura evaluada.

Cuando se evaluó el índice de TBARS, se observó un comportamiento similar. La aparición de compuestos secundarios se fue incrementando gradualmente en el tiempo (producto de la descomposición de los hidroperóxidos) para todas las temperaturas evaluadas (Fig. 4.33 B). En este caso, el aceite almacenado a 32°C también desestabilizó más rápidamente que los conservados a 4°C y -18°C.

Por lo tanto, la temperatura de almacenamiento constituye un factor importante en la estabilidad oxidativa del aceite de lino, dado que a mayores temperaturas se acelerarían las reacciones de autooxidación.

Oxidación de las microcápsulas en polvo en función del tiempo para distintas temperaturas

La Fig 4.34 muestra los índices IP y TBARS de las microcápsulas formuladas con distintas concentraciones de MDX, en función del tiempo y de la temperatura de almacenamiento.

En los sistemas conservados a -18°C, se puede observar que en el tiempo inicial (momento en que se retiraron los polvos deshidratados del liofilizador) aquellos que no contenían MDX presentaron el mayor valor de IP (Fig 4.34 A), mientras que los menos oxidados fueron los formulados con 10% MDX. En estos últimos, el IP fue aumentando gradualmente con el transcurso del tiempo hasta alcanzar un máximo a las 3 semanas y, a partir de allí, los hidroperóxidos comenzaron a disminuir, probablemente debido a su conversión en compuestos secundarios de oxidación.

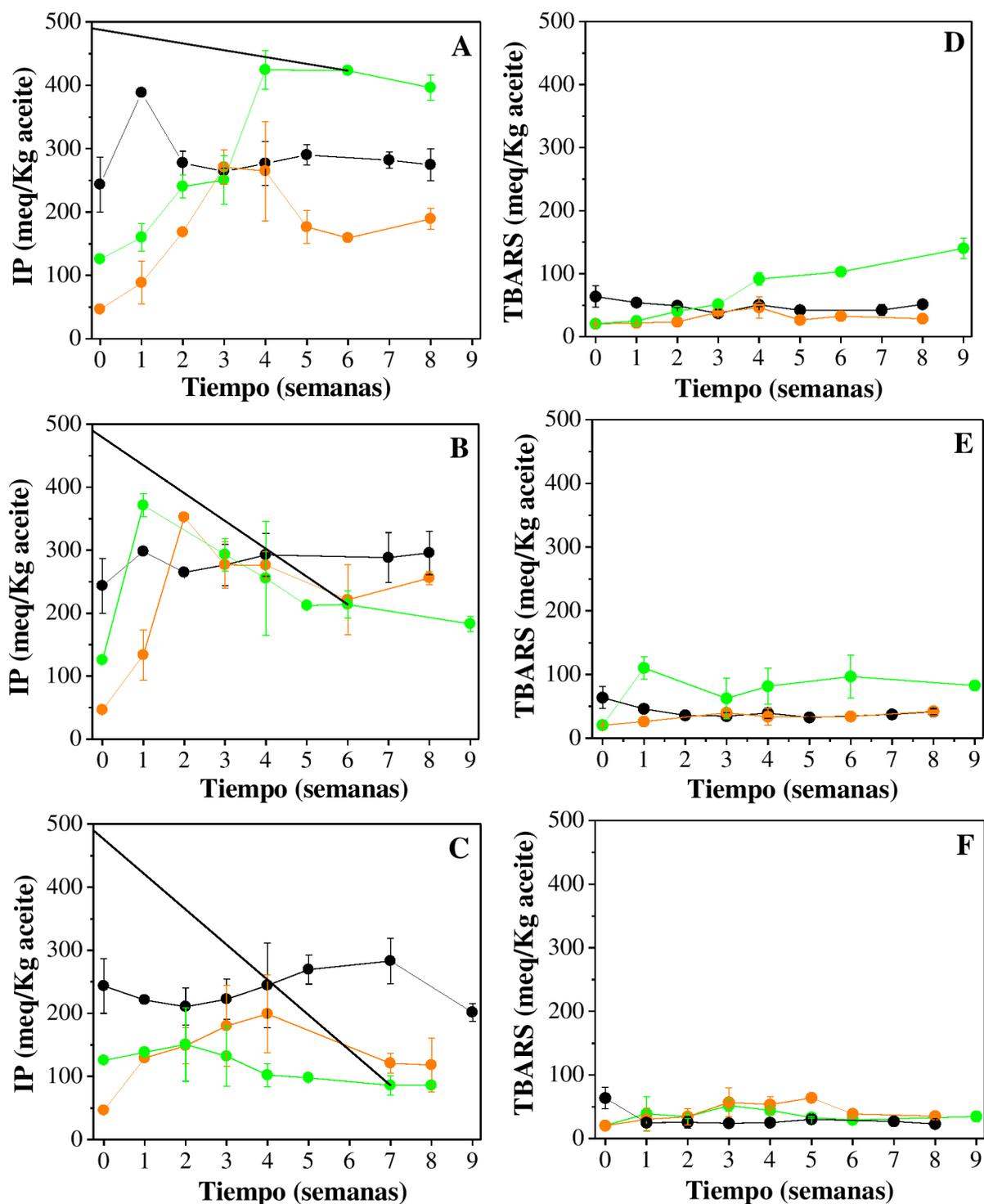


Figura 4.34. Índice de peróxidos (IP) (A, B, C) y de TBARS (D, E, F) de microcápsulas almacenadas a -18°C (A, D), 4°C (B, E) y 32°C (C, F), en función del tiempo; formuladas a con 0% (●), 10% (●) y 20% (●) de MDX.

Por otro lado, las microcápsulas que no contenían MDX presentaron un valor elevado de IP a la primera semana de evaluación (superior al de los sistemas conteniendo MDX) y,

por la forma descendente de la curva a partir de este periodo, es probable que el sistema ya se haya encontrado en la etapa de degradación de los hidroperóxidos (Fig. 4.31). Si esto fuera así, la concentración máxima de hidroperóxidos podría haberse alcanzado antes de cumplidos los 7 días de almacenamiento, por lo que este sistema sería el más inestable. Las posibles causas de este comportamiento estarían relacionadas con (i) el elevado IP exhibido por el aceite encapsulado luego del proceso de obtención de la emulsión multicapa (Fig. 4.32) y (ii) la elevada cantidad de aceite libre presente en las microcápsulas (Tabla 4.6).

Cuando las microcápsulas se almacenaron a 4°C, el IP de los sistemas sin MDX (Fig. 4.34 B) mostró una tendencia similar a la observada en los conservados a -18°C, por lo que es probable que transcurridos los primeros 7 días, el sistema a 4°C también se haya encontrado en la etapa de degradación de los hidroperóxidos (zona descendente de la curva de compuestos primarios, Fig. 4.31). Lo cierto es que, el valor de IP de estas microcápsulas a la primera semana fue menor que el correspondiente observado a -18°C. Por lo tanto, si la máxima concentración de hidroperóxidos fue alcanzada durante el transcurso de la primera semana de almacenamiento, el grado de avance de la reacción oxidativa a 4°C podría haber sido mayor que a -18°C.

A su vez, las microcápsulas con 10% MDX a 4°C alcanzaron su valor máximo de IP a la segunda semana de almacenamiento, mientras que las formuladas con 20% MDX lo hicieron a la primer semana (Fig. 4.34 B). La mayor velocidad oxidativa de los sistemas con 20%MDX frente a los sistemas con 10% MDX es consistente con la observada a -18°C.

En general, todas las microcápsulas almacenadas a 4°C parecen haber tenido una tasa de oxidación mayor que sus correspondientes sistemas conservados a -18°C (Fig. 4.34 A y B).

Finalmente, en la Fig. 4.34 C se muestran los valores de IP de las microcápsulas almacenadas a 32°C. Los sistemas sin MDX presentaron un comportamiento similar al ya

descrito y sus valores de IP en el tiempo se mantuvieron en el mismo rango que los observados a -18°C y 4°C . Por otro lado, las microcápsulas conteniendo MDX mostraron IP menores a los observados en los sistemas sin MDX.

Con respecto a la formación de compuestos secundarios, se pudo observar que los valores de TBARS para los sistemas sin MDX se mantuvieron relativamente constantes a las 3 temperaturas de almacenamiento (Fig. 4.34 C, D y E). Esto podría deberse a que el aceite en estas microcápsulas probablemente se haya oxidado completamente durante los primeros días de almacenamiento, debido a su baja eficiencia de encapsulación y su alto contenido de peróxidos en el tiempo inicial.

Las microcápsulas formuladas con 10% MDX presentaron índices de TBARS similares a las 3 temperaturas ensayadas, mientras que en los sistemas con 20% MDX se observó un incremento del TBARS cuando se almacenaron a -18°C y 4°C , lo que se relacionaría con los mayores valores de IP alcanzados en estas condiciones.

Finalmente, debería notarse que todos los sistemas evaluados, alcanzaron índice de peróxidos muy elevados, por encima del rango permitido en alimentos. Esto estaría relacionado con la elevada oxidación alcanzada en la formulación de las emulsiones. En este sentido, las microcápsulas liofilizadas, ya presentaban un alto contenido de radicales peróxido y es por eso que los valores de IP alcanzaron valores superiores a los 300 meq/Kg aceite durante el almacenamiento.

Por lo tanto, se deberían extremar los cuidados durante la formulación de las emulsiones, para mantener bajos niveles de oxidación, ya que una vez iniciada la fase inicial de la autooxidación, la velocidad de generación de radicales libres aumenta exponencialmente (Walker y col., 2014). De esta manera, se podría mejorar la conservación de las microcápsulas durante el almacenamiento.

Además, en la bibliografía, algunos estudios han revelado la importancia de la

presencia de metales de transición que actuarían como catalizadores de la degradación oxidativa de los lípidos y serían los responsables de la oxidación lipídica en los sistemas emulsionados (Waraho y col., 2011; Xu y col., 2013). Estos metales de transición podrían encontrarse en las proximidades de la interfase, donde podría haber una mayor concentración de hidroperóxidos, y promoverían la descomposición de estos hidroperóxidos en radicales. En sistemas lipídicos, estos radicales altamente reactivos podrían sustraer un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentren en su proximidad, con la consecuente formación de nuevos radicales que pueden continuar promoviendo y expandiendo el fenómeno de degradación oxidativa (rancidez).

Estos fenómenos deberían estudiarse en más detalle en trabajo futuros, teniendo un mayor control sobre la reacción de autooxidación, mediante (i) la obtención de las emulsiones en un homogeneizador de alta presión, dado que la aplicación continua de ultrasonidos puede causar un calentamiento excesivo, y (ii) el empleo de compuestos antioxidantes y quelantes para proteger mejor al compuesto bioactivo frente a las condiciones de procesamiento y de almacenamiento de las microcápsulas.

4.3.4. Conclusiones

En primer lugar, se lograron obtener microcápsulas en polvo con una eficiencia de encapsulación superior al 90%, mediante la formulación de emulsiones multicapa con 20% de MDX.

Mientras que las microcápsulas sin MDX fueron difíciles de rehidratar debido a la presencia de elevadas cantidades de aceite superficial, aquellas formuladas con 10 y 20% de MDX resultaron siendo polvos altamente hidratables, que pudieron reconstituirse fácilmente.

Sin embargo, el proceso de obtención de las emulsiones multicapa mediante agitación mecánica y por ultrasonido contribuyó significativamente al incremento de la oxidación del aceite, con la consecuente formación de peróxidos y radicales libres muy reactivos. Es por ello que las microcápsulas almacenadas a diferentes temperaturas mostraron índices de peróxidos y TBARS muy elevados, por encima del rango permitido para alimentos.

Conclusiones generales

5. Conclusiones

En el presente trabajo se abordó el estudio del proceso de microencapsulación de aceite de lino a través del empleo de emulsiones multicapa, con el fin de obtener un aditivo en polvo como ingrediente para la elaboración de alimentos funcionales.

Del análisis de las interacciones macromoleculares entre el WPI y el AS en solución acuosa se observó que el incremento de la relación WPI:AS favoreció la neutralización de cargas y ejerció una influencia sobre la estructura de los complejos WPI-AS formados por interacción electrostática.

Luego se estudió el efecto de distintas variables sobre la formación y estabilidad de emulsiones. A lo largo de todo el proceso lograron ponerse a punto el pH, la concentración de WPI, AS y MDX que producían las emulsiones más estables.

Finalmente, las emulsiones se liofilizaron y se obtuvieron microcápsulas con una alta eficiencia de encapsulación (>90%) a la mayor concentración de MDX estudiada. Cuando se analizó la estabilidad oxidativa de las microcápsulas frente al almacenamiento se comprobó que:

- (i) El proceso de obtención de las emulsiones multicapa contribuyó al incremento de la oxidación del aceite de lino, lo que podría estar relacionado con la incorporación de oxígeno a los sistemas durante la formación de la pre-emulsión en el Waring blender y la generación de gradientes de temperatura durante el paso de sonicación.
- (ii) Las microcápsulas que mostraron una mayor estabilidad frente al deterioro oxidativo fueron aquellas obtenidas a partir de emulsiones con 10% MDX.

Por lo tanto, a pesar de que se logró el diseño de emulsiones multicapa estables y se obtuvieron microcápsulas en polvo con una alta eficiencia de encapsulación, se debería mejorar la estabilidad oxidativa del aceite de lino teniendo un mayor control sobre la reacción de autooxidación durante la formación de las emulsiones. Esto se podría conseguir mediante (i) la

obtención de las emulsiones en un homogeneizador de alta presión, dado que la aplicación continua de ultrasonidos puede causar un calentamiento excesivo, y (ii) el empleo de compuestos antioxidantes (vitamina E) y quelantes para proteger mejor al compuesto bioactivo frente a las condiciones de procesamiento y de almacenamiento de las microcápsulas.

Referencias bibliográficas

- Abayasekara, D. R. E., & Wathes, D. C. (1999). Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 61, 275-287.
- Aghbashlo, M., Mobli, H., Madadlou, A., & Rafiee, S. (2012). Influence of wall material and inlet drying air temperature on the microencapsulation of fish oil by spray drying. *Food and Bioprocess Technology*, 6 (6), 1561-1569.
- Aitken, A. & Learmonth M. (1996). *The protein protocols handbook*, Part I, 3-6.
- Albani, J. R. (2004). *Structure and dynamics of macromolecules: absorption and fluorescence studies*. Paris: Elsevier.
- Augustin, M. A., & Hemar, Y. (2008). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, 38, 902-912.
- Badui Dergal, S. (1999). *Química de los alimentos*, 3rd, Longman, México.
- Bangs, W. E., & Reineccius, G. A. (1988). Corn starch derivatives: possible wall materials for spray-dried flavor manufacture. En: Reineccius, G.A., Risch, S.J. editors. *Flavor encapsulation*. Washington, D.C.
- Baranauskiene, R., Bylaite, E., Zukauskaite, J., & Venskutonis, R. P. (2007). Flavor retention of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil spray-dried in modified starches during encapsulation and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3027-3036.
- Beaulieu, M., Corredig, M., Turgeon, S. L., Wicker, L., & Doublier, J. L. (2005). The formation of heat-induced protein aggregates in whey protein/pectin mixtures studied by size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering detection. *Food Hydrocolloids*, 19, 803-812.

- Bhattacharjee, C., & Das, K. P. (2000). Thermal unfolding and refolding of β -lactoglobulin: an intrinsic and extrinsic fluorescence study. *European Journal of Biochemistry*, 267, 3957-3964.
- Camino, N. A., Carrera Sanchez, C., Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2012). Hydroxypropylmethylcellulose- β -lactoglobulin mixtures at the oil-water interface. Bulk, interfacial and emulsification behavior as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 27, 464-474.
- Carneiro, H. C. F., Tonon, R. V., Grosso, C. R. F., & Hubinger, M. D. (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, 115, 443-451.
- Cayot, P., & Lorrient, D. (1997). Structure-function relationship of whey proteins. In *Food Proteins and their applications*, eds., S. Damodaran & A. Paraf. New York: Marcel Dekker.
- Chee, C.P., Gallaher, J. J., Djordjevic, D., Faraji, H., McClements, D. J., Decker E. A., Hollender, R., Peterson, D. G., Roberts, R. F. & Coupland, J. N. (2005). Chemical and sensory analysis of strawberry flavoured yogurt supplemented with an algae oil emulsion. *Journal of Dairy Research*, 72 (3), 311–316.
- Chen, L. & Subirade, M. (2006). Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials*, 27, 4646-4654.
- Chen, Q., McGillivray, D., Wen, J., Zhong, F., Quek, S. Y. (2013). Co-encapsulation of fish oil with phytosterol esters and limonene by milk proteins. *Journal of Food Engineering*, 117, 505-512.

- Chuan-He, T & Xin-Rong, L. (2013). Microencapsulation properties of soy protein isolate and storage stability of the correspondingly spray-dried emulsions. *Food Research international*, 52, 419-428.
- Clandinin, M. T., Jumpsen, J., & Suh, M. (1994). Relationship between fatty acid accretion, membrane composition, and biologic functions. *Journal of Pediatrics*, 125, 25-35.
- Dalgleish, D. G., Senaratne, V., & Francois, S. (1997). Interactions between β -lactalbumin and α -lactoglobulin in the early stages of heat denaturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3469-3464.
- Dalgleish, J. (1990). *Freeze-drying for the food industry*. Elsevier Science Publishers Ltd., England.
- Damodaran, S. (1997). Food proteins: An overview. En: S. Damodaran and A. Paraf (Eds), *Food proteins and their application*. New York: Marcel Dekker.
- de Kruif, C. G., Weinbreck, F., & De Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9, 340-349.
- de Wit, J. N. (2001). *Lecturer's handbook on whey and whey products*. Renkum, Netherlands. Ed. European Whey Products Association, 1st Edition.
- Decher, G. & Schlenoff, J. B. (2003). *Multilayer thin films: sequential assembly of nanocomposite materials*. Weinheim, Germany. Wiley-VCH.
- Dickinson, E. (1998). Structure, stability and rheology of flocculated emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 3, 633-638.
- Dickinson, E. (2001). Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces*, 20 (3), 197-210.
- Dickinson, E. (2010). Flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81, 130-140.

- Dickinson, E. (2011). Mixed biopolymers at interfaces: Competitive adsorption and multilayer structures. *Food Hydrocolloids*, 25, 1966-1983.
- Dokic, P., Jakovljevic, J., & Dokic-Baucal, Lj. (1998). Molecular characteristics of maltodextrins and rheological behaviour of diluted and concentrates solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 141, 435-440.
- Drusch, S., & Berg, S. (2008). Extractable oil in microcapsules prepared by spray-drying: Localisation, determination and impact on oxidative stability. *Food Chemistry*, 109, 17-24.
- Dubin, P., Gao, J., & Mattinson, K. (1994). Protein purification by selective phase separation with polyelectrolytes. *Separation and Purification Methods*, 23 (1), 1-16.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28 (3), 350-356.
- Dziezak, J. D. (1991). A focus on gums. *Food Technology*, 45 (3), 115-132.
- Fennema, O. R. (1996). *Food Chemistry*, 3rd ed., Fennema, O. R., Ed., Marcel Dekker, New York.
- Fessas, D., Iametti, S., Schiraldi, A., Bonomi, F. (2001). Thermal unfolding of monomeric and dimeric β -lactoglobulins. *European Journal of Biochemistry*, 268, 5439-5448.
- Foegeding, E. A., Davis, J. P., Doucet, D., & McGuffey, M. K. (2002). Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 13 (5), 151-159.
- Galani, D., & Owusu Apenten, R. K. (1999). Heat-induced denaturation and aggregation of β -lactoglobulin: kinetics of formation of hydrophobic and disulphide-linked aggregates. *International Journal of Food Science & Technology*, 34, 467-476.

- Garg, M. L., Wood, L. G., Singh, H., & Moughan, P. J. (2006). Means of delivering recommended levels of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids in human diets. *Journal of Food Science*, 71 (5), 66-71.
- Geankoplis, J. C. (1998). *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. Compañía Editorial Continental. México.
- Gharsallaoui, A., Roudant, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40, 1107-1121.
- Ghosh, S. & Coupland, J. N. (2008). Factors affecting the freeze-thaw stability of emulsions. *Food Hydrocolloids* 22, 105-111.
- Ghosh, S. & Rousseau, D. (2009). Freeze-thaw stability of water-in-oil emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 339, 91-102.
- Ghosh, S., Cramp, G. L., & Coupland, J. N. (2006). Effect of aqueous composition on the freeze-thaw stability of emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 272, 82-88.
- Girard, M., Turgeon, S. L., & Gauthier, S. F. (2002). Interbiopolymer complexing between β -lactoglobulin and low- and high- methylated pectin measured by potentiometric titration and centrifugation. *Food Hydrocolloids*, 16, 585-591.
- Gu, Y. S., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2005). Influence of pH and carrageenan type on properties of β -lactoglobulin stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 19, 83-91.
- Gu, Y. S., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2007). Application of multi-component biopolymer layers to improve the freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions: β -Lactoglobulin- κ -carrageenan-gelatin. *Journal of Food Engineering*, 80, 1246-1254.

- Guzey, D., & McClements, D. J. (2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 128-130, 227-248.
- Guzey, D., Kim, H. J., McClements, D. J. (2004). Factors influencing the production of o/w emulsions stabilized by β -lactoglobulin-pectin membranes. *Food Hydrocolloids*, 18, 967-975.
- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., & McClements, D. J. (2006). Characterization of β -lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20, 577-585.
- Harris, W. S., Kris-Etherton, P. M., & Harris, K. A. (2008). Intakes of long-chain omega-3 fatty acid associated with reduced risk for death from coronary heart disease in healthy adults. *Current Atherosclerosis Reports*, 10 (6), 503-509.
- Heinzelmann, K., Franke, K., Velasco, J., & Marquez-Ruiz, G. (2000). Microencapsulation of fish oil by freeze-drying techniques and influence of process parameters on oxidative stability during storage. *European Food Research and Technology*, 211, 234-239.
- Hornero Méndez, D., Pérez-Gálvez, A., & Minguéz-Mosquera, M. I. (2001). A rapid spectrophotometric method for the determination of peroxide value in food lipids with high carotenoid content. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78 (11), 1151-1155.
- Huck-Iriart, C., Pizones Ruiz-Hernestrosa, V. M., Candal, R., & Herrera, M. L. (2013). Effect of aqueous phase composition on stability of sodium caseinate/sunflower oil emulsions. *Food and Bioprocess Technology*, 6 (9), 2406-2418.

- Jackel, V. K. (1964). Über die Funktionen des Schutzkolloids. *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere*, 197, 143-151.
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids*, 22, 1191-1202.
- Jafari, S. M., He, Y., & Bhandari, B. (2007). Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. *Journal of Food Engineering*, 82, 478-488.
- Jones, O. G., & McClements, D. J. (2011). Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein-polysaccharide complexes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167, 49-62.
- Kagami, Y., Sugimura, S., Fujishima, N., Matsuda, K., Kometani, T., & Matsumura, Y. (2003). Oxidative stability, structure, and physical characteristics of microcapsules formed by spray drying of fish oil with protein and dextrin wall materials. *Journal of Food Science*, 68 (7), 2248-2255.
- Kenyon, M. M. (1995). Modified starch, maltodextrin, and corn syrup as wall materials for food encapsulation. *ACS Symposium Series*, 590, 42-50.
- Kinsella, J. E. (1982). Relationship between structure and functional properties of food proteins. En: P. F. Fox, & J. J. Condon, *Food proteins* (p. 51). New York: Applied Science Publishers.
- Kiokias, S., Dimakou, C., Oreopoulou, V. (2007). Effect of heat treatment and droplet size on the oxidative stability of whey protein emulsions. *Food Chemistry*, 105, 94-100.
- Klein, M., Aserin, A., Svitov, I., & Garti, N. (2010). Enhanced stabilization of cloudy emulsions with gum Arabic and whey protein isolate. *Colloids and Surfaces B*, 77, 75-81.

- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2005). Encapsulation of emulsified tuna oil in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Hydrocolloids*, 19, 1044-1053.
- Klinkesorn, S., Sophanodora, P., Chinachoti, P., & McClements, D. J. (2004). Stability and rheology of corn oil-in-water emulsions containing maltodextrin. *Food Research International*, 37, 851-859.
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2006). Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Research International*, 39, 449-457.
- Kosaraju, S. L., D'ath, L., Lawrence, A. (2006). Preparation and characterization of chitosan microspheres for antioxidant delivery. *Carbohydrate Polymers*, 64 (2), 163–167.
- Krishnan, S., Bhosale, R., Singhal, R. S. (2005). Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydrate Polymers*, 61, 95-102.
- Kuhn, K. R., & Cunha, R. L. (2012). Flaxseed oil – Whey protein isolate emulsions: Effect of high pressure homogenization. *Journal of Food Engineering*, 111, 449-457.
- Lamprecht, A., & Bodmeier, R. (2010). Microencapsulation. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Ed. Wiley-VCH. Estados Unidos.
- Lee, S., Faustman, C., Djordjevic, D., Faraji, H., & Decker, E. A. (2006). Effect of antioxidants on stabilization of meat products fortified with n-3 fatty acids. *Meat Science*, 72 (1),18–24.
- Leung, H. K. (1987). Influence of water activity on chemical reactivity. En: *Water Activity: Theory and Applications to Food*, (Ed) Rockland, L. B., & Beuchar, L. R. Chicago, Illinois, Estados Unidos.

- Lizarraga, M. S., Pan, L. G., Añón, M. C., & Santiago, L. G. (2008). Stability of concentrated emulsions measured by optical and rheological methods. Effect of processing conditions – I. Whey protein concentrate. *Food Hydrocolloids* 22, 868-878.
- Loch, J. I., Polit, A., Bonarek, P., Olszewska, D., Kurpiewska, K., Dziejicka-Wasylewska, M., Lewinsky, K. (2012). Structural and thermodynamic studies of binding saturated fatty acids to bovine β -lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 1095-1102.
- Lombraña, J. I. (2009). Fundamentals and tendencies in freeze-drying of foods. En "Advances in Food Dehydration", Ed. Cristina Ratti, CRC Press, Boca Ratón, Estados Unidos.
- Lumdubwong, N. & Seib, A. P. (2001). Low and medium-DE maltodextrins from waxy wheat starch: Preparation and properties. *Starch/Stärke*, 53, 605-615.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1-21.
- Magnusson, E., Rosén, C., & Nilsson, L. (2011). Freeze-thaw stability of mayonnaise type oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids* 25, 707-715.
- Malvern Instruments Ltd. (2013). Zeta Potential: An introduction in 30 minutes. Technical note. Worcestershire, United Kingdom.
- Manoj, P., Fillery-Travis, A. J., Watson, A. D., Hibbered, D. J., & Robins, M. M. (1998). Characterization of a depletion-flocculated polydisperse emulsion: I. Creaming behavior. *Journal of Colloid and Interface Science*, 207, 283-293.
- Martínez Navarrete, N., Andrés Grau, A. M., Chiralt Boix, A., & Maupoey, P. F. (1998). *Termodinámica y cinética de sistemas alimento entorno*. Ed. Universidad Politécnica de Valencia, España.

- McClements, D. J. (1999). *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques*. CRC Press. Boca Ratón, Florida, Estados Unidos.
- McClements, D. J. (2000). Comments on viscosity enhancement and depletion flocculation by polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 14, 173-177.
- McClements, D. J. (2004). Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9, 305-313.
- McClements, D. J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 24, 621-625.
- McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 65 (8), 1270-1282.
- 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, 213-228.
- McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72 (8), 109-124
- McCrae, C. H., Law, A. J. R., Leaver, J. (1999). Emulsification properties of whey proteins in their natural environment: Effect of whey protein concentration at 4 and 18% milk fat. *Food Hydrocolloids*, 13, 389-399.
- Meller, A., & Stavans, J. (1996). Stability of emulsions with nonadsorbing polymers. *Langmuir*, 12, 301-304.
- Mengual, O., Meunier, G., Cayré, I., Puech, K., & Snabre, P. (1999). Turbiscan MA 2000: Multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, 50 (2), 445-456.

- Millqvist-Fureby, A., Elofsson, U., Bergenstahl, B. (2001). Surface composition of spray-dried milk protein stabilized emulsions in relation to pre-heat treatment of proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21, 47-58.
- Mis Solval, K. E. (2011). Spray drying technology for the production and processing of microencapsulated omega-3 fish oil with egg powder. PhD Thesis. The United States: Louisiana State University.
- Mleko, S., & Foegeding, E. A. (1999). Formation of whey protein polymers: effects of a two-step heating process on rheological properties. *Journal of Texture Studies*, 30, 137-149.
- Molina Ortiz, S. E., Puppo, M. C., & Wagner, J. R. (2004). Relationship between changes and functional properties of soy protein isolates-carrageenan systems. *Food Hydrocolloids*, 18, 1045-1053.
- Montgomery, D. C. y Runger, G. C. (2003). *Applied Statistics and Probability for Engineers* (3rd ed). Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.
- Moreau, D. L. & Rosenberg, M. (1996). Oxidative stability of anhydrous milk fat microencapsulated in whey proteins. *Journal of Food Science*, 61, 39-43.
- Mun, S., Cho, Y., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2008). Utilization of polysaccharide coatings to improve freeze-thaw and freeze-dry stability of protein-coated lipid droplets. *Journal of Food Engineering* 86, 508-518.
- Neirynek, N., Van der Meeren, P., Lukaszczwicz-Lausecker, M., Cocquyt, J., Verbeken, D., & Dewettinek, K. (2007). Influence of pH and biopolymer ratio on whey protein-pectin interactions in aqueous solutions and in O/W emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 298, 99-107.

- Oakenfull, D., Pearce, J., & Burley, R. W. P. (1997). Protein gelation. En: Food proteins and their applications. Ed. Damodaran, S. y Paraf, A. New York: Marcel Dekker, p. 111-142.
- Papiz, M. Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E. E., North, A. C. T., Findlay, J. B. C., Sivaprasadrao, R., Jones, T. A., Newcomer, M. E. & Kraulis, P. J. (1986). The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol binding protein. *Nature*, 324, 383-385.
- Parker, A., Gunning, P. A., & Robins, M. M. (1995). How does xanthan stabilize salad dressing? *Food Hydrocolloids*, 9, 333-342.
- Perez, A. A. (2011). Espumado de proteínas de suero lácteo en presencia de polisacáridos. Tesis doctoral, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Perez, A. A., Carrara, C. R., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J. M., Santiago, L. G. (2009). Interactions between milk whey protein and polysaccharide in solution. *Food Chemistry*, 116, 104-113.
- Perez, A. A., Sánchez, C. C., Patino, J. M. R., Rubiolo, A. C., & Santiago, L. G. (2010). Milk whey proteins and xanthan gum interactions in solution and at the air-water interface: A rheokinetic study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81 (1), 50-57.
- Perez-Alonso, C., Baez-Gonzalez, J. G., Beristain, C. I., Vernon-Carter, E. J. & Vizcarra-Mendoza, M.G. (2003). Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, 53 (2), 197-203.
- Perrechil, F. A. & Cunha, R. L. (2013) Stabilization of multilayered emulsions by sodium caseinate and κ -carrageenan. *Food Hydrocolloids*, 30, 606-613.

- Plashchina, I. G., Mrachkovskaya, T. A., Danilenko, A. N., Kozhevnikov, G. O., Starodubrovskaya, N. Y., Braudo, E. E., Schwenke, K. D. (2001). Complex formation of Faba bean legumin with chitosan: surface activity and emulsion properties of complexes. En: E. Dickinson and R. Miller (eds). *Food Colloids: Fundamentals of formulation*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 293-303.
- Pongsawatmanit, R., Harnsilawat, T., & McClements, D. J. (2006). Influence of alginate, pH and ultrasound treatment on palm oil-in-water emulsions stabilized by β -lactoglobulin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 287, 59-67.
- Radford, S. J., & Dickinson, E. (2004). Depletion flocculation of caseinate-stabilised emulsions: what is the optimum size of the non-adsorbed protein nano-particles? *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 238, 71-81.
- Radosta, S., & Schierbaum, F. (1990). Polymer-water interaction of maltodextrins. *Starch – Stärke*, 4, 142-147.
- Ramírez-Navas, J. S. (2006). *Liofilización de Alimentos*. Ed. ReCiTeIA, Cali, Valle, Colombia.
- Ribeiro, A. J., Neufeld, R. J., Arnaud, P., Chaumei, J. C. (1999). Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 187 (1), 115–123.
- Riediger, N. D., Othman, R. A., Suh, M., & Monghadasian, M. H. (2009). A systematic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *Journal of the American Dietetic Association*, 109, 668-679.
- Robins, M. M. (2000). Emulsions – Creaming phenomena. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 5, 265-272.

- Robins, M. M., & Hibbered, D. J. (1998). Emulsion flocculation and creaming. En: Modern Aspects of Emulsions Science, Binks, B.P., Ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom.
- Rodea-González, D. A., Cruz-Olivarez J., Román-Guerrero, A., Rodríguez-Huezo, M. E., Vernon-Carter, E. J., & Pérez-Alonso, C. (2012). Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispánica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *Journal of Food Engineering*, 111, 102-109.
- Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2011). Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 25, 1925-1937.
- Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R., & Carrera, C. (2003). Protein-emulsifier interactions at the air-water interface. *Advances in Colloid and Interface Science*, 8, 387-395.
- Rosenberg, M. & Sheu, T. Y. (1996). Microencapsulation of volatiles by spray-drying in whey protein-based wall systems. *International Dairy Journal*, 6, 273-284.
- Royer, C. A. (1995). Teaching biophysics: approaches to teaching fluorescence spectroscopy. *Biophysical Journal*, 68, 1191-1195.
- Sagalowicz, L. & Leser, M. E. (2010). Delivery for liquid food products. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, 61-72.
- Sampels, S. (2013). Oxidation and antioxidants in fish and meat from farm to fork. En: *Food Industry*, (Ed) Muzzalupo, I., Intech, Croatia.
- Santiago, L. G., Carrara, C. R., & González, R. J. (2005). Interaction of soy protein isolate and meat protein in a model emulsion system. Effect of emulsification order and characteristics of soy isolate used. *Food Science and Technology International*, 11 (2), 79-88.

- Santiago, L. G., Gonzalez, R. J., Fillery-Travis, A., Robins M., Bonaldo, A. G., & Carrara, C. (2002). The influence of xanthan and λ -carrageenan on the creaming and flocculation of an oil-in-water emulsion containing soy protein. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19 (4), 411-417
- Santipanichwong, R., Supphantharika, M., Weiss, J., & McClements, D. J. (2008). Core-shell biopolymer nanoparticles produced by electrostatic deposition of beet pectin onto heat-denatures beta-lactoglobulin aggregates. *Journal of Food Science*, 73 (6), 23-30.
- Sava, N., Van der Plancken, I., Claeys, W., & Hendrickx, M. (2005). The kinetics of heat-induced structural changes of β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 88, 1646-1653.
- Schmitt, C., & Turgeon, S. L. (2011). Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167, 63-70.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., & Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 689–753.
- Shi, X. Y. & Tan, T. W. (2002). Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of vitamin D2. *Biomaterials*, 23 (23), 4469–4473.
- Simopoulos, A. P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70 (3), 560S-569S.
- St. Angelo, A. J., Vercellotti, J., Jacks, T., & Legendre, M. (1996). Lipid oxidation in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36 (3), 175-224.
- Taherian, A. R., Britten, M., Sabik, H., & Fustier, P. (2011). Ability of whey protein isolate and/or fish gelatin to inhibit physical separation and lipid oxidation in fish oil-in-water beverage emulsion. *Food Hydrocolloids*, 25, 868-878.

- Taneja, A., Ye, A., Jones, J. R., Archer, R., Singh, H. (2013). Behaviour of oil droplets during spray drying of milk-protein-stabilised oil-in-water emulsions. *International Dairy Journal*, 28, 15-23.
- Tolstoguzov, V. (2006). *Food Polysaccharides and their applications*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis.
- Tuinier, R., Rolin, C., & de Kruif, C. G. (2002). Electrosorption of pectin onto casein micelles. *Biomacromolecules*, 3, 632-638.
- Uauy, R., & Dangour, A. (2006). Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids. *Nutrition Reviews*, 64 (5), 24-33.
- Vanapalli, S. A., Palanuwech, & J., Coupland, J. N. (2002). Stability of emulsions to dispersed phase crystallization: effect of oil type, dispersed phase volume fraction, and cooling rate. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 204, 227-237.
- Vanden Heuvel, J. P. (2012). Nutrigenomics and nutrigenetics of ω -3 polyunsaturated fatty acids. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 108, 75-112.
- Vardhanabhuti, B., Yucel, U., Coupland, J. N., & Foegeding, E. A. (2009). Interactions between β -lactoglobulin and dextran sulfate at near neutral pH and their effect on thermal stability. *Food Hydrocolloids*, 23, 1511-1520.
- Walker, R., Decker, E., & McClements, D. J. (2014). Development of food-grade nanoemulsions and emulsions for delivery of omega-3 fatty acids: opportunities and obstacles in the food industry. *Food and Function*, 6 (1), 41-54.
- Wang, J., & Wang, L. (2000). Structures and properties of commercial maltodextrins from corn, potato and rice starches. *Starch/Stärke*, 52, 296-304.
- Waraho, T., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2011). Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 3-13.

- Weinbreck, F. (2004). Whey protein/gum arabic coacervates: Structure and dynamics. Thesis Utrecht University, The Netherlands.
- Weinbreck, F., de Vries, R., Schrooyen, P., & de Kruif, C. G. (2003). Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. *Biomacromolecules*, 4, 293-303.
- Welti-Chanes, J., & Vergara-Balderas, F. (1997). Actividad de agua: Concepto y aplicación en alimentos con alto contenido de humedad. En: *Temas de Tecnología de Alimentos*, (Ed) José Miguel Aguilera. CYTED-IPN. Distrito Federal. México.
- Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P., & Morris, V. (2004). Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109, 63-71.
- Wulff-Pérez, M., Torcello-Gómez, A., Gálvez-Ruíz, M.J., & Martín-Rodríguez, A. (2009). Stability of emulsions for parenteral feeding: Preparation and characterization of o/w nanoemulsions with natural oils and Pluronic f68 as surfactant. *Food Hydrocolloids*, 23, 1096-1102.
- Xu, D., Wang, X., Jiang, J., Yuan, F., & Decker, E. A. (2013). Influence of pH, EDTA, α -tocopherol, and WPI oxidation on the degradation of β -carotene in WPI-stabilized oil-in-water emulsions. *LWT-Food Science and Technology*, 54, 236-241.
- Zaho, Y., Li, F., Carvajal, M. T., Harris, M. T. (2009). Interactions between bovine serum albumin and alginate: An evaluation of alginate as protein carrier. *Journal of Colloid and Interface Science*, 332, 345-353.
- Zhong, D., Huang, X., Yang, H., & Cheng, R. (2010). New insights into viscosity abnormality of sodium alginate aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 81, 948-952.
- Zimet, P., & Livney, Y. D. (2009). Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 23, 1120-1126.

Zuta, P. C., Simpson, B. K., Zhao, X., & Leclerc, L. (2007). The effect of α -tocopherol on the oxidation of mackerel oil. *Food Chemistry*, 100, 800-807.