

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



EFFECTO DE DIFERENTES ÉTERES DE CELULOSA SOBRE LA ESTABILIDAD, ESTRUCTURA Y DIGESTIBILIDAD IN VITRO DE NUEVAS EMULSIONES

TRABAJO FINAL DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS

AUTOR: GERARD GIMÉNEZ RIBES

TUTORA: AMPARO QUILES CHULIÁ
COTUTORA: ISABEL HERNANDO HERNANDO

Curso académico: 2015/2016
VALENCIA, JUNIO 2016



Efecto de diferentes éteres de celulosa sobre la estabilidad, estructura y digestibilidad *in vitro* de nuevas emulsiones

Autor: Gerard Giménez Ribes

Tutora: Amparo Quiles Chuliá

Cotutora: Isabel Hernando Hernando

Valencia, junio 2016

RESUMEN:

Una buena vía de acción para luchar contra la obesidad y todas las enfermedades relacionadas con el sobrepeso podría ser el diseño de nuevas emulsiones, que proporcionen menos calorías al organismo, con las que reemplazar la grasa convencional de los alimentos. Sin embargo, la grasa contribuye positivamente a la aceptación sensorial de los alimentos por parte de los consumidores, al aportar una textura cremosa, buena palatabilidad, sabor agradable y efectos saciantes. Por esta razón, las estrategias en investigación podrían ir orientadas hacia el diseño de emulsiones con: i) una proporción de grasa/aceite media, de manera que no se modifiquen las propiedades fisicoquímicas y sensoriales del alimento en boca, y ii) una digestibilidad reducida; es decir, que al pasar por el tracto gastrointestinal, sean menos digeridas que las grasas habitualmente utilizadas en la formulación de los alimentos. Para avanzar en este sentido, surge este trabajo que tiene como objetivo diseñar nuevas emulsiones aceite en agua (O/W) capaces de reemplazar la grasa convencional de los alimentos y conferir un menor valor calórico. Para ello se han utilizado como emulsionantes los éteres de celulosa metilcelulosa e hidroxipropil metilcelulosa, y se ha estudiado la estabilidad, estructura y digestibilidad *in vitro* de estas nuevas emulsiones alimentarias. Los resultados muestran que las emulsiones O/W elaboradas con éteres de celulosa se presentan como una opción a tener en cuenta a la hora de sustituir la grasa y formular alimentos de bajo aporte calórico y más saludables.

Palabras clave: grasa, emulsión, metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, microscopía confocal, estructura, estabilidad, oxidación, digestión *in vitro*.

Efecte de diferents èters de cel·lulosa sobre l'estabilitat, estructura i digestibilitat *in vitro* de noves emulsions

Autor: Gerard Giménez Ribes

Tutora: Amparo Quiles Chuliá

Cotutora: Isabel Hernando Hernando

València, juny 2016

RESUM:

Una bona via d'acció per a lluitar contra l'obesitat i totes les malalties relacionades amb el sobrepès podria ser el disseny de noves emulsions, que proporcionen menys calories a l'organisme, amb les quals substituir el greix convencional dels aliments. Tot i així, el greix contribueix positivament a l'acceptació sensorial dels aliments per part dels consumidors, en aportar aquest una textura cremosa, un sabor agradable i un efecte saciant. Per aquesta raó, les estratègies d'investigació podrien anar orientades cap al disseny d'emulsions amb: i) una proporció de greix/oli mitjana, de manera que no es modifiquen les propietats fisicoquímiques i sensorials de l'aliment en boca, i ii) digestibilitat reduïda; és a dir, que en passar pel tracte gastrointestinal siguin menys digerides que els greixos habitualment utilitzats en la formulació dels aliments. Per avançar en aquest sentit, sorgeix aquest treball que té com a objectiu dissenyar noves emulsions d'oli en aigua (O/W) que puguin reemplaçar el greix convencional dels aliments i conferir-los un menor valor calòric. Per tal d'aconseguir açò, s'han utilitzat com a emulsionants els èters de cel·lulosa metilcel·lulosa i hidroxipropil metilcel·lulosa, i s'ha estudiat l'estabilitat, estructura i digestibilitat *in vitro* d'aquestes noves emulsions alimentàries. Els resultats mostren que les emulsions O/W elaborades amb èters de cel·lulosa es presenten com a una opció a tenir en compte a l'hora de substituir el greix i formular aliments amb un contingut calòric reduït i més sans.

Paraules clau: greix, emulsió, metilcel·lulosa, hidroxipropil metilcel·lulosa, microscopia confocal, estructura, estabilitat, oxidació, digestió *in vitro*

Effect of different cellulose ethers on the stability, structure and *in vitro* digestibility of new emulsions

Author: Gerard Giménez Ribes

Tutor: Amparo Quiles Chuliá

Cotutor: Isabel Hernando Hernando

Valencia, June 2016

ABSTRACT:

A good course of action to fight against obesity and the rest of overweight-related diseases could be the design of new food emulsions that provide fewer calories to the organism, with which to replace the fat conventionally found in the food. However, the fat contributes positively to the sensorial acceptability of the consumers, due to the creamier texture, pleasant flavor and satiating effect. For this reason, the research strategies could be oriented towards the design of emulsions that have: i) a medium proportion of fat/oil, so that physicochemical and sensorial properties in the mouth are not modified, and ii) reduced digestibility, this is, being less digested when going through the gastrointestinal tract than fats that are usually employed in the formulation of foods. In this line, arises this research with the aim of designing new oil in water emulsions (O/W) capable of substituting the conventional fat of the food and confer a smaller caloric value. To accomplish this, two cellulose ethers have been employed as emulsifiers, methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose, and the structure, stability and *in vitro* digestibility has been studied. The results show that the O/W emulsions made with cellulose ethers are an option that should be taken into account when it comes to replacing fat and designing healthier, less caloric foods.

Keywords: fat, emulsion, methylcellulose, hydroxypropyl methylcellulose, confocal microscopy, structure, stability, oxidation, *in vitro* digestion.

Agradecimientos

Aprovecho estas líneas para agradecer a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de este trabajo, directa o indirectamente, y que han marcado mis inicios en el campo de la investigación, un camino que me gustaría seguir en el futuro.

En primer lugar, agradecer a Amparo por haber accedido a ser mi tutora, y haber hecho posible la realización de este proyecto. Desde el primer momento ha estado siempre a mi disposición y ha mostrado un entusiasmo inigualable por resolver mis dudas y ayudar. Por supuesto también por todo el esfuerzo dedicado a realizar las correcciones de este texto. ¡Y por su amabilidad sin igual!

A Isabel, mi segunda tutora y tutora de prácticas, por todo su tiempo dedicado, no solo a la realización de este trabajo, sino también a la hora de elegir lugar para la realización de las prácticas curriculares y su orientación a la hora de elegir estudios de master. Así como también por entender mi afán por continuar mi formación en el extranjero y por viajar, dándome siempre buenos consejos al respecto.

A Jenny, por su constante apoyo, ayuda cada día en el laboratorio durante estos meses para elegir los protocolos adecuados para realizar las medidas del trabajo y todo el tiempo dedicado. También por su esfuerzo para orientarme en la redacción de este texto.

Y por supuesto también agradecer al resto del grupo de Microestructura y Química de Alimentos, del Departamento de Tecnología de Alimentos, Empar, Ana, Cristina y Pere, por haberme dado la oportunidad de formar parte del equipo de química de alimentos, donde me he sentido como en casa durante estos meses.

A todo el departamento de Postcosecha en el IVIA quienes me han hecho sentir uno más del equipo, y en especial a Cristina Besada, por su tutorización, apoyo durante los últimos tres meses realizando prácticas, y brindarme la enorme oportunidad de aprender cosas nuevas casi a diario.

Finalment, i com no podia ser d'altra manera, als meus pares que han fet de mi la persona que soc hui. El seu suport incondicional dia a dia és el que m'ha permès realitzar el llarg camí fins arribar aquí. Us trobaré a faltar durant els anys que estiga fora realitzant el màster! Però tranquils, m'alimentaré bé. Al cap i a la fi, soc un futur tecnòleg d'aliments!

Índice

1	Introducción	1
2	Objetivos y plan de trabajo	7
3	Materiales y métodos	8
3.1	Ingredientes de las emulsiones	8
3.2	Preparación de las emulsiones	8
3.3	Digestión <i>in vitro</i> de las emulsiones. Método pH stat.....	10
3.4	Estabilidad de las emulsiones a la digestión <i>in vitro</i>	11
3.5	Microscopía láser confocal de barrido (CLSM)	12
3.6	Estabilidad fisicoquímica de las emulsiones.....	12
3.6.1	Estabilidad física (sinéresis)	12
3.6.2	Extracción de la grasa.....	13
3.6.3	Índice de Peróxidos (IP)	13
3.6.4	Coeficiente de extinción	13
3.6.5	Medidas de color.....	14
3.7	Análisis estadístico.....	15
4	Resultados y discusión	16
4.1	Digestibilidad <i>in vitro</i> de las emulsiones.....	16
4.2	Estabilidad de las emulsiones a la digestión <i>in vitro</i>	18
4.3	Microestructura de las emulsiones	19
4.4	Estabilidad fisicoquímica de las emulsiones.....	22
4.4.1	Estabilidad física (sinéresis)	22
4.4.2	Índice de Peróxidos (IP)	23
4.4.3	Coeficiente de extinción	25
4.4.4	Medidas del color	26
5	Conclusiones	29
6	Bibliografía	30

Índice de figuras

Figura 1 Esquema de los principales tipos de asociaciones que presentan las moléculas anfifílicas (McClements et al., 2009).	2
Figura 2 Representación esquemática de las condiciones en cada fase de la digestión y cambios comunes que pueden ocurrir para los glóbulos de la emulsión (Singh, Ye, & Horne, 2009).	5
Figura 3 Agitador Heidolph	9
Figura 4 Proceso de homogenización de la emulsión con ultra-turrax.	9
Figura 5 Funcionamiento del método pH stat con valorador automático (Li & McClements, 2010)....	10
Figura 6 Valorador automático Mettler-Toledo DL50.	11
Figura 7 Microscopio óptico Nikon Eclipse E800 V-PS100E con microscopio láser confocal Nikon C1 acoplado (Nikon, Tokio, Japón).	12
Figura 8 Porcentaje de AGL en función del tiempo de digestión intestinal <i>in vitro</i> . Los valores representados corresponden a la media de dos repeticiones por emulsión.	16
Figura 9 Imágenes tomadas con microscopio confocal laser de barrido (CLSM) de las emulsiones EP 2, EP 4, EH y EM antes y durante la digestión <i>in vitro</i> al finalizar las fases oral, gástrica e intestinal. Barra blanca correspondiente a 60 μm	19
Figura 10 Estabilidad física de las emulsiones EH y EM a los días 0 y 30	22
Figura 11 Resultados obtenidos para los Índices de peróxidos a los diferentes días para las dos emulsiones y el control.....	23
Figura 12 Resultados de los coeficientes de extinción obtenidos para las dos emulsiones y la muestra de aceite. Las letras minúsculas muestran valores con diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para una de las muestras a lo largo de los días, mientras que las letras mayúsculas muestran valores con diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre cada muestra para un día concreto.	25

Índice de tablas

Tabla 1 Composición de las emulsiones en %	8
Tabla 2 Resultados de gravimetría obtenidos para antes y después de la digestión. Pesos antes y después de la digestión mostrados como media de dos repeticiones.	18
Tabla 3 Resultados obtenidos para las medidas de color de la emulsión EH.....	27
Tabla 4 Resultados obtenidos para las medidas de color de la emulsión EM.	27

1 Introducción

Actualmente y a lo largo de las últimas décadas se ha podido observar un aumento en el porcentaje de población con síntomas de sobrepeso/obesidad, debido principalmente, al consumo de dietas con un alto contenido calórico, y a la tendencia a seguir un estilo de vida sedentario con poca actividad física. A nivel mundial, la prevalencia de la obesidad casi se ha duplicado en un periodo de 28 años. En 1980 la prevalencia era de 4,8% en hombres y 7,9% en mujeres, y en 2008 aumentó hasta niveles de 9,8% y 13,8% en hombres y mujeres respectivamente (Finucane *et al.*, 2011). Así pues, se estima que 297 millones de mujeres y 205 millones de hombres mayores de 20 años eran obesos en el año 2008. Para el año 2020, se prevé que el número de muertes debidas a enfermedades crónicas no contagiosas, que incluyen la diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares, obesidad y cáncer, representarán el 75% de las muertes totales (Micha *et al.*, 2014).

De los tres principales macronutrientes, el de mayor densidad calórica es la grasa, con 9kcal/g, siendo esta densidad de 4kcal/g para carbohidratos y proteínas. Esto ha provocado un interés creciente en la sociedad por el consumo de productos denominados “light”, los cuales presentan menor contenido en grasa que sus homólogos convencionales. Con el objetivo de ofrecer opciones para el seguimiento de una dieta sana, en la actualidad, se siguen en investigación distintas estrategias. Por una parte, hay tendencia a desarrollar productos con un bajo contenido en grasa, sustituyéndola por proteínas, carbohidratos o aire (Wu, Degner, & McClements, 2013). Por otra parte, las grasas que se utilizan en la formulación de alimentos tienden a ser de mejor calidad, ya que se intenta reemplazar las tradicionales grasas trans y las saturadas por otras insaturadas como los aceites de oliva y de girasol (Sanz, Falomir, & Salvador, 2015). Sin embargo, la grasa contribuye positivamente a la aceptación sensorial de los alimentos por parte de los consumidores, al aportar una textura cremosa, sabor agradable por la presencia de componentes lipofílicos, y a sus efectos saciantes. Algunos alimentos, de hecho, necesitan un determinado tipo de grasas para su fabricación, debido entre otras razones a que las grasas con mayor índice de insaturación se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente, mientras que las saturadas están en estado sólido (Sanz *et al.*, 2015). En consecuencia la elaboración de alimentos con bajo contenido en grasa sigue siendo una tarea complicada para la industria alimentaria (Kaufmann & Palzer, 2011). El estudio estructural es fundamental para comprender las relaciones entre los componentes de los alimentos y puede ayudar a diseñar nuevas matrices/alimentos con una disminución del contenido graso, sin alterar o haciéndolo mínimamente, su aceptación sensorial, y sus propiedades fisicoquímicas, es decir, sin alterar las propiedades del producto convencional. Un ejemplo donde esto se ha conseguido adecuadamente es el helado con bajo contenido en grasa, aunque como desventaja este suele tener una menor estabilidad en el almacenamiento (Palzer, 2009). Otro ejemplo es la mayonesa, ya que también se ha conseguido hacer una versión con menor contenido en grasa. La viscosidad típica de la mayonesa se debe a la formación de los glóbulos de grasa, por lo que si se reduce el contenido en grasa, esta viscosidad se pierde. Mediante el uso de una disolución de almidón, la cual gelifica para espesar la fase acuosa, se obtiene una mayonesa con características similares en lo que respecta a la textura y sabor de esta, pero menor contenido calórico que la convencional (Palzer, 2009).

Las grasas o lípidos son un grupo de compuestos que comprenden gran variedad de moléculas, como pueden ser los ácidos grasos (AG) y los fosfolípidos. No obstante, en los alimentos, los más abundantes son los triglicéridos (TG), consistentes en tres AG unidos mediante enlaces éster a una molécula de glicerina. Debido a la naturaleza apolar de la cadena alifática de los AG, los TG son insolubles en agua y las fuerzas principales de atracción que se presentan entre estas moléculas son las fuerzas de Van der Waals (McClements, Decker, Park, & Weiss, 2009). Mediante el uso de moléculas anfifílicas se puede introducir la grasa, en alimentos con elevado contenido en agua sin

que su separación sea casi instantánea, como ocurre cuando se intenta mezclar un aceite con agua. Estas moléculas anfifílicas consisten en una cabeza polar hidrofílica que se orienta hacia el agua, y una cola apolar lipofílica que está en contacto con los lípidos. Con la suficiente concentración, estas moléculas pueden agregarse de diferentes formas a fin de conseguir una estructura más termodinámicamente estable, por ejemplo con la formación de micelas o bicapas (Fig. 1). De esta forma se minimiza el contacto entre las colas apolares con las moléculas polares del agua (McClements *et al.*, 2009).

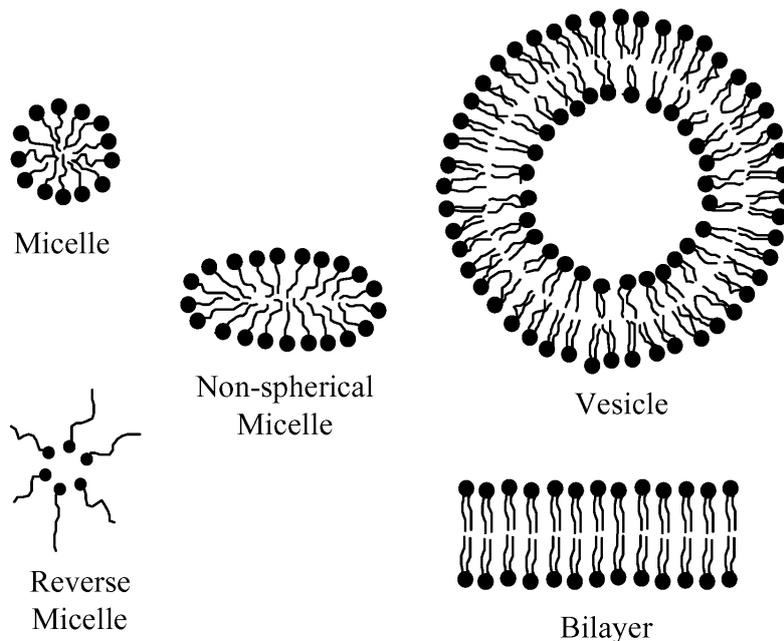


Figura 1 Esquema de los principales tipos de asociaciones que presentan las moléculas anfifílicas (McClements *et al.*, 2009).

Las grasas que se consumen en la dieta humana se encuentran en una gran variedad de formas, por ejemplo en forma líquida, en el caso de los fritos o aliños de ensalada, atrapada en matrices sólidas en los bizcochos o galletas, o en forma de espumas, en la nata montada. Pero cabe destacar que una gran parte de las grasas que se consumen en la dieta se encuentran formando parte de emulsiones alimentarias. Una emulsión es una mezcla homogénea de dos líquidos inmiscibles entre sí. Uno actúa como fase dispersa y el otro se encuentra en suspensión en forma de pequeñas gotitas ó partículas. La leche, mantequilla o mayonesa son claros ejemplos de alimentos consumidos asiduamente donde la grasa se encuentra en forma de emulsión. Además, también la mayoría de las grasas que se consumen en formas diferentes terminan en forma de emulsión en su paso por el tracto gastrointestinal (TGI), debido a las fuerzas mecánicas que actúan en el proceso de digestión, como el masticado o los movimientos de contracción estomacales (Mun, Decker, Park, Weiss, & McClements, 2006). La presencia de moléculas surfactantes en los alimentos y en el cuerpo humano, como los fosfolípidos y las sales biliares, respectivamente, contribuyen a la formación de estas emulsiones en el TGI. Es por esto que normalmente el sustrato para la digestión de las grasas se encuentra en forma de pequeños glóbulos de grasa dispersos en un medio acuoso.

Las emulsiones constan de tres partes, la fase continua, la fase dispersa y la interfase entre estos dos medios. Asimismo, son termodinámicamente inestables debido a la energía libre positiva que requieren para aumentar el área superficial total de los glóbulos dispersos. Por lo tanto, la emulsión tenderá a reducir esta área superficial disminuyendo el número de gotas y aumentando el tamaño de éstas (McClements & Decker, 2000). También afecta a esta inestabilidad las diferentes naturalezas mencionadas anteriormente (sustancias hidrofílicas y lipofílicas), que presentan diferentes

densidades, por lo que se hace necesario la presencia de moléculas anfifílicas o emulsionantes que se ubiquen en la interfase entre las dos sustancias de diferente naturaleza, la acuosa y la lipídica, haciendo así más estable el sistema. Los principales tipos de emulsiones se tratan de aceite en agua (O/W) o de agua en aceite (W/O), dependiendo estas de factores como el porcentaje de cada sustancia o el tipo de emulsionante. Aunque también hay formas más complejas como O/W/O o W/O/W.

Los emulsionantes más utilizados por la industria alimentaria son las proteínas, en su mayoría provenientes de la leche, como pueden ser la proteína de suero o las caseínas. También son ampliamente utilizados como emulsionantes los mono y diglicéridos de AG y la lecitina de soja. Recientemente están ganando protagonismo los derivados de la celulosa para su utilización como emulsionantes. Aún siendo la celulosa una molécula hidrofílica, no es soluble en agua debido a la estructura cristalina que presenta con puentes de hidrógeno intra e intermoleculares. Así pues, aunque la celulosa en sí misma no se puede utilizar como emulsionante, se puede modificar por medio de grupos metoxilo e hidroxipropilo añadidos a la cadena de celulosa mediante enlaces éter para la formación de metilcelulosas (MC) o hidroxipropil metilcelulosas (HPMC) (Sanz *et al.*, 2015). De esta forma, se añaden a la celulosa grupos que presentan hidrofobicidad, mientras la cadena de celulosa sigue siendo hidrofílica, dando como resultado moléculas que presentan actividad emulsionante. Los derivados de celulosa, confieren además una estructura semi-sólida a las emulsiones que forman, pudiendo así servir como sustitutas de grasas sólidas como las mantecas.

Por otro lado, la introducción de la grasa en una emulsión puede afectar a la estabilidad química de esta grasa, dificultando o facilitando su oxidación. En la mayoría de los alimentos, la oxidación de las grasas es un fenómeno indeseable que disminuye la calidad del producto, pues esta oxidación produce el conocido “enranciamiento”, que es la formación de sabores y olores desagradables debido a los compuestos resultantes de la oxidación, aunque en algunos productos, como los quesos, esos compuestos resultantes de la oxidación pueden ser deseables. Oxidación lipídica es el término general más utilizado para expresar la serie de reacciones químicas que tienen lugar en tres distintas fases: iniciación, propagación y finalización. Estudios previos indican que esta serie de reacciones, cuando suceden en una emulsión, ocurren mayoritariamente debido a la interacción entre los hidroperóxidos de los lípidos y metales de transición presentes en la fase acuosa (McClements & Decker, 2000). No obstante, hay muchos factores que pueden afectar a la oxidación de los lípidos presentes en una emulsión. La presencia de impurezas en los surfactantes o ingredientes de la emulsión, sobre todo si éstas son metales de transición, pueden acelerar la oxidación de las grasas. La cantidad de oxígeno disponible determina el grado de oxidación del producto, por lo que mantener la emulsión en un ambiente a vacío o en atmósfera de nitrógeno reduce drásticamente la oxidación (McClements & Decker, 2000). El tipo de lípido también afecta, en tanto que los enlaces insaturados son los más susceptibles de sufrir oxidación, debido a la mayor reactividad de los dobles enlaces. El tipo de emulsionante es también determinante, pues puede ayudar a retardar la oxidación, si éste actúa como quelante de iones metálicos. La goma xantana, por ejemplo ha demostrado reducir significativamente la oxidación de lípidos cuando esta se introduce en la emulsión (Shimada *et al.*, 1994), pero otros emulsionantes como la goma tragacanto o la metilcelulosa no han demostrado las mismas propiedades para atrapar iones metálicos (McClements & Decker, 2000). En otro estudio, llevado a cabo por Kuhn *et al.* (2012), se ha comprobado que en emulsiones realizadas con proteína sérica y aceite de linaza, cuando presentan menor tamaño de glóbulo debido a la mayor presión utilizada en el homogeneizador, la oxidación es mayor en el transcurso de 30 días a temperatura ambiente, debido presumiblemente a la mayor área superficial (Kuhn & Cunha, 2012). Por último, la introducción de antioxidantes en el producto puede reducir casi por completo la oxidación del producto en los plazos previstos para el consumo de éste, especialmente si se trata de antioxidantes sin carga, pues son más solubles en los lípidos que en la fase acuosa.

En el diseño de emulsiones alimentarias para combatir enfermedades relacionadas con la obesidad es importante conocer cómo se digieren a lo largo del TGI. En los humanos, la digestión de las grasas se inicia en el estómago, con la presencia de la lipasa gástrica. No obstante, es en el intestino donde se realiza la mayor parte de la digestión de los lípidos, del 70% al 90%, debido a la lipasa pancreática (Mun, Decker, & McClements, 2007). La lipasa actúa rompiendo los enlaces entre los AG que se encuentran esterificados a la molécula de glicerina, liberando así dos AG, y quedando el tercero unido al glicerol, formando un monoglicérido. Para que la lipasa pancreática pueda catalizar la digestión de los lípidos, ésta se debe adsorber a la superficie de los glóbulos grasos con el fin de encontrarse en proximidad suficiente a los lípidos. Es por ello que la interfase entre los glóbulos grasos y el medio acuoso tiene un papel determinante a la hora de la digestión de las grasas, pudiendo hacer que se realice en mayor o en menor grado. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo por Mun *et al.* (2006) en el que se utilizó una emulsión de aceite en agua con lecitina como emulsionante, se comprobó que cuando los glóbulos se recubrían con quitosano, la digestión de los lípidos era claramente inferior.

Aunque las digestiones *in vivo* son las que mejor representan la digestión de un alimento en condiciones reales, éstas pueden variar dependiendo del sexo, edad, estado de salud y momento en que se realizan (Hur, Lim, Decker, & McClements, 2011), por no mencionar otros inconvenientes como la dificultad y los costes de realizar estas digestiones, así como los problemas éticos que pueden presentar (Kong & Singh, 2008). Es por este motivo que las digestiones *in vitro* son una alternativa más barata, reproducible y rápida para la obtención de primeras hipótesis en lo que respecta a la digestión de un determinado alimento o nutriente (Minekus *et al.*, 2014).

La digestión *in vitro* de los lípidos puede verse afectada por diferentes factores. Entre ellos, uno de gran interés es el componente que está formando parte de la interfase, así como las moléculas que se encuentran cubriendo los glóbulos. Estos componentes pueden favorecer la adsorción de la enzima a la interfase, que es donde ésta se localiza para realizar la digestión de los lípidos, o dificultar esta adsorción, reduciendo así la digestión (Mun *et al.*, 2006). Otro factor que afecta el grado de lipólisis será el tamaño que presenten los glóbulos de grasa, pues a menor tamaño de los glóbulos, mayor será el área superficial donde la enzima se puede adsorber para actuar (Li, Hu, & McClements, 2011). Los ácidos grasos libres (AGL) que se liberan durante la digestión, tienden a colocarse en la interfase, al tratarse estos de moléculas con una cabeza polar y una cadena alifática apolar. La presencia de calcio también influye, debido a que aumenta el ratio de la digestión al reaccionar con los AGL y reducir la presencia de estos en la interfase al crear complejos que precipitan (Hu, Li, Decker, & McClements, 2010). No obstante, una concentración excesiva de calcio, puede provocar la floculación de los glóbulos, dificultando así la acción de la enzima. Las sales biliares pueden producir reducción de la digestión de las grasas en emulsiones, al desplazar la enzima de la interfase, reduciendo así también la digestión lipídica (Li *et al.*, 2011). El tipo de lípido también afecta a la velocidad y grado en que estos son digeridos por la lipasa, en tanto que los ácidos grasos de cadena media o corta, se digieren más rápido que los de cadena larga. Esto es debido a que los AGL de cadenas más cortas, presentan una mayor afinidad por el agua que las cadenas alifáticas más largas, por lo que se ubican en mayor grado en la fase acuosa que los AGL de cadenas largas, los cuales se ubican más en la interfase, disminuyendo la actividad de la lipasa (Zhang, Zhang, Zhang, Decker, & McClements, 2015).

La figura 2 muestra de forma esquemática las condiciones a las que están sometidos los alimentos en su paso por el TGI. En la digestión, la fase oral constituye la primera parte, donde la comida reside únicamente unos cuantos segundos. En esta fase, la emulsión puede sufrir grandes modificaciones por la acción de enzimas como la α -amilasa, electrolitos, proteínas como la mucina y los procesos mecánicos como la masticación y acción de la lengua (Mao & Miao, 2015). En la siguiente fase, la comida desciende por el esófago hasta el estómago, donde tendrá lugar la fase gástrica. En ésta fase, la emulsión es sometida a pH ácidos, así como a la acción de enzimas que actúan en el medio ácido

como la pepsina, a la influencia de electrolitos y a movimientos de peristalsis (Mao & Miao, 2015). Finalmente, en la fase intestinal, el pH vuelve a ascender hasta un valor aproximado de 7. En esta fase la presencia de sales biliares, electrolitos y enzimas como la lipasa pancreática tiene una gran influencia sobre las emulsiones (Mao & Miao, 2015) y la digestión de los lípidos contenidos en éstas.

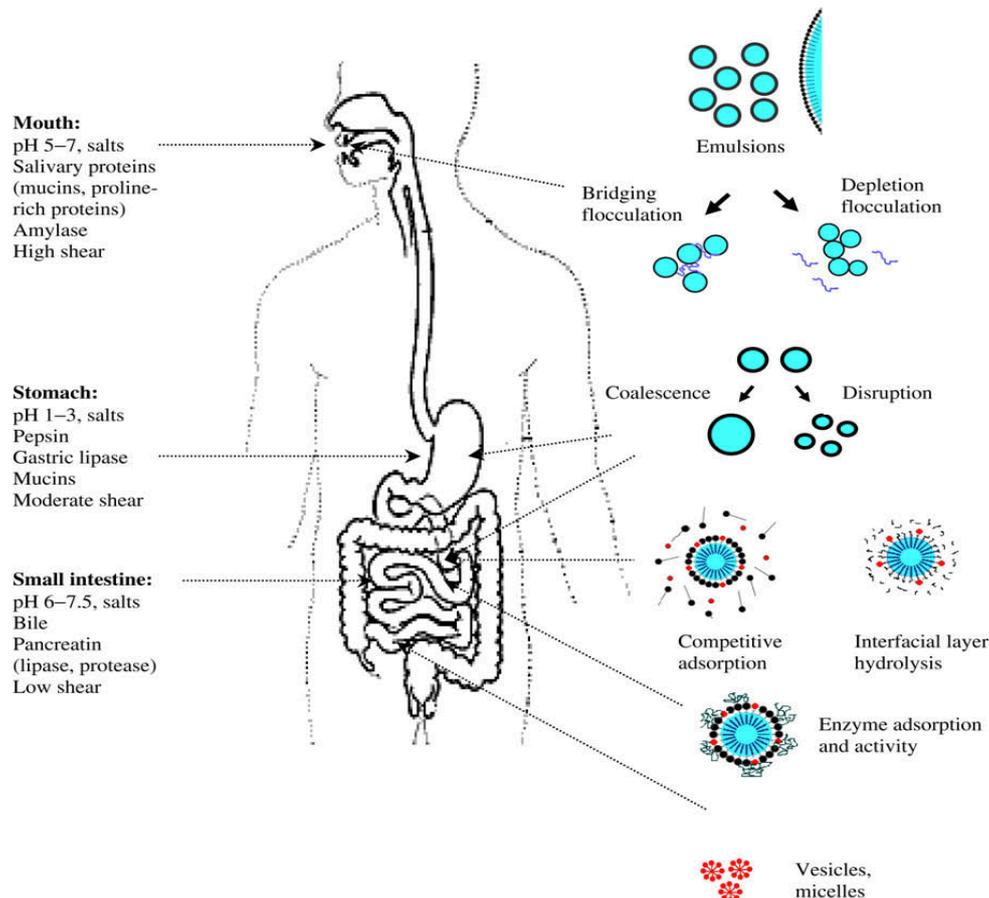


Figura 2 Representación esquemática de las condiciones en cada fase de la digestión y cambios comunes que pueden ocurrir para los glóbulos de la emulsión (Singh, Ye, & Horne, 2009).

A consecuencia de todo lo expuesto anteriormente, hay un interés creciente en el mundo científico por entender y controlar el nivel en que los lípidos presentes en los alimentos se pueden digerir (Li *et al.*, 2011). En ocasiones puede ser interesante potenciar el grado en que se digieren los TG, para favorecer la liberación de ácidos grasos beneficiosos, o compuestos lipofílicos de interés para el cuerpo humano. Mediante la adición de pectina y goma xantana, por ejemplo, se observó una liberación mayor de AGL, por lo que el ratio de digestión de los TG había sido mayor (Qiu, Zhao, Decker, & McClements, 2015a). Sin embargo también puede ser interesante conseguir una digestión menor de los TG, con el fin de reducir el aporte calórico de los alimentos, entre otras cosas para combatir enfermedades relacionadas con la obesidad y el sobrepeso, o como reclamo para el consumidor interesado en la pérdida o mantenimiento del peso. También la industria farmacéutica se puede beneficiar de estos conocimientos para la elaboración de medicamentos que liberen su compuesto activo en la parte deseada del TGI (Li *et al.*, 2011).

En este sentido, una buena vía de acción para luchar contra la obesidad y todas las enfermedades relacionadas podría ser el diseño de nuevas emulsiones que reemplacen la grasa original de los alimentos y que contengan una proporción de grasa media para modificar lo mínimo posible las propiedades fisicoquímicas y sensoriales. Una condición importante sería que dichas emulsiones fueran de digestibilidad reducida; es decir, que pasaran por el TGI siendo menos digeridas que las

emulsiones y grasas habitualmente utilizadas en la formulación de los alimentos. Hasta la fecha no se han encontrado referencias sobre emulsiones con un contenido medio en grasa y alto en agua, de baja digestibilidad, capaces de sustituir la grasa en la formulación de alimentos.

2 Objetivos y plan de trabajo

El principal objetivo de este trabajo es diseñar nuevas emulsiones aceite en agua (O/W) con un contenido medio en aceite, estables y de menor digestibilidad que las grasas convencionales presentes en los alimentos. Para ello se va a utilizar como emulsionantes los éteres de celulosa metilcelulosa e hidroxipropil metilcelulosa.

Para alcanzar estos objetivos se han establecido los siguientes objetivos parciales:

- Estudiar el efecto de diferentes emulsionantes (metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa y proteína sérica) sobre la microestructura de nuevas emulsiones O/W, antes y durante la digestión *in vitro*.
- Estudiar el efecto de diferentes emulsionantes (metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa y proteína sérica) sobre la digestibilidad *in vitro* de nuevas emulsiones O/W.
- Estudiar el efecto de diferentes emulsionantes (metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa y proteína sérica) sobre la estabilidad de las nuevas emulsiones O/W tras la digestión *in vitro*.
- Estudiar la resistencia fisicoquímica al almacenamiento de las nuevas emulsiones O/W, diseñadas con éteres de celulosa.

Para alcanzar los objetivos se programa el siguiente plan de trabajo:

- Búsqueda y estudio bibliográfico, de manera sistemática, durante la realización del Trabajo Final de Grado. Estudio de la normativa y protocolos a seguir en la parte experimental.
- Diseño de experimentos.
- Diseño, desarrollo y obtención de las nuevas emulsiones.
- Determinación de la resistencia de las emulsiones a las digestiones oral, gástrica e intestinal *in vitro*.
- Determinación de la microestructura de las emulsiones, por microscopía láser confocal de barrido (CLSM), antes y tras las digestiones oral, gástrica e intestinal *in vitro*.
- Determinación de la estabilidad de las emulsiones tras las digestiones oral, gástrica e intestinal *in vitro*.
- Determinación de la estabilidad a la oxidación, mediante el cálculo del índice de peróxidos (IP) y los coeficientes de extinción (DC y TC), y la estabilidad física de las emulsiones durante el almacenamiento.
- Análisis de los resultados
- Redacción del documento de Trabajo Fin de Grado

3 Materiales y métodos

3.1 Ingredientes de las emulsiones

Los ingredientes de las emulsiones fueron aceite de girasol (Koipesol, Sevilla, España), agua (Bezoya, Segovia, España) y emulsionante (diferentes éteres de celulosa o aislado de proteína sérica). Para la preparación de las nuevas emulsiones se emplearon como emulsionantes dos diferentes éteres de celulosa con propiedades termogelificantes. Sus especificaciones han sido proporcionadas por el fabricante (The Dow Chemical Co., Alemania): una metilcelulosa (MC) (MX, The Dow Chemical Co., Germany) de alto metoxilo (viscosidad de 50000 mPa·s en disolución acuosa al 2% a 20°C, medido por The Dow Chemical Company siguiendo los métodos de referencia ASTM D1347 y ASTM D2363), y una hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) (F4M, The Dow Chemical Co., Alemania) (29.0% metoxil, 6.8% hidroxipropil, viscosidad de 4000 mPa·s en disolución acuosa al 2% a 20°C, medido por The Dow Chemical Company siguiendo los métodos de referencia ASTM D1347 y ASTM D23633). Para la realización de las emulsiones control se empleó aislado de proteína de suero lácteo (P) ISOLATE WHEY (BestPROTEIN SLU, Barcelona, España). Se prepararon dos emulsiones control, la EP2 y la EP4, con diferente proporción de emulgente (P).

En la tabla 1 se puede ver la proporción de los ingredientes utilizados para la elaboración de las emulsiones con hidroxipropil metilcelulosa (EH), metilcelulosa (EM) y aislado de proteína sérica (EP2 y EP4).

Tabla 1 Composición de las emulsiones en %

	EP2	EP4	EM	EH
Agua (%)	51	49	51	51
Aceite (%)	47	47	47	47
P (%)	2	4	0	0
MC (%)	0	0	2	0
HPMC (%)	0	0	0	2

P: aislado de proteína de suero lácteo; MC: metilcelulosa; HPMC: hidroxipropil metilcelulosa. EP2: emulsión control con un 2% de proteína de suero lácteo como emulgente; EP4: emulsión control con un 4% de proteína de suero lácteo como emulgente; EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente; EH: emulsión con hidroxipropil metilcelulosa como emulgente.

3.2 Preparación de las emulsiones

El emulgente, MC, HPMC ó P se dispersó primero en aceite utilizando un agitador Heidolph (figura 3) a la mínima velocidad (283 rpm) durante 5 min. La mezcla se hidrató posteriormente añadiendo gradualmente agua a 1°C con agitación constante. La temperatura de 1°C se eligió por ser la temperatura de hidratación específica de la MC (Sanz *et al.*, 2015), y se empleó también para el resto de emulsionantes.

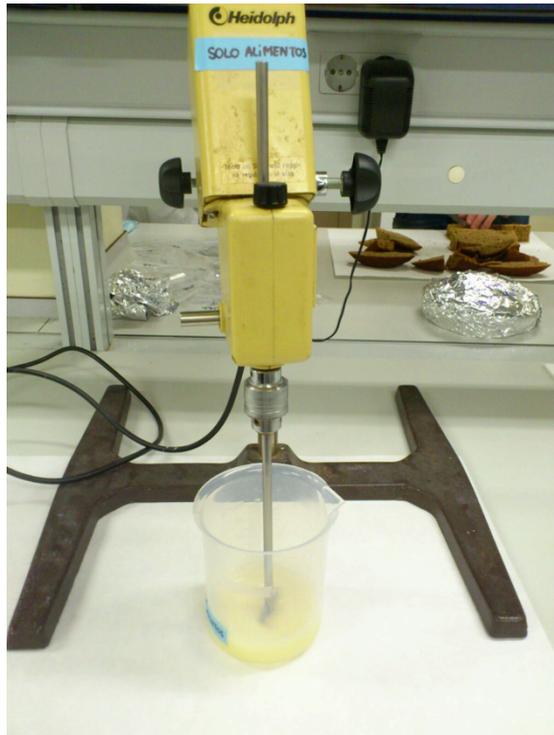


Figura 3 Agitador Heidolph

La agitación continuó utilizando un homogeneizador (Ultraturrax T18, IKA, Alemania) con agitación a 6600 rpm durante 15 s y a 17600 rpm durante 60 s (figura 4). Una vez preparadas, las emulsiones se dejaron en refrigeración a 4°C durante 24h para permitir su completa hidratación.



Figura 4 Proceso de homogenización de la emulsión con ultraturrax.

3.3 Digestión *in vitro* de las emulsiones. Método pH stat.

Para determinar la influencia que las celulosas modificadas, ubicadas en la interfase de los glóbulos de grasa, tienen sobre la biodisponibilidad de la grasa en la emulsión, se realizó una simulación *in vitro* de las condiciones de digestión y se determinaron los AGL liberados con el método pH stat por duplicado. Cada molécula de TG genera dos ácidos grasos libres (AGL) y un monoglicérido (MG) debido a la acción de la lipasa, como se puede ver en la figura 5. Por lo tanto, conociendo la cantidad de triglicéridos (TG) presentes inicialmente en la muestra, y los AGL que se liberan durante la digestión, se puede obtener el porcentaje de estos AGL que han sido digeridos por la lipasa (Li & McClements, 2010). Este porcentaje de AGL se calcula (ecuación 1) mediante el número de moles de álcali (NaOH) necesarios para neutralizar los ácidos grasos liberados, dividido por el número de moles de AGL que podrían ser producidos asumiendo una digestión del 100% (Li & McClements, 2010):

$$\%AGL = 100 * \frac{(V_{NaOH} * M_{NaOH} * P_{m_{lipido}})}{m_{lipido} * 2} \quad (\text{ecuación 1})$$

Donde V_{NaOH} es el volumen (L) de hidróxido sódico utilizado para neutralizar los AGL producidos y mantener el pH estático en 7, M_{NaOH} es la molaridad ($\text{mol} * \text{L}^{-1}$) de la disolución de NaOH utilizada (0,1M), $P_{m_{lipido}}$ es el peso molecular del aceite ($\text{g} * \text{mol}^{-1}$) y m_{lipido} es la masa total del aceite presente en la celda de digestión. Los datos generados en este método pH stat consisten en una gráfica que muestra una curva de %AGL frente al tiempo (Li & McClements, 2010).

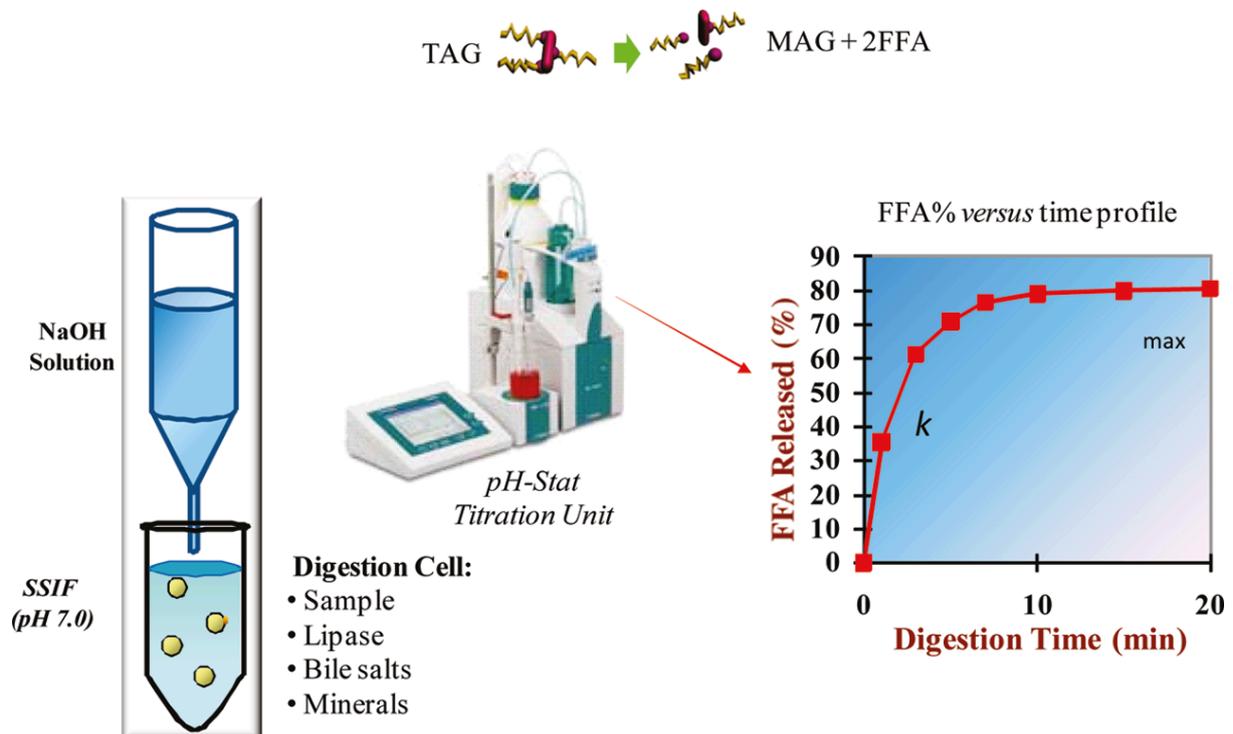


Figura 5 Funcionamiento del método pH stat con valorador automático (Li & McClements, 2010)

Aunque el seguimiento con el método pH stat se realizó sobre la fase intestinal, por ser en ésta donde ocurre la mayor parte de la digestión de los lípidos (Aarak *et al.*, 2013; Bauer, Jakob, & Mosenthin, 2005), las fases anteriores del proceso digestivo también se incluyeron con el fin de simular los posibles cambios previos que pudieran afectar a la estructura de la emulsión en su paso por el TGI. Este método pH stat se llevó a cabo con un valorador automático Mettler-Toledo DL50 (Mettler-Toledo International, Greifensee, Suiza) (figura 6), con vaso de 50 mL de capacidad encamisado, conectado a un baño termostataado a 37°C, bureta de capacidad 10 mL y agitador. Para

monitorizar el proceso en la celda de digestión se emplearon un electrodo de pH de vidrio combinado DG115-SC (Mettler-Toledo International, Greifensee, Suiza) y un sensor de temperatura DT1000 (Mettler-Toledo International, Greifensee, Suiza). El manejo del valorador automático se realizó desde ordenador por medio del software LabX (Versión 1.1)



Figura 6 Valorador automático Mettler-Toledo DL50.

La preparación de la saliva se llevó a cabo según el método propuesto por Mishellany-Dutour *et al.*, (2011) con algunas modificaciones, empleando un ratio saliva:muestra=1:45. Ésta se mezcló con la muestra agitando durante 5 s.

Una vez añadida la muestra a la celda de digestión, donde el fluido gástrico preparado según el estudio de Sanz *et al.* (2007) con modificaciones se había atemperado durante 5 min a 37°C, se ajustó el pH a 2 con HCl 2M. Cuando se alcanzó el pH deseado, se añadió pepsina, siguiendo un ratio 1:250 (enzima:sustrato), (Zhang & Vardhanabhuti, 2014) y se dejó en agitación durante 1h a 37°C.

Para la realización de la fase intestinal se siguió el protocolo propuesto por el estudio de Sanz *et al.* (2007), Lopez-Pena *et al.*, (2015) y Qiu *et al.* (2015b) con algunas modificaciones. Se añadieron sales biliares (Sigma Aldrich, B8631) (46,84 mg/mL) y una disolución de electrolitos. A continuación se ajustó el pH a 7 con NaOH 2M y se añadió pancreatina (Sigma Aldrich P3292) (ratio 1:14 (enzima:sustrato)). Inmediatamente tras la adición de la enzima se inició el método pH stat en el valorador.

3.4 Estabilidad de las emulsiones a la digestión *in vitro*

Para examinar la estabilidad de las emulsiones, es decir su resistencia a la liberación de aceite, se centrifugaron antes y después de la digestión *in vitro* a 14000 rpm, junto con 15 mL de etanol, y se dejaron secar en estufa a 100°C durante una noche. Se calculó la estabilidad determinando la diferencia de peso del aceite extraído antes y después de la digestión.

3.5 Microscopía láser confocal de barrido (CLSM)

Para la observación de las diferentes emulsiones por CLSM, se utilizó un microscopio Nikon Eclipse E800 acoplado a una unidad C1 Confocal (Nikon, Tokyo, Japan) (figura 7). Para excitar los agentes de tinción fluorescentes rodamina B y Nile red, se empleó como fuente de luz un láser Ar-Kr (488 nm). La rodamina B (Fluka, Sigma-Aldrich, Missouri, USA), con una $\lambda_{\text{ex max}}$ de 488 nm y $\lambda_{\text{em max}}$ de 580 nm, se disolvió en agua destilada a una concentración de 2 g/L. Este agente de tinción se utilizó para teñir proteínas e hidratos de carbono. El Nile red (Fluka, Sigma-Aldrich, Missouri, USA), con una $\lambda_{\text{ex max}}$ de 488 nm y $\lambda_{\text{em max}}$ de 515 nm, se disolvió en PEG 200 a una concentración de 0.1 g/L y se utilizó para teñir grasa. Para observar la muestra por CLSM, se colocó una gotita de la emulsión, sobre un portaobjetos de vidrio y se le añadió 20 μL de disolución de rodamina B y 20 μL de disolución de Nile red. Las observaciones se realizaron 10 min después de la difusión de los agentes de tinción en la muestra empleando una lente objetiva de 60x/1.40NA/Oil/ Plan Apo VC Nikon. Las imágenes se obtuvieron y almacenaron con una resolución de 1024 x 1024 pixel utilizando el software del microscopio (EZ-C1 v.3.40, Nikon, Tokyo, Japan).



Figura 7 Microscopio óptico Nikon Eclipse E800 V-PS100E con microscopio láser confocal Nikon C1 acoplado (Nikon, Tokio, Japón).

3.6 Estabilidad fisicoquímica de las emulsiones

Para determinar su estabilidad al almacenamiento, las nuevas emulsiones (EM y EH) y aceite de girasol (A), que actuó como control, se mantuvieron en refrigeración durante un periodo de 30 días. Durante este periodo se determinó la estabilidad física (sinéresis), el índice de peróxidos, el coeficiente de extinción y el color, tanto de las emulsiones como del aceite control (A) a los 0, 10, 20 y 30 días. Para evitar el crecimiento microbiano durante el almacenamiento, se añadió durante la agitación inicial del aceite con el emulsionante 0,1% de ácido sórbico. Se realizaron las determinaciones por triplicado.

3.6.1 Estabilidad física (sinéresis)

Para determinar la estabilidad física de las emulsiones, después de su elaboración, una pequeña cantidad de éstas se introdujo en tubos de vidrio de 26 mm de diámetro que se mantuvieron en refrigeración a 4°C. Se determinó la pérdida de altura que tuvo lugar con el paso del tiempo, y el % de separación ó sinéresis se midió de acuerdo a la ecuación 2 (Goyal et al., 2014):

$$\%Sinéresis = 100 \cdot \frac{H}{H_0} \quad (\text{ecuación 2})$$

Donde H_0 representa la altura inicial de la emulsión y H representa la altura de la fase separada.

Para monitorizar los cambios cada 10 días, se tomaron también imágenes con una cámara Olympus E-510 (Olympus Corporation, Tokio, Japón) de los tubos frente a un fondo negro.

3.6.2 Extracción de la grasa

La determinación del índice de peróxidos (IP) y del coeficiente de extinción se realizó sobre el aceite previamente extraído de la emulsión. Para extraer el aceite contenido en las emulsiones se siguió el protocolo empleado por Jacobsen *et al.* (2003) con ligeras modificaciones. Para ello se introdujeron 25 g de emulsión en tubos de centrifuga que se ultracongelaron a -71°C durante 24 h. Se dejó descongelar la muestra durante 1h y se centrifugó (Sorvall Super T21) durante 10 min a 10765 rpm y 20°C . La capa de sobrenadante, formada por el aceite se recogió para su análisis.

3.6.3 Índice de Peróxidos (IP)

Para examinar el proceso de oxidación en las emulsiones, se midió la formación de peróxidos, los cuales son productos primarios de la oxidación lipídica. La determinación del IP se realizó por triplicado siguiendo el protocolo estándar iodométrico descrito por la AOAC (2005) con modificaciones propuestas por Hornero-Méndez *et al.* (2001). Primero se enjuagó un matraz erlenmeyer con una disolución preparada de ácido acético glacial/diclorometano (6:4), para evitar la presencia de sustancias oxidantes. Se pesaron 0,3 g en el matraz erlenmeyer, con precisión 0,0001 g, y se disolvieron en 30 mL de la disolución de ácido acético glacial/diclorometano, agitando suavemente. Se añadieron 0,5 mL de yoduro potásico, tras lo que se cerró el matraz con un tapón de vidrio esmerilado y se mezcló con agitador magnético durante 60 s. A continuación, se añadieron 30 mL de agua destilada, y se agitó brevemente. Inmediatamente se tituló el yodo liberado con la disolución patrón de tiosulfato sódico 0,001N (cambio de naranja amarillento a amarillo pálido) y, tras la adición de 0,5 mL de disolución de almidón (concentración en masa = 1g/100mL), de violeta a incoloro. La valoración se detuvo cuando la mezcla se mantuvo incolora durante 30 s. Cada día se realizó un blanco sin muestra de aceite. Finalmente, a partir de la muestra inicial de aceite pesada y los mL de tiosulfato sódico utilizados en la valoración, se pudo obtener el índice de peróxidos (IP), expresados en meq de oxígeno activo por kilogramo, mediante la ecuación 3:

$$IP = \frac{(V-V_0) \cdot c_{tio} \cdot 1000}{m} \quad (\text{ecuación 3})$$

Donde V es el volumen de disolución patrón de tiosulfato sódico (0,001N) utilizada en la determinación, en mL; V_0 es el volumen de disolución patrón de tiosulfato sódico utilizada en la determinación en blanco, en mL; c_{tio} es la concentración de la disolución patrón de tiosulfato sódico en moles por litro; m es la masa de la porción para análisis en gramos.

3.6.4 Coeficiente de extinción

Los dienos (DC) y trienos conjugados (TC), que complementan junto con el IP, la determinación de los productos de la oxidación del aceite, presentan un espectro característico en la región ultravioleta. La medida a 232nm es indicadora de los DC formados como productos primarios de oxidación (Rade, Mokrovčak, Štrucelj, Škevin, & Neđeral, 2004). La medida a 270nm a su vez corresponde a los TC que son también productos primarios de oxidación, pero esta medida también corresponde a los

productos de oxidación secundarios como cetonas, aldehídos y alcoholes (De Marco *et al.*, 2007; Nikovska, 2010). Para conocer la resistencia de las emulsiones a la oxidación se determinó el coeficiente de extinción (DC formados (K_{232}) y TC formados (K_{270})) (Nikovska, 2010).

El protocolo para la determinación de los coeficientes de extinción específicos, K_{232} y K_{270} siguió la norma ISO 3656:2011 (ISO, 2011). Para medir la absorbancia UV se empleó un espectrofotómetro Cecil CE 1021 (Cecil Instruments, Cambridge, Reino Unido). Primero se comprobó que la absorbancia del ciclohexano a 232 nm era inferior a 0.12, utilizando agua como referencia. Seguidamente se realizó un blanco con el disolvente empleado (ciclohexano) para la disolución de la muestra. Se pesó una cantidad de 0.01 g (precisión 0,0001 g), y se llevó a un matraz aforado de 10 mL. Se disolvió la porción para análisis en unos mL de ciclohexano, y se enrasó con el mismo disolvente. Se enjuagó la cubeta de cuarzo con la disolución de análisis, y se rellenó con dicha disolución para determinar la absorbancia en el espectrofotómetro (intentando obtener siempre valores de absorbancia comprendidos entre 0.2 y 0.8). La absorbancia se midió a longitudes de onda de 232nm y de 270nm. Cada muestra se analizó por triplicado. A partir del peso de la muestra, y la absorbancia obtenida, fue posible obtener la extinción específica, K_λ (coeficiente de extinción) a cada longitud de onda específica, λ , a partir de la ecuación 4:

$$K_\lambda = \frac{E_\lambda}{cs} \quad (\text{ecuación 4})$$

Donde E_λ es la extinción medida a la longitud de onda λ ; c es la concentración de la disolución en gramos por cada 100 mL; s es el paso óptico de la cubeta en centímetros.

Para eliminar el efecto del ácido sórbico, que presenta dobles enlaces conjugados, sobre las medidas de absorbancia se realizaron medidas previamente con la presencia del conservante y sin esta. La diferencia se restó posteriormente a las medidas obtenidas.

3.6.5 Medidas de color

El color de las diferentes muestras se midió utilizando un Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japón). Para comprobar los cambios de color que pudieran sufrir las emulsiones, los cuales son difícilmente cuantificables de manera objetiva por el ojo humano, se hicieron medidas del color que se expresaron mediante las coordenadas de la *Commission Internationale de l'Eclairage* (CIE $L^*a^*b^*$) (Davidov-Pardo, Gumus, & McClements, 2016) con referencia al iluminante C y observador próximo al estándar 2. Este sistema hace uso de tres variables matemáticas para definir el color, siendo estas: L^* que representa la luminosidad ($L^*=0$ es negro y $L^*=100$ es blanco); a^* que indica la dirección de color entre rojo ($+a^*$) y verde ($-a^*$); b^* que indica la dirección hacia amarillo ($+b^*$) o azul ($-b^*$). Así pues, valores de $a^*=0$ y $b^*=0$ corresponden al punto acromático (gris) (McClements, 2002b). A partir de estas tres coordenadas se pueden calcular otros parámetros como el croma ó C^* (ecuación 5), que mide la intensidad o saturación de color (McGuire, 1992):

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{ecuación 5})$$

y el tono ó h^* (ecuación 6), que mide la orientación relativa del color respecto al origen 0° en el espacio tridimensional CIE $L^*a^*b^*$ (Boix, Navarrete, Martínez, Oliag, & Ballesteros, 2007).

$$h^* = \arctg \frac{b^*}{a^*} \quad (\text{ecuación 6})$$

La diferencia de color (ΔE^*) entre dos muestras se calculó mediante la ecuación 7:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (\text{ecuación 7})$$

3.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y las mínimas diferencias significativas de Fisher (LSD) se calcularon con un nivel de significación del 95% ($P < 0,05$). Para ello, se empleó el programa estadístico XLSTAT (versión 2014.5.03, Microsoft Excel, Barcelona, España).

4 Resultados y discusión

4.1 Digestibilidad *in vitro* de las emulsiones.

En la figura 8 se muestra el porcentaje de ácidos grasos (AGL) que se liberó de las emulsiones estudiadas en este trabajo (EM, EH, EP2 y EP4), durante el proceso de la digestión intestinal *in vitro*, debido a la acción de la lipasa presente en la pancreatina. Como se puede apreciar, existieron diferencias entre las dos emulsiones control, elaboradas con proteína de suero lácteo, EP 2 y EP 4, ya que la emulsión elaborada con mayor porcentaje de proteína emulsionante, EP 4, fue la que apareció más digerida. Probablemente esto es debido al hecho de que la emulsión EP4 presenta glóbulos más pequeños y de aspecto más redondeado y homogéneo que la EP2, tal y como se observa en las imágenes de la figura 9 correspondiente a microscopía confocal láser de barrido (CLSM). La mayor proporción de emulsionante facilita la acción de la enzima al proporcionar mayor área superficial ó interfase (Golding & Wooster, 2010; Li & McClements, 2010). Estas dos emulsiones control, además, presentaron un aumento más rápido de AGL al inicio del proceso de la digestión intestinal *in vitro*, seguido por un crecimiento más gradual a tiempos mayores, lo que está de acuerdo con estudios anteriores que también examinaron la liberación de AGL durante la digestión *in vitro* de emulsiones (Giang *et al.*, 2016; Guo, Ye, Lad, Dagleish, & Singh, 2016; Lopez-Pena & McClements, 2015; Qiu *et al.*, 2015b; Zhu, Ye, Verrier, & Singh, 2013).

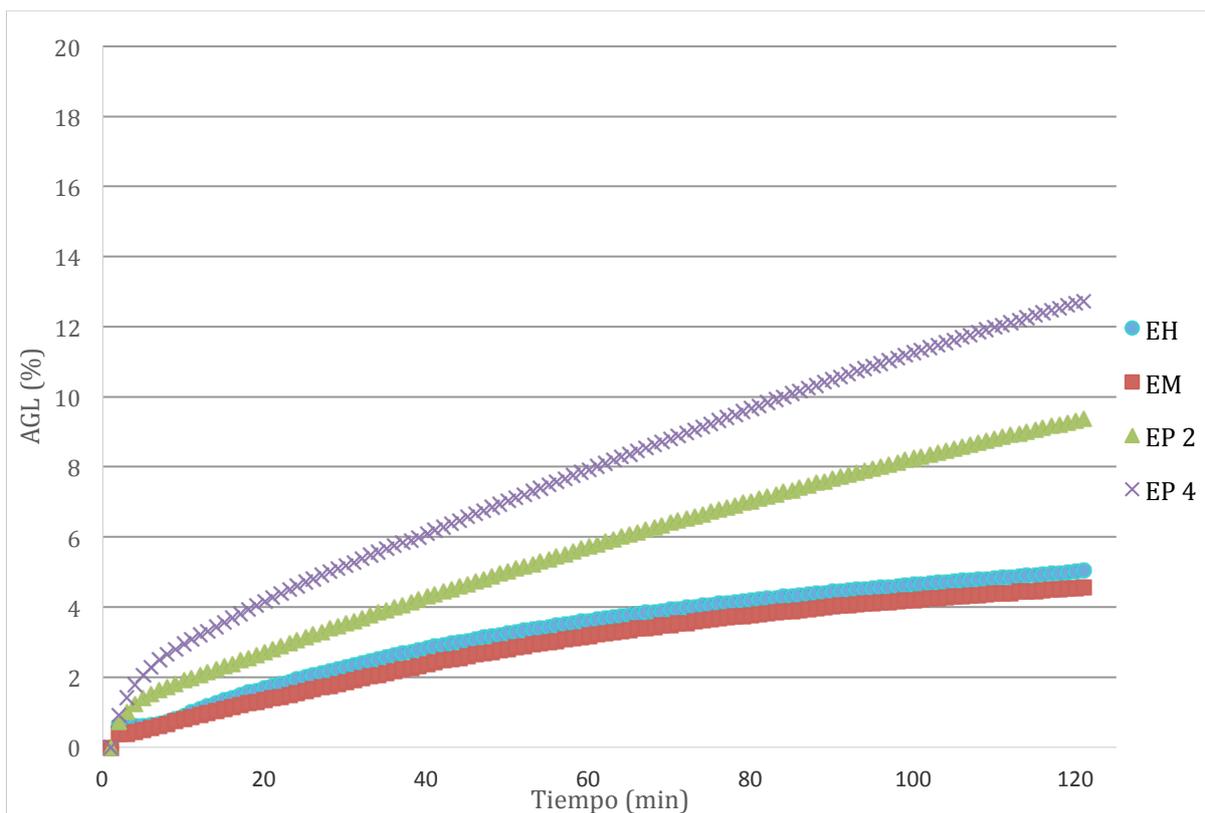


Figura 8 Porcentaje de AGL en función del tiempo de digestión intestinal *in vitro*. Los valores representados corresponden a la media de dos repeticiones por emulsión. EP2: emulsión control con un 2% de proteína de suero lácteo como emulgente; EP4: emulsión control con un 4% de proteína de suero lácteo como emulgente; EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente; EH: emulsión con hidroxipropil metilcelulosa como emulgente.

Las dos emulsiones elaboradas con celulosas modificadas, EH y EM, presentaron una digestibilidad menor, así como una liberación de ácidos grasos más gradual desde el inicio de la digestión intestinal

in vitro que las elaboradas con proteína de suero (EP2 y EP4). Las emulsiones EH y EM mostraron un porcentaje de AGL un 46,50% y un 51,50% respectivamente inferior al de la EP2 al final de la digestión (120 min). Esta menor digestibilidad de las emulsiones elaboradas con éteres de celulosas podría deberse a la formación por parte de las celulosas modificadas de una barrera física alrededor de los glóbulos de grasa. Tanto la HPMC que está formando parte de la EH como la MC que está constituyendo la emulsión EM están formadas por unidades de glucosa unidas mediante enlace glicosídico β 1-4 (Silva *et al.*, 2008) que no es digerible ni fermentable en el TGI. (Yokoyama *et al.*, 2011). Además estos biopolímeros son no-iónicos, lo que les confiere una gran resistencia al pH, a la presencia de sales (McClements, 2005; Nasatto *et al.*, 2015), y por lo tanto tienen una gran estabilidad a las condiciones de la digestión. De esta forma es posible que la matriz que forman estas celulosas se mantenga en gran parte durante el proceso de la digestión *in vitro*. La HPMC ha sido utilizada anteriormente como matriz hidrofílica con el fin de realizar una liberación retardada de compuestos nutricionales (Chessa *et al.*, 2014; Sanz & Luyten, 2006; Williams, Ward, Hardy, & Melia, 2009). Esta liberación retardada se debe a que la HPMC, al ser expuesta al tracto gastrointestinal (TGI) forma una capa de gel protectora, la cual tiene que ser erosionada antes de la liberación de los compuestos activos (Chessa *et al.*, 2014). Es previsible, pues, que estas celulosas tengan un efecto protector similar cuando se encuentran formando parte de las emulsiones a digerir, proporcionando una barrera física frente a la lipasa pancreática. En un estudio llevado a cabo con hámsteres a los que se les suministraron tres dietas diferentes con elevado contenido graso a base de comida basura (i) pizza, ii) pound cake y iii) hamburguesa con patatas fritas, todas ellas liofilizadas y molidas), se observó que los grupos de hámsteres a los que se les suministró HPMC o celulosa microcristalina (MCC) en sus dietas, presentaron una excreción significativamente mayor de grasas saturadas, insaturadas, trans y sales biliares en heces respecto al grupo control (Yokoyama *et al.*, 2011).

Las emulsiones diseñadas en este trabajo presentan una proporción de grasa elevada, por lo tanto una concentración de glóbulos alta, y además por el proceso de preparación de la emulsión, estos son de tamaño relativamente grande. No se han encontrado referencias de trabajos en los que se estudie la digestión *in vitro* de emulsiones similares. Las emulsiones estudiadas en este trabajo presentaron una liberación de AGL en general menor que la obtenida en otros estudios previos en los que también se utilizó el método pH stat pero siempre en emulsiones de menor contenido en grasa (Bellesi, Martinez, Pizones Ruiz-Henestrosa, & Pilosof, 2016; Mun *et al.*, 2007; Qiu *et al.*, 2015b).

4.2 Estabilidad de las emulsiones a la digestión *in vitro*

La tabla 2 muestra los datos obtenidos en las medidas de gravimetría de las emulsiones antes y después de la digestión.

Tabla 2 Resultados de gravimetría obtenidos para antes y después de la digestión. Pesos antes y después de la digestión mostrados como media de dos repeticiones.

Emulsión	Muestra inicial		Grasa Extraída	
	Peso total (g)	Peso grasa (g)	Antes Digestión (g)	Después Digestión (g)
EP 2	15	7,05	0,55 (0,01)	4,45 (0,16)
EP 4	15	7,05	0,26 (0,00)	4,47 (0,03)
EH	15	7,05	0,26 (0,10)	2,93 (0,62)
EM	15	7,05	0,06 (0,08)	1,22 (0,10)

EP2: emulsión control con un 2% de proteína de suero lácteo como emulgente; EP4: emulsión control con un 4% de proteína de suero lácteo como emulgente; EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente; EH: emulsión con hidroxipropil metilcelulosa como emulgente.

Mientras que las dos emulsiones elaboradas con proteína de suero (EP2 y EP4) tuvieron valores de estabilidad muy similares después de la digestión, las dos emulsiones elaboradas con celulosas (EH y EM) presentaron valores de estabilidad superiores que los de las elaboradas con proteína de suero, pues solo el 41,56% de la grasa contenida en la emulsión EH pudo ser extraída. Este valor fue menor incluso para la emulsión EM, donde solo el 17,3% de la grasa contenida en esta emulsión pudo ser separada físicamente de la emulsión.

Estos resultados están en línea con los valores de digestibilidad *in vitro* obtenidos en el método pH stat, y confirmarían la presencia de una matriz resistente tanto en la emulsión EM elaborada con MC como en la emulsión EH elaborada con HPMC, quedando la grasa más atrapada en la emulsión EM. La emulsión EM es también la que presentaba los menores valores de digestibilidad *in vitro*. Esto podría ser debido a que los sustituyentes metilo, más hidrofóbicos que los grupos hidroxipropilo, interaccionan entre sí con el aumento de la temperatura, para formar un “gel claro” a partir de los 30 grados (Nasatto *et al.*, 2014) que podría favorecer la estabilidad de la emulsión.

4.3 Microestructura de las emulsiones

En la figura 9 se pueden observar las imágenes obtenidas, mediante microscopía confocal láser de barrido (CLSM) de las diferentes emulsiones, en las diferentes etapas de la digestión *in vitro*.

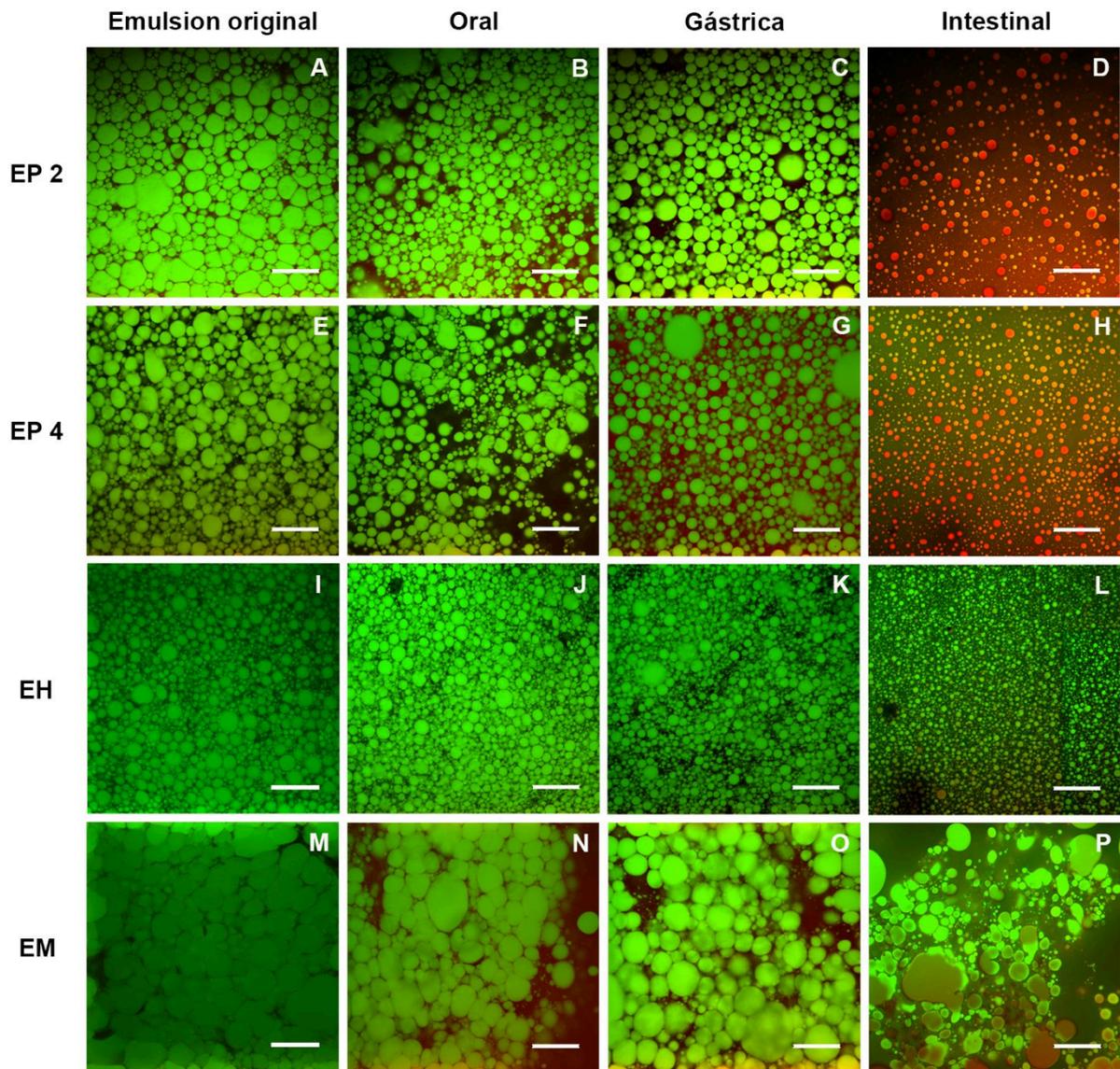


Figura 9 Imágenes tomadas con microscopio confocal láser de barrido (CLSM) de las emulsiones EP 2, EP 4, EH y EM antes y durante la digestión *in vitro* al finalizar las fases oral, gástrica e intestinal. Barra blanca correspondiente a 60 μm. EP2: emulsión control con un 2% de proteína de suero lácteo como emulgente; EP4: emulsión control con un 4% de proteína de suero lácteo como emulgente; EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente; EH: emulsión con hidroxipropil metilcelulosa como emulgente.

La emulsión original control elaborada con proteína aislada de suero lácteo al 2% (EP 2) apareció formada por glóbulos de estructura poliédrica y de distintos tamaños (Figura 9A). El rango de tamaño de los glóbulos fue muy amplio y dispar, además, estos glóbulos presentaron una estructura íntegra con límites bien definidos. Cuando esta emulsión se preparó con una cantidad de emulgente mayor, al 4% (EP 4) (Figura 9E), los glóbulos aparecieron con un aspecto más redondeado homogéneo, probablemente la mayor cantidad de emulsionante pudo encapsular mejor la grasa. En las emulsiones originales EP 2 y EP 4 no parecieron observarse fenómenos de coalescencia ni de floculación. Tanto los procesos de digestión oral (Figura 9B y F) como gástrica *in vitro* (Figura 9C y G)

influyeron de forma sustancial en el aspecto de los glóbulos de grasa de las emulsiones control originales, probablemente debido a los fenómenos físicos simulados a los que se sometió la muestra en estos procesos, ya que se apreciaron con una apariencia mucho más fluida que en las emulsiones sin digerir. En la emulsión EP 2 se produjeron cambios en la fase de digestión oral *in vitro* (Figura 9B) en el tamaño y la forma de los glóbulos, que se volvieron más redondeados y de tamaños menos dispares que en la emulsión original (sin digerir) (Figura 9A). En esta emulsión EP 2 no se apreciaron fenómenos de coalescencia durante la digestión oral *in vitro*. En la emulsión EP 4, los cambios producidos en la fase de digestión oral *in vitro* (Figura 9F) no fueron tan notables aunque sí parece que tuvo lugar fenómenos de coalescencia. El efecto de la digestión gástrica *in vitro* (Figuras 9C y G) sí produjo una modificación importante en la forma de los glóbulos en las dos emulsiones de proteína, ya que aparecieron de forma generalizada mucho más redondeados que antes de la digestión. Estos cambios estarían producidos presumiblemente por la acción de la pepsina gástrica que actúa sobre la proteína sérica (Mao & Miao, 2015). Se observó también en la emulsión EP 4 la presencia de grandes glóbulos probablemente formados por fenómenos de coalescencia. La fase de digestión intestinal *in vitro* influyó de forma similar en las dos emulsiones originales EP 2 y EP 4 (Figuras 9D y H). El tamaño de los glóbulos disminuyó de forma notable y su aspecto fue totalmente redondeado si se compara con la emulsión control original, es decir, sin digerir.

La estructura de las emulsiones elaboradas con las celulosas modificadas fue diferente a la de las elaboradas con proteína. Las elaboradas con celulosa se mostraron con una apariencia compacta y estable. En las emulsiones de celulosa, probablemente los glóbulos se estabilizaron debido a la formación de una red de celulosa hidratada presente en la fase acuosa (Lin, Wang, & Xu, 2003), que pudo prevenir fenómenos de floculación y coalescencia debido a una menor movilidad de los glóbulos dentro de la matriz (Aranberri, Binks, Clint, & Fletcher, 2006).

La emulsión EH presentó una apariencia compacta y densa (Figura 9I). Estuvo formada por glóbulos de aspecto semi-redondeado y de tamaños muy dispares. No se apreció en ella fenómenos de coalescencia. La fase de digestión oral *in vitro* (Figura 9J) no pareció afectar a la estructura de la emulsión ya que presentó un aspecto similar a la no digerida u original (Figura 9I). La fase de digestión gástrica *in vitro* (Figura 9K) tampoco afectó ni al tamaño ni a la forma de los glóbulos que continuaron teniendo un aspecto semi-redondeado, pero sí a la apariencia general de la emulsión que perdió densidad y adoptó un aspecto más fluido, debido a la adición de los fluidos gástricos. En esta etapa de digestión gástrica *in vitro*, los glóbulos de grasa de las emulsiones EP 2 y EP 4, a diferencia de en la EH, sí que mostraron ya un aspecto redondeado y bien definido. La fase de digestión intestinal *in vitro* (Figura 9L) produjo un efecto similar que en las emulsiones EP 2 y EPI 4, ya que el tamaño de los glóbulos disminuyó y su aspecto adoptó una apariencia totalmente redondeada si se compara con la emulsión EH sin digerir. La diferencia entre las emulsiones de proteína sérica EP 2 y EP 4, y la emulsión con la HPMC, EH, es que ésta mantuvo una estructura densa y compacta tras la digestión. Esto indicaría una menor digestibilidad tal y como se ha podido comprobar en el estudio realizado de digestión *in vitro* de las emulsiones.

La emulsión EM estuvo formada por glóbulos en general más grandes que los de las otras emulsiones estudiadas (EP 2, EP 4 y EH) y de aspecto poliédrico (Figura 9M). Estos glóbulos, en la emulsión EM se mantuvieron unidos unos con otros íntimamente por lo que la emulsión adoptó una apariencia muy compacta y densa, incluso más que la emulsión EH. Esta apariencia compacta y densa puede deberse a la mayor presencia de grupos sustituyentes hidrofóbicos, en la metilcelulosa, que confieren mayor hidrofobicidad a la celulosa, si se compara con la hidroxipropilmetilcelulosa. Esto favorece las interacciones intermoleculares entre los grupos hidrofóbicos y por tanto la apariencia más densa de la emulsión (Sanz et al., 2015). La fase de digestión oral *in vitro* (Figura 9N) no pareció afectar a la estructura de la emulsión EM ya que presentó un aspecto similar a la no digerida. La fase de digestión gástrica *in vitro* (Figura 9O) sí modificó el aspecto de los glóbulos ya que aparecieron con estructura menos poliédrica, además entre ellos pareció intuirse la aparición de fenómenos

incipientes de coalescencia. La digestión intestinal *in vitro* (Figura 9P) afectó de forma muy considerable la estructura de la emulsión EM. En la emulsión digerida se observó la grasa estructurada de diferentes forma y tamaños, pudiéndose apreciar tanto glóbulos pequeños y redondos como grandes y poliédricos, y además importantes fenómenos de coalescencia. El aspecto de esta emulsión digerida fue irregular y diferente al de las otras emulsiones. Igual que en la emulsión EH, esta emulsión EM continuó manteniendo la apariencia compacta de la emulsión antes de la digestión. En este sentido y probablemente, tanto el aspecto original denso de esta emulsión EM, que está constituida por glóbulos de gran tamaño, lo que significa menor área superficial donde las enzimas puedan actuar, como el aspecto denso que sigue manteniendo la emulsión tras la digestión *in vitro* indican una baja digestibilidad de la emulsión.

4.4 Estabilidad fisicoquímica de las emulsiones

4.4.1 Estabilidad física (sinéresis)

Como se puede apreciar en la figura 10, las nuevas emulsiones diseñadas con celulosa modificada tuvieron una buena estabilidad a lo largo de los 30 días de almacenamiento en refrigeración, ya que en ningún caso se observó separación de fases ó sinéresis. En la figura 4, a modo de ejemplo, se presentan imágenes de las emulsiones EH y EM a los 0 y 30 días de almacenamiento. En la emulsión EH se produjo durante el almacenamiento liberación de burbujas de aire hacia la superficie de la emulsión. Sin embargo en la emulsión EM, las pequeñas burbujas permanecieron en la emulsión durante todo el periodo de almacenamiento. Esta emulsión EM impidió el desplazamiento de las burbujas hacia la superficie, probablemente debido a la estructura más compacta que presenta esta emulsión debido a la presencia de la celulosa MC, tal y como se ha podido observar en el estudio de la microestructura. Además la MC presenta una mayor viscosidad que la HPMC.

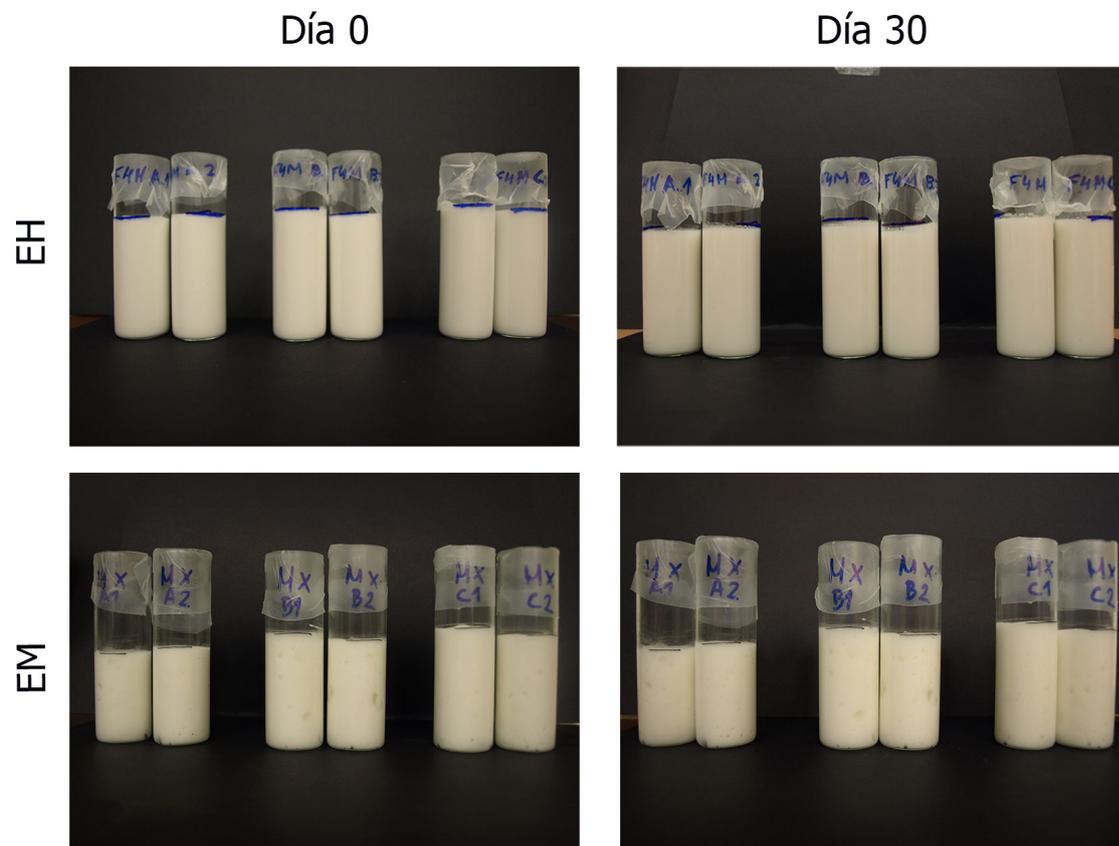


Figura 10 Estabilidad física de las emulsiones EH y EM a los 0 y 30 días de almacenamiento. EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente; EH: emulsión con hidroxipropil metilcelulosa como emulgente.

Las emulsiones EM y EH diseñadas en este trabajo parecen presentar una buena estabilidad física, al considerar la cantidad de aceite (47%) incluido en la emulsión y la baja cantidad de emulsionante (2%) empleado. En otro estudio en que se utilizó proteína NaCas al 2%, para estabilizar una cantidad de aceite casi 5 veces menor (10%) que en el presente estudio, se pudo apreciar desestabilización de la emulsión (Julio et al., 2015). De forma similar, en un estudio en que utilizaron maltodextrina:WPC-80 (25:75) como estabilizante, se observó una pequeña desestabilización a las 24h después de la preparación de la emulsión (Goyal et al., 2014).

4.4.2 Índice de Peróxidos (IP)

La estructura que adoptan las grasas en una emulsión puede afectar en gran medida a su grado de oxidación. Para conocer la estabilidad de las emulsiones a la oxidación, se determinó el índice de peróxidos (IP) en aceite de girasol (A) y en las dos emulsiones desarrolladas en este trabajo (EM y EH) durante el almacenamiento de las emulsiones a 4°C (figura 11).

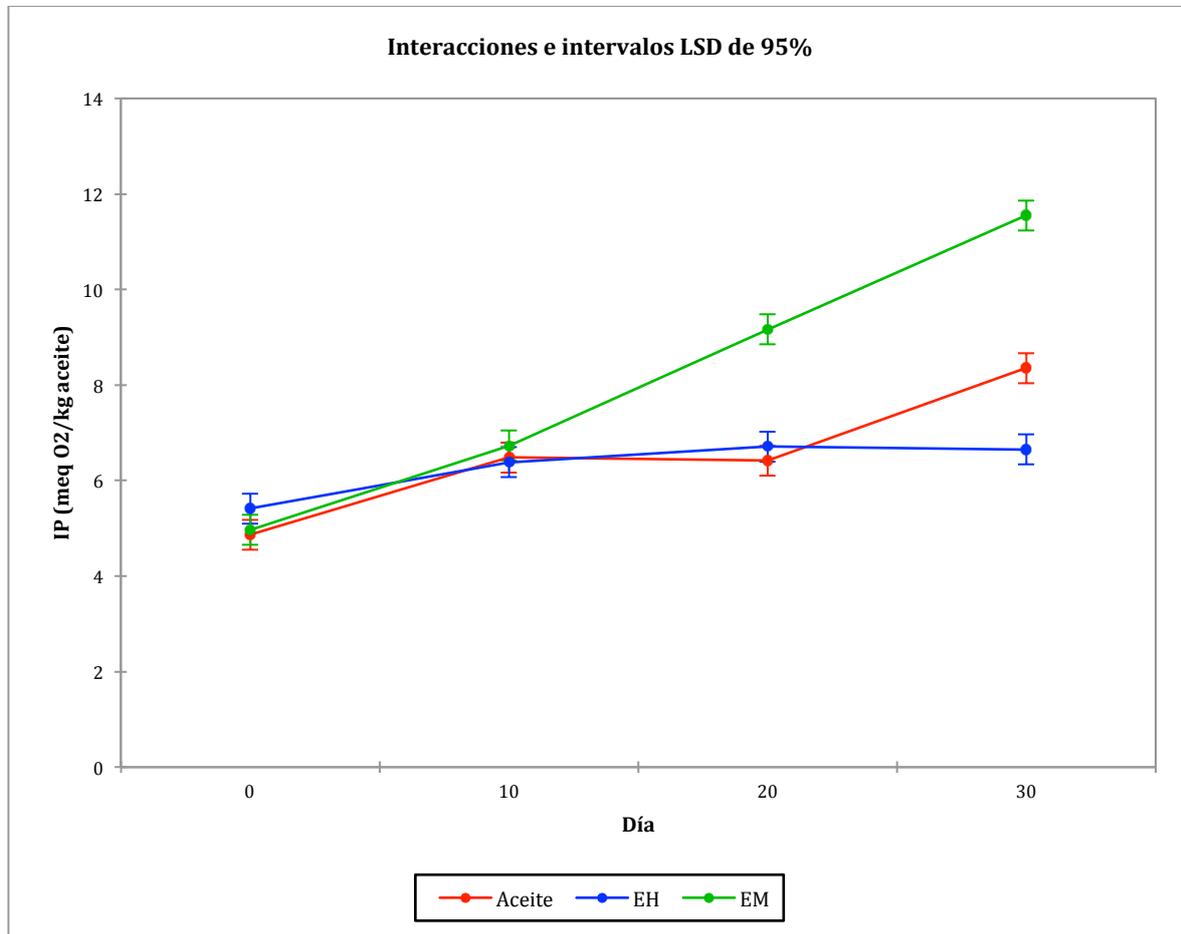


Figura 11 Resultados obtenidos para los Índices de peróxidos a los diferentes días para las dos emulsiones y el control. EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente; EH: emulsión con hidroxipropil metilcelulosa como emulgente; A: aceite de girasol (control).

A lo largo de los primeros 10 días de almacenamiento en refrigeración, las dos emulsiones (EM y EH) y el aceite de girasol (A) tuvieron una evolución similar en los valores de IP, no encontrándose diferencias significativas ($P > 0,05$) entre estas muestras. A partir del día 20 de almacenamiento se pudieron observar diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las distintas muestras. La emulsión EM presentó el mayor incremento de IP con valores de 9,16 meq O₂/kg aceite, acentuándose más esta diferencia ($P < 0,05$) en el día 30 de almacenamiento, llegando a valores de 11,55 meq/kg aceite. La muestra de aceite (A), sufrió un incremento marcado ($P < 0,05$) en los valores de IP principalmente entre los días 20 y 30 de almacenamiento, llegando a valores de 8,35 meq O₂/kg aceite después del transcurso de un mes. La emulsión más estable a la oxidación fue la EH, que mantuvo los valores de IP constantes desde el día 10 al día 30 de almacenamiento en refrigeración.

En literatura previa, donde se analizó la oxidación de lípidos en emulsiones mantenidas en condiciones similares, se comprobó que algunos emulsionantes podían disminuir el grado de oxidación de la grasa (Goyal et al., 2014; Julio et al., 2015). No se han encontrado estudios previos

sobre la oxidación de grasas en emulsiones con HPMC o MC. En el caso de utilizar proteína sérica como emulsionante, sí existen datos que indican (Tong, Sasaki, McClements, & Decker, 2000) que ésta proteína reduce la oxidación de las grasas, posiblemente debido a que actúa como antioxidante y quelante de iones metálicos, los cuales son pro-oxidantes (Goyal et al., 2014). Por otra parte, las moléculas presentes en la interfase pueden actuar como barreras físicas que impiden el acceso de las sustancias oxidantes, las cuales son normalmente hidrofílicas, al aceite presente en la fase dispersa de la emulsión (McClements & Decker, 2000). Esto podría explicar porque la emulsión EH, al formar una barrera física, redujo la formación de peróxidos respecto al aceite (A). La emulsión EM presentó los mayores valores de IP a lo largo del almacenamiento. El efecto barrera de la MC no fue tan efectivo como protector de la oxidación de la emulsión EM, a pesar de presentar esta celulosa modificada una mayor viscosidad y efecto de compactación estructural, y por lo tanto, presumiblemente, una ralentización del movimiento a nivel molecular de los reactivos oxidantes. En un estudio previo llevado a cabo por Basaran (1999) el aumento de la viscosidad producido por la adición del polisacárido goma xantana tuvo muy poca influencia en el coeficiente de difusión para la sacarosa a través de la disolución (Basaran, Coupland, & McClements, 1999). Por lo tanto, el movimiento a nivel molecular de las moléculas pequeñas de sustancias oxidantes sigue siendo relativamente fácil en matrices de polisacáridos utilizados como espesantes (McClements & Decker, 2000). Así pues, la mayor oxidación de la emulsión EM con respecto a las otras dos emulsiones podría explicarse por la elevada viscosidad de esta emulsión que además de no influir en la difusión de moléculas oxidantes, favorece la retención de las burbujas de aire que se forman en el proceso de elaboración, como se ha podido comprobar en el estudio de la estabilidad física de las emulsiones. Esto provocaría una mayor presencia de oxígeno y por lo tanto mayor área de contacto con el oxígeno el cual es el principal reactivo causante de la formación de peróxidos. También el mayor tamaño de glóbulo en la emulsión EM, como se ha podido apreciar en las imágenes del estudio de la microestructura, podría favorecer la oxidación, lo que está de acuerdo con otros estudios donde el mayor tamaño de glóbulo dio lugar a mayor oxidación de los lípidos en emulsiones (Julio et al., 2015; Let, Jacobsen, Sørensen, & Meyer, 2007; Nakaya, Ushio, Matsuwaka, Shimizu, & Ohshima, 2005).

4.4.3 Coeficiente de extinción

En la figura 12 se muestran los valores de los coeficientes de extinción (K_{232}) (fig 12A) y (K_{270}) (fig 12B) para el aceite (A), y las dos emulsiones (EH y EM).

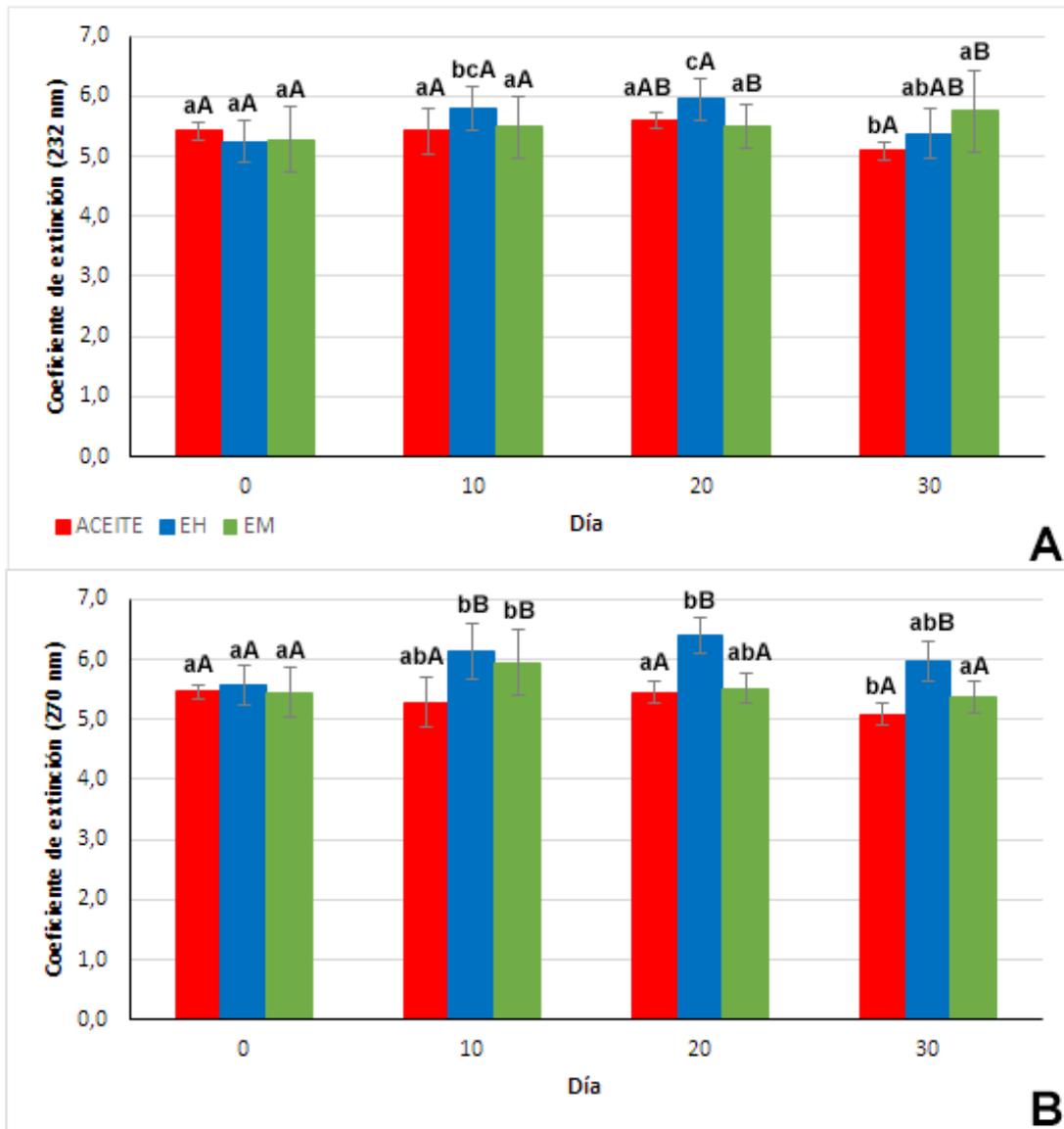


Figura 12 Resultados de los coeficientes de extinción obtenidos para las dos emulsiones y la muestra de aceite. Las letras minúsculas muestran valores con diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para una de las muestras a lo largo de los días, mientras que las letras mayúsculas muestran valores con diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre cada muestra para un día concreto. EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente; EH: emulsión con hidroxipropil metilcelulosa como emulgente.

Los valores de coeficiente de extinción para los dienos conjugados (DC), al inicio del periodo de almacenamiento y tras 10 días de almacenamiento (Figura 12A) fueron similares para las tres muestras estudiadas, no existiendo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ellas. A los 20 días de almacenamiento, sí existieron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las dos emulsiones, siendo la EH la que presentó mayores valores de DC, no existiendo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre A y cualquiera de las dos emulsiones. A los 30 días de almacenamiento, la emulsión EM presentó valores de DC significativamente superiores a los del aceite, no encontrándose diferencias entre el aceite y la emulsión EH, ni entre las dos emulsiones. Parece que las dos emulsiones presentan

comportamientos similares en cuanto a la formación de DC, que en ocasiones es muy similar también al del aceite. El efecto del almacenamiento afectó a la emulsión EH, que sufrió aumentos significativos en los valores de DC tanto a los 10, como a los 20 días de almacenamiento, y al aceite, que disminuyó su valor el día 30 de almacenamiento. Si se compara el inicio y el final del almacenamiento no existieron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las emulsiones.

En cuanto a los valores de coeficiente de extinción para los trienos conjugados (TC), en el inicio del almacenamiento no existieron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las emulsiones y el aceite de girasol. Tras 10 días de almacenamiento se produjo un aumento significativo ($P < 0,05$) en los valores de TC en ambas emulsiones, no existiendo diferencias significativas entre ellas. Sin embargo si se comparan todas las muestras, tras 20 días de almacenamiento, solo la emulsión EH presentó diferencias significativas ($P < 0,05$) en los valores de TC, diferencias que se mantuvieron también hasta el día 30 de almacenamiento. En cuanto al efecto del almacenamiento, ambas emulsiones presentaron un incremento significativo ($P < 0,05$) en los valores de TC, el día 10 de almacenamiento, pero el día 20 de almacenamiento, ese incremento solo lo presentó la emulsión EH. Si se compara el inicio y el final del periodo de almacenamiento no existieron diferencias significativas ($P > 0,05$) en los valores de TC para ninguna de las emulsiones. Parece que las emulsiones tienen una buena estabilidad frente a la oxidación.

4.4.4 Medidas del color

En las tabla 3 y 4 se presentan los valores de las medidas de color de las dos emulsiones diseñadas en este trabajo (EM y EH) y su evolución a lo largo del almacenamiento. La L^* no pareció verse afectada por el periodo de almacenamiento en ninguna de las dos emulsiones. Como se ha podido observar en el apartado de estabilidad física, ambas emulsiones mantuvieron un alto grado de estabilidad estructural a lo largo del tiempo. Probablemente los glóbulos de grasa también se mantienen intactos. Esto está en acuerdo con estudios previos que relacionan la concentración de glóbulos, con la luminosidad. (McClements, 2002a). En cuanto a las coordenadas a^* , b^* , C^* y h^* tanto en la emulsión EM como en la EH se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en sus valores a partir del día 10 de almacenamiento. Los valores de a^* disminuyeron, lo que implica un viraje hacia el color verde, y los valores de b^* aumentaron, implicando un viraje hacia el color amarillo. El aumento del valor b^* , podría deberse a una ligera coalescencia de los glóbulos de grasa, ya que en emulsiones de aceite en agua, este parámetro aumenta con el aumento del radio de glóbulo (McClements, 2002b), aunque este cambio no llega a ser perceptible para el ojo humano. Estos cambios en las coordenadas a^* y b^* produjeron por tanto un ligero aumento de la intensidad de color o croma (C^*) en ambas emulsiones durante los 30 días de almacenamiento. En cuanto al parámetro h^* , los valores permanecieron estables en la emulsión EM, a partir del día 10 de almacenamiento, mientras que en la emulsión EH mostraron un aumento gradual durante todo el periodo de almacenamiento.

Tabla 3 Resultados obtenidos para las medidas de color de la emulsión EH

	EH			
	Día 0	Día 10	Día 20	Día 30
L*	84,66 ^{a*} (0,13)	84,39 ^b (0,31)	84,62 ^{ab} (0,19)	84,57 ^{ab} (0,12)
a*	-2,89 ^a (0,03)	-2,98 ^b (0,07)	-3,11 ^c (0,02)	-3,15 ^c (0,04)
b*	2,15 ^a (0,06)	2,45 ^b (0,07)	2,68 ^c (0,04)	2,84 ^d (0,05)
C*	3,60 ^a (0,05)	3,86 ^b (0,07)	4,11 ^c (0,03)	4,24 ^d (0,06)
h*	143,35 ^a (0,66)	140,54 ^b (1,01)	139,28 ^c (0,53)	137,91 ^d (0,39)
ΔE^*		0,114	0,282	0,483

*Diferentes letras minúsculas en la misma fila para cada muestra indican valores con una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) según la prueba de rangos múltiples LSD de Fisher. EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente

Tabla 4 Resultados obtenidos para las medidas de color de la emulsión EM.

	EM			
	Día 0	Día 10	Día 20	Día 30
L*	79,55 ^{a*} (0,85)	78,74 ^a (1,12)	78,59 ^a (1,03)	78,97 ^a (0,55)
a*	-2,76 ^a (0,03)	-2,97 ^b (0,06)	-3,06 ^c (0,05)	-2,99 ^b (0,19)
b*	2,81 ^a (0,13)	3,56 ^b (0,16)	3,84 ^c (0,20)	3,76 ^{bc} (0,18)
C*	3,94 ^a (0,1)	4,63 ^b (0,14)	4,91 ^c (0,17)	4,80 ^{bc} (0,18)
h*	134,46 ^a (1,28)	130,07 ^b (1,35)	128,58 ^b (1,39)	128,53 ^b (2,43)
ΔE^*		0,827	1,401	0,949

*Diferentes letras minúsculas en la misma fila para cada muestra indican valores con una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) según la prueba de rangos múltiples LSD de Fisher. EH: emulsión con hidroxipropil metilcelulosa como emulgente.

En cuanto a las diferencias de color, en la emulsión EH se pudo ver un progresivo aumento de ΔE^* , llegando a alcanzar un valor de 0,483 en el día 30 de almacenamiento, siendo estas diferencias de

color muy pequeñas, y por tanto no se espera que estas fueran observables por el ojo humano. En la emulsión EM aunque los valores de ΔE^* fueron superiores a los de la emulsión EH durante todo el periodo de almacenamiento, también estas diferencias de color fueron muy pequeñas. Las emulsiones EH y EM diseñadas en este trabajo no sufrieron variaciones perceptibles de color por lo que fueron estables durante un periodo de almacenamiento de 30 días.

5 Conclusiones

Las emulsiones O/W emulsionadas con los éteres de celulosa MC e HPMC presentan una menor digestibilidad *in vitro* que las emulsiones convencionales elaboradas con proteína de suero lácteo. Los éteres de celulosa, MC e HPMC aportan estabilidad estructural a las emulsiones, que presentan pocos cambios estructurales después de su paso por el tracto gastrointestinal simulado. La emulsión EM emulsionada con MC es la que presenta mayor estabilidad estructural y menores valores de digestibilidad *in vitro*. Así pues, existe una relación directa entre la estabilidad estructural que aportan los éteres de celulosa MC e HPMC y la resistencia a la digestión *in vitro* de las emulsiones que los contienen como emulgentes.

Las emulsiones O/W emulsionadas con los éteres de celulosa MC e HPMC presentan además una buena estabilidad y resistencia oxidativa durante el almacenamiento por lo que se presentan como una opción a tener en cuenta para sustituir la grasa convencional en la elaboración de nuevos alimentos, enfocados a un público preocupado por su salud y/o que desea reducir su ingesta calórica. Sería interesante estudiar el efecto que estas emulsiones tienen sobre la digestibilidad de la grasa cuando se incluyen en un alimento real y la aceptación sensorial del mismo.

6 Bibliografía

- Aarak, K. E., Kirkhus, B., Holm, H., Vogt, G., Jacobsen, M., & Vegarud, G. E. (2013). Release of EPA and DHA from salmon oil - a comparison of in vitro digestion with human and porcine gastrointestinal enzymes. *The British Journal of Nutrition*, *110*(8), 1402–10. doi:10.1017/S0007114513000664
- AOAC. (2005). *Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL*. (AOAC INTERNATIONAL, Ed.) (18th ed.). Gaithersburg, MD, USA: AOAC INTERNATIONAL.
- Aranberri, I., Binks, B. P., Clint, J. H., & Fletcher, P. D. I. (2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensioactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, *7*(3).
- Basaran, T. K., Coupland, J. N., & McClements, D. J. (1999). Monitoring molecular diffusion of sucrose in xanthan solutions using ultrasonic velocity measurements. *Journal of Food Science*, *64*(1), 125–128. doi:10.1111/j.1365-2621.1999.tb09874.x
- Bauer, E., Jakob, S., & Mosenthin, R. (2005). Principles of physiology of lipid digestion. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *18*(2), 282–295. doi:10.5713/ajas.2005.282
- Bellesi, F. A., Martinez, M. J., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M., & Pilosof, A. M. R. (2016). Comparative behavior of protein or polysaccharide stabilized emulsion under in vitro gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, *52*, 47–56. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.06.007
- Boix, A. C., Navarrete, N. M., Martínez, C. G., Oliag, P. T., & Ballesteros, G. M. (2007). *Propiedades físicas de los alimentos* (1st ed.). Valencia: Editorial UPV.
- Chessa, S., Huatan, H., Levina, M., Mehta, R. Y., Ferrizzi, D., & Rajabi-Siahboomi, A. R. (2014). Application of the Dynamic Gastric Model to evaluate the effect of food on the drug release characteristics of a hydrophilic matrix formulation. *International Journal of Pharmaceutics*, *466*(1-2), 359–367. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.03.031
- Davidov-Pardo, G., Gumus, C. E., & McClements, D. J. (2016). Lutein-enriched emulsion-based delivery systems: Influence of pH and temperature on physical and chemical stability. *Food Chemistry*, *196*, 821–827. doi:10.1016/j.foodchem.2015.10.018
- De Marco, E., Savarese, M., Parisini, C., Battimo, I., Falco, S., & Sacchi, R. (2007). Frying performance of a sunflower/palm oil blend in comparison with pure palm oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *109*(3), 237–246. doi:10.1002/ejlt.200600192
- Finucane, M. M., Stevens, G. A., Cowan, M. J., Danaei, G., Lin, J. K., Paciorek, C. J., ... Ezzati, M. (2011). National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9,1 million participants. *The Lancet*, *377*(9765), 557–567. doi:10.1016/S0140-6736(10)62037-5
- Giang, T. M., Gaucel, S., Brestaz, P., Anton, M., Meynier, A., Trelea, I. C., & Le Feunteun, S. (2016). Dynamic modeling of in vitro lipid digestion: Individual fatty acid release and bioaccessibility kinetics. *Food Chemistry*, *194*, 1180–1188. doi:10.1016/j.foodchem.2015.08.125
- Golding, M., & Wooster, T. J. (2010). The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *15*(1-2), 90–101. doi:10.1016/j.cocis.2009.11.006
- Goyal, A., Sharma, V., Upadhyay, N., Singh, a. K., Arora, S., Lal, D., & Sabikhi, L. (2014). Development of stable flaxseed oil emulsions as a potential delivery system of ω -3 fatty acids. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(July), 4256–4265. doi:10.1007/s13197-014-1370-2
- Guo, Q., Ye, A., Lad, M., Dalgleish, D., & Singh, H. (2016). Impact of colloidal structure of gastric digesta on in-vitro intestinal digestion of whey protein emulsion gels. *Food Hydrocolloids*, *54*, 255–265. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.10.006
- Hornero-Méndez, D., Pérez-gálvez, A., & Mínguez-mosquera, M. I. 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. doi:10.1007/s11746-001-0404-y

- Hu, M., Li, Y., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2010). Role of calcium and calcium-binding agents on the lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model. *Food Hydrocolloids*, *24*(8), 719–725. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.03.010
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, *125*(1), 1–12. doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.036
- ISO. (2011). ISO 3656:2011 - Animal and vegetable fats and oils: Determination of ultraviolet absorbance expressed as specific UV extinction. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Jacobsen, C., Xu, X., Skall Nielsen, N., & Timm-Heinrich, M. (2003). Oxidative stability of mayonnaise containing structured lipids produced from sunflower oil and caprylic acid. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *105*(8), 449–458. doi:10.1002/ejlt.200300796
- Julio, L. M., Ixtaina, V. Y., Fernández, M. A., Sánchez, R. M. T., Wagner, J. R., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2015). Chia seed oil-in-water emulsions as potential delivery systems of ω -3 fatty acids. *Journal of Food Engineering*, *162*, 48–55. doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.04.005
- Kaufmann, S. F. M., & Palzer, S. (2011). Food structure engineering for nutrition, health and wellness. *Procedia Food Science*, *1*(Icef 11), 1479–1486. doi:10.1016/j.profoo.2011.09.219
- Kong, F., & Singh, R. P. (2008). Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of Food Science*, *73*(5), 67–80. doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x
- Kuhn, K. R., & Cunha, R. L. (2012). Flaxseed oil - Whey protein isolate emulsions: Effect of high pressure homogenization. *Journal of Food Engineering*, *111*(2), 449–457. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.01.016
- Let, M. B., Jacobsen, C., Sørensen, A.-D. M., & Meyer, A. S. (2007). Homogenization Conditions Affect the Oxidative Stability of Fish Oil Enriched Milk Emulsions: Lipid Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(5), 1773–1780. doi:10.1021/jf062391s
- Li, Y., Hu, M., & McClements, D. J. (2011). Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model: Proposal for a standardised pH-stat method. *Food Chemistry*, *126*(2), 498–505. doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.027
- Li, Y., & McClements, D. J. (2010). New mathematical model for interpreting pH-stat digestion profiles: Impact of lipid droplet characteristics on in vitro digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(13), 8085–8092. doi:10.1021/jf101325m
- Lin, L., Wang, Q., & Xu, Y. (2003). Thermoreversible Association and Gelation of Methylcellulose in Aqueous Solutions. *Nihon Reoroji Gakkaishi*, *31*(5), 287–296. doi:10.1678/rheology.31.287
- Lopez-Pena, C. L., & McClements, D. J. (2015). Impact of a food-grade cationic biopolymer (ϵ -polylysine) on the digestion of emulsified lipids: In vitro study. *Food Research International*, *75*, 34–40. doi:10.1016/j.foodres.2015.05.025
- Mao, L., & Miao, S. (2015). Structuring Food Emulsions to Improve Nutrient Delivery During Digestion. *Food Engineering Reviews*, *7*(4), 439–451. doi:10.1007/s12393-015-9108-0
- McClements, D. J. (2002a). Colloidal basis of emulsion color. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *7*(5-6), 451–455. doi:10.1016/S1359-0294(02)00075-4
- McClements, D. J. (2002b). Theoretical prediction of emulsion color. *Advances in Colloid and Interface Science*, *97*(1-3), 63–89. doi:10.1016/S0001-8686(01)00047-1
- McClements, D. J. (2005). *Food Emulsions: Principles, practices, and techniques* (2nd ed.). Boca Raton, United States of America: CRC Press.
- 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. doi:10.1111/j.1365-2621.2000.tb10596.x
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., & Weiss, J. (2009). Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *49*(6), 577–606. doi:10.1080/10408390902841529
- McGuire, R. G. (1992). Reporting of objective colour measurements. *HortScience*, *27*(12), 1254–1255.
- Micha, R., Khatibzadeh, S., Shi, P., Fahimi, S., Lim, S., Andrews, K. G., ... Mozaffarian, D. (2014). Global, regional, and national consumption levels of dietary fats and oils in 1990 and 2010: a

- systematic analysis including 266 country-specific nutrition surveys. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 348(apr14_18), g2272. doi:10.1136/bmj.g2272
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodkorb, a. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113–24. doi:10.1039/c3fo60702j
- Mishellany-Dutour, A., Peyron, M. A., Croze, J., François, O., Hartmann, C., Alric, M., & Woda, A. (2011). Comparison of food boluses prepared in vivo and by the AM2 mastication simulator. *Food Quality and Preference*, 22(4), 326–331. doi:10.1016/j.foodqual.2010.12.003
- Mun, S., Decker, E. a., & McClements, D. J. (2007). Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Research International*, 40(6), 770–781. doi:10.1016/j.foodres.2007.01.007
- Mun, S., Decker, E. A., Park, Y., Weiss, J., & McClements, D. J. (2006). Influence of interfacial composition on in vitro digestibility of emulsified lipids: Potential mechanism for chitosan's ability to inhibit fat digestion. *Food Biophysics*, 1(1), 21–29. doi:10.1007/s11483-005-9001-0
- Nakaya, K., Ushio, H., Matsuwaka, S., Shimizu, M., & Ohshima, T. (2005). Effect of oil droplet size on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Lipids*, 40(5), 501–507.
- Nasatto, P. L., Pignon, F., Silveira, J. L. M., Duarte, M. E. R., Nosedo, M. D., & Rinaudo, M. (2014). Interfacial properties of methylcelluloses: The influence of molar mass. *Polymers*, 6(12), 2961–2973. doi:10.3390/polym6122961
- Nasatto, P., Pignon, F., Silveira, J., Duarte, M., Nosedo, M., & Rinaudo, M. (2015). Methylcellulose, a Cellulose Derivative with Original Physical Properties and Extended Applications. *Polymers*, 7(5), 777–803. doi:10.3390/polym7050777
- Nikovska, K. (2010). Oxidative stability and rheological properties of oil-in-water emulsions with walnut oil. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(3), 172–177.
- Palzer, S. (2009). Food structures for nutrition, health and wellness. *Trends in Food Science and Technology*, 20(5), 194–200. doi:10.1016/j.tifs.2009.02.005
- Qiu, C., Zhao, M., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2015a). Influence of anionic dietary fibers (xanthan gum and pectin) on oxidative stability and lipid digestibility of wheat protein-stabilized fish oil-in-water emulsion. *Food Research International*, 74, 131–139. doi:10.1016/j.foodres.2015.04.022
- Qiu, C., Zhao, M., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2015b). Influence of protein type on oxidation and digestibility of fish oil-in-water emulsions: Gliadin, caseinate, and whey protein. *Food Chemistry*, 175, 249–257. doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.112
- Rade, D., Mokrovčak, Ž., Štrucelj, D., Škevin, D., & Neđeral, S. (2004). The Effect of Processing Conditions on the Nontriacylglycerol Constituents of Sunflower Oil. *Acta Alimentaria*, 33(1), 7–18. doi:10.1556/AAlim.33.2004.1.2
- Sanz, T., Falomir, M., & Salvador, A. (2015). Reversible thermal behaviour of vegetable oil cellulose ether emulsions as fat replacers. Influence of glycerol. *Food Hydrocolloids*, 46, 19–27. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.11.030
- Sanz, T., Handschin, S., Nuessli, J., & Conde-Petit, B. (2007). Effect of Thickening Agent and Fat in Custard Microstructure Upon in vitro Enzymatic Digestion. *Food Science and Technology International*, 13(5), 381–388. doi:http://dx.doi.org.subzero.lib.uoguelph.ca/10.1177/1082013207086094
- Sanz, T., & Luyten, H. (2006). Effect of thickening agent in the in vitro mouth, stomach and intestine release of tyrosol from enriched custards. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 703–711. doi:10.1016/j.foodhyd.2005.06.013
- Shimada, K., Muta, H., Nakamura, Y., Okada, H., Matsuo, K., Yoshioka, S., ... Nakamura, T. (1994). Iron-binding property and antioxidative activity of xanthan on the autoxidation of soybean oil in emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(8), 1607–1611. doi:10.1021/jf00044a004
- Silva, S. M. C., Pinto, F. V., Antunes, F. E., Miguel, M. G., Sousa, J. J. S., & Pais, A. A. C. C. (2008). Aggregation and gelation in hydroxypropylmethyl cellulose aqueous solutions. *Journal of Colloid*

- and Interface Science*, 327(2), 333–340. doi:10.1016/j.jcis.2008.08.056
- Singh, H., Ye, A., & Horne, D. (2009). Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Progress in Lipid Research*, 48(2), 92–100. doi:10.1016/j.plipres.2008.12.001
- Tong, L., Sasaki, S., McClements, D. J., & Decker, E. a. (2000). Antioxidant Activity of Whey in a Salmon Oil Emulsion. *Journal of Food Science*, 65(8), 1325–1329. doi:10.1111/j.1365-2621.2000.tb10606.x
- Williams, H. D., Ward, R., Hardy, I. J., & Melia, C. D. (2009). The extended release properties of HPMC matrices in the presence of dietary sugars. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/j.jconrel.2009.05.017
- Wu, B. C., Degner, B., & McClements, D. J. (2013). Creation of reduced fat foods: Influence of calcium-induced droplet aggregation on microstructure and rheology of mixed food dispersions. *Food Chemistry*, 141(4), 3393–3401. doi:10.1016/j.foodchem.2013.06.044
- Yokoyama, W., Anderson, W. H. K., Albers, D. R., Hong, Y. J., Langhorst, M. L., Hung, S. C., ... Young, S. A. (2011). Dietary hydroxypropyl methylcellulose increases excretion of saturated and trans fats by hamsters fed fast food diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 11249–11254. doi:10.1021/jf2020914
- Zhang, R., Zhang, Z., Zhang, H., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2015). Influence of lipid type on gastrointestinal fate of oil-in-water emulsions: In vitro digestion study. *Food Research International*, 75, 71–78. doi:10.1016/j.foodres.2015.05.014
- Zhang, S., & Vardhanabhuti, B. (2014). Intragastric gelation of whey protein-pectin alters the digestibility of whey protein during in vitro pepsin digestion. *Food & Function*, 5, 102–10. doi:10.1039/c3fo60331h
- Zhu, X., Ye, A., Verrier, T., & Singh, H. (2013). Free fatty acid profiles of emulsified lipids during in vitro digestion with pancreatic lipase. *Food Chemistry*, 139(1-4), 398–404. doi:10.1016/j.foodchem.2012.12.060