

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA
I DEL MEDI NATURAL



**Diseño de emulsiones con éteres de celulosa para
reemplazar la grasa en alimentos: estabilidad, estructura
y digestión *in vitro*.**

TRABAJO FINAL DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: BERTA PONS VIDAL

TUTORA: AMPARO QUILES CHULIÁ

COTUTORA: ISABEL HERNANDO HERNANDO

Curso académico: 2016/2017
VALENCIA, ENERO 2017



Alumna: Berta Pons Vidal

Tutora: Amparo Quiles Chuliá

Cotutora: Isabel Hernando Hernando

Valencia, enero 2017

RESUMEN

Una opción para reducir la ingesta calórica y por lo tanto las enfermedades relacionadas con el sobrepeso es la reformulación de alimentos. El diseño de emulsiones, capaces de reemplazar la grasa convencional de los alimentos, de baja digestibilidad lipídica y que por tanto van a disminuir la proporción de grasa absorbible por el organismo podría ser una respuesta adecuada tanto a nivel industria como de consumidor. En este trabajo se han desarrollado emulsiones aceite/agua (O/W) utilizando como emulsionantes los éteres de celulosa, metilcelulosa e hidroxipropil metilcelulosa, y se han estudiado y relacionado varios factores como la estabilidad, la estructura y la digestibilidad *in vitro* de las emulsiones. Los resultados obtenidos demuestran que las emulsiones diseñadas presentan una baja digestibilidad lipídica y podrían ser adecuadas para sustituir la grasa de los alimentos.

RESUM

L'interès creixent en reduir la ingesta calòrica de la població per a així disminuir les malalties relacionades amb el sobrepès, ens porta a buscar noves formulacions per als aliments. És per això que s'ha optat pel disseny d'unes emulsions que reemplaçarien el greix convencional dels aliments, aconseguint-ne així una menor absorció. En aquestes emulsions O/W s'han utilitzat com emulsionants els èters de cel·lulosa, metilcel·lulosa i hidroxipropil metilcel·lulosa. I, a més, s'han estudiat diversos factors com l'estabilitat, l'estructura, el color i la digestibilitat *in vitro*. Els resultats de l'estudi demostren que les emulsions dissenyades presenten una baixa digestibilitat lipídica y podrien ser adequats per substituir el greix dels aliments.

ABSTRACT

The growing interest in reducing the caloric intake of the population to reduce diseases related to overweight leads to search new formulations for food. The design of emulsions , which could replace the conventional fat of food, thus achieving a lower absorption of fat is studied in this work. Cellulose ethers, methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose, have been used as emulsifiers in these O/W emulsions. In addition, several factors such as stability, structure, colour and *in vitro* digestibility have been studied. The results of the study show that these new emulsions are good substitutes for food fat, as they can decrease their absorption.

PALABRAS CLAVE: emulsión, grasa, metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, estabilidad, oxidación, digestión *in vitro*, microscopia óptica, microscopía láser confocal de barrido.

KEYWORDS: emulsion, fat, methylcellulose, hydroxypropyl methylcellulose, stability, oxidation, *in vitro* digestion, optical microscopy, confocal microscopy.

Agradecimientos

Quiero utilizar estas líneas para agradecer a todas esas personas que han estado a mi lado y han depositado su confianza en mí.

En primer lugar, a Amparo e Isabel por hacerme un hueco en el laboratorio cuando parecía casi imposible, por sus consejos y su confianza. A Jenny por su trabajo incansable, por su ayuda, tanto en el laboratorio como en la redacción, y por el gran apoyo que me ha dado.

Por hacer las horas de laboratorio más divertidas, gracias a las grandes profesionales que forman parte del departamento y a Gerard por brindarme su apoyo en cualquier momento.

No podria acabar sense agrair als meus pares i a Eloy per aguantar-me en els pitjors moments, ni quan jo mateix ho podia fer. Al meu germà, "TIS", per obrir-me els ulls i aconsellar-me este grau. A les meues boniques per alegrar-me tots els dies de classe i fer que els quatre anys passaren volant. I als meus nebotets per donar-me l'energia necessària per passar la setmana fora de casa.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Definición de grasa. Repercusión del consumo excesivo de grasa.....	1
1.2. Reducción del contenido de grasa.....	1
1.3. Emulsiones.....	2
1.4. Digestión <i>in vitro</i>	4
2. Objetivos	5
3. Materiales y métodos.....	6
3.1. Materiales.....	6
3.1.1.Emulsiones	6
3.1.1.1. Ingredientes.....	6
3.1.1.2. Preparación	6
3.2. Métodos.....	7
3.2.1.Estabilidad de las emulsiones.....	7
3.2.1.1. Estabilidad física	7
3.2.1.2. Medidas de color.....	7
3.2.1.3. Índice de peróxidos	8
3.2.2.Técnicas microscópicas.....	9
3.2.2.1. Microscopia óptica.....	9
3.2.2.2. Microscopia láser confocal de barrido (CLSM).....	9
3.2.3.Digestiones <i>in vitro</i>	10
3.2.4.Análisis estadístico.....	12
4. Resultados y discusión.....	13
4.1. Estabilidad de las emulsiones.....	13
4.1.1. Estabilidad física	13
4.1.2. Medidas de color.....	14
4.1.3.Índice de peróxidos.....	17
4.2. Microestructura de las emulsiones.....	18
4.3. Digestibilidad <i>in vitro</i>	21
5. Conclusiones.....	23
6. Bibliografía.....	24

Índice de figuras

Figura I: Recreación de la emulsión de aceite en el agua. Las gotitas amarillas son gotitas de aceite y el fondo azul cielo es la fase acuosa. (scienceandcooking.seas.harvard.edu, 2016).....	3
Figura II: Se puede considerar que una emulsión aceite en agua consiste en tres fases: el interior de la gotita de aceite, la región interfacial (que son los emulsionantes) y la fase acuosa. (Abd Karim Alias, 2013).....	3
Figura III: Unidad de metilcelulosa: -OH o -OCH ₃ en las posiciones 2, 3 y 6 de la anhidro-D-glucosa (Nasatto <i>et al.</i> , 2015).....	3
Figura IV: Microscopio óptico Nikon Eclipse 80i (Nikon, Tokio, Japón).....	9
Figura V: Microscopio óptico Nikon Eclipse E800 V-PS100E con microscopio láser confocal Nikon C1 acoplado (Nikon, Tokio, Japón).....	10
Figura VI: Funcionamiento del método pH stat con valorador automático (Li & McClements, 2010).....	11
Figura VII: Valorador automático Mettler-Toledo DL50.....	11
Figura VIII: Estabilidad física de las emulsiones estudiadas a los 0 y 30 días de almacenamiento	13
Figura IX: Índice de peróxidos a lo largo del almacenamiento para las dos emulsiones formuladas con los éteres de celulosa y la control	17
Figura X: Imágenes tomadas con microscopio óptico (LM) y microscopio confocal laser de barrido (CLSM) de las emulsiones antes de la digestión <i>in vitro</i>	18
Figura XI: Imágenes tomadas con microscopio óptico (LM) y microscopio confocal laser de barrido (CLSM) de las emulsiones en la fase oral de la digestión <i>in vitro</i>	19
Figura XII: Imágenes tomadas con microscopio óptico (LM) y microscopio confocal laser de barrido (CLSM) de las emulsiones en la fase gástrica de la digestión <i>in vitro</i>	20
Figura XIII: Imágenes tomadas con microscopio óptico (LM) y microscopio confocal laser de barrido (CLSM) de las emulsiones en la fase intestinal de la digestión <i>in vitro</i>	21
Figura XIV: Porcentaje de AGL en función del tiempo de digestión intestinal <i>in vitro</i>	22

Índice de tablas

Tabla I: Composición de las emulsiones.....	6
Tabla II: Luminosidad (L*) de las emulsiones estudiadas a lo largo de 30 días de almacenamiento.....	14

Tabla III: Pureza (C^*_{ab}) de las emulsiones estudiadas a lo largo de 30 días de almacenamiento.....	15
Tabla IV: Tono (h^*_{ab}) de las emulsiones estudiadas a lo largo de 30 días de almacenamiento.....	15
Tabla II: Diferencia de color total (ΔE^*) de las emulsiones estudiadas a lo largo de 30 días de almacenamiento.....	16

1. Introducción

1.1. Definición de grasa. Repercusión del consumo excesivo de grasa.

El término genérico grasa se utiliza para designar varias clases de lípidos. Los lípidos forman parte de los seres vivos e intervienen en múltiples funciones fisiológicas y bioquímicas. Los lípidos son moléculas muy diversas; unos están formados por cadenas alifáticas saturadas o insaturadas, en general lineales, pero algunos tienen anillos (aromáticos). La mayoría de los lípidos tienen algún tipo de carácter no polar, es decir, poseen una gran parte apolar o hidrofóbica. Otra parte de su estructura puede ser polar o hidrofílica y tenderá a asociarse con disolventes polares como el agua. Así pues, los lípidos son un grupo de compuestos muy heterogéneo que usualmente se subdivide en dos, atendiendo a que posean en su composición ácidos grasos (lípidos saponificables) o no los posean (lípidos insaponificables).

Los lípidos, junto con las proteínas y los carbohidratos, tienen un papel importante en la dieta de los seres humanos, éstos proporcionan energía, nutrientes esenciales, y componentes bioactivos (Zhang *et al.*, 2015). Además los lípidos sirven de vehículo de muchos componentes de los alimentos que le confieren sabor, olor y textura agradable. Por lo que contribuyen a la palatabilidad del alimento (calidad de un alimento de ser grato al paladar) y, en consecuencia, a su aceptación. Sin embargo, al ser los lípidos el macronutriente de mayor densidad calórica (9kcal/g) y debido a la creciente epidemia de obesidad que se está dando en los países desarrollados, se tiende en los últimos años hacia el diseño de alimentos con menor contenido en estos compuestos.

El consumo de dietas hipercalóricas y la disminución de la actividad física durante las últimas décadas se ha relacionado con aumentos en obesidad, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo II y cáncer (Millstone & Lang, 2003). Para el año 2020, se prevé que el 75% de las muertes totales sean debidas a estas enfermedades crónicas no contagiosas (Micha *et al.*, 2014). En España, las enfermedades cardíacas y cerebrovasculares fueron, respectivamente, la 2ª y 3ª causa de muerte en 2010 (Regidor & Gutiérrez-Fisac, 2013). Por todo ello, no cesa de crecer el interés por el desarrollo de productos con un menor contenido en grasa y, consecuentemente, en calorías.

1.2. Reducción del contenido de grasa

Con el fin de abordar estas cuestiones relacionadas con la dieta, hay un creciente interés por el desarrollo de alimentos saludables siguiendo diferentes estrategias, tales como la reducción del contenido de grasa o la eliminación total de esta. Esta última hace muy complicada la formulación de alimentos (Heertje, 2014) ya que la grasa desempeña múltiples funciones fisicoquímicas y proporciona propiedades sensoriales deseables (Arancibia *et al.*, 2011). La grasa aporta una textura suave de aspecto cremoso, un sabor deseable y efectos saciantes (Van Aken *et al.*, 2011).

Por esta razón es importante identificar estrategias viables que sean capaces de reducir el contenido de grasa de los productos alimenticios, pero manteniendo sus atributos sensoriales deseables. En este sentido existen técnicas tradicionales como la sustitución de parte de la grasa por agua o aire, o por proteínas, carbohidratos o espesantes (Ballabriga & Carrascosa, 2001). Sin embargo, el reemplazamiento de grasas saturadas con carbohidratos refinados también es motivo de preocupación porque tanto las dietas de bajo contenido en grasas como aquellas que contienen productos de alta refinación (mono y disacáridos) están asociadas con un conjunto diferente de problemas de salud (Forsythe et al., 2008). Para evitar estos problemas, otra estrategia es el reemplazo de las grasas saturadas y trans por otras insaturadas, ya que son de mejor calidad (Sanz, Falomir, & Salvador, 2015).

La inhibición o ralentización de la digestión lipídica podría ser un medio eficaz con el que reducir la absorción de grasa por el organismo, reducir el apetito y aumentar la saciedad, lo que conduciría a una reducción de la obesidad y a un consumo de energía más equilibrado (Espert et al., 2016). Una posible forma de conseguir la inhibición o ralentización de la digestión lipídica es mediante el diseño de nuevas emulsiones.

1.3. Emulsiones

Una emulsión es una mezcla homogénea de dos líquidos inmiscibles entre sí, donde uno actúa como fase dispersa y el otro se encuentra en suspensión en forma de pequeñas gotitas. Existen varias formas de emulsión, siendo las más comunes las emulsiones aceite en agua (O/W) y agua en aceite (W/O), formándose una u otra dependiendo del porcentaje de cada sustancia o del tipo de emulsionante. La leche, la mayonesa o algunos embutidos son ejemplos de alimentos donde la grasa se encuentra en forma de emulsión O/W. También existen formas más complejas como las emulsiones O/W/O y W/O/W.

Las emulsiones son termodinámicamente inestables ya que requieren energía libre positiva para aumentar el área superficial de las gotitas. En consecuencia, la emulsión tiende a reducir el área superficial disminuyendo el número de gotas y aumentando su tamaño (McClements & Decker, 2000). Por esto, es necesaria la presencia de moléculas anfifílicas o emulsionantes para que se coloquen en la interfase de la emulsión, entre la fase acuosa y la lipídica, y de esta forma estabilizar el sistema. Con una concentración suficiente de moléculas emulsionantes, estas se consiguen agregar de diferentes formas, como por ejemplo en forma de micela (Figuras I y II), y así conseguir una estructura termodinámicamente más estable.

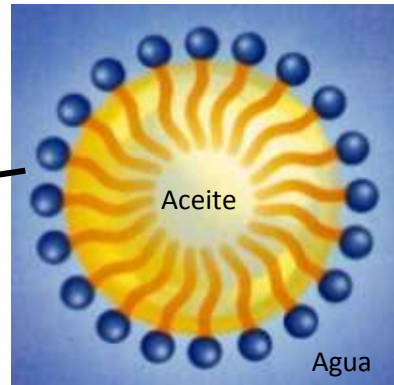
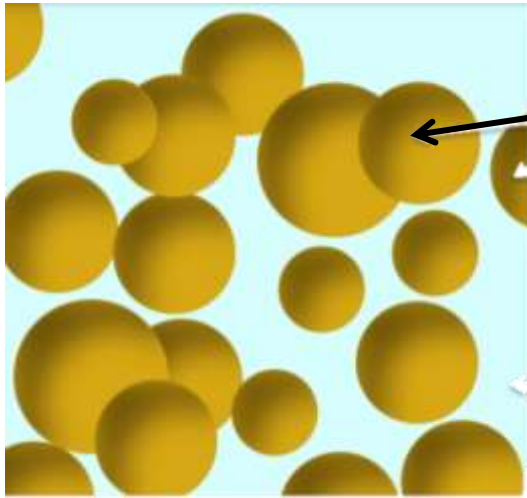


Figura II: Se puede considerar que una emulsión aceite en agua consiste en tres fases: el interior de la gotita de aceite, la región interfacial (que son los emulsionantes) y la fase acuosa. (Abd Karim Alias, 2013)

Figura I: Recreación de la emulsión de aceite en el agua. Las gotitas amarillas son gotitas de aceite y el fondo azul cielo es la fase acuosa. (SCIENCE AND COOKING HARVARD, 2016)

Existen gran variedad de emulsionantes, siendo las proteínas, muchas de ellas provenientes de la leche, como las caseínas, y los mono y diglicéridos de los ácidos grasos los más utilizados actualmente. En la actualidad se están abriendo camino como emulsionantes los derivados de la celulosa. Aunque la celulosa como tal no se puede utilizar como emulsionante, si lo puede ser siendo modificada por medio de grupos metoxilo e hidroxipropilo, añadidos mediante enlaces éter, formando metilcelulosas (MC) o hidroxipropil metilcelulosas (HPMC) (Sanz *et al.*, 2015). La MC (Figura III) es el derivado de celulosa más simple, donde los grupos metilo (-CH₃) sustituyen los hidroxilos en las posiciones C-2, C-3 y/o C-6 de unidades de anhidro-D-glucosa (Nasatto *et al.*, 2015).

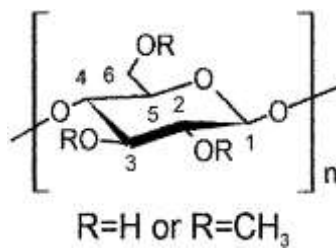


Figura III: Unidad de metilcelulosa: -OH o -OCH₃ en las posiciones 2, 3 y 6 de la anhidro-D-glucosa (Nasatto *et al.*, 2015).

De esta forma, tanto la MC como la HPMC presentan actividad emulsionante, ya que contienen una parte hidrofóbica, los grupos metoxilo e hidroxipropilo, y la cadena de celulosa que sigue siendo hidrofílica.

1.4. Digestión *in vitro*

Para comprobar la eficacia de la sustitución de la grasa de un alimento por emulsiones lipídicas de baja digestibilidad, es necesario conocer cómo se digieren a lo largo del tracto gastrointestinal. Para analizar la eficacia de la digestión de las emulsiones, lo mejor sería realizar digestiones *in vivo* pero hay razones éticas, económicas y prácticas que lo hacen poco factible. Algunos estudios pueden ser inadecuados para el ser humano o implican someter a los animales a condiciones incómodas y/o al sacrificio (McClements & Li, 2010). Además estos estudios son propensos a variaciones entre sujetos debido a las diferencias en sexo, edad, estado de salud, etc... (Hur, Lim, Decker, & McClements, 2011). En consecuencia, existe la necesidad de utilizar herramientas analíticas *in vitro* que puedan utilizarse para analizar la digestión de un alimento determinado, con datos reproducibles.

Después de la ingestión, las emulsiones experimentan una serie de cambios físicos y químicos a medida que pasan por la boca, el estómago y el intestino delgado y grueso (resistencia mecánica, presencia de enzimas, cambios en el pH, etc.) que afectan a su capacidad para ser ingeridas (McClements & Li, 2010). Por orden de entrada del alimento, en la fase oral la emulsión puede sufrir varios cambios por acción de enzimas (α -amilasa), electrolitos, proteínas (mucina) y procesos mecánicos (masticación y acción de la lengua) (Mao & Miao, 2015). En la fase gástrica, el alimento desciende por el esófago hasta el estómago, donde se encuentra con pHs ácidos, así como con la acción de enzimas, electrolitos y movimientos peristálticos. La digestión de las grasas se inicia en el estómago (20-30%), por la presencia de la lipasa gástrica, pero es en el intestino donde tiene lugar en torno al 80% de la digestión de los lípidos (Carriere, Barrowman, Verger, & Laugier, 1993), debido a la lipasa pancreática. En la fase intestinal, el pH asciende hasta un valor aproximado a 7 que permite la acción de la lipasa pancreática. La lipasa actúa rompiendo los enlaces entre los AG y la glicerina en los triacilglicéridos, liberando dos AG, y quedando uno unido al glicerol, formándose un monoglicérido (Gallier, Ye, & Singh, 2012). Es bien conocido que la lipasa pancreática es más activa en el TAG de cadena media (hasta C10) que en el TAG de cadena larga (más de C12) (Golding *et al.*, 2011), y que su actividad también depende del número y las posiciones de las insaturaciones (Yang *et al.*, 1990). Para que la lipasa pancreática actúe, esta se debe adsorber a la superficie de los glóbulos grasos y así estar lo más cerca posible de los lípidos. Es por esto que la interfase entre los glóbulos grasos y el medio acuoso es determinante en la digestión de las grasas. Ya que si la interfase permanece intacta o está muy poco alterada, la digestión de grasa será mínima. El grado de lipólisis también se ve afectado por el tamaño de glóbulos de grasa, ya que a menor tamaño de glóbulos, mayor será el área superficial dónde la enzima puede actuar (Li, Hu & McClements, 2011).

En el presente trabajo se pretende diseñar emulsiones aceite/agua, para mantener las propiedades sensoriales propias de la grasa, pero de baja digestibilidad lipídica. Para ello se van a utilizar como emulgentes diferentes éteres de celulosa. De esta manera se podrían diseñar alimentos capaces de proporcionar un menor aporte calórico y conseguir una mayor aproximación hacia el control del peso y de los problemas relacionados con la obesidad.

2. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es diseñar nuevas emulsiones aceite en agua (O/W) con un contenido medio en aceite, que sean estables y que presenten una menor digestibilidad que las grasas convencionales presentes en los alimentos. Para ello se utilizan los éteres de celulosa, metilcelulosa e hidroxipropil metilcelulosa, como emulsionantes. También se prepara una emulsión con caseinato cálcico como emulsionante, que se usa como control.

Para cumplir este objetivo general se han establecido los siguientes objetivos parciales:

- Estudiar el efecto de diferentes emulsionantes (metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa y caseinato cálcico) sobre la estabilidad fisicoquímica de las emulsiones almacenadas durante un mes.
- Estudiar el efecto de diferentes emulsionantes (metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa y caseinato cálcico) sobre la digestibilidad *in vitro* de las nuevas emulsiones O/W.
- Estudiar el efecto de diferentes emulsionantes (metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa y caseinato cálcico) sobre la microestructura de las emulsiones O/W, antes y durante la digestión *in vitro*.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Emulsiones

3.1.1.1. Ingredientes

Se estudiaron tres formulaciones diferentes de emulsiones empleando como emulgentes dos éteres de celulosa y una proteína (P). Los éteres de celulosa empleados fueron una hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) (METHOCEL K4M, The Dow Chemical Company, Alemania) y una metilcelulosa (MC) (METHOCEL A4M, The Down Chemical Company, Alemania). Como proteína se empleó caseinato cálcico (CaCN) (Fonterra Co-operative Group Ltd, Palmerston North, Nueva Zelanda). La emulsión elaborada con proteína como emulgente se tomó como emulsión control. Los ingredientes de las emulsiones fueron aceite de girasol (Koipesol, Sevilla, España), agua (Bezoya, Segovia, España) y los diferentes emulsionantes. Las emulsiones formuladas con HPMC, MC y P se denominaron EH, EM y EP, respectivamente, y la composición de cada una de ellas se muestra en la tabla I.

Tabla I: Composición de las emulsiones.

Ingredientes (g/100g)	EM	EH	EP
Aceite de girasol	47	47	47
Agua	51	51	48,5
HPMC	0	2	0
MC	2	0	0
CaCN	0	0	4,5

EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente; EH: emulsión con hidroxipropilmetilcelulosa como emulgente; EP: emulsión control con proteína caseinato cálcico como emulgente; HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa; MC: metilcelulosa; CaCN: caseinato cálcico.

En el caso de la emulsión control, se utilizó un 4,5% de emulgente caseinato cálcico para obtener una emulsión con un tamaño de glóbulos similar al de las otras dos emulsiones. Para el estudio de la estabilidad fisicoquímica a las emulsiones se les añadió un 0,1% de ácido sórbico.

3.1.1.2. Preparación

En primer lugar, se disolvió la celulosa en el aceite de girasol con la ayuda de una agitadora Heidolph (Heidolph RZR 1, Schwabach, Alemania) a velocidad mínima (283 rpm) durante 5 min.

En segundo lugar se adicionó gradualmente agua a 1°C. 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.

Para continuar la agitación de toda la mezcla y formar una emulsión se utilizó un homogeneizador (Ultraturrax T18, IKA, Alemania) con una agitación de 6500 rpm durante 15 s y a continuación a 17500 rpm durante 60 s. Finalmente se almacenaron en refrigeración a 4°C durante 24h para favorecer una hidratación completa.

Para la emulsión control, se realizaron cambios en el tiempo de homogeneización en Ultraturrax para conseguir un tamaño de glóbulo similar al de las otras dos emulsiones. En este caso fueron 30 s a velocidad de 6500 rpm seguidos de 120 s a 17500 rpm.

3.2. Métodos

3.2.1. Estabilidad de las emulsiones

3.2.1.1. Estabilidad física

Para medir la estabilidad física de las emulsiones en el tiempo, se colocaron aproximadamente 20 g de muestra en un tubo de vidrio de 26 mm de diámetro y se mantuvieron en refrigeración a 4°C durante un periodo de almacenamiento de 30 días. Se determinó la pérdida de altura y el % de separación o sinéresis, de acuerdo a la ecuación 1 (Goyal et al., 2014).

$$\%Sinéresis = 100 \cdot \frac{H}{H_0} \quad (\text{ecuación 1})$$

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

Además se realizaron fotos cada 10 días (concretamente los días 0, 10, 20 y 30 de almacenamiento) con una cámara Olympus E-510 (Olympus Corporation, Tokio, Japón) para poder relacionar los parámetros instrumentales con los visuales.

3.2.1.2. Medidas de color

El color de las diferentes muestras se midió utilizando el equipo Chroma meter CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japón). Los resultados se expresaron mediante sistema CIELAB. Los parámetros determinados fueron L^* ($L^* = 0$ [negro] y $L^* = 100$ [blanco]), a^* ($-a^* =$ verde y $+a^* =$ rojo), b^* ($-b^* =$ azul y $+b^* =$ amarillo), C^*_{ab} (croma o saturación mediante la ecuación 2) y h^*_{ab} (tono con la ecuación 3).

$$C^*_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})^{\frac{1}{2}} \quad (\text{ecuación 2})$$

$$h^*_{ab} = \arctan(b^*/a^*) \quad (\text{ecuación 3})$$

La diferencia de color total (ΔE^*) entre el día 0 y los diferentes días de almacenamiento (10, 20 y 30 días) se calculó aplicando la ecuación 4.

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{\frac{1}{2}} \quad (\text{ecuación 4})$$

Dependiendo de la ΔE^* obtenida (Bodart, de Penaranda, Deneyer, & Flamant, 2008), las diferencias de color pueden ser o no apreciadas por el ojo humano:

- $\Delta E^* < 1$; las diferencias de color no son apreciadas por el ojo humano.
- $1 < \Delta E^* < 3$; las diferencias de color no son distinguidas por el ojo humano.
- $\Delta E^* > 3$; las diferencias de color se observan por el ojo humano.

3.2.1.3. Índice de peróxidos

Para poder evaluar la estabilidad a la oxidación, del aceite de las emulsiones, durante un periodo de almacenamiento de 30 días, fue necesario extraer el aceite de las emulsiones. Para conseguirlo se siguió el protocolo empleado por Jacobsen *et al.* (2003) con ligeras modificaciones. Para ello, tubos de centrifuga de plástico Falcon™ con aproximadamente 25 g de muestra se ultracongelaron a -71°C durante 24 h, a continuación se descongelaron durante 1 h y se centrifugaron a 10765 rpm durante 10 min a 20°C. La capa de sobrenadante, compuesta de aceite, se recogió y se utilizó en los análisis posteriores.

En la muestra control, al observarse una separación de fases durante el almacenamiento, se recogió la fase superior, constituida por aceite, y fué la que se sometió al procedimiento de extracción de aceite, comentado en el párrafo superior. Todas las determinaciones de estabilidad fisicoquímica de las emulsiones se realizaron cada 10 días y por triplicado.

El índice de peróxidos nos indica el contenido total de hidroperóxidos, productos primarios de oxidación, formados por la reacción entre el oxígeno y los ácidos grasos. Para realizar esta determinación se siguió el protocolo estándar descrito por la AOAC (2005) con modificaciones propuestas por Hornero-Mendez *et al.* (2001). En primer lugar, se enjuagó el Erlenmeyer con una disolución ácido acético glacial/diclorometano (6:4), para evitar la presencia de sustancias oxidantes. En el Erlenmeyer se pesaron 0,3 g de la muestra de aceite con una balanza analítica de precisión 0,0001 g y se disolvieron, agitando suavemente, en 30 mL de la disolución de ácido acético glacial/diclorometano. Se añadieron 0,5 mL de una disolución de yoduro potásico saturada, preparada al inicio del análisis. Posteriormente se cerró el matraz con un tapón de vidrio esmerilado y se mezcló con agitador magnético durante 60 s. Pasado este tiempo se añadieron 30 mL de agua destilada y se agitó suavemente. Inmediatamente se valoró el yodo liberado con una disolución patrón de tiosulfato sódico 0,001 N, hasta cambio de amarillo oscuro a amarillo pálido. Al adicionar 0,5 mL de almidón (concentración: 1 g/100 mL), se observó un cambio de color a violeta y se siguió valorando hasta incoloro. Se dejó de valorar cuando la disolución se mantuvo incolora durante 30 s. Finalmente, a partir del peso exacto de la muestra de aceite y los mL de tiosulfato sódico 0,001 N utilizados en la valoración, se obtuvo el índice de peróxidos (IP), expresados en meq de oxígeno activo por kg de aceite, mediante la ecuación 5:

$$IP = \frac{(V - V_0) \cdot N_{Na_2S_2O_3} \cdot 1000}{m} \quad (\text{ecuación 5})$$

Donde V es el volumen de disolución patrón de tiosulfato sódico (0,001 N) 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; $N_{Na_2S_2O_3}$ es la normalidad de la disolución patrón de tiosulfato sódico, en moles por litro; m es la masa de la muestra de aceite para análisis, en g.

3.2.2. Técnicas microscópicas

3.2.2.1. Microscopía óptica

Para la observación de las emulsiones por microscopía óptica se utilizó un microscopio óptico (Figura IV) Nikon Eclipse 80i (Nikon Co., Ltd., Tokio, Japón) que lleva incorporada una cámara (ExwaveHAD, modelo nº. DXC-190, Sony Electronics Inc., Park Ridge, Nueva Jersey, EE.UU.). Una alícuota de 20 μ L de cada formulación se colocó sobre un portaobjetos de vidrio utilizando azul de toluidina (0,2%) para teñir las proteínas y celulosas. Las muestras se observaron a 20 aumentos (lente de objetivo 20x / 0,75 DIC N2 ∞ /0.17 WD 1.0, Nikon, Tokio, Japón) y las imágenes fueron capturadas y almacenadas a 1280 x 1024 píxeles utilizando el software de microscopio (NIS-Elements M, Versión 4.0, Nikon, Tokio, Japón).



Figura IIIV: Microscopio óptico Nikon Eclipse 80i (Nikon, Tokio, Japón).

3.2.2.2. Microscopía láser confocal de barrido (CLSM)

Las observaciones por microscopía láser confocal de barrido de las emulsiones se realizaron mediante un microscopio láser confocal Nikon C1 (Nikon, Tokyo, Japan) acoplado a un microscopio óptico Nikon Eclipse E800 V-PS100E en modo de fotón simple equipado con un láser Ar-Kr (Figura V).



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

Se utilizaron dos agentes de tinción fluorescentes rodamina B (Fluka, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) y Nile red (Fluka, Sigma-Aldrich, Missouri, USA). En cuanto a la rodamina B, se utilizaron 20 μL en una concentración de 2 g/L, con λ_{ex} de 488 nm y λ_{em} de 580 nm. Con este agente se consiguió teñir las proteínas y los éteres de celulosa con una coloración rojiza. De Nile red se utilizaron 20 μL con una concentración de 0,1 g/L, este presenta una λ_{ex} de 488 nm y λ_{em} de 515 nm y tiñe la grasa. Para observar la muestra se colocó una gota pequeña de la emulsión a analizar sobre un portaobjetos de vidrio. Se añadieron las cantidades de Nile red y rodamina B, en este orden y con 10 min de reposo entre cada adición. Pasados los últimos 10 min se procedió a la observación de las muestras con una lente objetiva de 40x y, posteriormente, de 60x y se obtuvieron imágenes que se almacenaron con una resolución de 1024 x 1024 pixel.

3.2.3. Digestiones *in vitro*

Para cada una de las emulsiones se realizaron simulaciones de digestión *in vitro* y se determinaron los ácidos grasos liberados con el método pH stat (Figura VI), para determinar la influencia de las celulosas en la digestión lipídica. Cada molécula de triglicérido (TG) genera dos ácidos grasos libres (AGL) y un monoglicérido (MG) debido a la acción de la lipasa. Por lo tanto, conociendo la cantidad de triglicéridos (TG) presentes inicialmente en la muestra, y la cantidad de NaOH necesaria para mantener el pH a 7, se puede obtener el porcentaje de AGL que han sido digeridos por la lipasa. Este porcentaje de AGL se calcula (ecuación 6) 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):

$$\%AGL = 100 * \frac{(V_{NaOH} * m_{NaOH} * M_{lipido})}{w_{lipido} * 2} \quad (\text{ecuación 6})$$

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 (0,1 M), M_{lipido} es la masa molecular del aceite ($\text{g} * \text{mol}^{-1}$) y w_{lipido} es la masa total del aceite presente en la celda de digestión. Los datos generados en este método

pH stat se representan en una gráfica que muestra una curva de %AGL frente al tiempo (Li & McClements, 2010).

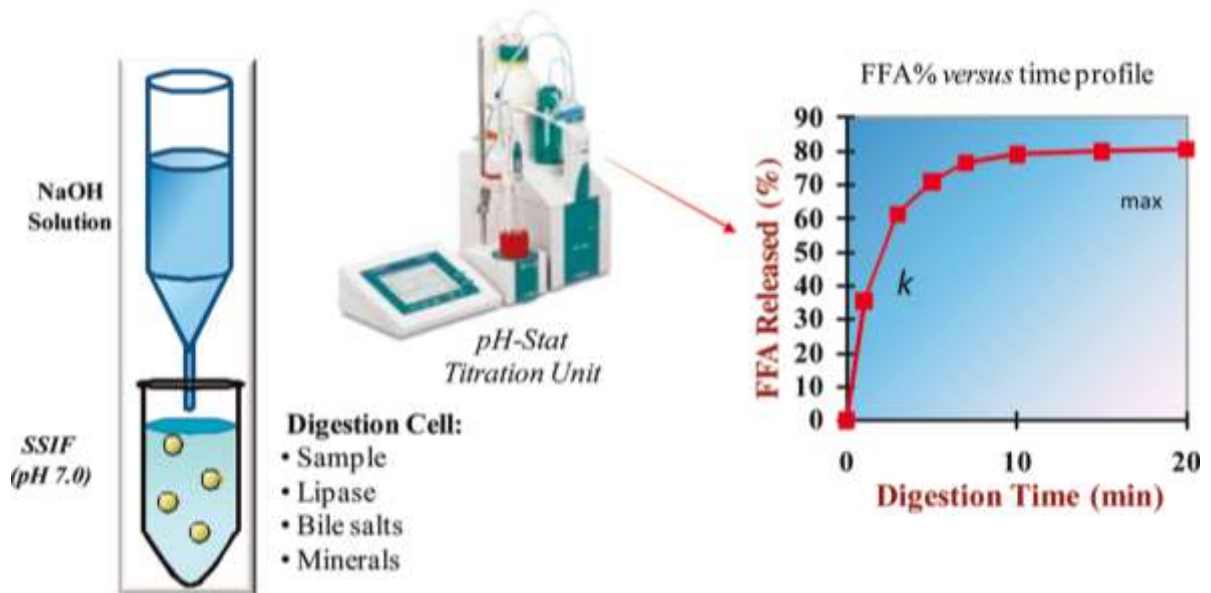


Figura VIV: Funcionamiento del método pH stat con valorador automático (Li & McClements, 2010)

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 intestinal, es decir las digestiones oral y gástrica, también se realizaron con el fin de simular los posibles cambios previos que pudieran afectar a la estructura de la emulsión. Este método pH stat se llevó a cabo con un valorador automático Mettler-Toledo DL50 (Mettler-Toledo International, Greifensee, Suiza) (figura VII), con vaso de 50 mL de capacidad encamisado de 50 mL, conectado a un baño termostático a 37°C, bureta de capacidad 10 mL y agitador.



Figura VII: 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 2 M. 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 siguieron los protocolos propuestos 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) y lipasa (Sigma Aldrich L3126), con un ratio 1:2,5 (enzima:sustrato). Inmediatamente tras la adición de las enzimas se inició el método pH stat en el valorador y se dejó en agitación durante 2h a 37°C. Se realizaron las digestiones por duplicado para cada muestra.

3.2.4. 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. Estabilidad de las emulsiones

4.1.1. Estabilidad física

En la figura VIII se muestra la estabilidad de las emulsiones a lo largo del almacenamiento. La desestabilización de las emulsiones es provocada a menudo por procesos físicos como coalescencia o floculación que conllevan a un aumento en el tamaño de partícula (Castel et al. 2017).

Como se puede observar en la figura VIII, las emulsiones elaboradas con éteres de celulosa (EH y EM) permanecieron estables durante los 30 días de almacenamiento. En cambio, en la emulsión control (EP) se produjo una separación de fases de un 32,13% a los 10 días, sin observarse más cambios en los días posteriores. Los éteres de celulosa tanto la metilcelulosa como la hidroxipropilmetilcelulosa parecen proporcionar una buena estabilidad a la emulsión en las condiciones estudiadas. La presencia de éteres de celulosa en la EH y EM, hace que estas emulsiones sean más compactas por lo que resultan ser más estables. En cambio el caseinato aporta una menor compactidad a la emulsión por lo que es más probable que se produzcan fenómenos de coalescencia y en consecuencia la desestabilización de la emulsión (Chang & McClements, 2016).

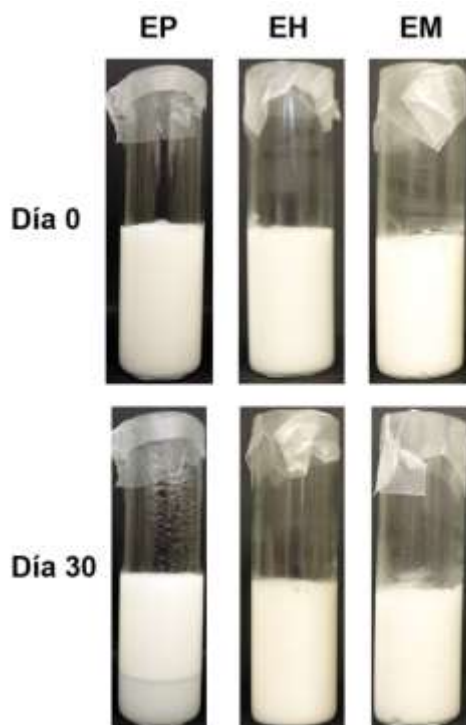


Figura VIII: Estabilidad física de las emulsiones estudiadas a los 0 y 30 días de almacenamiento. EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente; EH: emulsión con hidroxipropilmetilcelulosa como emulgente; EP: emulsión control con caseinato cálcico como emulgente.

4.1.2. Medidas de color

A continuación se presentan los valores de las medidas de color de las tres emulsiones analizadas (EP, EM y EH) y su evolución a lo largo del almacenamiento (Tabla II, III, IV y V).

En primer lugar, la coordenada L^* representa la medida de luminosidad de un color variando desde 0 (negro) hasta 100 (blanco). En la tabla II se puede observar que los valores de L^* obtenidos para la emulsión control (EP), durante todo el periodo de almacenamiento, fueron significativamente ($P < 0,05$) inferiores a los obtenidos para las emulsiones con éteres de celulosa (EM y EH), lo que indica que las emulsiones con éteres de celulosa presentaron un color más blanco que la emulsión control. En general las emulsiones con éteres de celulosa no presentaron diferencias significativas en cuanto a la coordenada L^* a lo largo del almacenamiento. Sin embargo, la emulsión control (EP) sí presentó un aumento significativo ($P < 0,05$) del valor de L^* a partir del día 10 de almacenamiento, manteniéndose este valor sin cambios significativos hasta el final del periodo de almacenamiento (día 30). Según un estudio de McClements (2002), el color de la emulsión está relacionado con las características coloidales, como por ejemplo: el tamaño de gota, la concentración y el índice de refracción. La luminosidad (L^*) de una emulsión aumenta con el tamaño y la concentración de glóbulos de grasa, por lo que podría ser debido a fenómenos de coalescencia con el consiguiente aumento en el tamaño de las partículas. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el apartado de estabilidad física, ya que también fue la emulsión EP la que presentó desestabilización estructural y probablemente fenómenos de coalescencia durante el almacenamiento.

Tabla II: Luminosidad (L^*) de las emulsiones estudiadas a lo largo de 30 días de almacenamiento

	EP	EM	EH
Día 0	81,16 ^{aA} ± 0,20	83,75 ^{abB} ± 0,50	84,03 ^{aB} ± 0,36
Día 10	81,65 ^{bA} ± 0,21	83,50 ^{aB} ± 0,34	84,05 ^{aC} ± 0,62
Día 20	81,70 ^{bA} ± 0,20	84,02 ^{bB} ± 0,23	84,10 ^{aB} ± 0,33
Día 30	81,53 ^{bA} ± 0,21	83,86 ^{abB} ± 0,49	84,01 ^{aB} ± 0,41

*Diferentes letras minúsculas en la misma columna indican valores con una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) para cada muestra a lo largo del almacenamiento, según la prueba de rangos múltiples LSD de Fisher. Diferentes letras mayúsculas en la misma fila indican valores con una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) para las diferentes muestras en un mismo día, según la prueba de rangos múltiples LSD de Fisher. EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente; EH: emulsión con hidroxipropilmetilcelulosa como emulgente; EP: emulsión control con caseinato cálcico como emulgente.

A partir de los parámetros L^* , a^* y b^* se pueden obtener las coordenadas psicométricas, que son el croma (C^*_{ab}) y el tono (h^*_{ab}). El croma es la medida de saturación de un color. Un valor de C^*_{ab} de 0 indica un estímulo acromático ($a^*=b^*=0$), en cambio un color con un valor alto de C^*_{ab} (valor máximo de 16 para tonos rojizos y de 10 para azules-verdosos (Artigas, 2002)) es un color altamente saturado, es decir, con una clara orientación hacia rojo, verde, amarillo o

azul). Como se puede observar en la tabla V las emulsiones presentaron valores de C* bajos, por lo que no mostraron un color saturado. La diferencia existente en los valores de C* para cada emulsión a lo largo del almacenamiento se debió al aumento de la coloración amarilla.

Tabla III: Pureza (C*_{ab}) de las emulsiones estudiadas a lo largo de 30 días de almacenamiento

	EP	EM	EH
Día 0	3,79 ^{aA} ± 0,15	3,35 ^{aB} ± 0,16	3,17 ^{aC} ± 0,15
Día 10	5,41 ^{bA} ± 0,05	3,75 ^{bB} ± 0,32	3,74 ^{bB} ± 0,18
Día 20	5,50 ^{bcA} ± 0,05	4,06 ^{cb} ± 0,11	3,85 ^{bcc} ± 0,06
Día 30	5,51 ^{ca} ± 0,08	4,16 ^{cb} ± 0,11	3,97 ^{cc} ± 0,07

*Diferentes letras minúsculas en la misma columna indican valores con una diferencia estadísticamente significativa (P<0,05) para cada muestra, según la prueba de rangos múltiples LSD de Fisher. Diferentes letras mayúsculas en la misma fila indican valores con una diferencia estadísticamente significativa (P<0,05) para las diferentes muestras en un mismo día, según la prueba de rangos múltiples LSD de Fisher. EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente; EH: emulsión con hidroxipropilmetilcelulosa como emulgente; EP: emulsión control con caseinato cálcico como emulgente.

Por último, h*_{ab} es el ángulo que mide la tonalidad. Se define el origen 0° en la posición a* positiva y b*=0, que representa un color estrictamente rojo. Siguiendo el sentido contrario a las agujas del reloj: en el ángulo 90° sería un color estrictamente amarillo, en 180° un verde estricto y un azul estricto en 270°. Según los valores obtenidos, las tres emulsiones formuladas presentan un tono entre amarillo y verde. En general, durante todo el periodo de almacenamiento, las tres emulsiones fueron significativamente diferentes (P<0,05) en los valores de h*_{ab}, como también se ha visto anteriormente para C*. En cuanto a la evolución del parámetro h*_{ab} a lo largo de los 30 días de almacenamiento, las muestras EP y EH mostraron diferencias significativas entre los días 0, 10 y 30, mientras que la emulsión EM presentó diferencias significativas entre los días 0, 10 y 20.

Tabla IV: Tono (h*_{ab}) de las emulsiones estudiadas a lo largo de 30 días de almacenamiento

	EP	EM	EH
Día 0	137,34 ^{aA} ± 1,12	146,24 ^{aB} ± 2,32	151,14 ^{aC} ± 3,04
Día 10	128,78 ^{bA} ± 0,47	141,59 ^{bB} ± 4,43	142,52 ^{bB} ± 2,82
Día 20	128,44 ^{bcA} ± 0,48	137,78 ^{cb} ± 1,31	141,15 ^{bcc} ± 0,85
Día 30	128,01 ^{ca} ± 0,40	136,44 ^{cb} ± 1,28	139,35 ^{cc} ± 1,62

*Diferentes letras minúsculas en la misma columna indican valores con una diferencia estadísticamente significativa (P<0,05) para cada muestra, según la prueba de rangos múltiples LSD de Fisher. Diferentes letras mayúsculas en la misma fila indican valores con una diferencia estadísticamente significativa

($P < 0,05$) para las diferentes muestras en un mismo día, según la prueba de rangos múltiples LSD de Fisher. EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente; EH: emulsión con hidroxipropilmetilcelulosa como emulgente; EP: emulsión control con caseinato cálcico como emulgente.

En la tabla V se muestran los valores obtenidos de la diferencia total de color (ΔE^*). Como se puede ver los valores de ΔE^* fueron pequeños por lo que ninguna diferencia fue perceptible por el ojo humano, ya que ninguno superó el valor límite establecido de 3 unidades (Bodart, de Penaranda, Deneyer, & Flamant, 2008). Analizando las variaciones de las tres emulsiones producidas a lo largo del tiempo de almacenamiento, se deduce que la emulsión menos estable fue la EP.

Tabla V: Diferencia de color total (ΔE^*) de las emulsiones estudiadas a lo largo de 30 días de almacenamiento

	EP	EM	EH
Día 0			
Día 10	1,816	0,548	0,768
Día 20	1,923	0,936	0,912
Día 30	1,904	1,032	1,074

EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente; EH: emulsión con hidroxipropilmetilcelulosa como emulgente; EP: emulsión control con caseinato cálcico como emulgente.

4.1.3. Índice de peróxidos (IP)

Para conocer la estabilidad a la oxidación de las emulsiones se determinó el índice de peróxidos (IP) en las dos emulsiones con éteres de celulosa (EM y EH) y en la emulsión control (EP) a lo largo de 30 días de almacenamiento en refrigeración (Figura IX).

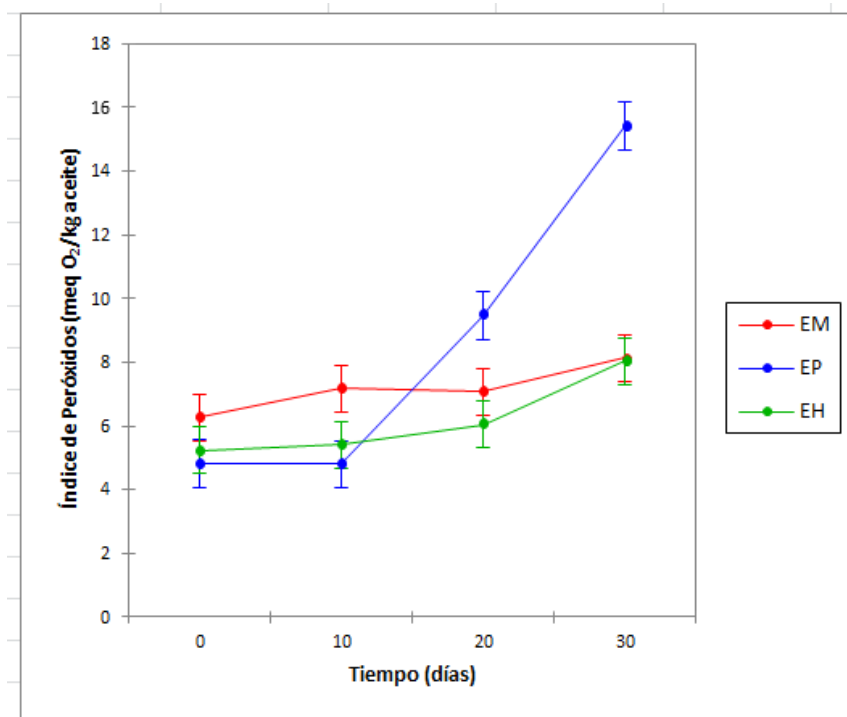


Figura IX: Índice de peróxidos a lo largo del almacenamiento para las dos emulsiones formuladas con los éteres de celulosa y la control. EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente; EH: emulsión con hidroxipropilmetilcelulosa como emulgente; EP: emulsión control con caseinato cálcico como emulgente.

Como se muestra en la figura IX, en ninguna de las emulsiones se observaron cambios significativos ($P > 0,05$) en los valores de IP entre los días 0 y 10 de almacenamiento. A partir del día 10 se produjo una diferenciación significativa ($P < 0,05$) de la muestra control (EP) ya que sufrió una mayor oxidación que las dos emulsiones con éteres de celulosa (EM y EH). La emulsión EM mantuvo los valores de IP constantes durante los 30 días de almacenamiento, en cambio en la emulsión EH se produjo un aumento significativo ($P < 0,05$) entre el día 20 y 30.

Al final del almacenamiento, las emulsiones EM y EH obtuvieron un valor de IP de 8,02 meq O₂/kg aceite sin mostrar por tanto diferencias significativas ($P < 0,05$) entre ellas. En cambio la emulsión control (EP) sufrió un incremento del IP muy superior al de las otras dos emulsiones alcanzando valores de 15,41 meq O₂/kg aceite. Este valor superó el valor máximo de IP permitido en aceites refinados, que es de 10 meq O₂/kg aceite (CODEX STAN 210-1999). Los resultados obtenidos parecen indicar que las emulsiones con éteres de celulosa (EM y EH) son más estables a la oxidación que la emulsión control, ya que mantuvieron valores de IP significativamente ($P < 0,05$) inferiores al final del periodo de almacenamiento.

4.2. Microestructura de las emulsiones

La microestructura de las emulsiones fue estudiada mediante microscopía óptica (LM) y microscopía laser confocal de barrido (CLSM). En las muestras observadas en el microscopio óptico se utilizó el azul de toluidina como agente de tinción para teñir proteínas y celulosas. Por otro lado para las muestras observadas por CLSM se utilizaron dos agentes de tinción fluorescentes: rodamina B y Nile red, los cuales tiñen las proteínas y celulosas, y la grasa, respectivamente.

- Emulsiones sin digerir

En la figura X se muestra la estructura de las emulsiones recién preparadas (antes de someterlas al proceso de digestión *in vitro*). En las tres emulsiones se observaron glóbulos de grasa con aspecto homogéneo, de forma redondeada y de diferentes tamaños. En cuanto a las emulsiones con éteres de celulosa, los glóbulos de grasa de la emulsión EM se apreciaron algo más grandes que los de la EH. Las emulsiones con éteres de celulosa (EH y EM) presentaron una matriz más densa y compacta que la de la emulsión con caseinato (EP), siendo la emulsión EM la que presentó un aspecto más compacto.

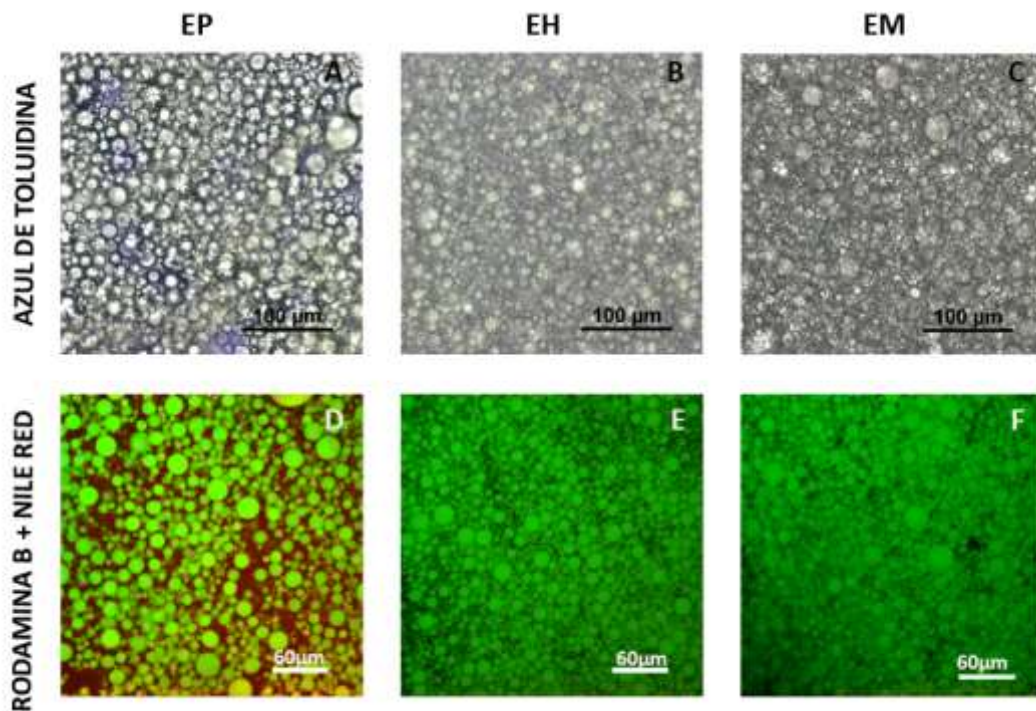


Figura X: Imágenes tomadas con microscopio óptico (LM) y microscopio confocal laser de barrido (CLSM) de las emulsiones antes de la digestión *in vitro*. EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente; EH: emulsión con hidroxipropilmetilcelulosa como emulgente; EP: emulsión control con caseinato cálcico como emulgente.

- Fase oral

En la figura XI, se muestran las micrografías de las emulsiones tras la fase oral de la digestión *in vitro*. Tras la digestión oral, se pudo observar una menor densidad de los glóbulos de grasa en la emulsión EP, si se compara con la emulsión no digerida (Figura X), lo que probablemente se debió al efecto de dilución tras añadir la saliva. De esta manera, la red proteica formada por el caseinato, que se aprecia de color violeta, se observó mejor que en la fase sin digerir (Figura X). Sin embargo, las emulsiones con celulosa (EH y EM) siguieron manteniendo la misma estructura densa, es decir no se observaron cambios en cuanto al tamaño de los glóbulos ni en cuanto a su distribución. En esta fase de la digestión las emulsiones elaboradas con éteres de celulosa continuaron manteniendo el aspecto compacto. Esto puede ser debido a que los éteres de celulosa favorecen la formación de una red capaz de estabilizar los glóbulos de grasa (Kargar *et al* 2012).

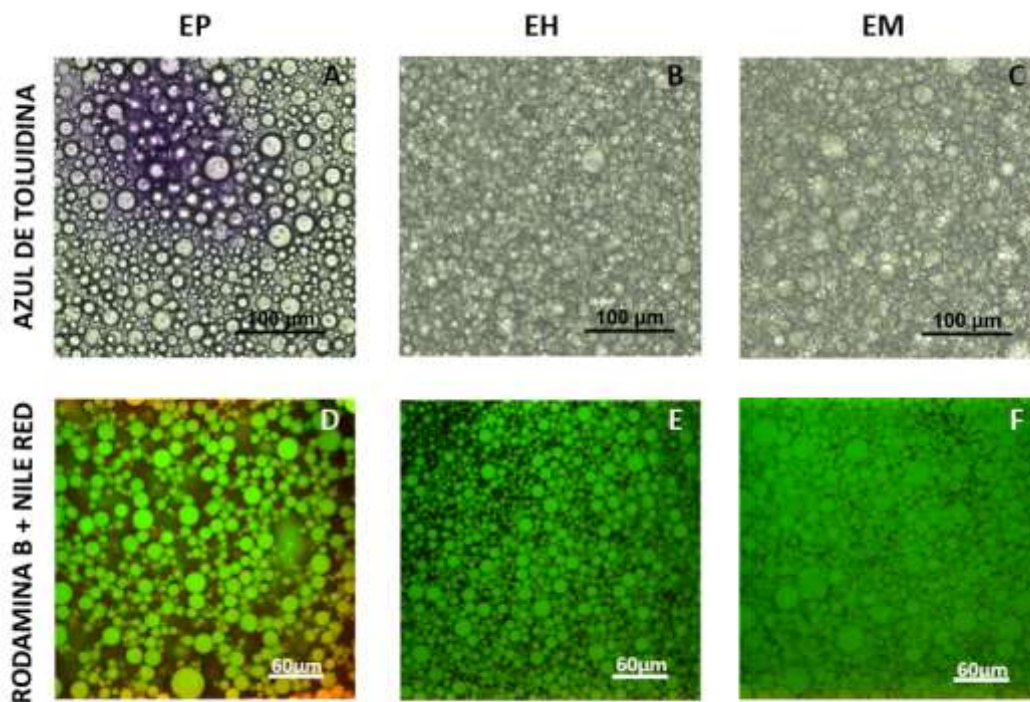


Figura XI: Imágenes tomadas con microscopio óptico (LM) y microscopio confocal laser de barrido (CLSM) de las emulsiones en la fase oral de la digestión *in vitro*. EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente; EH: emulsión con hidroxipropilmetilcelulosa como emulgente; EP: emulsión control con caseinato cálcico como emulgente.

- Fase gástrica

En la figura XII, se muestran las micrografías de las emulsiones tras la fase gástrica de la digestión *in vitro*. Tras la digestión gástrica, el efecto de dilución fue más notable y esto se pudo apreciar en todas las emulsiones estudiadas, EP, EH y EM (figuras XII D, E y F). En las

emulsiones con celulosa, la distribución de los glóbulos de grasa siguió ofreciendo un aspecto compacto. La emulsión EP se mostró como la más diluida en esta etapa de la digestión *in vitro*, y ya no se observó la presencia de proteína de color violeta, probablemente debido a la proteólisis por la acción de la pepsina sobre el caseinato cálcico que se encuentra rodeando los glóbulos de grasa.

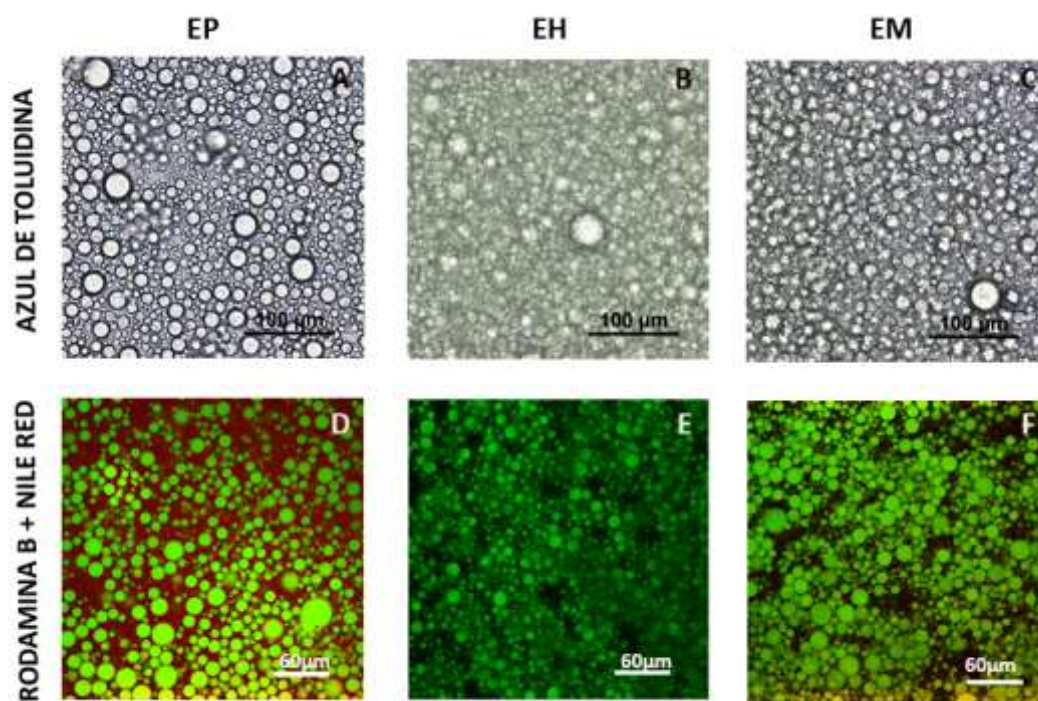


Figura XII: Imágenes tomadas con microscopio óptico (LM) y microscopio confocal laser de barrido (CLSM) de las emulsiones en la fase gástrica de la digestión *in vitro*. EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente; EH: emulsión con hidroxipropilmetilcelulosa como emulgente; EP: emulsión control con caseinato cálcico como emulgente.

- Fase intestinal

En la fase intestinal (figura XIII) es donde se pudieron apreciar los mayores cambios estructurales. En la emulsión EP se pudieron observar grandes agregados coloidales (figura XIII A) y la rotura de la emulsión (figura XIII D). En las emulsiones EH y EM todavía se apreció la presencia de una estructura compacta aunque se observaron glóbulos de grasa de menor tamaño (LM y CLSM), aparición de coalescencia (figuras XIII E y F) y presencia de agregados coloidales de menor tamaño (figuras XIII B y C) que en la muestra EP. Por ello, al final de la digestión se pudo concluir que las emulsiones EM y EH permanecieron más estables a la digestión ya que no se produjo la rotura de la emulsión como en EP. Al presentar estas emulsiones, EH y EM, una estructura compacta al final de la digestión, probablemente la grasa de estas emulsiones es menos accesible a la lipasa y por lo tanto menos disponible para su absorción.

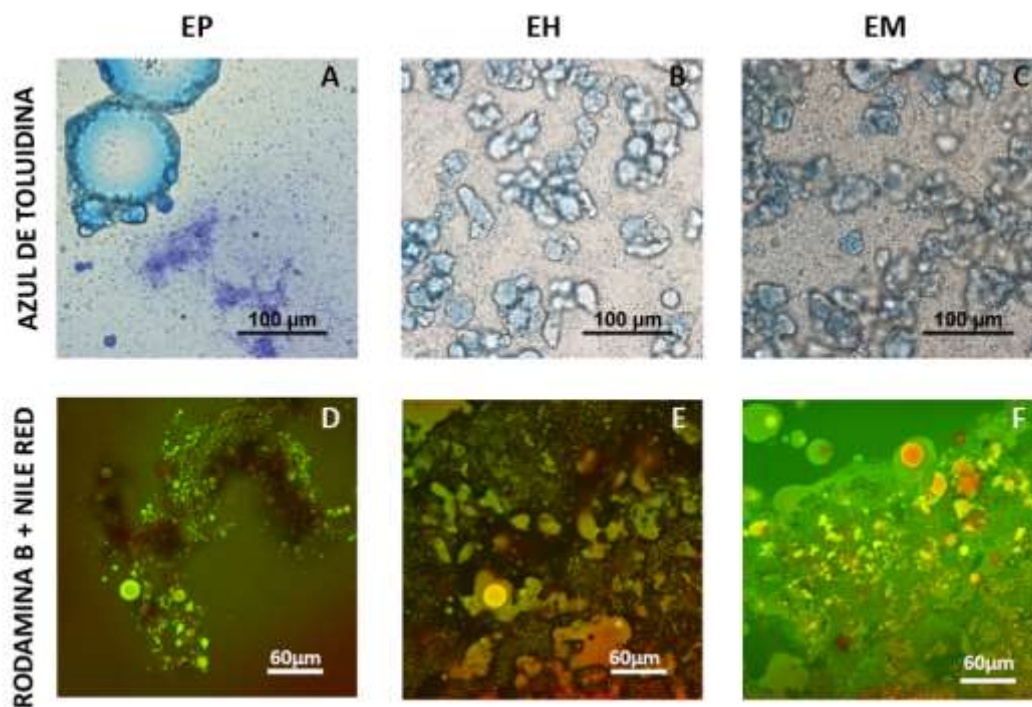


Figura XIII: Imágenes tomadas con microscopio óptico (LM) y microscopio confocal laser de barrido (CLSM) de las emulsiones en la fase intestinal de la digestión *in vitro*. EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente; EH: emulsión con hidroxipropilmetilcelulosa como emulgente; EP: emulsión control con proteína caseinato cálcico como emulgente.

4.3. Digestibilidad *in vitro*

En la figura XIV se muestra el porcentaje de ácidos grasos libres (AGL) que se liberaron durante el proceso de digestión intestinal *in vitro* de las emulsiones estudiadas (EM, EH, EP), debido a la acción de la lipasa. Li *et al.* (2011) estudiaron algunos de los factores que afectan a la digestión de los lípidos en emulsión. Estos autores concluyeron que la velocidad y alcance de la digestión de los lípidos aumenta a medida que aumenta la concentración de lipasa y que disminuyen la concentración de bilis, el tamaño de los glóbulos y la concentración de estos. En este estudio estos parámetros se mantuvieron constantes en todas las digestiones.

Como se puede apreciar, existió una diferencia considerable en los valores de % AGL, entre la emulsión control (EP) y las dos emulsiones con éteres de celulosa (EH y EM). El perfil de liberación de AGL de la emulsión control, con proteína de caseinato cálcico como emulgente, presentó un crecimiento más rápido al inicio del proceso de digestión intestinal *in vitro* comparado con las demás emulsiones (formuladas con los éteres de celulosa). A tiempos más prolongados, esa liberación de AGL siguió aumentando de forma casi exponencial, empezando a estabilizarse a los 90-100 minutos y alcanzando valores del 50%.

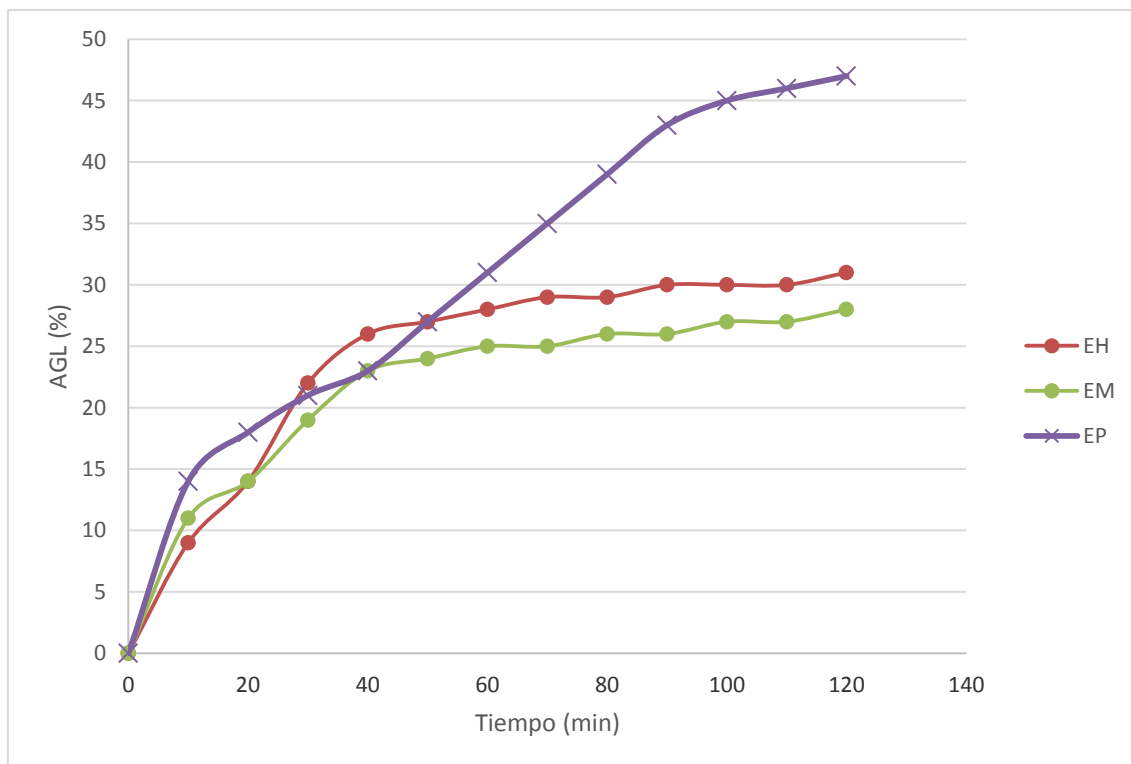


Figura XIV: Porcentaje de AGL en función del tiempo de digestión intestinal *in vitro*. EH: emulsión con hidroxipropil metilcelulosa como emulgente; EM: emulsión con metilcelulosa como emulgente; EP: emulsión control de proteína de caseinato cálcico como emulgente.

En las emulsiones EH y EM, se observó una estabilización de la liberación de AGL a partir de los 40 – 50 minutos, alcanzando por lo tanto valores cercanos al 30%. Esto puede ser debido a que la emulsión de caseinato presenta una carga negativa relativamente alta (Chang & McClements, 2016), mientras que las emulsiones EH y EM están formadas por biopolímeros con propiedades anfífilas (Nasatto et al., 2015) que les proporcionan mayor estabilidad a las condiciones de la digestión. Además los éteres de celulosa crean una red compacta que dificulta el acceso de las enzimas y por lo tanto la digestibilidad lipídica. Esto coincide con los resultados obtenidos en el apartado de microestructura donde se concluye que la estructura de la emulsión EP se rompe durante la digestión *in vitro* mientras que las dos emulsiones con éteres de celulosa EH y EM permanecen más compactas.

5. Conclusiones

Las emulsiones con éteres de celulosa, MC e HPMC, presentan una buena estabilidad física, sin embargo la emulsión elaborada con caseinato cálcico se desestabiliza a los 10 días de almacenamiento. En cuanto a la estabilidad oxidativa, existe una gran diferencia entre las emulsiones que contienen éteres de celulosa y la emulsión proteica, la cual supera los valores de índice de peróxidos máximos permitidos para los aceites refinados tras 30 días de almacenamiento.

Las emulsiones O/W diseñadas con éteres de celulosa presentan una mayor estabilidad estructural durante el transcurso de la digestión *in vitro*, y menor digestibilidad lipídica que las emulsiones elaboradas con caseinato cálcico. Parece que existe una correlación inversa entre la estabilidad estructural de las emulsiones durante la digestión y la digestibilidad lipídica *in vitro*.

Estos resultados parecen indicar que las emulsiones elaboradas con éteres de celulosa, MC e HPMC, podrían usarse como sustitutos de grasa para diseñar alimentos de menor aporte calórico.

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), 1402–1410. doi:10.1017/S0007114513000664
- AKOH, C.C. ; MIN, D.B.(2008). *Food lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. Third Edition. Ed.CRC Press. Online. 928 pp
- AOAC. (2005). *Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL*. (AOAC INTERNATIONAL, Ed.) (18th ed.). Gaithersburg, MD, USA: AOAC INTERNATIONAL.
- ARANCIBIA, C., JUBLOT, L., COSTELL, E., & BAYARRI, S. (2011). Flavor release and sensory characteristics of o/w emulsions. Influence of composition, microstructure and rheological behavior. *Food Research International*, 44(6), 1632–1641. doi:10.1016/j.foodres.2011.04.049
- ARREBOLA, J.P., OCAÑA, R., ARREBOLA, A., FERNÁNDEZ, M., MARTIN, P., FERNÁNDEZ, M. Y OLEA, N. (2014). Associations of accumulated exposure to persistent organic pollutants with serum lipids and obesity in an adult cohort from Southern Spain. *Environmental Pollution*, 195, 9-15. doi:10.1016/j.envpol.2014.08.003
- ARTIGAS, J.M (2002) *Fundamentos de colorimetria*. Ed. Universitat de València, 95.
- BALLABRIGA, A. & CARRASCOSA, A. (2001). Sustitutos de grasa y edulcorantes, en: *Nutrición en la infancia y adolescència* (2ª ed). Ed. Ergon.
- 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
- BODART, M., DE PENARANDA, R., DENEYER, A., & FLAMANT, G. (2008). Photometry and colorimetry characterisation of materials in daylighting evaluation tools. *Building and Environment*, 43(12), 2046–2058. doi:10.1016/j.buildenv.2007.12.006
- CARRIERE, F., BARROWMAN, J.A., VERGER, R. & RENÉ, L. (1993). Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology*, 105 (3), 876-888. doi: 10.1016/0016-5085(93)90908-U
- CASTEL, V; RUBIOLO, A.C & CARRARA, C.R. (2017). Droplet size distribution, rheological behavior and stability of corn oil emulsions stabilized by a novel hydrocolloid (Brea gum) compared with gum aràbic. *Food Hydrocolloids*, 63, 170-177. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.08.039
- CHIRALT, A; MARTÍNEZ, N; GONZÁLEZ, C; TALENS, P & MORAGA, G (2007). Propiedades ópticas en alimentos, en: *Propiedades físicas de los alimentos*. Ed. Universitat Politècnica de València, 89-125.
- CHANG, Y. & MCCLEMENTS, D.J. (2016). Influence of emulsifier type on the in vitro digestion of fish oil-in-water emulsions in the presence of an anionic marine polysaccharide

- (fucoidan): Caseinate, whey protein, lecithin, or Tween 80. *Food Hydrocolloids*, 61, 92-101. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.04.047
- CODEX (1999). Norma del Codex para aceites vegetales especificados. CODEX STAN 210-1999, pp 7.
- ESPERT, M; SALVADOR, A & SANZ, T (2016). In vitro digestibility of highly concentrated methylcellulose O/W emulsions: rheological and structural changes. *Food & function*, 7, 3933–3942 doi: 10.1039/c6fo00888g
- FORSYTHE, C. E., PHINNEY, S. D., FERNANDEZ, M. L., QUANN, E. E., WOOD, R. J., BIBUS, D. M., KRAEMER, W.J., FEINMAN, R.D & VOLEK, J. S. (2008). Comparison of low fat and low carbohydrate diets on circulating fatty acid composition and markers of inflammation. *Lipids*, 43(1), 65-77. doi: 10.1007/s11745-007-3132-7
- GALLIER, S., YE, A. & SINGH, H. (2012). Structural changes of bovine milk fat globules during *in vitro* digestion. *Journal of Dairy Science*, 95 (7), 3579-3592. doi: 10.3168/jds.2011-5223
- GOLDING, M., WOOSTER, T.J., DAY, L., XU, M., LUNDIN, L., KEOGH, J. & CLIFTON, P. (2011). Impact of gastric structuring on the lipolysis of emulsified lipids. *Soft Matter*, 7, 3513-3523. doi: 10.1039/C0SM01227K
- 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, 4256–4265. doi:10.1007/s13197-014-1370-2
- GRACIANI, E (2006). *Los aceites y grasas: composición y propiedades*. Ed. Mundi-Prensa y AMV Ediciones, 1-15.
- HEERTJE, I.(2014). Structure and function of food products: A review. *Food Structure*, 1(1), 3-23. doi:10.1016/j.foostr.2013.06.001
- HORNERO-MENDEZ, D., PEREZ-GALVEZ, A., & MINGUEZ-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
- 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

- KARGAR, M., FAYAZMANESH, K., ALAVI, M., SPYROPOULOS, F., & NORTON, I.T. (2012). Investigation into the potential ability of pickering emulsions (food-grade particles) to enhance the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 366 (1), 209-215. doi: 10.1016/j.jcis.2011.09.073
- 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 Reoraji 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
- MCCLEMENTS, D. J. (2002). 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. & DECKER, E.A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Food Science*, 65(8), 1270-1282. doi: 10.1111/j.1365-2621.2000.tb10596.x
- MCCLEMENTS, D.J. & LI, Y. (2010). Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based Systems. *Food & Function*, 1, 32-59. doi: 10.1039/c0fo00111b
- 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
- MISHELLANY-DUTOUR, A., PEYRON, M. A., CROZE, J., FRANCOIS, 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
- NASATTO, P.L., PIGNON, F., SILVEIRA, J.L., DUARTE, M.E., NOSEDA, M.D. & RINAUDO, M. (2015) Methylcellulose, a Cellulose Derivative with Original Physical Properties and Extended Applications. *Polymers*, 7(5), 777-803. Doi:10.3390/polym7050777

- 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., & NEDERAL, 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
- RAHN-CHIQUÉ, K. & URBINA-VILLALBA, G. (2017) Dependence of emulsion stability on particle size: Relative importance of drop concentration and destabilization rate on the half lifetimes of O/W nanoemulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 38(2), 167-179.
- RAMPURNA, G & BHOGLI, S (1996). Effect of methylcellulose on the stability of oil-in-water emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 140 (1), 97-109. doi:10.1016/0378-5173(96)04591-7
- 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
- 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., NUESLI, 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
- VAN AKEN, G. A., VINGERHOEDS, M. H., & DE WIJK, R. A. (2011). Textural perception of liquid emulsions: Role of oil content, oil viscosity and emulsion viscosity. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 789–796. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.09.015
- YANG, L.Y., KUKSIS, A. & MYHER, J.J. (1990). Lipolysis of menhaden oil triacylglycerols and the corresponding fatty acid alkyl esters by pancreatic lipase *in vitro*: a reexamination. *The Journal of Lipid Research*, 31, 137-147.
- 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). Intra-gastric gelation of whey protein-pectin alters the digestibility of whey protein during in vitro pepsin digestion. *Food & Function*, 5, 102–110. doi:10.1039/c3fo60331h