

Estudio de una emulsión múltiple adicionada con antioxidantes naturales y su aplicación en una bebida de frutas

Gallegos-Garza M.M. ^{a*}, Báez-González J. G. ^a, Gallardo-Rivera C.T.^a, Castillo S. L. ^a García-Alanís, K. G. ^a, Durán-Lugo R.^b, García-Márquez E. ^b

^a Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Alimentos, Av. Universidad s/n, Col. Cd. Universitaria, C.P. 66451, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

^b Tecnológico de Estudios Superiores de Chimalhuacán C. Primavera S/N Col. Santa María Nativitas, Chimalhuacán Estado de México, C.P. 56330.

^c Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Ciatej, Unidad Noreste.

*melissagallegosgarza@hotmail.com

RESUMEN:

La industria de bebidas en el país experimenta una creciente demanda de nuevos productos con propiedades funcionales. El objetivo de este trabajo fue evaluar la estabilidad de emulsiones múltiples con extracto de *Hibiscus sabdariffa-Camellia sinensis* y su capacidad antioxidante para adicionarse en una bebida a base de frutas. Se lograron estabilizar emulsiones con extracto de Jamaica y té verde, que contenían aceite esencial de toronja y de linaza, obteniendo tamaño de partícula de 1.1 μm en promedio y tasas de coalescencia estables. Así mismo se comprobó que añadir un copigmento (té verde) a un extracto de Jamaica, el cual es rico en antocianinas, incrementa y estabiliza la actividad antioxidante. Respecto a la evaluación sensorial la bebida sin emulsión se va amargando al paso del tiempo dejando un resabio amargo debido ya que se utilizan frutos naturales (toronja y frambuesa), la cual no agrada tanto a los consumidores, en cambio la bebida con emulsión retrasa dicho amargor debido al sabor del aceite esencial, el cual enmascara el amargor y prolonga el sabor a toronja, por ende, la bebida con emulsión tuvo un nivel de aceptación más alto. En resumen, las emulsiones obtenidas son estables y permiten incorporar diversos antioxidantes como aceites esenciales para brindar sabor y olor en el desarrollo de bebidas funcionales que son del gusto de niños y personas de cualquier edad.

Palabras clave: Emulsión, Jamaica, té verde, actividad antioxidante, aceite de linaza, aceite esencial de toronja, bebida funcional.

ABSTRACT:

The beverage industry in the country experiences a growing demand for new products with functional properties. The objective of this work was to evaluate the stability of multiple emulsions with *Hibiscus sabdariffa-Camellia sinensis* extract and its antioxidant capacity to be added to a fruit-based drink. It was possible to stabilize emulsions with extract of Jamaica and green tea, which contained essential oil of grapefruit and linseed, obtaining particle size of 1.1 μm on average and stable coalescence rates. Likewise, it was found that adding a co-pigment (green tea) to an extract of hibiscus, which is rich in anthocyanins, increases and stabilizes the antioxidant activity. Regarding the sensory evaluation, the drink without emulsion becomes bitter over time, leaving a bitter aftertaste due to the use of natural fruits (grapefruit and raspberry), which consumers do not like so much, whereas the drink with emulsion delays said Bitterness due to the flavor of the essential oil, which masks the bitterness and prolongs the grapefruit flavor, therefore, the emulsion drink had a higher acceptance level. In summary, the emulsions obtained are stable and allow the incorporation of various antioxidants such as essential oils to provide flavor and odor in the development of functional drinks that are liked by children and people of any age.

Key words: Emulsion, green tea, antioxidant activity, linseed oil, grapefruit essential oil, functional beverage.

Área: Alimentos funcionales

INTRODUCCIÓN

El mercado de bebidas en México experimenta una creciente demanda de productos saludables. Las bebidas funcionales, requieren contener en su formulación uno o más ingredientes capaces de mejorar el estado de salud y reducir el riesgo de enfermedades, por ejemplo, antioxidantes (Arai, 2000). Sin embargo, los compuestos antioxidantes son sensibles a las condiciones del medio ambiente y se degradan. La encapsulación por medio de emulsiones son un vehículo, para posteriormente añadirse a una bebida. Las emulsiones deben contener un agente emulsionante, este va a disminuir la tensión superficial entre la fase oleosa y acuosa, además de aportar estabilidad física (Muñoz *et al.*, 2007). Las emulsiones múltiples son sistemas coloidales en los que una emulsión simple (primaria) se dispersa en otra fase para formar una nueva emulsión (múltiple). Estos sistemas se componen de tres fases y, por lo tanto, de dos tipos diferentes de interfase, la que compone las gotas internas y gotas externas, que al ser de naturaleza distinta requieren de un agente emulsionante que se absorba en la interfase. Debido a lo antes mencionado, este tipo de emulsiones se considera que presentan inestabilidad termodinámicamente mayor, lo cual ocasiona la separación de las fases, en comparación con emulsiones simples (Peredo-Luna y Jiménez-Munguía, 2012). Las emulsiones múltiples agua-aceite-agua ($W_1/O/W_2$) ofrecen varias posibilidades para la liberación, retención, eliminación y/o protección de compuestos bioactivos (Dickinson, 1982).

La flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), es una de las fuentes más conocidas que contienen antocianinas (2.5 g de antocianinas/100 g de cálices secos), las cuales presentan alta capacidad antioxidante y suele emplearse como pigmento rojo (Zhang *et al.*, 2019), pueden obtenerse extractos concentrados con aplicación en la industria alimenticia y farmacéutica. Se ha descrito el efecto de las antocianinas sobre las células tumorales, la actividad antiinflamatoria, la actividad anticonvulsiva y la actividad antioxidante (Ramírez-Rodriguez, *et al.*, 2011, Gracia, *et al.*, 1997). Las principales antocianinas identificadas en *Hibiscus sabdariffa* son la cianidina-3-sambubiósido y la delphinidina-3-sambubiósido. Diversos factores como la luz, el pH, la temperatura, el oxígeno, ácido ascórbico, presencia de azúcares, iones metálicos y copigmentos influyen en la estabilidad de estas moléculas durante el proceso y almacenamiento; (Jackman *et al.*, 1987, Francis, 1998). Existe una amplia variedad de moléculas que tienen la capacidad de actuar como copigmento, algunos de ellos son los flavonoides y otros polifenoles, aminoácidos, alcaloides y ácidos orgánicos (Brouillard *et al.*, 1998) que potencian y estabilizan el color de las antocianinas. Una de las mayores fuentes de flavonoides a nivel mundial es el té. De los polifenoles totales del té verde (*Camellia sinensis*) el 59,9% lo constituyen las catequinas (Ananingsih *et al.*, 2011).

El aceite esencial de toronja es un subproducto de importancia en el estado de Nuevo León ya que se encuentra entre los cinco principales productores de cítricos, destacando la producción de toronja (13.2 Toneladas/Hectárea). Por lo anterior, el aceite de toronja fue usado en la fabricación de emulsiones. El segundo compuesto fue el aceite de linaza debido al aporte de ácidos grasos poliinsaturados $\Omega 3$ y $\Omega 6$ debido a sus efectos contra las enfermedades cardiovasculares (Carrero *et al.*, 2005). Sin embargo, los ácidos grasos insaturados son inestables bajo los efectos de luz, agua, acidez, minerales, entre otros, ocasionado su deterioro por efecto de oxidación. Una fuente de antioxidantes naturales son los aceites esenciales cítricos, la cual puede retardar la oxidación. Ambos componentes aceite esencial de toronja y aceite de linaza fueron utilizados en la fase oleosa para preparar la emulsión múltiple.

En este trabajo se evaluó la estabilidad de emulsiones múltiples con extracto de *Hibiscus sabdariffa*-*Camellia sinensis* y su capacidad antioxidante para adicionarse en una bebida a base de frutas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Té verde (*Camellia sinensis*) marca Organic By the Cup, Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) marca comercial, aceite esencial de toronja roja adquirido en Frutech, aceite de semilla de linaza marca OLIMU, Mixgum® (goma xantana y goma arábica), goma xantana, carragenina, Palsgaard® PGPR 4150 (Polirricinoleato de poliglicerol), Tween 20 (Monolaurato de polioxietilensorbitano), DPPH, ABTS, Reactivo Folin-Ciocalteu comprados en Sigma-Aldrich, Aceite de Canola (AC) comercial adquirido en tiendas locales, benzoato de

sodio, sucralosa, toronja, frambuesa.

Extractos liofilizados

Se pesaron 5 g de Jamaica y se colocaron en una solución etanol:agua 80:20, etanol y agua previamente acidificados con HCl concentrado, se agitó durante 30 min a 50°C y se dejó 24 horas en reposo a 4°C, seguido a esto se filtraron los sólidos a vacío en papel Wathman #2 para eliminar impurezas. El solvente se evaporó en un rotavapor Heidolph 2 y el producto se liofilizó en un equipo Telstar LyoQuest, posteriormente se almacenó en viales ámbar a 0°C.

Se pesaron 5 g de té verde y se colocaron en una solución etanol:agua 80:20, se agitó durante 2 horas, seguido a esto se filtraron los sólidos a vacío en papel Wathman #2 para eliminar impurezas. El solvente se evaporó en un rotavapor Heidolph 2 y el producto se liofilizó en un equipo Telstar LyoQuest, posteriormente se almacenó en viales ámbar a 0°C.

La mezcla de los extractos liofilizados Jamaica y del té verde (copigmento) (relación 1:1) se realizó en agua a 25°C, en agitación constante 1 h a 150 rpm, en oscuridad y se ajustó el pH a 3.0.

Elaboración de emulsión primaria (W/O $\phi=0.2$) y múltiple (W₁/O/W₂ $\phi=0.4$)

La fase oleosa fue preparada mezclando 34.1 g de aceite de linaza, 34.1 g de aceite de canola y 3.8 g de aceite de toronja, posteriormente se añadieron 8 g de Palsgaard® PGPR, esta mezcla se llevó a un Homogeneizador (OMNI GLH850) a 5000 rpm, la fase acuosa fue elaborada adicionando 0.4 g de extracto de Jamaica (EP-LTJ), 0.2 g de extracto de Jamaica y 0.2 g de extracto de té verde (EP-LTCO), en 17.58 g de agua destilada, se añadió 0.002 g de azida de sodio y 2 g de tween 20, finalmente esta mezcla fue agregada en la fase oleosa. Las emulsiones EP-LT Y EP-L, no contenían extractos en la fase acuosa, únicamente agua destilada y azida de sodio. Ambas fases fueron homogenizadas durante 5 min, la temperatura se mantuvo en 25 °C. La emulsión múltiple W₁/O/W₂ $\phi=0.4$ se elaboró con una fase acuosa externa (W₂) compuesta de carragenina, goma xantana y goma arábica, (2% del contenido total de estos biopolímeros), se dejaron hidratar 12 horas. Se agregó 60% de fase acuosa externa (W₂), 40% de la emulsión primaria y se homogeneizó a 3000 rpm por 5 minutos en un Homogeneizador (OMNI GLH850) a 25°C.

Tamaño de partícula y tasa de coalescencia

Se utilizó el equipo Malvern Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK) acoplado a una unidad hidro MV. En éste se midió el diámetro promedio de los glóbulos con el analizador de tamaño y distribución de partículas.

Índice de cremado

Aproximadamente 10 g de las emulsiones primarias y múltiples se colocaron en tubos cónicos de 15 mL y se almacenaron a 4°C. Se midió la altura de la capa (capa superficial, H₁) y la altura de la capa semitransparente o menos opaca (H₂), la altura total de la emulsión es (H₃=H₁+H₂). Para obtener el índice de cremado se siguió la siguiente fórmula: $H_1/H_3 * 100$.

Extracción de antioxidantes de las emulsiones múltiples

Las emulsiones múltiples fueron desestabilizadas pesando 2 g en tubos cónicos de 50 mL, Luego se le agregó 3 mL 10% NaCl – Metanol. La mezcla se mantuvo en agitación en vortex durante 5 minutos. Después, se le agregaron 16 mL de la mezcla de hexano – acetona (1:1) durante 1 minuto. Posteriormente la mezcla fue separada por centrifugación a 10,000 rpm por 20 minutos a 25°C. Finalmente ambas fases fueron separadas, la fase orgánica y la fase acuosa.

Fenoles totales

Se tomaron aproximadamente 200 μ L del extracto (fase acuosa). Se le adiciono 100 μ L de Folin-Ciocalteu y se agitó por 5 minutos, después se agregaron 300 μ L de carbonato de sodio al 20% y finalmente se ajustó el volumen a 2 mL con agua destilada. La muestra control fue preparada con todos los reactivos excepto el extracto. La mezcla se mantuvo en reposo y en oscuridad por 90 minutos. Las muestras fueron analizadas a 760 nm en un espectrofotómetro UV. El análisis se realizó por triplicado. Este fue el mismo procedimiento

para cada una de las emulsiones múltiples (EM-LTJ, EM-LTCO, EM-LT, EM-L).

Actividad antioxidante DPPH•⁺

Aproximadamente 400 µl del extracto (fase acuosa), fue mezclado con 350 µl de etanol absoluto, luego se añadió 2.25mL de DPPH•⁺, se mezclaron en vortex y finalmente se mantuvieron en reposo durante 90 min en la oscuridad. Posteriormente las muestras fueron analizadas, determinando la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro UV Genesys. La concentración de antioxidantes se calculó a partir de una curva de calibración de trolox. Este fue el mismo procedimiento para cada una de las emulsiones múltiples (EM-LTJ, EM-LTCO, EM-LT, EM-L).

Actividad antioxidante ABTS•⁺

Aproximadamente 100 µl del extracto (fase acuosa), fue mezclado con 200 µl etanol absoluto. Después se añadió 2.7 mL de ABTS•⁺. Cada concentración se realizó por triplicado. Posteriormente se tomaron las lecturas correspondientes en un espectrofotómetro UV Genesys 5 a 730 nm después de 7 minutos. Todo este método se realizó en oscuridad.

Este fue el mismo procedimiento para cada una de las emulsiones múltiples (EM-LTJ, EM-LTCO, EM-LT, EM-L).

Elaboración de la bebida

Los componentes usados fueron toronja fresca, frambuesa, azúcar, sucralosa, benzoato de sodio, goma xantana y emulsión múltiple (EM-LTCO). Todos los ingredientes fueron dispersados a 4000 rpm por 5 minutos en un Homogeneizador (OMNI GLH850) a 25°C. Las muestras fueron monitoreadas durante un mes.

Análisis sensorial

La bebida fue evaluada sensorialmente, se determinó la prueba de nivel de agrado con una escala hedónica de 5 puntos, la cual se emplea para determinar el agrado de aceptación de un producto en base a distintos atributos por parte de los consumidores. La prueba hedónica determina el nivel de agrado o desagrado de cada atributo del producto. La evaluación se determinó usando una población de 50 personas (hombres y mujeres) de entre 20 a 50 años.

Análisis estadístico

Los datos se sometieron a un análisis de varianza utilizando el paquete estadístico SPSS Statistics 22, con un nivel de confianza del 95%, para identificar las diferencias significativas entre las medias individuales.

Claves: J: Extracto de Jamaica. CO: Extracto de extracto de Jamaica y té verde. EP-LTJ: Emulsión primaria (W₁/O) con extracto de Jamaica, aceite de toronja roja y aceite de linaza. EP-LTCO: Emulsión primaria (W₁/O) con extracto de Jamaica y té verde, aceite de toronja roja y aceite de linaza. EP-LT: Emulsión primaria (W₁/O) con aceite de toronja roja y aceite de linaza. EP-L: Emulsión primaria (W₁/O) con aceite de linaza. EM-LTJ: Emulsión múltiple con extracto de Jamaica, aceite de toronja roja y aceite de linaza. EM-LTCO: Emulsión múltiple con extracto de Jamaica, té verde, aceite de toronja roja y aceite de linaza. EM-LT: Emulsión múltiple con aceite de toronja roja y aceite de linaza. EM-L: Emulsión múltiple con aceite de linaza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La estabilidad de la emulsión se refiere a la capacidad de una emulsión para resistir los cambios en sus propiedades fisicoquímicas en el tiempo: cuanto mayor es la estabilidad, más extenso es el tiempo necesario para alterar sus propiedades (McClements, 2005). Los mecanismos más importantes de inestabilidad física son el cremado, la sedimentación, la floculación, la coalescencia, el fenómeno de maduración de Ostwald y la inversión de fase.

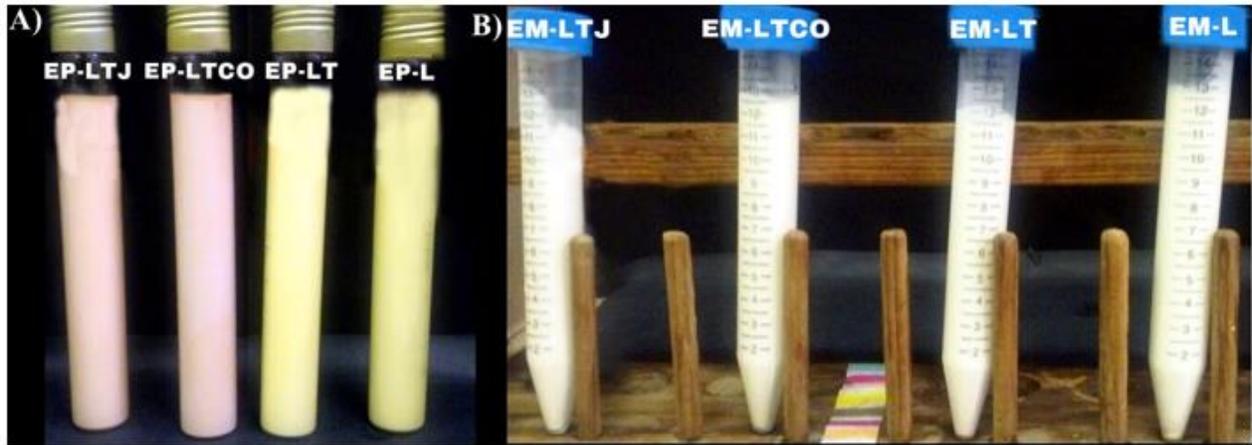


Figura 1. Formulaciones finales Palsgaard:Tween 20 al 10% relación 8:2. **A)** Emulsiones primarias $\varnothing= 0.2$. **B)** Emulsiones múltiples $\varnothing= 0.4$.

Las emulsiones primarias fueron estabilizadas usando la una proporción de 8:2 (palsgaard:tween 20) al 10% en la emulsión primaria. Se usó como emulsionante base el palsgaard, debido a su HLB de 4.3, el cual indica que es para emulsiones con mayor proporción de grupos lipófilos que hidrófilos, esto debido a la mezcla de aceites utilizados (canola, aceite esencial de toronja y de linaza), sin embargo también se encapsulo extracto de Jamaica y té verde, por lo cual también existe una proporción alta de grupos hidrófilos, debido a esto se decidió utilizar una mezcla de emulsionantes, el Palsgaard para la fase oleosa y tween 20 en la fase acuosa. En la realización de estas formulaciones el valor de HLB está influenciado directamente ya que a mayor número de HLB, la proporción de componentes hidrófilos logro estabilizarse (Figura 1).

Tabla 1. Tamaño de partícula promedio evaluado una vez por semana durante 35 días y tasa de coalescencia de las emulsiones múltiples ($W_1/O/W_2$).

<i>EMULSIÓN MÚLTIPLE</i>	<i>D (3,2) μm PROMEDIO 35 DÍAS</i>	<i>TASA DE COALESCENCIA</i>
<i>EM-LTJ</i>	1.05 ± 0.03^a	$1.07 \times 10^{-6}^a$
<i>EM-LTCO</i>	1.11 ± 0.08^a	$1.03 \times 10^{-6}^b$
<i>EM-LT</i>	1.16 ± 0.10^a	$1.32 \times 10^{-6}^a$
<i>EM-L</i>	1.15 ± 0.06^a	$1.00 \times 10^{-6}^b$

Los valores obtenidos son promedios de tres repeticiones con sus respectivas desviaciones estándar. Valores con diferente letra de superíndice entre columnas difieren estadísticamente ($p < 0.05$).

Se evaluaron distintas formulaciones variando el contenido de la fase acuosa interna y la fase oleosa, donde el tamaño de partícula $d_{3,2}$ promedio de 35 días no vario significativamente (Tabla 1), se obtuvieron tamaños de partícula muy pequeños, de alrededor de $1 \mu\text{m}$, lo cual podría considerarse un factor de estabilidad de las emulsiones, ya que, a menor tamaño de partícula, la estabilidad es mayor. Sin embargo, se obtuvieron emulsiones múltiples estables de acuerdo con las formulaciones realizadas, debido a que como menciona (Sherman, 1968); una tasa de coalescencia menor a 1×10^{-6} se considera inestable, sin embargo, se obtuvieron valores ligeramente mayores a 1×10^{-6} (Tabla 1). Esta estabilidad podría estar atribuida al uso de aceite de linaza y toronja, ya que en una emulsión múltiple la estabilidad es directamente proporcional a la viscosidad de la fase oleosa, es decir, la composición de el o los aceites utilizados respecto al largo de la cadena de los ácidos grasos que contienen es importante, ya que aumentar la proporción de ácidos grasos de cadena media (C8, C10) disminuye la viscosidad, por otro lado, al utilizar ácidos grasos de cadena larga (C16-C20) la

viscosidad aumenta (Kosegarten-Conde, C y Jiménez-Munguía, 2012). De esta manera influyo en la estabilidad el utilizar aceite de linaza, el cual contiene en su estructura ácidos grasos de cadena larga. Los valores obtenidos de índice de cremado para las emulsiones primarias (W_1/O) fue casi insignificante (Tabla 2), así mismo en las emulsiones múltiples ($W_1/O/W_2$) se solucionó este problema de estabilidad ya que las emulsiones no presentaron separación de fases. El cremado es ocasionado por la diferencia de densidad entre las gotas de fase oleosa y las gotas de la fase acuosa, lo cual provoca que el sistema experimente fuerzas externas, usualmente gravitacionales (Álvarez, 2013).

Tabla 2. Índice de cremado (%) evaluado a los 35 días de elaborar las emulsiones primarias (W_1/O) y múltiples ($W_1/O/W_2$).

<i>CLAVE</i>	EP (EMULSIÓN PRIMARIA)	EM (EMULSIÓN MÚLTIPLE)
<i>LTJ</i>	1.06% ± 0.01 ^a	0%
<i>LTCO</i>	1.19% ± 0.01 ^a	0%
<i>LT</i>	1.06% ± 0.00 ^a	0%
<i>L</i>	1.09% ± 0.01 ^a	0%

Los valores obtenidos son promedios de tres repeticiones con sus respectivas desviaciones estándar. Valores con diferente letra de superíndice entre columnas difieren estadísticamente ($p < 0.05$).

En las micrograffías (Figura 2) de las emulsiones múltiples, a los 24 días se observó floculación, esto debido a que añadir un exceso de biopolímeros en la fase acuosa externa, la floculación suele ser mayor (McClements, 2005) y en la realización de estas formulaciones se utilizó una mezcla de biopolímeros en la fase acuosa externa. Sin embargo, la mayor floculación a partir del día 24 se presentó en la formulación EM-L. Lo mismo ocurrió en la emulsión EM-LTCO, la cual contiene extracto de Jamaica y té verde, por ende, la fase acuosa de esta emulsión tiene una concentración más alta de grupos hidrófilos, y en este caso el contenido del emulsificante (tween 20) no fue suficiente, debido a esto se observa una mayor floculación.

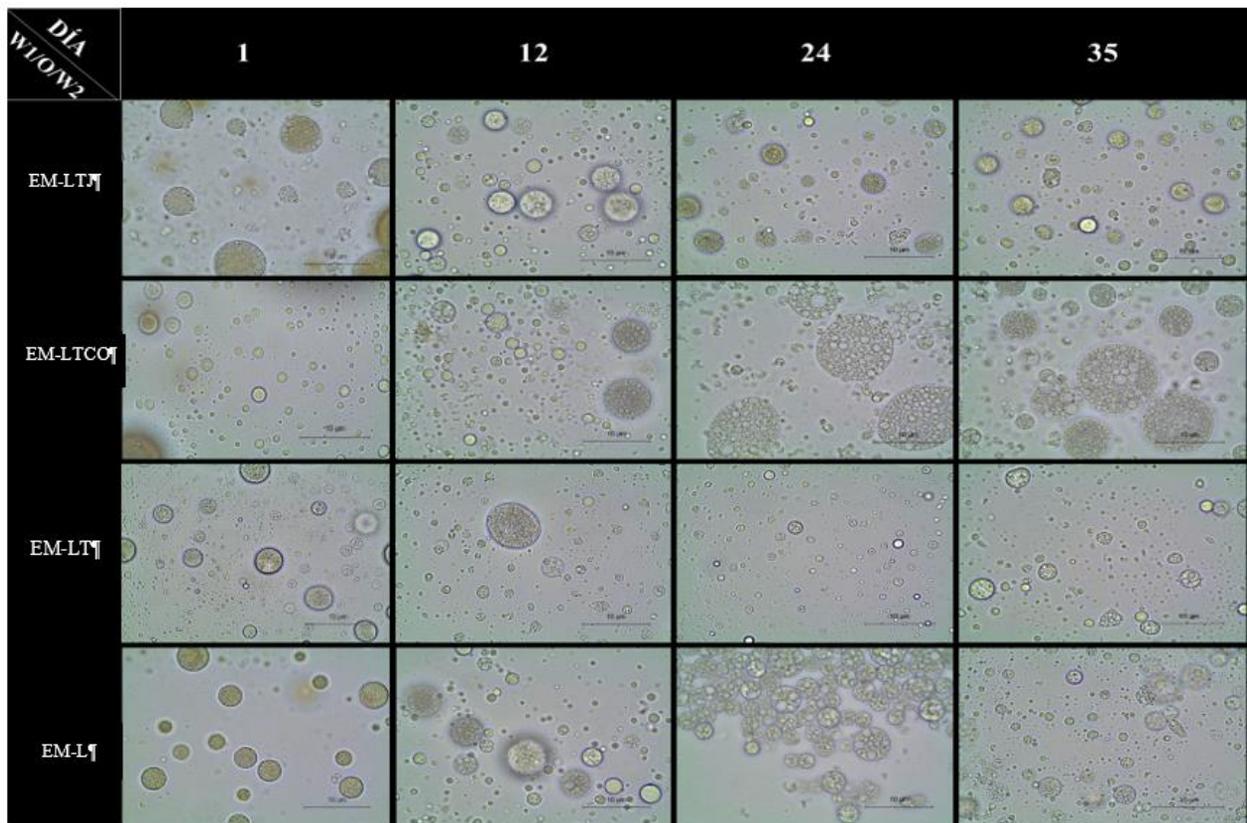


Figura 2. Micrografías 100x de las Emulsiones múltiples ($W_1/O/W_2$) monitoreadas durante 35 días.

Actividad antioxidante y fenoles totales

Respecto a la actividad antioxidante y fenoles totales, entre las emulsiones EM-LT y EM-L no existe diferencia significativa en la degradación de la actividad antioxidante en el transcurso del tiempo, por lo tanto, podría decirse que es estable en un tiempo de 35 días. Herchi *et al.* (2015), evaluaron el efecto de diferentes días de germinación de la linaza en la actividad antioxidante, reportada como % de atrapamiento del radical DPPH \cdot^+ del aceite obtenido de dichas muestras de linaza germinadas, en donde el dato con el que se compara esta investigación es una muestra control reportado por dichos autores, es decir de linaza sin germinar, en donde para el aceite de esta muestra obtuvieron 52% de atrapamiento. En la tabla 3, para la emulsión EM-L se obtuvieron valores respecto al tiempo (35 días) de 23, 21, 19, 13 y 9% de atrapamiento, esta diferencia podría ser debido a que como mencionan Herchi *et al.*, (2015), realizaron los análisis al aceite puro, en cambio en los datos que se obtuvieron en esta investigación, que se enuncian en la tabla 3, son de emulsiones, las cuales presentan más componentes en su fase oleosa, en el caso de esta emulsión (EM-L) presenta una mezcla de aceite de linaza y aceite de canola. Por otro lado, para la emulsión EM-LT, que contiene aceite esencial de toronja, se obtuvieron valores de 28, 25, 22, 20, 14% de atrapamiento del radical DPPH \cdot^+ respecto al tiempo (Tabla 3), cabe destacar que presenta mayor % de atrapamiento que la emulsión EM-L, debido a la adición del aceite esencial de toronja. Yang *et al.*, (2010), analizaron las características antioxidantes del aceite esencial de toronja y reportan un % de atrapamiento del radical DPPH \cdot^+ de 18.3 \pm 9.63% y un % de atrapamiento del radical ABTS \cdot^+ de 26.0 1.07%. En los datos obtenidos de DPPH \cdot^+ y ABTS \cdot^+ para la emulsión EM-LT respecto al tiempo (35 días), se obtuvieron valores de 28, 25, 22, 20, 14% y 33, 28, 18, 10, 9% de atrapamiento del radical DPPH \cdot^+ y ABTS \cdot^+ respectivamente (Tabla 3 y 4), por lo cual podría decirse que concuerda con lo reportado por dichos autores ya que existen un sinnúmero de investigaciones en las que se comprueba que los aceites esenciales de cítricos suelen tener alta actividad

antioxidante (Misharina & Samusenko, 2008).

Por otro lado, existe diferencia significativa en la degradación de la actividad antioxidante de la emulsión (EM-LTJ) (Figura 3 y 4), sin embargo, la degradación significativa comienza a partir del día 14. Debido a lo anterior se puede comprobar, que el utilizar la tecnología de emulsiones para encapsular antocianinas retrasa la degradación de la actividad antioxidante.

Calva (2015) en un estudio desarrollo emulsiones utilizando jugo de zarzamora en la fase continua, el cual es un fruto rico en antioxidantes, principalmente antocianinas; obtuvo un % de atrapamiento del radical DPPH•⁺ de 77%, en cambio en esta investigación para la emulsión EM-LTJ respecto al tiempo, se obtuvieron valores de 92, 77, 39, 18 y 22% de atrapamiento del radical DPPH•⁺ (Tabla 3), así mismo esta emulsión presenta una mayor actividad antioxidante que las emulsiones EM-LT y EM-L, debido a la adición de antocianinas en la fase acuosa interna, también es importante destacar que la actividad antioxidante no es completamente dependiente de las antocianinas adicionadas, sino también de un efecto sinérgico entre los compuestos lipofílicos (aceite esencial de toronja y aceite de linaza) e hidrofílicos (extracto de Jamaica) que se encuentran presentes en la emulsión EM-LTJ. Becker *et al.*, (2007) observó dicho efecto sinérgico entre compuestos antioxidantes en sistemas multifásicos, especialmente emulsiones O/W, atribuyendo dicho sinergismo a las diferencias de solubilidad y distribuciones de fase cercanas o en la interfaz. La degradación de la actividad antioxidante respecto al tiempo ya sea expresada como $\mu\text{mol ET}$, podría atribuirse a la alta inestabilidad de las antocianinas durante el almacenamiento, dicha inestabilidad se ha correlacionado con la degradación fenólica y por ende con la disminución de la actividad antioxidante (Artes, 2002).

En el caso de la emulsión con mezcla de extracto de Jamaica y té verde en la fase acuosa interna (EM-LTCO), no se presentan diferencias significativas respecto a tiempo y la actividad antioxidante se mantiene estable en un periodo de 35 días. Se puede observar que existe una mayor actividad antioxidante reportada como $\mu\text{mol ET}$, al agregar a las antocianinas de la Jamaica, una fuente distinta de fenoles, en este caso polifenoles del té verde. El incremento en la actividad antioxidante es debido a un efecto sinérgico provocado por la mezcla de polifenoles de ambos extractos. La adición de té verde estabiliza la actividad antioxidante, evitando la degradación de los antioxidantes a factores externos como la temperatura y la luz.

La diferencia en la actividad antioxidante entre los métodos evaluados (Figura 3 y 4), de acuerdo a la literatura, el radical ABTS•⁺ suele presentar mayor actividad antioxidante, ya que este ensayo es más sensible a una gran cantidad de compuestos antioxidantes tanto hidrófilos como lipófilos, en cambio el método del radical DPPH•⁺ presenta una menor sensibilidad y reacción más lenta, así mismo este ensayo se disuelve solo en matrices polares, los espectros de fases oleosas y/o de contenido lipídico se suelen superponer con el radical DPPH•⁺ ocasionando una distorsión de la medición espectrofotométrica, obteniéndose valores de actividad antioxidante menores (Leong, & Shui, 2002).

La emulsión EM-LTCO al día 1, respecto al radical ABTS•⁺ presentan un contenido antioxidante de 1017 $\mu\text{mol TE/g}$ de emulsión, lo cual contribuye de 20 a 34% de la ingesta diaria recomendada (3,000 a 5,000 $\mu\text{mol ET}$) para antioxidantes (USDA, 2010). Entre las emulsiones EM-LT y EM-L existe diferencia significativa a partir del día 35 en el contenido de polifenoles, por ende, podría considerarse que las emulsiones con aceite esencial de toronja y aceite de linaza presentan un contenido fenólico estable en un transcurso de 35 días. Para el caso de la concentración de fenoles totales, de acuerdo con la Figura 5, para la emulsión EM-L se obtuvieron valores respecto al tiempo de 0.016, 0.013, 0.016, 0.021 y 0.019 mg EAG/g emulsión), por otro lado, para la emulsión EM-LT, se obtuvieron valores de 0.017, 0.013, 0.018, 0.022 y 0.023 mg EAG/g emulsión.

En cuanto a la degradación del contenido de polifenoles expresado como mg EAG/g de emulsión, en el transcurso del tiempo, existe diferencia significativa en la degradación del contenido de polifenoles a partir del día 14 en la emulsión (EM-LTJ).

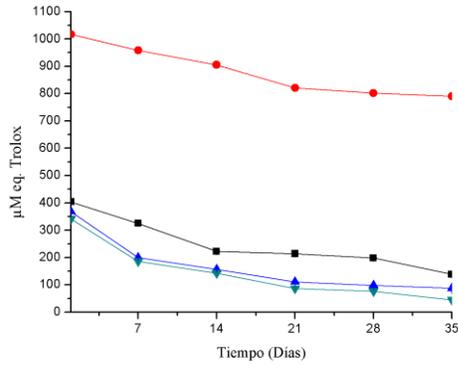


Figura 3. Cambio del contenido de actividad antioxidante (ABTS•+) en emulsiones múltiples. ■ EM-LTJ ● EM-LTCO ▲ EM-LT. ▼ EM-L

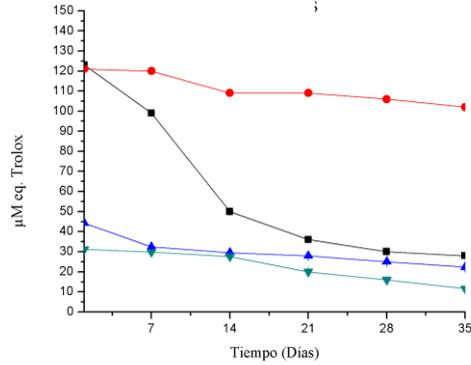


Figura 4. Cambio del contenido de actividad antioxidante (DPPH•+) en emulsiones múltiples. ■ EM-LTJ ● EM-LTCO ▲ EM-LT. ▼ EM-L

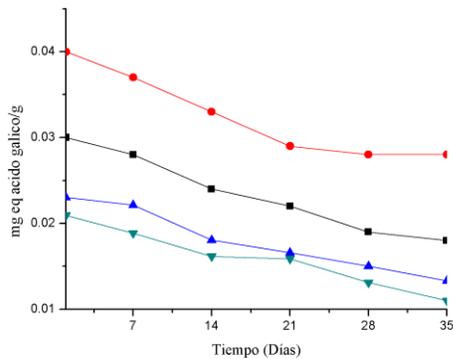


Figura 5. Cambio del contenido de fenoles totales en emulsiones múltiples: ■ EM-LTJ ● EM-LTCO ▲ EM-LT ▼ EM-L

Tabla 3. % de atrapamiento DPPH•+ al transcurso del tiempo de emulsiones múltiples.

% ATRAPAMIENTO					
DPPH	Día 1	Día 7	Día 14	Día 28	Día 35
EM-LTJ	92	77	39	18	22
EM-LTCO	93	90	85	69	64
EM-LT	28	25	22	20	14
EM-L	23	23	21	13	9

Tabla 4. % de atrapamiento ABTS^{•+} al transcurso del tiempo de emulsiones múltiples.

% ATRAPAMIENTO					
ABTS	Día 1	Día 7	Día 14	Día 28	Día 35
EM-LTJ	90	76	42	23	13
EM-LTCO	92	92	80	73	65
EM-LT	33	28	18	10	9
EM-L	36	25	21	15	7

Para todos los análisis evaluados (DPPH^{•+}, ABTS^{•+} y fenoles) respecto a la emulsión con extracto de Jamaica (EM-LTJ), se observa una disminución de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos, debido a la alta inestabilidad de las antocianinas. En el caso de la emulsión con extracto de Jamaica y té verde (copigmento) (EM-LTCO) se logró estabilizar la degradación antioxidante y fenólica respecto a tiempo de 35 días.

Evaluación sensorial

En la prueba triangular al día 1, los datos se sometieron a un análisis estadístico t de student, en donde se encontró que no existió diferencia significativa entre el sabor de la bebida con emulsión y sin emulsión. El mismo procedimiento se realizó respecto al atributo de olor y se obtuvo que no existió diferencia significativa entre el sabor de la bebida con emulsión y sin emulsión. Así mismo, se realizó el mismo procedimiento al día 30 (vida de anaquel sensorial), en donde se obtuvo que existe diferencia significativa respecto al sabor entre la bebida con emulsión y sin emulsión. De igual manera sucedió respecto al olor, ya que existió diferencia significativa entre la bebida con emulsión y sin emulsión.

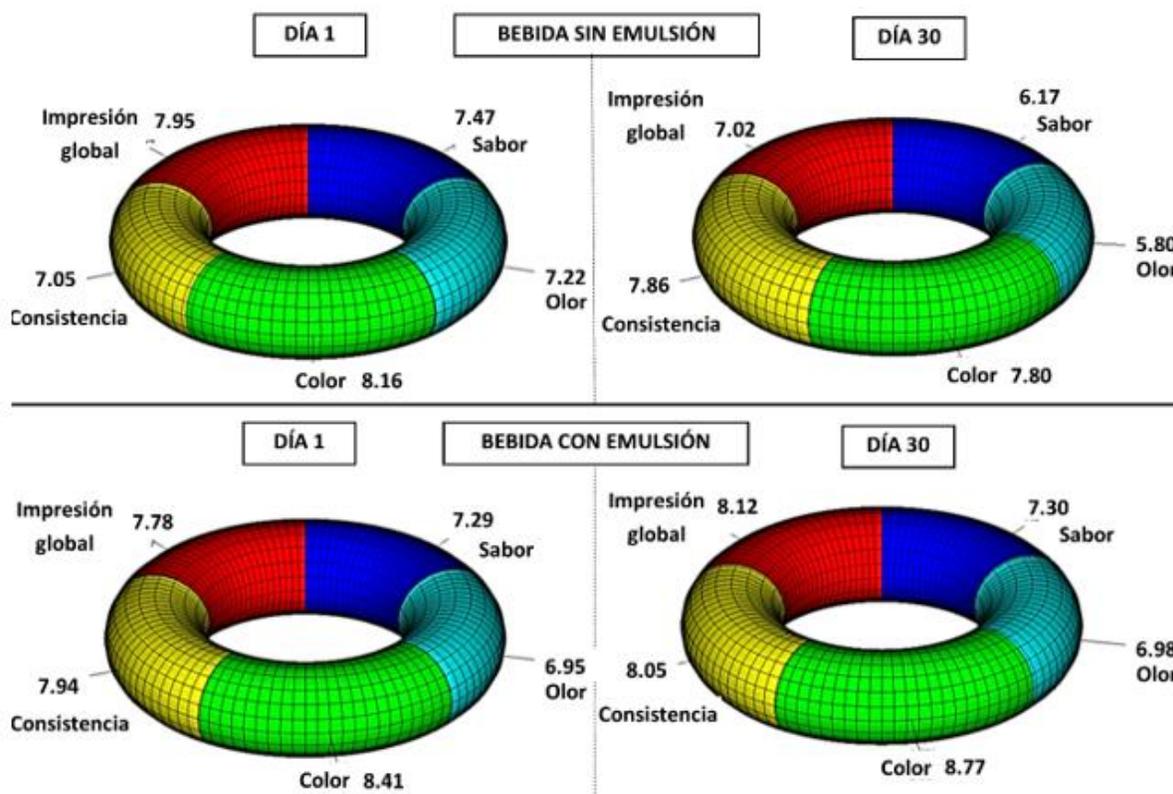


Figura 6. Atributos evaluados en las pruebas de nivel de agrado de la bebida sin emulsión y con emulsión al día 1 y 30.

Los resultados de la prueba hedónica de nivel de agrado se analizaron mediante un análisis estadístico t de Student, en donde no se presentó diferencia significativa (α 0.05) entre la bebida con emulsión y sin emulsión, en los 5 atributos evaluados al día 1. Sin embargo, al día 30 si se presentó diferencia significativa en los 5 atributos entre la bebida con emulsión y sin emulsión. Así mismo cabe destacar que al día 30 la bebida con emulsión presento mayor nivel de agrado, ya que la emulsión ayudo a que conservara sus atributos sensoriales, siendo del agrado de los jueces.

Esto es debido a que la bebida sin emulsión se va amargando al paso del tiempo dejando un resabio amargo debido a que se utilizan frutos naturales (toronja y frambuesa), en cambio la bebida con emulsión, a pesar de también tener frutos naturales (toronja y frambuesa), se logra retrasar dicho amargor debido al sabor otorgado por el aceite esencial de toronja, el cual enmascara el amargor y prolonga el sabor natural de la toronja.

CONCLUSIÓN

La combinación de extractos de *Hibiscus safdariffa* y *Camelia sinensis* prolonga la actividad antioxidante presente en las emulsiones múltiples usando aceite esencial de toronja y aceite de linaza. La relación de Palsgaard PGPR y Tween 20 y (8:2) al 10% en función de las fases permitió obtener tamaño de partícula de 1.1 μm en promedio y tasa de coalescencia 1.03×10^{-6} . Las emulsiones múltiples con la combinación de extractos (EM-LTCO) prolongaron la actividad antioxidante determinada por ABTS y DPPH, prácticamente 5 veces más en comparación con la emulsión formulada con extracto de hibiscus (EM-LTJ). Parece que la combinación de extractos acuosos de *Hibiscus safdariffa* y *Camelia sinensis* mejoran la estabilidad antioxidante de emulsiones múltiples que, cuando se usaron los extractos por separado. La estabilidad de la emulsión múltiple adicionada en la bebida evitó la oxidación de los antioxidantes naturales de *Hibiscus safdariffa* y *Camelia sinensis* y la adición de aceite esencial de toronja mejoro el sabor de la bebida.

BIBLIOGRAFIA

Álvarez Cerimedo, M. S. (2013). *Estabilidad de emulsiones y encapsulación de aceites con propiedades nutraceuticas* (Tesis doctoral), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).

Ananingsih, V.; Sharma, A. and Zhou, W. (2011). Green tea catechins during food processing and storage. *Food Research International* [Online]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399691100161X>

Arai S. (2000). Functional food science in Japan. *BiofactorS*; 12: 13-6

Artes, F. (2002): *Colour in Food Improving Quality*. Woodhead Publishing, Cambridge.

Becker EM, Ntouma G y Skibsted LH. (2007). Synergism and antagonism between quercetin and other chainbreaking antioxidants in lipid systems of increasing structural organization. *Food Chemistry*, 103: 1288- 1296.

Brouillard, R., Mazza, G., Saad, Z., Albrecht-Gary, A.M., and Cheminat A., 1989. "The co-pigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for the structural study of aqueous solutions," *Journal of The American Chemical Society*, 111(11). 2604-2610.

Brouillard, R.; Dangles, O. (1994). Anthocyanin molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging . *Food Chem.* 51, 365-371

Calva Estrada, S. D. J. (2015). Caracterización, actividad antioxidante y estabilidad de una emulsión O/W de carotenoides totales empleando jugo de zarzamora con fase continua.

Carrero, J. J., Martín-Bautista, E., Baró, L., Fonollá, J., Jiménez, J., Boza, J. J., & López-Huertas, E. (2005). Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Nutrición Hospitalaria*, 20(1), 63-69.

Dickinson, E., y Stainsby, G. (1982). *Colloids in Foods* London: Applied Science.

Francis, F. J., 1989 "Food colorants: anthocyanins," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28(4). 273-314.

Gracia, M.T.S., Heinonen, M., and Frankel, E.N., (1997). "Anthocyanin as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin liposome systems," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9). 3362-3367.

Herchi, W., Bahashwan, S., Sebei, K., Saleh, H. B., Kallel, H., y Boukhchina, S. (2015). Effects of germination on chemical composition and antioxidant activity of flaxseed (*Linum usitatissimum* L) oil. *Grasas y Aceites*, 66(1), 057.

Jackman, R. L., Yada, R. Y., Tung, M. A., y Speers, R. (1987). Anthocyanins as food colorants—a review. *Journal of Food Biochemistry*, 11(3), 201-247.

Kosegarten-Conde, C. E., y Jiménez-Munguía, M. T. (2012). Factores principales que intervienen en la estabilidad de una emulsión doble. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. Puebla, México. 6-2: 1-18

Leong, L. P., & Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food chemistry*, 76(1), 69-75.

McClements, D. J. (2005). *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques* (2nd ed.). Boca Raton: CRC Press.

Misharina, T. A., y Samusenko, A. L. (2008). Antioxidant properties of essential oils from lemon, grapefruit, coriander, clove, and their mixtures. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(4), 438-442.

Muñoz, J., Alfaro, M., y Zapata, I. (2007). Avances en la formulación de emulsiones. *Grasas Aceites*, 58(1), 64-73.

Peredo-Luna, H. A., y Jiménez-Munguía, M. T. (2012). Mecanismos de inestabilidad y métodos de estabilización de emulsiones múltiples. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 122-130.

Ramirez-Rodrigues, M.M., Plaza, M.L., Azeredo, A., Balaban, M.O. and Marshall, M.R., 2011. "Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*," *Journal of Food Science*, 76(3). C428-C435.

Sherman, P. 1968. Rheology of emulsions. In Emulsion Science, p.314, (Ed.) Sherman,P. Academic Press, London.

USDA. (2010). “Antioxidants and Health,” ACES Publications, Beltsville. p. 4.

Yang, S. A., Jeon, S. K., Lee, E. J., Shim, C. H., y Lee, I. S. (2010). Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Natural product research*, 24(2), 140-151.

Zhang, G. B. Celli and M. S. Brooks. (2019). Chapter 1: Natural Sources of Anthocyanins , in Anthocyanins from Natural Sources: Exploiting Targeted Delivery for Improved Health, pp. 1-33