

INFLUENCIA DEL ESTRÉS AMBIENTAL SOBRE MICROEMULSIONES ELABORADAS CON ACEITE DE PESCADO

Noelia Mori Cortés¹, Gabriel Lorenzo^{1,2} y Alicia N. Califano¹

¹CIDCA, CONICET, Fac. Cs. Exactas, UNLP, 47 y 116, La Plata (1900), Argentina.

²Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata.

e-mail de contacto: noe89lp@hotmail.com

1. Introducción

La fortificación de alimentos y bebidas con lípidos bioactivos es una iniciativa importante dentro de la industria alimentaria para mejorar la salud de la población. El aceite de pescado es una fuente importante de ácidos grasos poliinsaturados ω -3 como los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), los cuales han sido reportados como los de mayor bioactividad [1]. Su consumo reduce el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares e inflamatorias y además favorecen el buen desarrollo del cerebro entre otros beneficios. Sin embargo, la mayoría de la población no alcanza los niveles de consumo necesarios [2]. En particular, las microemulsiones resultan una alternativa interesante para incorporar aceites funcionales ya que presentan una gran capacidad para solubilizar y mejorar su biodisponibilidad [3]. Las microemulsiones son mezclas macroscópicamente homogéneas de aceite, agua y surfactante, frecuentemente en combinación con un cosurfactante. Son ópticamente isotrópicas, transparentes con tamaños de gotas por debajo de los 100 nm. Los alimentos y bebidas emulsionados pueden estar sujetos a una gran variedad de estrés ambiental durante el procesamiento, almacenamiento, transporte y utilización. Por lo tanto, es importante examinar el efecto de cambios del pH, fuerza iónica, centrifugación y temperatura ya que son las variables más importantes que pueden conducir a la desestabilización de las microemulsiones. Asimismo, los ácidos grasos ω -3 son muy susceptibles a la oxidación y pueden degradarse dando como resultado alteraciones en la composición nutricional. Además, la oxidación conduce a la formación de agentes indeseables que afectan la calidad sensorial del producto y así disminuye la aceptación del alimento por parte del consumidor. Por lo cual, es fundamental estudiar la estabilidad física y química de las microemulsiones elaboradas con ácidos grasos ω -3.

2. Parte experimental

2.1 Materiales

Se empleó hidroxistearato de macrogolglicerol (Kolliphor RH40) provisto por BASF (BASF Argentina S.A.) y aceite de pescado suministrado por OmegaSur (OmegaSur S.A., Argentina), el cual se utilizó sin purificación adicional. También se utilizó etanol de grado analítico > 99,5% como cosurfactante (Soria, Argentina), azida sódica como agente antimicrobiano (Anedra, Argentina) y agua destilada y desionizada.

2.2 Preparación de las microemulsiones

La elaboración de las microemulsiones se realizó mediante leve agitación a 125 rpm y manteniendo una temperatura controlada de 40°C durante todo el proceso. Inicialmente se elaboró la fase dispersa constituida por una mezcla de emulsificante (Kolliphor RH40), aceite de pescado y etanol absoluto (cosurfactante). Las microemulsiones se prepararon agregando

lentamente agua destilada sobre la fase lipídica manteniendo una velocidad de agitación constante. Así se obtuvo una formulación con 80g de agua cada 100g de microemulsión con una fase oleosa con 90g de emulsificante cada 100g de fase orgánica y una relación aceite: etanol de 2:1.

2.3 Ensayos de estabilidad física

Mediante un equipo de dispersión dinámica de luz Horiba SZ-100 (Horiba Scientific, Japón) se determinó la distribución de tamaños y el diámetro hidrodinámico promedio de gotas de la microemulsión antes (control) y después de someterse a distintas condiciones de estrés ambiental: cambios de pH, fuerza iónica, centrifugación y temperatura.

2.3.1 Influencia del pH, fuerza iónica y centrifugación

Se seleccionaron cuatro diferentes pH (3, 5, 7, 9) para evaluar su efecto en la preparación de las microemulsiones. Se empleó HCl o NaOH para ajustar el pH de las soluciones que se utilizaron en reemplazo del agua en la formulación de las microemulsiones. Además, con el objetivo de evaluar la influencia de la fuerza iónica se utilizaron diferentes soluciones acuosas de CaCl₂ (0.1%, 0.5%, 1% y 10% p/v) en lugar de agua durante la formación de la microemulsión. Posteriormente, todas las muestras elaboradas se almacenaron durante 24 horas a 20°C. Por otro lado, las microemulsiones se sometieron a 3000 rpm durante 30 minutos inmediatamente después de su preparación.

2.3.2 Influencia de la temperatura

Se investigó la estabilidad de la microemulsión a distintas temperaturas. Las mismas se almacenaron congeladas (-20°C) o refrigeradas (4°C) y se inspeccionaron periódicamente durante más de un mes. Asimismo, se aplicaron dos procesos térmicos típicos en la pasteurización de alimentos: las microemulsiones se sometieron por 30 minutos a 63°C (VAT o pasteurización lenta) y durante 25 segundos a 85°C (HTST o pasteurización a altas temperaturas durante un breve período). Finalmente, se evaluó la estabilidad en condiciones más extremas de 100°C durante 1 hora y a 150°C por 30 minutos.

2.4. Estabilidad oxidativa

Se elaboraron microemulsiones con 1.33% p/p de aceite de pescado y se comparó su estabilidad oxidativa con el aceite de pescado solo, sometido previamente a las mismas condiciones de temperatura y agitación que las utilizadas al preparar las microemulsiones. Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se determinaron durante el almacenamiento a 4°C y a 20°C. Asimismo, se estudió la estabilidad oxidativa del emulsificante en un ensayo de oxidación acelerada (62°C durante 13 días) para evaluar su posible contribución a las TBARS de la microemulsión. Por lo cual, se preparó una mezcla de agua, Kolliphor RH40 y etanol siguiendo el mismo procedimiento que en la preparación de la microemulsión y conservando la misma proporción entre los componentes (es decir, 100: 22.5: 0.8 para agua: emulsificante: etanol, respectivamente). La determinación de las TBARS se realizó por cuadruplicado de acuerdo al método seguido por Marchetti, Andrés y Califano [4].

2.5 Oxidación lipídica y composición de ácidos grasos

Mediante cromatografía gaseosa se identificó la composición de ácidos grasos del aceite de pescado. Se analizó la estabilidad oxidativa de las microemulsiones y el aceite de pescado con respecto a la temperatura (4°C y 20°C) y tiempo de almacenamiento (35 y 60 días).

La extracción de lípidos de las microemulsiones se realizó mediante el método de Folch y colaboradores [5]. El aceite de pescado se extrajo mediante una mezcla (2:1, v/v) de cloroformo: metanol (reactivo de Folch).

La transformación de los triglicéridos a sus ésteres metílicos se realizó por transesterificación alcalina con hidróxido de potasio en metanol según ISO N° 5509 [6]. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se analizaron en un cromatógrafo gaseoso Agilent Technologies 7890 A con columna capilar DB-23 (30 m de largo, 0,25 mm diámetro x 250 μm espesor).

3. Resultados y discusión

3.1 Influencia del pH, fuerza iónica y centrifugación

Las microemulsiones se mantuvieron estables en un amplio rango de pH, fuerza iónica e incluso después de ser centrifugadas, sin mostrar diferencias significativas en el tamaño promedio de gotas o en su distribución ($P < 0.05$) con la microemulsión control. La cual presentó una distribución de tamaño monomodal con un bajo índice de polidispersidad (0.175 ± 0.006) y un tamaño de gota hidrodinámico promedio de 14.6 nm (± 0.2).

3.2 Influencia de la temperatura

Las microemulsiones sometidas a $63 \text{ }^\circ\text{C}$, $85 \text{ }^\circ\text{C}$ y $100 \text{ }^\circ\text{C}$ no mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el tamaño medio de las gotas o en su distribución en comparación con el control. Además, el almacenamiento refrigerado ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) no alteró la estabilidad física de las microemulsiones y el tamaño de las gotas se mantuvo por debajo de 15 nm durante el período estudiado. Las muestras almacenadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 36 días ($21 \text{ nm} \pm 0.4$) mostraron un aumento constante en el tamaño hidrodinámico medio de las gotas con respecto al control como se observa en la **Figura 1**. Por otro lado, las microemulsiones sometidas a $150 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos se desestabilizaron rápidamente para formar dos fases transparentes bien definidas.

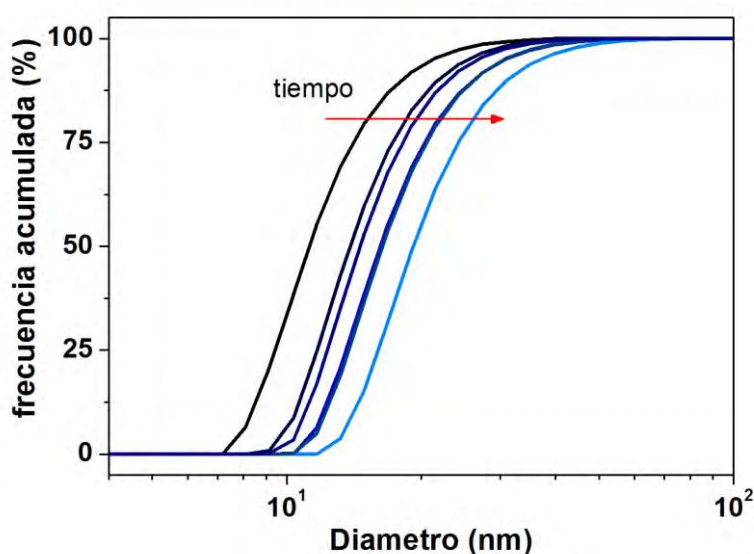


Figura 1. Frecuencia acumulada de tamaño de gotas para las microemulsiones almacenadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ a distintos tiempos: 0 (—), 1 (—), 7 (—), 15 (—), 24 (—) y 36 (—) días.

3.3 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Las TBARS del aceite de pescado solo y la microemulsión elaborada con 1.33% p/p de aceite de pescado se midieron para controlar los productos de oxidación secundaria durante el almacenamiento a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y $20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 56 días (**Figura 2**). Los resultados obtenidos se ajustaron satisfactoriamente mediante el modelo Özilgen [7].

$$C = \frac{C_0 e^{kt}}{1 - \frac{C_0}{C_{\max}}(1 - e^{kt})} \quad (\text{Ec.1})$$

donde C_0 es la concentración inicial de los productos de oxidación total, C_{\max} , es el valor máximo alcanzable del parámetro C durante el proceso de oxidación, t es el tiempo, y k es la constante de velocidad de reacción.

Tanto el aceite de pescado como la microemulsión mostraron el mismo efecto cuando se almacenaron a temperaturas más altas; primero un aumento abrupto en TBARS seguido por una región donde la concentración de TBARS se mantuvo prácticamente constante y finalmente una caída en la concentración de TBARS como resultado de la degradación de los productos de oxidación secundaria. Por otro lado, durante el almacenamiento a 4°C, solo se observó la primera etapa de aumento constante de TBARS. A temperaturas más altas, se observó una disminución marcada en la estabilidad oxidativa tanto para las microemulsiones como para el aceite de pescado solo. Sin embargo, la formación de productos de oxidación secundaria fue significativamente mayor en la microemulsión que en el aceite de pescado, independientemente de la temperatura utilizada en el almacenamiento. Frankel, Satué-Gracia, Meyer y German [8] encontraron resultados similares al comparar la estabilidad oxidativa del aceite de pescado y algas con sus respectivas emulsiones o/w. Como se esperaba, la constante cinética ($k = 0.323 \text{ días}^{-1}$) del proceso de oxidación a 20°C fue mayor que a 4°C ($k = 0.088 \text{ días}^{-1}$). Mientras que en el aceite de pescado, las constantes cinéticas fueron 0.168 días^{-1} a 20°C y 0.070 días^{-1} a 4°C. Después de almacenar la microemulsión a 20°C durante 34 días, la concentración de TBARS alcanzó su valor máximo (2.79 mM), mientras que en el aceite el valor máximo se obtuvo después de 30 días y fue aproximadamente 96 veces menor (0.029 mM). Esta diferencia observada podría deberse al hecho de que en las microemulsiones, la oxidación de los lípidos se produce en la interfaz aceite-agua, mientras que en el aceite de pescado la reacción se produce principalmente debido al oxígeno en el aire en contacto con el aceite. Aunque la constante cinética de oxidación es similar para el aceite de pescado y la microemulsión almacenada a 4°C, la alta área superficial de las gotas de la microemulsión produce un mayor número de interacciones entre la fase lipídica y los agentes oxidantes (radicales libres, metales de transición, hidroperóxidos), lo que lleva a un aumento en TBARS.

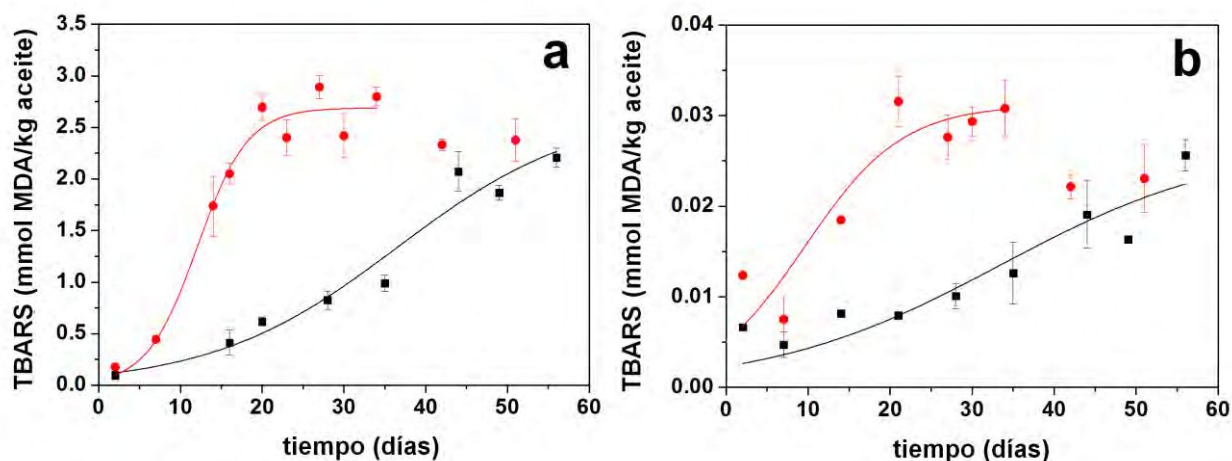


Figura 2. TBARS para (a) microemulsión y (b) aceite de pescado almacenados a 4°C (■) y a 20°C (●). Las líneas continuas representan el modelo cinético de oxidación lipídica (Ec. 1)

Por otro lado, el tipo de emulsificante también puede tener un efecto negativo en la estabilidad oxidativa de las emulsiones, ya que pueden contener hidroperóxidos [9]. Sin embargo, cuando se estudió la estabilidad oxidativa del Kolliphor RH40 a 62 °C, en una mezcla con etanol y agua, sólo se observó una pequeña variación en la concentración de TBARS durante el período evaluado, alcanzando una concentración equivalente a 10.9% de la concentración máxima de MDA obtenida para la microemulsión.

3.4 Análisis de ácidos grasos mediante cromatografía gaseosa

Se analizaron los cambios en los perfiles de ácidos grasos (FA) del aceite de pescado y de la microemulsión durante el almacenamiento a 4°C y a 20°C. La cantidad total relativa de FA se mantuvo invariable en el aceite de pescado independientemente de las condiciones ensayadas. El contenido de ácidos grasos saturados (SFA) fue de 29 g/100 g de ácidos grasos totales. Los SFA que se encontraron en mayor proporción fueron el ácido palmítico (16:0, 18 g/100 g de ácidos grasos) seguido por el ácido esteárico (18:0, 3 g/100 g de ácidos grasos). Por otro lado, el contenido de FA insaturados fue de aproximadamente 71 g/100 g de ácidos grasos totales. La cantidad de MUFA fue superior a la de PUFA, encontrándose el ácido oleico como el MUFA predominante (25 g/100 g del total). Asimismo, los PUFA que se encontraron en mayor proporción fueron el DHA (22:6, 19g/100g del total), EPA (20:5, 8 g/100 g del total) y ácido linoleico (18:2, 2 g/100 g del total).

La **Tabla 1** muestra la cantidad total relativa de DHA y EPA de la microemulsión y el aceite de pescado. Independientemente de la temperatura de almacenamiento, la cantidad relativa de EPA y DHA del aceite de pescado fue mayor que en la microemulsión después de 35 o 60 días de almacenamiento. Esto indicaría una mayor tasa de degradación de ácidos grasos en la microemulsión que en el aceite de pescado. En el aceite de pescado no se detectaron cambios significativos en el perfil de ácidos grasos al aumentar la temperatura de 4 a 20°C. Sin embargo, el aumento de la temperatura de almacenamiento de 4°C a 20°C disminuyó significativamente el contenido de EPA y DHA ($P < 0.05$) en las microemulsiones. El tiempo de almacenamiento solo modificó el contenido de PUFA a 20°C.

Tabla 1 Cantidad total relativa de DHA y EPA para la microemulsión y el aceite de pescado.

Temp. (°C)	Aceite de pescado				Microemulsión			
	4	4	20	20	4	4	20	20
Tiempo (días)	35	60	35	60	35	60	35	60
DHA	20.209 ^a	20.041 ^a	20.567 ^a	18.578 ^a	15.027 ^b	14.217 ^{bc}	12.335 ^c	6.3 ^d
EPA	8.637 ^a	8.604 ^a	8.718 ^a	8.298 ^a	6.974 ^b	6.567 ^{bc}	5.936 ^c	3.321 ^d

Diferentes superíndices dentro de la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Por otro lado, se estudió el perfil de ácidos grasos de una mezcla que contenía 18.24 g/100 g de Kolliphor RH40 y no hubo una contribución significativa del emulsificante al perfil de ácidos grasos de la microemulsión.

4. Conclusión

Las microemulsiones elaboradas con Kolliphor RH40 se mantuvieron estables en un amplio rango de pH, fuerza iónica y después de ser sometidas a centrifugación, sin mostrar diferencias

significativas en el tamaño promedio de las gotas o en su distribución. En todos los casos, el tamaño de las gotas fue inferior a 15 nm y tuvo un bajo índice de polidispersidad. Además, las microemulsiones mostraron una buena estabilidad térmica incluso durante el almacenamiento refrigerado. Durante la congelación, se observó un ligero aumento en el tamaño (<21 nm), pero se mantuvo su apariencia ópticamente transparente, lo que le da un gran potencial para incorporarse a una matriz alimenticia. Las microemulsiones solo se desestabilizaron durante el calentamiento a 150°C. La gran área superficial de las gotas de la microemulsión condujo a la disminución de la estabilidad oxidativa en comparación con el aceite de pescado solo, lo que también se reflejó en la disminución del contenido de EPA y DHA. Aunque el proceso de emulsificación causó una disminución en la estabilidad oxidativa, cuando las microemulsiones se mantuvieron refrigeradas, los contenidos de EPA y DHA no se alteraron, lo que refleja que con la adecuada adición de antioxidantes es posible aprovechar la gran estabilidad física de estos sistemas sin afectar la composición de los ácidos grasos.

5. Bibliografía

- [1] Komaiko, J., Sastrosubroto, A., & McClements, D. (2016). Encapsulation of ω -3 fatty acids in nanoemulsion-based delivery systems fabricated from natural emulsifiers: Sunflower phospholipids (Vol. 203).
- [2] Nejadmansouri, M., Hosseini, S. M. H., Niakosari, M., Yousefi, G. H., & Golmakani, M. T. (2016). Physicochemical properties and oxidative stability of fish oil nanoemulsions as affected by hydrophilic lipophilic balance, surfactant to oil ratio and storage temperature. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 506, 821-832.
- [3] Dong, X., Zhu, Q., Dai, Y., He, J., Pan, H., Chen, J., & Zheng, Z.-P. (2016). Encapsulation artocarpone and ascorbic acid in OW microemulsions: Preparation, characterization, and antibrowning effects in apple juice. *Food chemistry*, 192, 1033-1040.
- [4] Marchetti, L., Andrés, S. C., & Califano, A. N. (2017). Physicochemical, Microbiological and Oxidative Changes During Refrigerated Storage of n-3 PUFA Enriched Cooked Meat Sausages with Partial NaCl Substitution. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41 (3), e12920.
- [5] Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226 (1), 497-509.
- [6] ISO, P. (2000). Animal and vegetable fats and oils—preparation of methyl esters of fatty acids. *Polish Standard Method PN-EN ISO, 5509*, 2000.
- [7] Özilgen, S., & Özilgen, M. (1990). Kinetic model of lipid oxidation in foods. *Journal of Food Science*, 55 (2), 498-498.
- [8] Frankel, E. N., Satué-Gracia, T., Meyer, A. S., & German, J. B. (2002). Oxidative stability of fish and algae oils containing long-chain polyunsaturated fatty acids in bulk and in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (7), 2094-2099.
- [9] Nuchi, C. D., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2001). Impact of Tween 20 hydroperoxides and iron on the oxidation of methyl linoleate and salmon oil dispersions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (10), 4912-4916.