



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Programa de Doctorat en Ciència dels Aliments

Tesis doctoral

**ELABORACIÓN DE UN ANÁLOGO DE QUESO FRESCO POR
SUSTITUCIÓN DE LA GRASA LÁCTEA CON EMULSIONES DE
ACEITES VEGETALES RICOS EN OMEGA 3 Y 6 CON
INCORPORACIÓN DE ACEITES ESENCIALES**

Advelí Durand Villarroel

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 2018



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Programa de Doctorat en Ciència dels Aliments

**Elaboración de un análogo de queso fresco por sustitución de la
grasa láctea con emulsiones de aceites vegetales ricos en omega 3
y 6 con incorporación de aceites esenciales**

Tesis doctoral

**Director
Tutor Académico**

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'AJT'.

Antonio José
Trujillo Mesa

Directora

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'MH'.

Manuela
Hernández Herrero

Doctoranda

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Advellí'.

Advellí
Durand Villarroel

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), septiembre 2018

ANTONIO JOSÉ TRUJILLO MESA, Catedrático de Universidad y MANUELA HERNÁNDEZ HERRERO, Profesora Titular de Universidad, ambos del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB),

HACEN CONSTAR: que **Adelí Durand Villarroel** ha realizado, bajo nuestra dirección, en el área de Tecnología de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), el trabajo titulado **“Elaboración de un análogo de queso fresco por sustitución de la grasa láctea con emulsiones de aceites vegetales ricos en omega 3 y 6 con incorporación de aceites esenciales”** que presenta para optar al grado de Doctor en Ciencia de los Alimentos.

Y para que así conste firmamos el presente documento en:

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 26 de septiembre de 2018

Dr. Antonio José Trujillo Mesa

Dra. Manuela Hernández Herrero

Este trabajo se ha realizado con la financiación aportada por el Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo del Ministerio de Educación de Perú a través de la Beca Presidente de la República, convocatoria 2013-III y del Ministerio de Economía y Competitividad de España a través del proyecto AGL2011-26766.

*A mi mami Agustina, que siempre apoyó mis
decisiones y que ahora desde algún cielo en el que
está me acompaña siempre.*

*A mi padre Alberto, a Liz y Paul mis hermanos,
por ser mi fortaleza en la distancia.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mis directores, a Toni por confiar en mí para llevar adelante este proyecto y por su apoyo y enseñanzas durante todos estos años, a Manolí, por estar siempre dispuesta a apoyarme y escuchar mis dudas, aunque estuvieras muy ocupada, por las conversaciones en el despacho y por arrancarme sonrisas incluso en momentos difíciles. Gracias, aprendí mucho de ustedes.

A Ramón y Joan Miquel, por estar siempre atentos y prestos para hacer las producciones en la Planta Piloto.

A Marta, Vicky y Bibi por su disposición para ayudarme cuando lo necesité.

A Sonia, Dolors y Elena por el importante soporte en los laboratorios.

A Belén, por su apoyo, que fue más allá del uso del HPLC.

A Sasha, Natalia y Cristina, por transmitirme sus conocimientos en las distintas etapas de esta tesis.

A Julia L., por su amabilidad y rapidez para realizar trámites

A los compañeros del Departamento de Tecnología de los Alimentos e Higiene, con quienes compartí momentos agradables, conversaciones amenas e interesantes, a Alicia, Idoia, Alvar, Montse, Jezer, Carol, María, Erola, Abel, Favio, Noemí, Ulises, Jhony, Daniel, Blanca.

A Sonia G., por los momentos compartidos dentro y fuera del despacho, gracias por la compañía y apoyo que me brindaste en los momentos más difíciles y gracias por Wanguita.

A los amigos maravillosos que conocí aquí, a Carmen, por ser mi guía y amiga cuando llegué. A Paloma, Rafael y Marino, por los momentos compartidos, las largas caminatas, por todo lo vivido. A Maria Queralt, por su apoyo y alegría que contagia.

A Ana, gracias por tu apoyo, por las conversas y por los ricos postres que compartiste conmigo.

A mi madre querida que me acompañó y animó a continuar en la primera etapa de esta experiencia y aunque ahora ya no está físicamente, siempre siento su compañía. A mis hermanos y a mi padre por confiar en mí y apoyarme durante todos estos años y a toda mi familia por hacerme sentir otra vez en casa.

Gracias a todos por hacer de mi estadía en Barcelona una gran experiencia.

Moltes gràcies!!!

RESUMEN

El objetivo general de esta tesis fue elaborar un análogo de queso fresco con alto contenido de ácidos grasos omega-3 y 6, a partir de la sustitución de la grasa de la leche por una emulsión de aceites de oliva y chía, utilizando caseinato de sodio como emulgente, y con la incorporación de aceites esenciales como antimicrobianos y antioxidantes naturales.

En un primer estudio se determinó la capacidad antioxidante y antimicrobiana *in vitro* de aceites esenciales (AEs) de albahaca, canela, clavo, laurel, limón, mandarina, salvia, romero, valeriana, tomillo y orégano. Para determinar la capacidad antimicrobiana se ensayaron diez microorganismos de relevancia en los productos lácteos: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.* Los AEs de canela, clavo, orégano y tomillo fueron los que mostraron mayor eficacia antioxidante y antimicrobiana, por ello fueron seleccionados para incluirlos en el segundo estudio. Los cuatro AEs mostraron un comportamiento similar para evitar la oxidación de lípidos; sin embargo, la canela y el clavo presentaron una mayor actividad antioxidante frente a los radicales libres, mientras que el orégano y el tomillo fueron los que mostraron una mayor actividad antimicrobiana. En un segundo estudio, se formularon y elaboraron emulsiones O/W con un 15% de aceite de oliva y un 5% de chía, ricos en omega-3 y 6, con caseinato de sodio como el emulgente, estabilizadas por homogeneización convencional (15 MPa), con la adición o no de los AEs seleccionados en el estudio anterior. En una primera etapa se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los AEs de orégano, tomillo, clavo y canela incluidos en las emulsiones frente a los 10 microorganismos ensayados en el primer estudio. La CMI de estos cuatro AEs fue similar frente a todos los microorganismos estudiados excepto para *P. aeruginosa* que fue el microorganismo más resistente, las CMIs obtenidas en este estudio fueron entre 4 y 32 veces superiores al obtenido en el ensayo *in vitro*, realizado previamente. Por su potencial actividad antimicrobiana y antioxidante, y menor impacto a nivel sensorial, se seleccionaron los AEs de tomillo y clavo para el estudio de caracterización de las emulsiones a nivel fisicoquímico, y microbiológico durante su almacenamiento a 4 °C. El efecto antimicrobiano fue leve, debido probablemente a la mayor resistencia a estos aceites de la microbiota presente en la emulsión elaborada, aunque se determinó cierto efecto antimicrobiano, especialmente

en la emulsión con clavo presentando una vida útil de 9 días y 4-5 días en la emulsión control y la de tomillo.

En un tercer estudio se desarrolló y caracterizó un análogo de queso fresco (AQF) con sustitución de la grasa de la leche por la emulsión del segundo estudio. Con el objetivo de evaluar el efecto antimicrobiano y antioxidante de los AEs de tomillo y clavo en el AQF, se incluyeron en el AQF a través de la emulsión o de manera directa en el análogo de leche a una concentración final de un 0,05%, y se estudiaron las características de los diferentes AQF a nivel fisicoquímico, microbiológico y sensorial durante su almacenamiento a 4 °C. Para poder coagular el análogo de leche en la elaboración del AQF se optimizó el proceso de coagulación con un 0,03% de quimosina (actividad ~600 IMCU/mL), un 0,03% de solución de CaCl₂ al 50% y con temperatura y tiempo de coagulación de 35 °C durante 40 min. De acuerdo a la composición en ácidos grasos de los AQF, se pueden realizar una serie de declaraciones nutricionales y de salud en la etiqueta del producto en base a su bajo contenido de grasas saturadas y alto contenido de grasas insaturadas, monoinsaturadas y de ácidos grasos omega 3. Por otro lado, la incorporación de los AEs de clavo o tomillo no tuvo efecto en la composición y textura, pero sí en el desarrollo microbiano, especialmente del AQF con tomillo añadido en la emulsión, que presentó una vida útil de 12 días, mientras que en los otros AQF la vida útil fue de 7-8 días en condiciones de refrigeración. También los AQF con AEs presentaron niveles de oxidación (primaria y secundaria) menores que sus homólogos sin AEs. A nivel sensorial, el AQF control se describió como un producto de sabor herbal conferido por el aceite de chía, con textura y color aceptables, características sensoriales que fueron similares en los AQF que contenían AEs, aunque con diferencias considerables de sabor y olor, debido a la presencia de los AEs, sabor que fue percibido como intenso, persistente y característico del AE adicionado, pero de olor moderado.

ABSTRACT

The general objective of this thesis was to elaborate a fresh cheese analogue with a high content of omega-3 and 6 fatty acids, by replacing the milk fat by an emulsion of olive and chia oils, using sodium caseinate as emulsifier, and with the incorporation of essential oils as natural antimicrobials and antioxidants.

In a first study, the *in vitro* antioxidant and antimicrobial capacity of the essential oils (EOs) from basil, cinnamon, clove, laurel, lemon, tangerine, sage, rosemary, valerian, thyme, and oregano were determined. To analyze the EOs antimicrobial capacity ten relevant microorganisms in the dairy products were tested: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus niger*, and *Penicillium sp.* The EOs of cinnamon, clove, oregano, and thyme were those that showed the highest antioxidant and antimicrobial efficacy, and for this reason, they were selected to include them in the second study. The four EOs showed similar behavior to avoid oxidation of lipids; however, cinnamon and clove showed the highest antioxidant activity against the free radicals, while oregano and thyme were the EOs that showed the highest antimicrobial activity.

In a second study, O/W emulsions were formulated and elaborated with 15% olive oil and 5% chia, rich in omega-3 and 6, with sodium caseinate as emulsifier, and stabilized by conventional homogenization (15 MPa), with the addition or not of the EOs selected in the previous study. In a first stage, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the oregano, thyme, clove, and cinnamon EOs included in the emulsions were determined against the ten microorganisms tested in the first study. The MIC of these four EOs incorporated to the emulsions were similar to all the microorganisms studied except for *P. aeruginosa*, which was the most resistant microorganism. The MICs in this study were 4-32 times higher than those obtained in the previously performed *in vitro* test. Due to its potential antimicrobial and antioxidant activities, and lower sensory impact, the emulsions including thyme and clove EOs were selected to be characterized at the physicochemical and microbiological level during storage at 4 °C. The antimicrobial effect was mild, probably due to the higher resistance to the microbiota present in the emulsions to these EOs, although some antimicrobial effect was determined, especially in the emulsion with clove presenting a shelf life of 9 days, compared with the 4-5 days at control and thyme emulsions.

In a third study, a fresh cheese analogue (FCA) was developed and characterized by replacing the milk fat by the emulsion of the second study. In order to evaluate the antimicrobial and antioxidant effects of the thyme and clove EOs in the FCA, they were included through the emulsion or directly in the milk analogue at a final concentration of 0.05%, and the characteristics of the different FCAs were studied at the physicochemical, microbiological and sensory level during storage at 4 °C. To coagulate the milk analogue in the FCA preparation, the coagulation process was optimized by using 0.03% chymosin (activity ~600 IMCU/mL), 0.03% CaCl₂ solution at 50%, and a temperature and coagulation time of 35 °C and 40 min. According to the fatty acid composition of the FCA, a series of nutritional and health claims can be made on the product label based on their low content of saturated fats and high content of unsaturated fats and omega-3 fatty acids. On the other hand, the incorporation of clove or thyme EOs had no effect on the composition and texture, but these had effect on the microbial development, especially in the FCA added of emulsion containing thyme, with a shelf life of 12 days, whereas in the other FCAs the shelf life was 7-8 days under refrigeration conditions. Further, the FCAs containing EOs presented lower oxidation levels (primary and secondary) than their counterparts without EOs. At the sensory level, control FCA was described as an herbal flavor product conferred by chia oil, with acceptable texture and color, sensory characteristics that were similar in FCAs containing EOs, although with considerable flavor and odor differences, due to the presence of EOs, a flavor that was perceived as intense, persistent and characteristic of the EO added, but with moderate odor.

ÍNDICE

Capítulo I

Objetivos y plan de trabajo	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Objetivos	4
1.3. Plan de trabajo	5
1.4. Referencias	10

Capítulo II

Revisión de Literatura	13
2.1. Alimentos funcionales	13
2.1.1. Definición	14
2.1.2. Legislación.....	14
2.1.3. Desarrollo de alimentos funcionales.....	16
2.1.4. Los lípidos y su rol en la nutrición y salud humana	18
2.1.4.1. Recomendaciones de ingesta de grasas y declaraciones de propiedades saludables	19
2.1.4.2. Reemplazo de grasas saturadas por insaturadas	21
2.1.5. Ácidos grasos omega-3.....	23
2.1.5.1. Importancia nutricional de los ácidos grasos omega-3.....	24
2.1.5.2. Enriquecimiento de alimentos con ácidos grasos omega-3	26
2.1.5.3. Declaraciones de propiedades saludables relacionadas con los ácidos grasos omega-3	27
2.2. Aceites vegetales	28
2.2.1. Aceite de oliva	29
2.2.2. Aceite de chía	29
2.3. Aceites esenciales.....	34
2.3.1. Composición de los aceites esenciales	35
2.3.1.1. Terpenos	35
2.3.1.2. Fenilpropanoides	37
2.3.2. Componentes activos	38
2.3.3. Propiedades antimicrobianas	39
2.3.4. Propiedades antioxidantes	42
2.3.5. Aplicación de los aceites esenciales	43
2.4. Emulsiones	43
2.4.1. Formación de la emulsión.....	44
2.4.2. Dispositivos de homogeneización	45
2.4.2.1. Sistemas de rotor-estator	45
2.4.2.2. Homogeneizadores de válvula de alta presión	46
2.4.3. Emulsificantes o emulsionantes.....	48
2.4.3.1. Caseinato de sodio	49

2.4.4. Estabilidad de la emulsión	49
2.4.4.1. Estabilidad física de las emulsiones	50
2.4.4.2. Estabilidad química de las emulsiones	52
2.4.5. Potenciales aplicaciones de las emulsiones en alimentos.....	57
2.5. Queso.....	58
2.5.1. Producción y consumo queso	59
2.5.2. Variantes de queso.....	60
2.5.2.1. Queso de imitación/análogos.....	60
2.5.2.2. Queso con bajo contenido en grasa	61
2.5.2.3. Quesos fortificados	61
2.6. Referencias	62
Capítulo III	
Materiales y métodos.....	79
3.1. Determinación de la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales	79
3.1.1. Aceites esenciales y preparación de soluciones.....	79
3.1.2. Cepas microbianas, conservación y preparación de inóculo	79
3.1.3. Determinación in vitro de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales.....	80
3.2. Determinación de capacidad antioxidante de aceites esenciales in vitro	81
3.2.1. Ensayo del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).....	81
3.2.2. Método de decoloración del β -caroteno	83
3.3. Elaboración de emulsiones	84
3.3.1. Ingredientes	84
3.3.2. Preparación de las emulsiones.....	85
3.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria en las emulsiones	86
3.5. Caracterización de las emulsiones.....	86
3.5.1. Determinación del tamaño de partícula	86
3.5.2. Determinación de la viscosidad	87
3.5.3. Estabilidad física.....	87
3.5.4. Análisis microbiológico.....	88
3.5.5. Estabilidad oxidativa	88
3.5.5.1. Determinación de hidroperóxidos	88
3.5.5.2. Determinación de malondialdehído (MDA) mediante TBARS	89
3.6. Elaboración de análogo de queso fresco (AQF).....	89
3.7. Caracterización del análogo de queso fresco.....	91
3.7.1. Composición	91
3.7.2. Análisis microbiológico.....	92
3.7.3. Color	92
3.7.4. Textura.....	93
3.7.5. Oxidación.....	93
3.7.5.1. Determinación de hidroperóxidos y MDA por el método TBARS	93
3.7.5.2. Determinación de MDA por HPLC.....	93

3.7.6. Análisis sensorial.....	94
3.8. Análisis estadístico.....	94
3.9. Referencias.....	95

Capítulo IV

Actividad antioxidante y antimicrobiana in vitro de aceites esenciales	97
4.1. Introducción.....	97
4.2. Resultados y discusión.....	101
4.2.1. Actividad antioxidante in vitro de los aceites esenciales.....	101
4.2.1.1. Método del radical DPPH.....	101
4.2.1.2. Método de decoloración del β -caroteno.....	105
4.2.2. Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales.....	107
4.3. Referencias.....	120

Capítulo V

Emulsiones a base de caseinato de sodio y aceites de chía y oliva, con aceites esenciales incorporados	125
5.1. Introducción.....	125
5.2. Resultados y discusión.....	127
5.2.1. Concentración mínima inhibitoria de aceites esenciales contenidos en emulsiones elaboradas con aceites de chía y oliva y caseinato de sodio como emulsionante.....	127
5.2.2. Evaluación microbiológica de las emulsiones.....	132
5.2.3. Caracterización fisicoquímica de las emulsiones.....	135
5.2.3.1. pH.....	135
5.2.3.2. Distribución del tamaño de partícula.....	136
5.2.3.3. Comportamiento reológico.....	139
5.2.3.4. Estabilidad física de las emulsiones.....	141
5.2.3.5. Estabilidad oxidativa de las emulsiones.....	145
5.3. Referencias.....	150

Capítulo VI

Análogo de queso fresco enriquecido con omega 3 y 6, por sustitución de grasa de la leche con emulsiones de aceite de chía y oliva, y con aceites esenciales incorporados	159
6.1. Introducción.....	159
6.2. Resultados y discusión.....	161
6.2.1. Parámetros de coagulación del análogo de queso fresco.....	161
6.2.2. Composición química y pH del análogo de queso fresco.....	163
6.2.3. Evaluación de la textura y color de los análogos de queso fresco.....	170
6.2.3.1. Textura.....	170
6.2.3.2. Color.....	172

6.2.4. Estabilidad oxidativa	174
6.2.5. Estabilidad microbiana	176
6.2.6. Análisis sensorial	184
6.3. Referencias	187
Capítulo VII	
Conclusiones.....	193

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2. 1. Declaraciones de propiedades saludables relacionadas con ácidos grasos y con dietas bajas en ácidos grasos saturados y trans.	20
Tabla 2. 2. Declaraciones de propiedades saludables relacionadas con la sustitución de ácidos grasos saturados por ácidos grasos insaturados.....	22
Tabla 2. 3. Lípidos (g/100 g de aceite) en diferentes tipos de semillas y aceites de pescado.	24
Tabla 2. 4. Declaraciones de propiedades saludables aprobadas relacionadas con los ácidos grasos omega-3.....	27
Tabla 2. 5. Declaraciones respecto al ácido graso α -linolénico permitidos por la FDA en productos de la pesca.	28
Tabla 2. 6. Composición química de las semillas de chía de diferente procedencia.	31
Tabla 2. 7. Composición porcentual en ácidos grasos de aceite de chía de diferente procedencia.....	32
Tabla 2. 8. Características fisicoquímicas de aceite de chía.....	33
Tabla 2. 9. Producción total de queso y queso fresco en España (miles t).....	59
Tabla 2. 10. Evolución del consumo de queso en España (miles t).....	60
Tabla 2. 11. Quesos fortificados o con sustitución de grasa láctea y quesos de imitación.....	62
Tabla 3. 1. Especificaciones de los análisis físico-químicos y microbiológicos del caseinato de sodio utilizado en este estudio.	84
Tabla 3. 2. Contenido en ácidos grasos de aceite de chía.....	85
Tabla 4. 1. Principales componentes de los aceites esenciales utilizados.	99
Tabla 4. 2. Porcentaje de inhibición in vitro de aceites esenciales por el método de inhibición del radical DPPH.....	102
Tabla 4. 3. Concentración efectiva media ($\mu\text{g/mL}$) de aceites esenciales mediante el método de inhibición del radical DPPH.	105
Tabla 4. 4. Actividad antioxidante de los aceites esenciales por el método de decoloración del β -caroteno.	106
Tabla 4. 5. Concentración mínima inhibitoria (mg/mL) de los aceites esenciales frente a los microorganismos.	109
Tabla 4. 6. Concentración mínima inhibitoria (mg/mL) de los aceites esenciales estimadas mediante el software GraphPad Prism.	110
Tabla 4.7. Fase de latencia (λ , h) y velocidad máxima (μ_{max} , Δ absorbancia/h) de desarrollo de bacterias y levaduras a dos concentraciones por debajo de la concentración mínima inhibitoria de aceites esenciales de tomillo y orégano.	118

Tabla 4. 8. Fase de latencia (λ , h) y velocidad máxima (μ_{\max} , Δ absorbancia/h) de desarrollo de bacterias y levaduras a dos concentraciones por debajo de la concentración mínima inhibitoria de aceites esenciales de canela y clavo.	119
Tabla 5. 1. Concentración mínima inhibitoria (CMI, mg/mL) de aceites esenciales de tomillo, canela, clavo y orégano incorporados en emulsiones O/W a base de caseinato de sodio y aceite de chía y oliva.	129
Tabla 5. 2. Recuento inicial, final (log (UFC/mL)), fase de latencia (λ , días) y velocidad máxima (μ_{\max} , (log UFC/mL/día)) de microorganismos mesófilos y psicrótrofos en emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y con incorporación o no de aceites esenciales de tomillo y clavo durante el almacenamiento a 4 °C.	134
Tabla 5. 3. pH de emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y aceites esenciales de tomillo y clavo durante el almacenamiento a 4 °C.	135
Tabla 5. 4. Índices de distribución del tamaño de partícula y área superficial específica de las emulsiones elaboradas con caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y aceite esencial de tomillo y clavo.	138
Tabla 5. 5. Índice de consistencia e índice de comportamiento al flujo de emulsiones O/W obtenidas por homogeneización convencional (15 MPa) a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y aceites esenciales de tomillo y clavo durante el almacenamiento en refrigeración.	140
Tabla 5. 6. Hidroperóxidos (mmol/kg aceite) y TBARS (μg de malonaldehído/kg aceite) en emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva y aceites esenciales de tomillo y clavo, durante el almacenamiento en refrigeración.	146
Tabla 6. 1. Ensayos de coagulación de la mezcla leche desnatada:emulsión O/W, empleando diferentes concentraciones de CaCl_2 , aplicadas en diferentes proporciones en la mezcla final y como coagulante un 0,03% de quimosina con actividad ~ 600 IMCU/mL.	163
Tabla 6. 2. Composición (%), pH y rendimiento (%) de los análogos de queso fresco elaborados con emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y aceites esenciales de tomillo y clavo.	164
Tabla 6. 3. Composición en ácidos grasos (mg/100 g de AQF) de los análogos de queso fresco elaborados con emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y aceites esenciales de tomillo y clavo.	167
Tabla 6. 4. Esfuerzo por fractura (kPa), deformación por fractura (–) y módulo de elasticidad (kPa) de los análogos de queso fresco elaborados con emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y aceites esenciales de tomillo y clavo durante el almacenamiento a 4 °C.	170

Tabla 6. 5. Variación de los parámetros L^* , a^* y b de los análogos de queso fresco elaborados con emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y aceites esenciales de tomillo y clavo durante el almacenamiento a 4 °C.	172
Tabla 6. 6. Hidroperóxidos (mmol/kg aceite), TBARS ($\mu\text{g MDA/g AQF}$) y malondialdehído ($\mu\text{g/g AQF}$) en análogos de queso fresco elaborados con emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y aceites esenciales de tomillo y clavo durante el almacenamiento a 4 °C.	174
Tabla 6. 7. Recuento inicial y final, fase de latencia (λ) y velocidad máxima (μ_{max}), de microorganismos mesófilos, psicrótrofos, Pseudomonas, levaduras y enterobacterias en AQF control y con AEs de tomillo y clavo durante el almacenamiento a 4 °C.	182

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1. Estudio 1: Determinación de capacidad antimicrobiana y antioxidante in vitro de 11 aceites esenciales comerciales.	6
Figura 1. 2. Estudio 2: A) determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de aceites esenciales de orégano, tomillo, canela y clavo incorporados en emulsiones O/W elaboradas a partir de aceite de chía y oliva con caseinato de sodio como emulgente y estabilizadas por homogeneización convencional (HC). B) caracterización de las emulsiones O/W elaboradas a partir de aceite de chía y oliva con caseinato de sodio como emulgente con adición de aceites esenciales, y estabilizadas por homogeneización convencional.....	8
Figura 1. 3. Estudio 3: Elaboración y caracterización de análogos de queso fresco.	9
Figura 2. 1. Estructuras de los principales ácidos grasos omega-3. La numeración por encima del primer ácido graso representa el formato de etiquetado omega (ω), mientras que la numeración bajo el primer ácido graso representa el método de número IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).	23
Figura 2. 2. Semillas de chía oscura y blanca.	30
Figura 2. 3. Fórmula estructural de monoterpenos alifáticos, hidrocarbonados y oxigenados.....	36
Figura 2. 4. Fórmula estructural de sesquiterpenos alifáticos, mono y bicíclicos, hidrocarbonados y oxigenados.	37
Figura 2. 5. Fórmula estructural de fenilpropanos, con cadena lateral unida o no a un grupo funcional..	38
Figura 2. 6. Lugares y mecanismos de acción de los componentes de los AEs en la célula bacteriana: degradación de la pared celular; daño a la membrana citoplasmática; daño a las proteínas de membrana; pérdida de constituyentes celulares; coagulación del citoplasma y alteración de la fuerza motriz del protón.	41
Figura 2. 7. Etapas de formación de una emulsión.....	45
Figura 2. 8. Principio de la formación de emulsión en dispersores rotor-estator.	46
Figura 2. 9. Esquema de homogeneizador de válvulas de alta presión.	47
Figura 2. 10. Representación esquemática de una a) emulsión O/W y de los procesos de inestabilidad que ocurren b) cremado, c) sedimentación, d) floculación, e) coalescencia, f) maduración de Ostwald; que conducen a la g) separación completa.....	50
Figura 2. 11. Factores que influyen en la oxidación de los lípidos en emulsiones alimentarias.	55
Figura 3. 1. Reacción entre DPPH [•] y un antioxidante para formar DPPH.	82
Figura 3. 2. Diagrama de flujo de elaboración de queso fresco a partir de leche desnatada y emulsiones de aceites vegetales.....	90

Figura 4. 1. Inhibición del radical DPPH (%) por los aceites esenciales de canela, clavo, orégano, y tomillo a concentraciones de 60, 80, 200, 400, 800 y 2000 µg/mL.....	104
Figura 4. 2. Curvas de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en presencia de diferentes aceites esenciales a una concentración de 0,5 mg/mL durante un período de incubación de 24 h a 37 °C.....	108
Figura 5.1. Inhibición de crecimiento de: (1) <i>L. monocytogenes</i> , (2) <i>P. aeruginosa</i> , (3) <i>S. Enteritidis</i> , (4) <i>E. coli</i> , (5) <i>St. aureus</i> , (6) <i>L. lactis</i> y (7) <i>Lb. plantarum</i> . Método de dilución en agar Mueller-Hinton con una emulsión que contiene AE de canela a diferentes concentraciones: (A) control sin AE, (B) 2 mg/mL, (C) 16 mg/mL y (D) 32 mg/mL.....	128
Figura 5. 2. Evolución de microorganismos aerobios mesófilos (A) y psicótrofos (B) en emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y con incorporación o no de aceites esenciales de tomillo y clavo durante el almacenamiento a 4 °C.....	133
Figura 5. 3. Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones elaboradas por homogeneización convencional (15 MPa).....	137
Figura 5.4. Incremento de retrodispersión (Δ BS) en emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y aceites esenciales de tomillo y clavo, durante el almacenamiento a 4 °C.	142
Figura 6. 1. Evolución de microorganismos aerobios mesófilos (A) y psicótrofos (B) durante el almacenamiento a 4 °C en los análogos de queso fresco elaborados con emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva control y con aceite esencial de clavo y tomillo, adicionados en forma de emulsión (Tom1 y Cla1) o libre (Tom2 y Cla2).....	178
Figura 6. 2. Evolución de <i>Pseudomonas</i> spp. durante el almacenamiento a 4 °C en los análogos de queso fresco elaborados con emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva control y con aceite esencial de clavo y tomillo, adicionados en forma de emulsión (Tom1 y Cla1) o libre (Tom2 y Cla2).....	179
Figura 6. 3. Evolución de levaduras durante el almacenamiento a 4 °C en los análogos de queso fresco elaborados con emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva control y con aceite esencial de clavo y tomillo, adicionados en forma de emulsión (Tom1 y Cla1) o libre (Tom2 y Cla2).....	180
Figura 6. 4. Evolución de enterobacteria durante el almacenamiento a 4 °C en los análogos de queso fresco elaborados con emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva control y con aceite esencial de clavo y tomillo, adicionados en forma de emulsión (Tom1 y Cla1) o libre (Tom2 y Cla2).....	181

Capítulo I

Objetivos y plan de trabajo

1.1. Introducción

El queso fresco es un producto de consumo generalizado, siendo en España el segundo derivado lácteo de mayor consumo después de las leches fermentadas y/o yogur tal como lo reportan los informes de consumo de alimentación en España (MAGRAMA, 2015 y 2016; MAPAMA, 2017 y 2018). Este queso se caracteriza por ser de pasta blanda, blanco, de pH casi neutro, y con un 60 a 80% de humedad (Evert-Arriagada *et al.*, 2013), el cual está listo para el consumo al finalizar el proceso de fabricación (España, 2015).

El queso es un alimento lácteo nutritivo y versátil, del que existen una amplia variedad para cumplir con los requisitos específicos del consumidor y permitir la conveniencia de su uso. El queso contiene una alta concentración de nutrientes en relación con su nivel de energía. Su contenido de nutrientes está influenciado por el tipo de leche utilizada (especie, etapa de lactación, contenido en grasa), la forma de fabricación y, en menor medida, su grado de maduración. En general, la composición de ácidos grasos de los lípidos del queso está en torno a un 66% de ácidos grasos saturados, 30% de monoinsaturados y un 4% de ácidos grasos poliinsaturados (O'Brien y O'Connor, 2004).

Con la finalidad de satisfacer la demanda de un estilo de vida saludable de los consumidores, la industria alimentaria viene realizando cambios en la fabricación y el procesamiento de alimentos, y entre todas, una de las áreas más interesantes de

investigación e innovación se relaciona con los alimentos funcionales (Bigliardi y Galati, 2013). Así, por ejemplo, una línea de investigación es la optimización del contenido de lípidos y de los perfiles de ácidos grasos de diversos alimentos, para lograr una composición más acorde con los objetivos saludables de ingesta de nutrientes (Jiménez-Colmenero, 2013). En el caso de leche y productos lácteos, con el fin de proporcionar una forma útil de reducir la ingesta de ácidos grasos saturados (AGS) conservando los beneficios nutricionales y cardiometabólicos de la leche, se ha modificado la composición de los ácidos grasos, concretamente mediante la sustitución de algunos AGS con ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y/o poliinsaturados (AGPI) (Givens, 2017).

En España, en el año 2011 se publicó la Ley 17/2011 para regular tanto la Seguridad Alimentaria como la Nutrición. Esta ley complementa los trabajos emprendidos por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición para iniciar la lucha contra la obesidad a través de la Estrategia para la Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad (Estrategia NAOS), lanzada por el Ministerio de Sanidad y Consumo en el año 2005. La ley atiende de manera primordial al principio de prevención y precaución, fijando que los operadores económicos no podrán poner en el mercado productos que no sean seguros. También incorpora hábitos de alimentación saludables con un mayor control de la presencia de ácidos grasos saturados, ácidos grasos *trans*, sal y azúcares en los productos alimenticios, prohibiendo su presencia en el ámbito escolar, y se prevé también la creación de un Observatorio de la nutrición y el estudio de la obesidad, entre otros (AESAN, 2005; España, 2011).

En relación con el consumo de grasas, las Pautas Dietéticas dictadas en Estados Unidos para 2015-2020, eliminan el límite superior de la ingesta total de grasas, pero conservan las recomendaciones de < 10% de calorías de ácidos grasos saturados y el reemplazo de estos con ácidos grasos insaturados; por otra parte, sugieren hacer hincapié en la optimización de los tipos de grasa en la dieta y no en la reducción de la grasa total, y desaconsejan el consumo de productos "bajos en grasa" o "sin grasa" con altas cantidades de harinas refinadas y azúcares añadidos. Seguir estas recomendaciones tiene el gran potencial de mejorar la calidad de la dieta en general y reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (ECV) y otras enfermedades crónicas (Wang y Hu, 2017). De manera específica, aumentar la presencia de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en diversos alimentos de consumo frecuente, puede mejorar los valores nutricionales en la dieta occidental y permitir a la población que, sin cambiar drásticamente la dieta habitual, su

ingesta se ajuste a la recomendada (Wang *et al.*, 2018). También es relevante el aporte de otros ácidos grasos, así al aceite de oliva como fuente abundante de ácidos grasos monoinsaturados, se le ha relacionado con un menor riesgo de ECV (Wang y Hu, 2017).

La fortificación de los alimentos con omega-3 es el método más conveniente para incorporar estos ácidos grasos tan necesarios en la dieta (Hall y Tulbek, 2008), y que efectivamente se están agregando directamente a los alimentos convencionales (Hernandez, 2016). Si bien el aceite de pescado es una fuente natural de ácidos grasos omega-3, que generalmente se incorporan a diversos productos alimenticios (Rubio-Rodríguez *et al.*, 2010), el aceite de chía (*Salvia hispánica L.*) puede ser una alternativa, ya que no tiene el inconveniente del sabor y el olor del aceite procedente de fuentes marinas, siendo además rico en AGPI debido a su alta proporción de ácido α -linolénico (~60%), especialmente si se compara con otras fuentes vegetales conocidas (Guimarães-Inácio *et al.*, 2018; Segura-Campos *et al.*, 2014).

La fortificación de alimentos con ingredientes ricos en ácidos grasos omega-3 o la sustitución de la grasa de la leche, con aceites vegetales, también puede contribuir a un equilibrio más saludable de grasas saturadas/insaturadas, de aplicación por ejemplo en la elaboración del queso (Calligaris *et al.*, 2015; Stratulat *et al.*, 2015). Como consecuencia, en el mercado han surgido diversos productos con características similares al queso, que afectan a su denominación y por lo tanto a su etiquetado. A este respecto, la Comisión del *Codex Alimentarius* (Codex Alimentarius, 2016) describe a los análogos de queso como productos que se parecen al queso, pero en los cuales la grasa de la leche ha sido reemplazada parcial o completamente por otras grasas, y que se pueden clasificar como lácteos, lácteos parciales o no lácteos, según el origen de los ingredientes utilizados en su formulación. Por otro lado, la *Food and Drug Administration* (FDA) clasifica los análogos de queso, como queso de imitación cuando sustituyen y se asemejan a un queso y son nutricionalmente inferiores al queso natural, y sustitutos del queso cuando no son nutricionalmente inferiores (Masotti *et al.*, 2018). Por lo tanto, un análogo de queso puede clasificarse como un sustituto de queso, si sustituye y se parece al queso y no es nutricionalmente inferior (Guinee, 2011). Sin embargo, en el mundo, la definición de productos similares al queso no es uniforme y se requiere una legislación más clara para garantizar un etiquetado adecuado (Masotti *et al.*, 2018).

Un inconveniente de la inclusión de ácidos grasos omega-3 en los alimentos es que, al ser ácidos grasos poliinsaturados con dobles enlaces múltiples, son altamente propensos a la

degradación oxidativa, lo cual afecta la calidad organoléptica y disminuye sus beneficios nutricionales. Además, podrían tener efectos adversos en humanos debido a la formación de los productos de degradación (Sivapratha y Sarkar, 2018). Una de las formas más comunes de retardar la oxidación de los lípidos es el uso de antioxidantes sintéticos, ampliamente utilizados en la industria alimentaria, pero que son potencialmente tóxicos (Gorji *et al.*, 2016). Una de las alternativas de reemplazo a estos antioxidantes son los aceites esenciales, los cuales son compuestos naturales reconocidos generalmente como seguros (GRAS) (Ramos *et al.*, 2014); que tienen gran capacidad para prevenir el daño oxidativo (Leyva-López *et al.*, 2017) y también presentan actividad antimicrobiana (Burt, 2004). La adición de aceites esenciales en los alimentos se realiza convencionalmente de forma directa, aunque su inclusión en forma de emulsiones puede ser una herramienta prometedora para su aplicación. Sin embargo, el uso de los aceites esenciales en los productos alimentarios está limitado debido a su fuerte sabor y olor, que afectan a las características organolépticas de los alimentos a los que se agregan (Prakash *et al.*, 2018), inconveniente, que en ocasiones no es considerado por parte de los investigadores que realizan estudios de evaluación de las concentraciones a las que los aceites esenciales son efectivos como antimicrobianos o antioxidantes (Fernandes *et al.*, 2017; Moosavy *et al.*, 2013; Smith-Palmer *et al.*, 2001).

1.2. Objetivos

El **objetivo general** de esta tesis fue desarrollar y caracterizar un análogo de queso fresco con alto contenido de ácidos grasos omega-3 y 6, a partir de la sustitución de la grasa de la leche por una emulsión O/W de aceites de oliva y chía utilizando caseinato de sodio como emulgente, y con la eventual incorporación de aceites esenciales como antimicrobianos y antioxidantes de origen natural, con el propósito de alargar la vida útil microbiológica del producto y proteger de la oxidación a los aceites altamente insaturados utilizados en su elaboración.

Para cumplir con el objetivo propuesto se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

- Evaluar *in vitro* las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de 11 aceites esenciales comerciales, y seleccionar aquéllos que poseen mejores características para su aplicación en emulsiones alimentarias.

- Formular, desarrollar y fijar las condiciones de elaboración de emulsiones O/W elaboradas con aceites vegetales de oliva y chía ricos en omega-3 y 6, y caseinato de sodio como emulgente, estabilizadas por homogeneización convencional.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales seleccionados previamente según sus actividades antioxidantes y antimicrobianas, como componentes incorporados en las emulsiones elaboradas con aceites vegetales ricos en omega-3 y 6.
- Caracterizar fisicoquímica y microbiológicamente las emulsiones O/W adicionadas de los aceites esenciales a las concentraciones con mejores propiedades antioxidantes, antimicrobianas y de menor impacto sensorial, durante su almacenamiento a temperatura de refrigeración.
- Desarrollar y fijar las condiciones de elaboración de un producto análogo de queso fresco con sustitución de grasa de leche por emulsiones O/W elaboradas con aceites vegetales ricos en omega-3 y 6.
- Elaborar productos análogos de queso fresco con sustitución de grasa de leche por emulsiones O/W con aceites vegetales ricos en omega-3 y 6, y adicionadas de aceites esenciales, estudiando el efecto de la forma de adición de los aceites esenciales en forma de emulsión o directamente en la mezcla leche desnatada/emulsión.
- Caracterizar fisicoquímica, microbiológica y sensorialmente los análogos de queso fresco adicionados o no de aceites esenciales, durante su almacenamiento a temperatura de refrigeración.

1.3. Plan de trabajo

De acuerdo con los objetivos trazados, en las Figuras 1.1 a 1.4 se presenta el diseño experimental de los estudios llevados a cabo.

En el primer estudio (Figura 1. 1) se evaluaron las propiedades antimicrobianas *in vitro* de 11 aceites esenciales, para lo cual se determinó la concentración mínima inhibitoria, mediante el método de microdilución, de cada aceite esencial frente a 10 microorganismos relevantes en los productos lácteos como patógenos, indicadores y alterantes. También se evaluaron las propiedades antioxidantes *in vitro* de los aceites esenciales, determinándose su capacidad antioxidante frente a radicales libres mediante el método del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y su capacidad como inhibidor de oxidación lipídica con el método del β -caroteno. En esta etapa, tomando como criterio

qué aceites esenciales presentaron las mejores propiedades antioxidantes y antimicrobianas, se seleccionaron 4 aceites esenciales que fueron los de orégano, tomillo, canela y clavo.

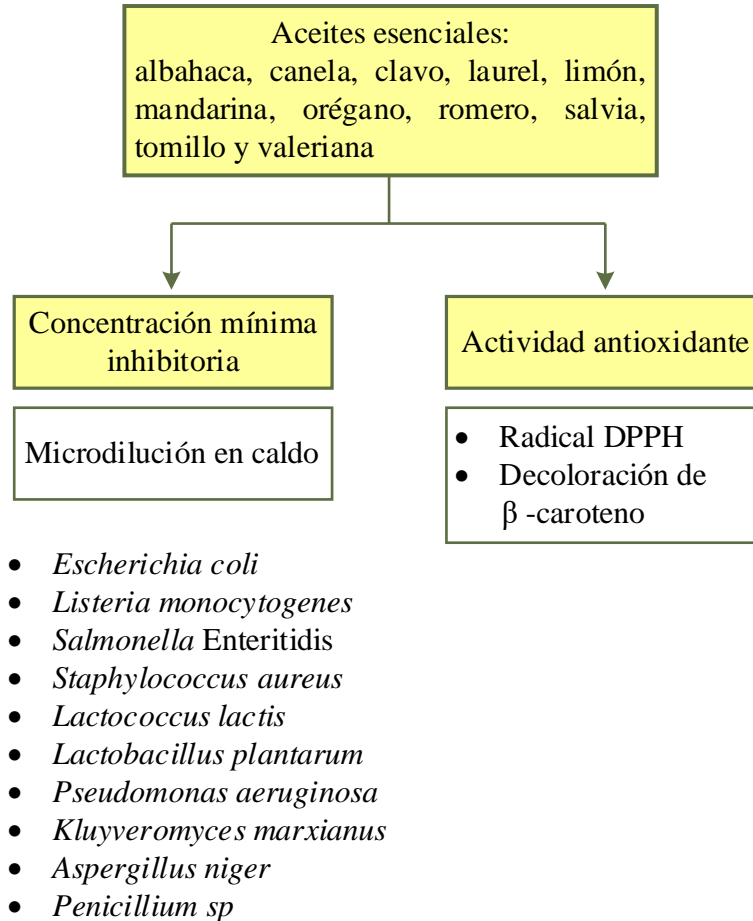


Figura 1. 1. Estudio 1: Determinación de capacidad antimicrobiana y antioxidante *in vitro* de 11 aceites esenciales comerciales.

En el estudio 2, se formularon y desarrollaron emulsiones O/W a base de aceite de chía y oliva, con y sin aceites esenciales, utilizando caseinato de sodio como emulgente, y que fueron estabilizadas por homogeneización convencional. En una primera etapa se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los 4 aceites esenciales seleccionados y adicionados en las emulsiones frente a los 10 microorganismos anteriormente mencionados. Previamente a la segunda etapa de este estudio, se elaboraron productos análogos de queso fresco (AQF) con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano, tomillo, canela y clavo, para elegir los aceites esenciales y la

concentración organolépticamente aceptable a utilizar en la elaboración de los AQF. Una vez seleccionados los aceites esenciales a utilizar (tomillo y clavo), se caracterizaron las emulsiones, determinándose sus propiedades físicas, microbiológicas y de estabilidad oxidativa durante su almacenamiento en refrigeración a 4 °C (Figura 1.2).

En el estudio 3 (Figura 1.3) se elaboró un producto análogo de queso fresco a partir de una mezcla de leche desnatada y la emulsión elaborada a partir de aceite de chía y oliva con caseinato de sodio. La cantidad de emulsión se calculó en función de la cantidad de ácido graso omega-3 que debería quedar en el producto final para poder usar la declaración nutricional de alto contenido de ácido graso omega-3. La incorporación de los aceites esenciales se realizó de dos maneras diferentes, una por adición directa del aceite esencial a la mezcla leche desnatada/emulsión y la otra vehiculando el aceite esencial en la emulsión elaborada por homogeneización convencional. El procedimiento seguido para elaborar el análogo de queso fresco es el que se usa de manera convencional para elaborar queso fresco, aunque se debieron realizar variaciones en la cantidad y concentración de CaCl_2 y quimosina utilizadas. Finalmente, los análogos de queso fresco adicionados o no de aceites esenciales, se caracterizaron en cuanto a su composición y a nivel fisicoquímico, microbiológico y sensorial durante su almacenamiento a 4 °C.

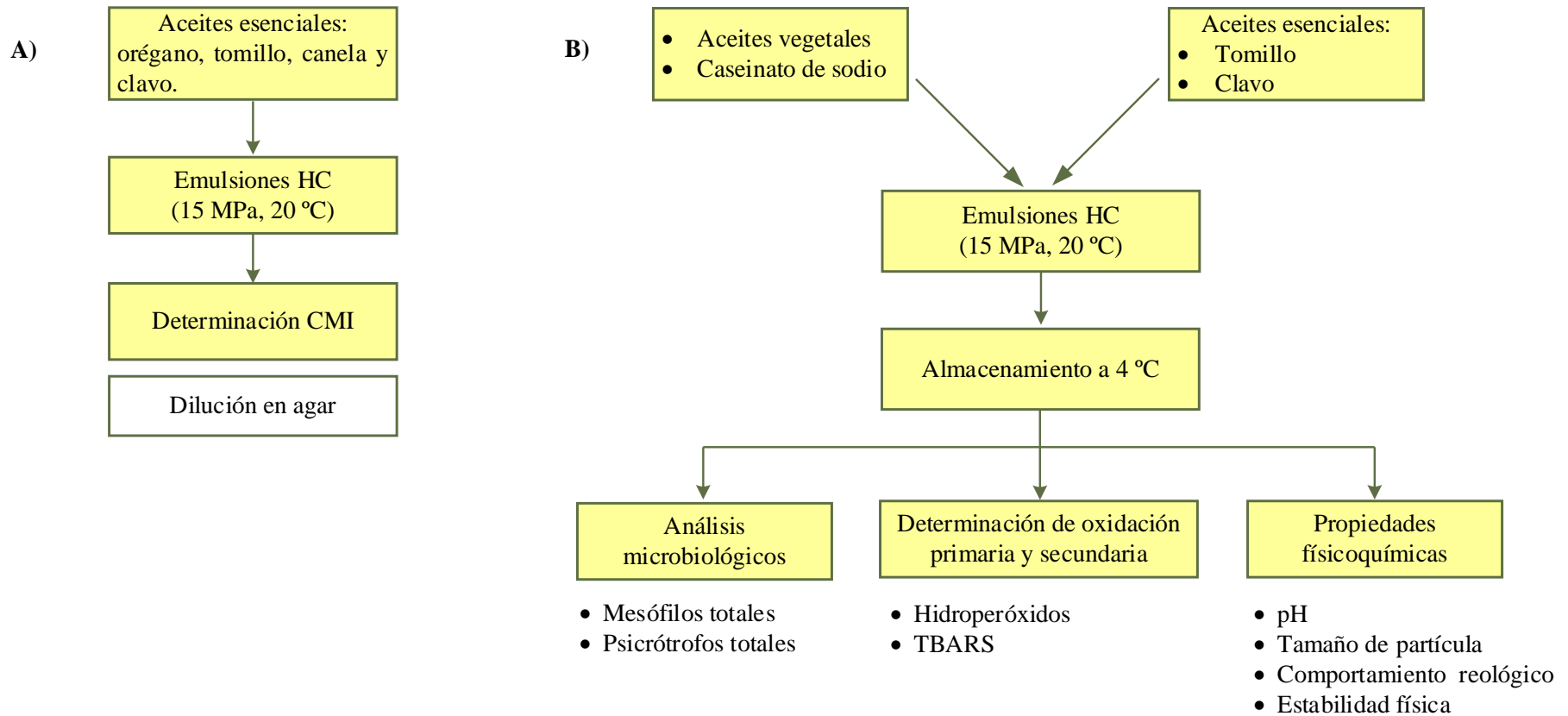


Figura 1. 2. Estudio 2: A) determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de aceites esenciales de orégano, tomillo, canela y clavo incorporados en emulsiones O/W elaboradas a partir de aceite de chía y oliva con caseinato de sodio como emulgente y estabilizadas por homogeneización convencional (HC). B) caracterización de las emulsiones O/W elaboradas a partir de aceite de chía y oliva con caseinato de sodio como emulgente con adición de aceites esenciales, y estabilizadas por homogeneización convencional.

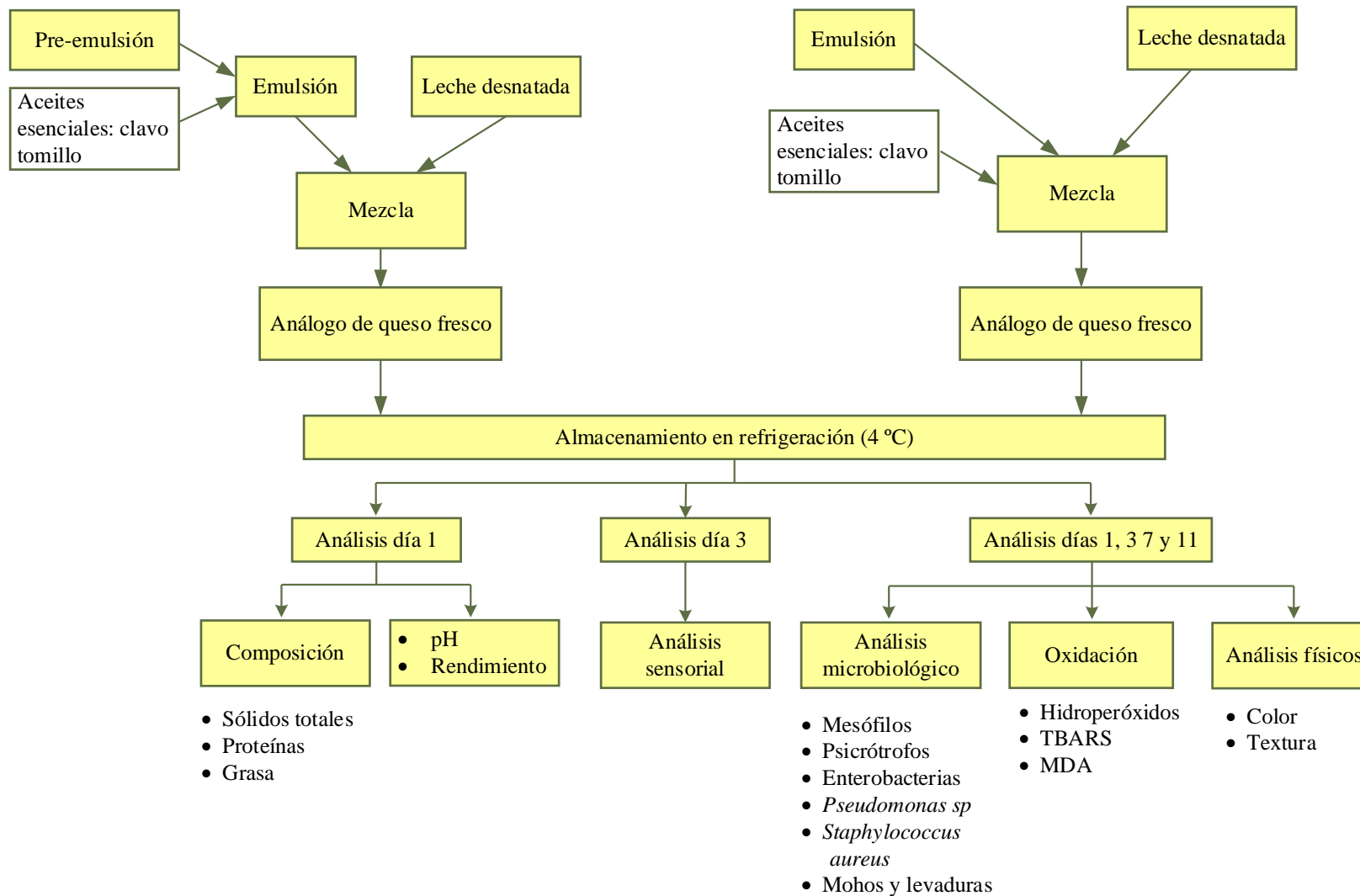


Figura 1. 3. Estudio 3: Elaboración y caracterización de análogos de queso fresco.

1.4. Referencias

- AESA. 2005. Estrategia para la nutrición, actividad física, prevención de la obesidad (NAOS). *Ministerio de Sanidad y Consumo. Agencia Española de Seguridad Alimentaria*, 40 pp.
- Bigliardi, B. y Galati, F. 2013. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science and Technology*, 31: 118-129.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- Calligaris, S., Ignat, A., Biasutti, M., Innocente, N., y Nicoli, M. C. 2015. Cheese fortification using saturated monoglyceride self-assembly structures as carrier of omega-3 fatty acids. *International Journal of Food Science and Technology*, 50: 2129-2134.
- Codex Alimentarius. 2016. General standard for food additives codex stan 192-1995. *Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization*, Revision 2: 1-420.
- España. 2011. Ley 17/2011, de 5 de julio, de seguridad alimentaria y nutrición. *Boletín Oficial del Estado*, 1-35.
- España. 2015. Real Decreto 1113/2006 de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos. Última modificación: 12 de septiembre de 2015. *Boletín Oficial del Estado*, 1-7.
- Evert-Arriagada, K., Hernández-Herrero, M. M., Gallardo-Chacón, J. J., Juan, B., y Trujillo, A. J. 2013. Effect of high pressure processing on volatile compound profile of a starter-free fresh cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19: 73-78.
- Givens, D. I. 2017. Saturated fats, dairy foods and health: A curious paradox? *Nutrition Bulletin*, 42: 274-282.
- Gorji, S. G., Smyth, H. E., Sharma, M., y Fitzgerald, M. 2016. Lipid oxidation in mayonnaise and the role of natural antioxidants: A review. *Trends in Food Science & Technology Journal*, 56: 88-102.
- Guimarães-Inácio, A., Lopes Francisco, C. R., Rojas, V. M., de Souza Leone, R., Valderrama, P., Bona, E., Leimann, F. V., Tanamati, A. A. C., y Gonçalves, O. H. 2018. Evaluation of the oxidative stability of chia oil-loaded microparticles by thermal, spectroscopic and chemometric methods. *LWT - Food Science and Technology*, 87: 498-506.
- Guinee, T. P. 2011. Cheese Analogues. *En Encyclopedia of Dairy Sciences*. J.W. Fuquay, P.F. Fox, y P.L.H. McSweeney, editores. Elsevier Ltd. 814-821.

- Hall III, C. y Tulbek, M. C. 2008. Omega-3-enriched bread. *En* Technology of functional cereal products. B.R. Hamaker, editor. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 362-387.
- Hernandez, E. M. 2016. Specialty Oils: Functional and Nutraceutical Properties. *En* Functional Dietary Lipids: Food Formulation, Consumer Issues and Innovation for Health. T.A.B. Sanders, editor. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 69-101.
- Jiménez-Colmenero, F. 2013. Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Research International*, 52: 64-74.
- Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Vazquez-Olivo, G., y Heredia, J. B. 2017. Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*, 22: 1-24.
- MAGRAMA. 2015. Informe del consumo de alimentación en España 2014. 139 pp.
- MAGRAMA. 2016. Informe del consumo de alimentación en España 2015. 230 pp.
- MAPAMA. 2017. Informe del consumo de alimentación en España 2016. 242 pp.
- MAPAMA. 2018. Informe del consumo de alimentación en España 2017. 230 pp.
- Masotti, F., Cattaneo, S., Stuknytė, M., y De Noni, I. 2018. Status and developments in analogue cheese formulations and functionalities. *Trends in Food Science & Technology*, 74: 15-169.
- O'Brien, N. M. y O'Connor, T. P. 2004. Nutritional Aspects of Cheese. *En* Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, y P. Guinee, editores. Elsevier Ltd., London. 573-581.
- Prakash, A., Baskaran, R., Paramasivam, N., y Vadivel, V. 2018. Essential oil based nanoemulsions to improve the microbial quality of minimally processed fruits and vegetables: A review. *Food Research International*, 111: 509-523.
- Ramos, M., Beltrán, A., Peltzer, M., Valente, A. J. M., y Garrigós, M. del C. 2014. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *LWT - Food Science and Technology*, 58: 470-477.
- Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., de Diego, S. M., Sanz, M. T., y Carballido, J. R. 2010. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11: 1-12.
- Segura-Campos, M. R., Ciau-Solís, N., Rosado-Rubio, G., Chel-Guerrero, L., y Betancur-Ancona, D. 2014. Physicochemical characterization of chia (*Salvia hispanica*) seed oil from Yucatán, México. *Agricultural Sciences*, 5: 220-226.
- Sivapratha, S. y Sarkar, P. 2018. Oxidative stability and effect of stress factors on flaxseed oil-in-water emulsions stabilized by sodium caseinate–sodium alginate–chitosan interfacial membrane. *Chemical Papers*, 72: 1-14.

- Stratulat, I., Britten, M., Salmieri, S., Fustier, P., St-Gelais, D., Champagne, C. P., y Lacroix, M. 2015. Enrichment of cheese with vitamin D₃ and vegetable omega-3. *Journal of Functional Foods*, 13: 300-307.
- Wang, D. D. y Hu, F. B. 2017. Dietary fat and risk of cardiovascular disease: Recent controversies and advances. *Annual Review of Nutrition*, 37: 423-446.
- Wang, Y. Z., Fu, S. G., Wang, S. Y., Yang, D. J., Wu, Y. H. S., y Chen, Y. C. 2018. Effects of a natural antioxidant, polyphenol-rich rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, on lipid stability of plant-derived omega-3 fatty-acid rich oil. *LWT - Food Science and Technology*, 89: 210-216.

Capítulo II

Revisión de Literatura

2.1. Alimentos funcionales

El término “alimento funcional” tiene origen a principios de los años ochenta en Japón, definiéndose en 1991 el concepto de alimentos para uso específico de salud (FOSHU). Una particularidad de estos alimentos destinados a mejorar la salud de las personas, en los que se informa de los efectos de salud específicos mediante lo que denominan declaraciones o “*claims*”, es que deben estar en forma de alimentos ordinarios, no como pastillas o cápsulas (Roberfroid, 2000). Internacionalmente, en 1997 se publicaron las Directrices del *Codex Alimentarius* para el uso de declaraciones nutricionales y en 2004 se adoptó la inclusión de las declaraciones de propiedades saludables (Codex Alimentarius, 2010). En Estados Unidos, las declaraciones de salud o de prevención de enfermedades, siempre basados en la evidencia científica, se permiten desde el año 1990, cuando se adoptó la Ley de Etiquetado y Educación Nutricional (NLEA) que fue modificada en 2016, según la cual es la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) la autoridad que aprueba las afirmaciones o declaraciones sobre un producto (FDA, 2018). En la Unión Europea, la armonización se logró en 2006 con el Reglamento (CE) N° 1924/2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos, reglamento que entró en vigor en 2007 (Comisión Europea, 2006).

2.1.1. Definición

No existe una definición simple y universalmente aceptada de alimentos funcionales. Además, si se basa en la función y no en el producto, es probable que el concepto sea más universal y no esté demasiado influenciado por las características locales o la tradición cultural (Roberfroid, 2011). Un alimento funcional se define como aquel que contiene un ingrediente funcional (nutriente o no nutriente) para mejorar el estado de salud y el bienestar y/o reducir el riesgo de enfermedad más allá de la deficiencia nutricional (de Deckere y Verschuren, 2000). Por otro lado, en 1999, se alcanzó un consenso sobre el concepto de alimentos funcionales en la Unión Europea, por el que un alimento puede considerarse funcional si se demuestra satisfactoriamente que afecta beneficiosamente una o más funciones del cuerpo, más allá de los efectos nutricionales, de manera que sea relevante para un mejor estado de salud y bienestar o una reducción del riesgo de enfermedad. Los alimentos funcionales deben seguir siendo alimentos y demostrar sus efectos cuando se consumen en cantidades diarias que normalmente se pueden esperar (Pravst, 2012).

2.1.2. Legislación

El Reglamento Europeo (CE) N° 1924/2006 sobre declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en alimentos, clasifica las declaraciones en tres categorías: (1) declaraciones nutricionales, que afirman, sugieren o dan a entender que un alimento tiene propiedades particulares debido a los nutrientes que contiene o no contiene; (2) las declaraciones de salud, que se definen como cualquier declaración que indique, sugiera o implique que existe una relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus componentes y la salud; y (3) las declaraciones de reducción de riesgo de enfermedad, que son declaraciones de propiedades saludables que indican, sugieren o implican que un alimento o uno de sus componentes reduce significativamente un factor de riesgo en el desarrollo de una enfermedad humana.

Las únicas declaraciones de propiedades saludables permitidas son las que figuran en las listas de la Comisión Europea, conocidas como el Registro Comunitario (EFSA, 2018). Estas listas indican la redacción que se puede usar y las condiciones, principalmente de composición, que se deben cumplir antes de que se permita la declaración. Para aparecer en el Registro Comunitario, todas las declaraciones de propiedades saludables, junto con su documentación científica justificativa, deben presentarse a los Estados miembros

pertinentes, que remiten las declaraciones a la Comisión Europea. Las declaraciones se envían a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), que tiene la tarea de evaluar los datos científicos que ha presentado el remitente para cada declaración y emitir una opinión (Ottaway y Jennings, 2011). Para complementar lo establecido en el artículo 13 del Reglamento Europeo (CE) N° 1924/2006, respecto a la función de un nutriente o de otra sustancia en el crecimiento, el desarrollo y las funciones corporales, en 2012 se publicó el Reglamento (UE) N° 432/2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños (Comisión Europea, 2012).

En Estados Unidos, los términos como "alimentos funcionales" o "nutracéuticos" son ampliamente utilizados en el mercado. Dichos alimentos están regulados por la FDA, a pesar de que no están específicamente definidos por la ley. Las declaraciones que se pueden usar en las etiquetas de alimentos se dividen en tres categorías: declaraciones de propiedades saludables, declaraciones de contenido de nutrientes y declaraciones de estructura/función (FDA, 2018).

Las declaraciones de propiedades saludables describen una relación entre una sustancia alimenticia (un alimento, un componente alimenticio o un ingrediente de un suplemento dietético) y un riesgo reducido de una enfermedad o afección relacionada con la salud, siendo supervisadas por la FDA. En el caso de la declaración de contenido de nutrientes, la NLEA permite el uso de declaraciones que caracterizan el nivel de un nutriente en un alimento si han sido autorizadas por la FDA y se realicen de acuerdo con las regulaciones de la FDA. Finalmente, en cuanto a las declaraciones de estructura/función y declaraciones suplementarias dietéticas relacionadas, el Acta de Salud y Educación de Suplementos Dietéticos (DSHEA) estableció que las declaraciones de estructura/función pueden describir el papel de un nutriente o ingrediente dietético destinado a afectar la estructura o función normal del cuerpo humano. Estas tres clases de declaraciones no están aprobados previamente por la FDA, el fabricante debe demostrar que la declaración es veraz y no engañosa (FDA, 2018).

En Australia y Nueva Zelanda las declaraciones de propiedades saludables están reguladas a través de la agencia estatutaria, Normas Alimentarias Australia Nueva Zelanda (FSANZ), mientras que el término "alimentos funcionales" no está definido en la legislación alimentaria y no está dentro de las categorías de propósito general o especial

bajo la jurisdicción de FSANZ (Ghosh, 2011). En 2013, se publicó el Estándar 1.2.7 Nutrición, salud y declaraciones relacionadas, que está en conformidad con la Ley de Normas Alimentarias de Australia Nueva Zelanda de 1991, donde se establecen las normas para las empresas alimentarias que eligen presentar declaraciones nutricionales y declaraciones de propiedades saludables (FSANZ, 2017a). En 2016, FSANZ emitió la resolución sobre la relación entre alimentos y salud de nueve declaraciones de propiedades saludables ya autorizadas por la Unión Europea. Además, se está considerando incluir otras declaraciones de relación entre alimentos y salud autorizadas por la Unión Europea y otros países (FSANZ, 2017b).

2.1.3. Desarrollo de alimentos funcionales

Tanto consumidores como expertos médicos y asesores nutricionales han comenzado a aceptar que existe una estrecha relación entre la nutrición y el estado de salud, lo cual conlleva a que los consumidores estén dispuestos a adoptar cambios en sus hábitos alimentarios (Siró *et al.*, 2008); siendo Estados Unidos y Japón los principales mercados de alimentos funcionales a nivel mundial, seguidos de Asia Pacífico y Europa. El mercado europeo es heterogéneo, caracterizado por grandes diferencias regionales en el uso y aceptación de alimentos funcionales; el interés de los consumidores en estos alimentos en los países de Europa Central y del Norte es mayor que en los países mediterráneos (Bigliardi y Galati, 2013; Bogue *et al.*, 2017; Vicentini *et al.*, 2016).

El desarrollo de productos alimenticios funcionales es un proceso complejo, con factores de éxito que son algo diferentes de los del desarrollo tradicional de nuevos productos alimentarios (Khan *et al.*, 2013). El diseño y desarrollo de estos alimentos requiere implementar diferentes estrategias, tecnológicas o biotecnológicas, para los sistemas de producción tanto de materias primas de origen animal como vegetal, así como para los procesos de preparación, almacenamiento y distribución o consumo, con el objetivo de inducir cambios cualitativos y cuantitativos en la composición de los alimentos y optimizar los beneficios. Pues los fabricantes buscan procedimientos innovadores y rentables para un mejor rendimiento en la producción (Jiménez-Colmenero, 2013; Manjula y Bhagath, 2017).

El desarrollo de alimentos funcionales puede implicar la integración de sustancias bioactivas promotoras de la salud en un ingrediente multifuncional (Tokuşoğlu, 2013).

Este desarrollo se basará, en la mayoría de los casos, en mediciones de "marcadores". Estos marcadores deben ser identificados y validados por su valor predictivo de los beneficios potenciales para una función objetivo o disminuir el riesgo de una enfermedad en particular. Los marcadores deben ser factibles, válidos, reproducibles, sensibles y específicos y pueden ser de naturaleza bioquímica, fisiológica, conductual o psicológica, por lo que será necesaria una validación tanto para la metodología como para la relevancia biológica (Roberfroid, 2011). El efecto funcional de un alimento o componente alimenticio depende de que el componente activo tenga acceso al sitio objetivo funcional. Por lo tanto, la matriz de alimentos, tanto en estado bruto como después del almacenamiento o preparación culinaria, puede tener una influencia significativa en la actividad de los componentes clave. La selección y el desarrollo de un vehículo alimenticio apropiado que mantenga la forma molecular activa hasta el momento del consumo y que cumpla su objetivo fisiológico dentro del organismo, es un paso importante para el éxito de un alimento funcional (Betoret *et al.*, 2011) y para obtener la aprobación del uso de declaraciones como alimentos funcionales (Siró *et al.*, 2008).

Los alimentos funcionales se han lanzado principalmente en los mercados de productos lácteos, confitería, refrescos, panadería y alimentos para bebés (Bigliardi y Galati, 2013). Aunque las compañías de alimentos invierten recursos sustanciales en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales, la gran mayoría de los productos fallan en el mercado (Oliveira *et al.*, 2016), debido a que el desarrollo y el comercio de estos productos es bastante complejo, costoso y arriesgado, ya que se deben responder requisitos especiales. El desarrollo y comercialización requieren importantes esfuerzos de investigación. Es un proceso de múltiples etapas que requiere la participación de intereses comerciales, académicos y regulatorios, con una necesidad crítica de lograr la aceptación de los consumidores (Siró *et al.*, 2008). En términos de estrategias de mercadotecnia, los alimentos funcionales deben promocionarse con el objetivo de hacerlas mucho más visibles y reconocibles para los consumidores finales y debería reforzarse el papel del etiquetado. Además, se deben desarrollar políticas de regulación claramente definidas para los alimentos funcionales, y así evitar declaraciones de propiedades saludables falsas durante el proceso de comercialización (Annunziata y Vecchio, 2011).

2.1.4. Los lípidos y su rol en la nutrición y salud humana

Las grasas son un contribuyente importante al consumo total de energía en la mayoría de las dietas occidentales. Todas las fuentes de grasa contienen mezclas de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, pero las proporciones varían significativamente según la fuente. Además de aportar energía, las grasas también desempeñan otras funciones diversas en el cuerpo humano (Pravst, 2012).

El principal ácido graso monoinsaturado (AGMI) en las dietas occidentales es el ácido oleico (~90% de todos los AGMI) (Liu *et al.*, 2017; Wang y Hu, 2017) y es abundante en fuentes tanto animales (incluidas la carne y las aves de corral) como vegetales (aceites de oliva y colza, nueces y semillas) (Nettleton *et al.*, 2016). En general, se reconoce que una mayor ingesta de ácido oleico y una ingesta limitada de grasas saturadas son beneficiosas y pueden ayudar a proteger contra las enfermedades cardiovasculares o ECV (Hernandez, 2016).

El aceite de oliva, como fuente abundante de AGMI, también se ha relacionado con un menor riesgo de ECV en varios estudios. En un estudio reciente se ha demostrado que el reemplazo de grasas saturadas con AGMI, principalmente de origen vegetal, disminuye el riesgo de enfermedades coronarias (Liu *et al.*, 2017). En el ensayo PREDIMED (Prevención con dieta mediterránea), se han evidenciado los beneficios de una dieta mediterránea rica en aceite de oliva en la prevención primaria de ECV (Nettleton *et al.*, 2016; PREDIMED, 2018; Vannice y Rasmussen, 2014; Wang y Hu, 2017). Un meta-análisis reciente basado en estudios de cohortes prospectivos informó que un aumento en la ingesta de 25 g/día de aceite de oliva se asoció con una reducción del 18% en el riesgo total de ECV (Wang y Hu, 2017). Por otro lado, la mayoría de las pautas dietéticas para el consumo de AGMI se basan en la sustracción de la ingesta recomendada de grasa saturada y grasa poliinsaturada del total de grasa, en lugar de la evidencia de una ingesta óptima específica de AGMI *per se* (Liu *et al.*, 2017).

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) más importantes, en términos de ocurrencia, salud humana y nutrición pertenecen a las familias del omega-3 y omega-6, basados en los ácidos grasos esenciales α -linolénico y linoleico respectivamente (Ratnayake y Galli, 2009). Estos ácidos grasos tienen funciones metabólicas específicas (suministro de energía, regulación de la actividad enzimática y regulación de la expresión génica), pero una de sus funciones más importantes es que son precursores metabólicos de AGPI de cadena larga (Rincón-Cervera *et al.*, 2016). Además de estas múltiples funciones

fisiológicas, los AGPI regulan el catabolismo lipídico y la lipogénesis, y los metabolitos de AGPI sirven como mediadores lipídicos en la señalización endocrina, paracrina y autocrina dentro del tejido adiposo (Liu *et al.*, 2015). Los AGPI también pueden tener beneficios frente a las comorbilidades relacionadas con la obesidad, como una reducción en la resistencia a la insulina, dislipidemias, inflamación y marcadores de enfermedad de hígado graso no alcohólico (Figueiredo *et al.*, 2017).

2.1.4.1. Recomendaciones de ingesta de grasas y declaraciones de propiedades saludables

Las pautas dietéticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de las Ingestas Dietéticas de Referencia (DRI) recomiendan una ingesta total de grasa de entre el 20 y el 35% del total de calorías, no estableciéndose un nivel superior de ingesta tolerable para la grasa total por no existir un nivel de ingesta demostrado para el que haya un evento adverso (Liu *et al.*, 2017).

La OMS y el Departamento de Agricultura y el Departamento de Servicios de Salud Humana de los Estados Unidos, recomiendan una limitación en la ingesta de grasas saturadas < 10% de la energía total de la dieta. Mientras que la Asociación Americana del Corazón y el Colegio Americano de Cardiología, recomiendan una ingesta de grasas saturadas entre 5-6% de la energía total. Por el contrario, la Fundación del Corazón y Accidente Cerebrovascular de Canadá eliminó recientemente cualquier limitación específica sobre la grasa saturada, indicando en cambio que sus directrices dietéticas no incluyen un límite para la grasa saturada y se centran en un patrón dietético saludable y equilibrado (Liu *et al.*, 2017). Además, el Comité Asesor de Pautas Alimentarias de 2015, recomienda el uso de aceites vegetales no hidrogenados ricos en grasas insaturadas y relativamente bajos en AGS, en lugar de grasas animales o aceites tropicales como principal fuente de grasa en la dieta (Wang y Hu, 2017). La EFSA sugiere que la ingesta de ácidos grasos saturados y *trans* sea la más baja posible (EFSA, 2010).

Adicionalmente, se han aprobado declaraciones saludables relacionadas con el consumo de diferentes ácidos grasos que están asociados con la reducción del colesterol en sangre y reducción del riesgo de enfermedades del corazón (Tabla 2. 1).

Tabla 2. 1. Declaraciones de propiedades saludables relacionadas con ácidos grasos y con dietas bajas en ácidos grasos saturados y *trans*.

Nutriente/alimento	Declaración
Unión Europea	
Ácido α -linolénico	El ácido α -linolénico contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo.
Ácido linoleico	El ácido linoleico contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo.
Alimentos con un contenido bajo o reducido de AGS	Un menor consumo de grasas saturadas contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo.
Estados Unidos	
Dietas bajas en grasas saturadas, colesterol y grasas <i>trans</i>	Las dietas bajas en grasas saturadas y colesterol, y tan bajas como sea posible en grasas <i>trans</i> , pueden reducir el riesgo de enfermedades del corazón
Australia/Nueva Zelanda	
Dietas bajas en ácidos grasos saturados	Las dietas bajas en ácidos grasos saturados reducen el colesterol sanguíneo total o el colesterol LDL en sangre
Canadá	
Grasa dietética, grasas saturadas, colesterol, ácidos grasos <i>trans</i>	Una dieta saludable baja en grasas saturadas y <i>trans</i> puede reducir el riesgo de enfermedad cardíaca. (Nombrando la comida) no contiene grasas saturadas y <i>trans</i> . Una dieta saludable baja en grasas saturadas y <i>trans</i> puede reducir el riesgo de enfermedad cardíaca. (Nombrar la comida) es baja en grasas saturadas y <i>trans</i> .

Fuente: Adaptado de Jones y Jew (2016) y Comisión Europea (2012).

En la Unión Europea, según el Reglamento (UE) N° 116/2010, que modifica el Reglamento (CE) N° 1924/2006 (Comisión Europea, 2010), se permiten las siguientes declaraciones nutricionales relacionadas con el contenido de grasa de los alimentos.

El término **bajo contenido de grasa** o cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, solamente se podrá usar si el producto no contiene más de 3 g de grasa por 100 g en el caso de los sólidos o 1,5 g de grasa por 100 mL en el caso de los líquidos (1,8 g de grasa por 100 mL para la leche semidesnatada).

El término **bajo contenido de grasas saturadas** o cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, solamente se podrá usar si la suma de ácidos grasos saturados y de ácidos grasos *trans* en el producto no es superior a 1,5 g/100 g para los productos sólidos y a 0,75 g/100 mL para los productos líquidos, y en cualquier

caso la suma de ácidos grasos saturados y de ácidos grasos *trans* no deberá aportar más del 10 % del valor energético.

El término **alto contenido de grasas monoinsaturadas** o cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, solamente se podrá usar si al menos un 45 % de los ácidos grasos presentes en el producto proceden de grasas monoinsaturadas y las grasas monoinsaturadas aportan más del 20 % del valor energético del producto.

El término **alto contenido de grasas poliinsaturadas** o cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, solamente se podrá usar si al menos un 45 % de los ácidos grasos presentes en el producto proceden de grasas poliinsaturadas y las grasas poliinsaturadas aportan más del 20 % del valor energético del producto.

El término **alto contenido de grasas insaturadas** o cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, solamente se podrá usar si al menos un 70 % de los ácidos grasos presentes en el producto proceden de grasas insaturadas y las grasas insaturadas aportan más del 20 % del valor energético del producto.

2.1.4.2. *Reemplazo de grasas saturadas por insaturadas*

Los desequilibrios cualitativos y cuantitativos en la ingesta y el metabolismo de las grasas alimentarias se han visto implicados en varias enfermedades crónicas, incluidas las ECV, la obesidad, la diabetes mellitus y la artritis reumatoide (Bhagat y Das, 2015).

Se han realizado diversos estudios sobre los efectos del consumo de grasas en la salud de las personas. En las décadas de 1950 y 1960 se demostró que las grasas saturadas aumentaban las concentraciones de colesterol sérico (Sanders, 2016). Un meta-análisis de 21 estudios prospectivos de cohortes concluyó que la evidencia no respaldaba una asociación entre el consumo de AGS *per se* y un mayor riesgo de ECV. En otra revisión sistemática de 12 estudios prospectivos de cohortes, no se encontró asociación significativa entre el consumo de AGS y todas las causas de ECV y mortalidad por cardiopatía coronaria ni el riesgo de accidente cerebrovascular isquémico o diabetes tipo 2 (Nettleton *et al.*, 2016). Los efectos de los AGS sobre los factores de riesgo de ECV y los criterios de valoración clínicos de ECV están intrínsecamente modulados por los nutrientes que los reemplazan (Siri-Tarino *et al.*, 2015), de manera que existe evidencia consistente de que el reemplazo parcial de AGS dietético con AGPI reduce

significativamente el riesgo de ECV, tanto en ensayos aleatorizados como en estudios de cohortes. Por el contrario, existen muy pocos datos para determinar el efecto de la sustitución de AGMI sobre la mortalidad por ECV (Hooper *et al.*, 2015), pero se ha evidenciado que la ingesta de AGMI, en comparación con los carbohidratos totales, se asocia con un riesgo significativamente menor de ECV (Wang y Hu, 2017). También se ha observado una mayor reducción en el colesterol de lipoproteína de baja densidad, cuando existe reemplazo de AGS por AGPI o una mezcla de AGPI/AGMI (Nettleton *et al.*, 2016; Te Morenga y Montez, 2017), concluyéndose que las grasas insaturadas son más saludables en términos metabólicos que las grasas saturadas (Alcock y Lin, 2015). En consecuencia, las jurisdicciones de la Unión europea, los Estados Unidos y Canadá, han aprobado declaraciones de propiedades saludables relacionadas con el reemplazo de AGS con ácidos grasos insaturados (Jones y Jew, 2016) (Tabla 2. 2).

Tabla 2. 2. Declaraciones de propiedades saludables relacionadas con la sustitución de ácidos grasos saturados por ácidos grasos insaturados.

Nutriente/alimento	Declaración
Unión Europea	
Ácido oleico	La sustitución de grasas saturadas por insaturadas en la dieta contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo. El ácido oleico es una grasa insaturada.
Ácidos grasos monoinsaturados y/o poliinsaturados	Reemplazar las grasas saturadas con las no saturadas en la dieta contribuye al mantenimiento de los niveles normales de colesterol en la sangre (los AGMI y los AGPI son grasas no saturadas).
Estados Unidos	
Las grasas no saturadas reemplazan las grasas saturadas	Reemplazar la grasa saturada con cantidades similares de grasas no saturadas puede reducir el riesgo de enfermedad cardíaca. Para lograr este beneficio, las calorías diarias totales no deberían aumentar.
Canadá	
Reemplazo de grasas saturadas con grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas y reducción del colesterol en la sangre	Declaración principal: Reemplazar las grasas saturadas con grasas poliinsaturadas y monoinsaturadas (de aceites vegetales) ayuda a reducir el colesterol. Declaración secundaria: El colesterol alto es un factor de riesgo para la enfermedad cardíaca.

Fuente : Adaptado de Jones y Jew (2016).

2.1.5. Ácidos grasos omega-3

Los ácidos grasos omega-3, son ácidos grasos esenciales para el ser humano debido a que carecemos de las enzimas necesarias para biosintetizarlos y por lo tanto son aportados por la dieta (Jiménez *et al.*, 2013). El más común de los ácidos grasos omega-3 de cadena corta, con 18 carbonos, es el ácido α -linolénico (ALA); y los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) omega-3 de cadena larga, con 20-22 carbonos y 5-6 enlaces dobles, son el ácido eicosapentaenoico (EPA), el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido docosapentaenoico (DPA) (Hall y Tulbek, 2008). Las estructuras de estos ácidos grasos se muestran en la Figura 2. 1.

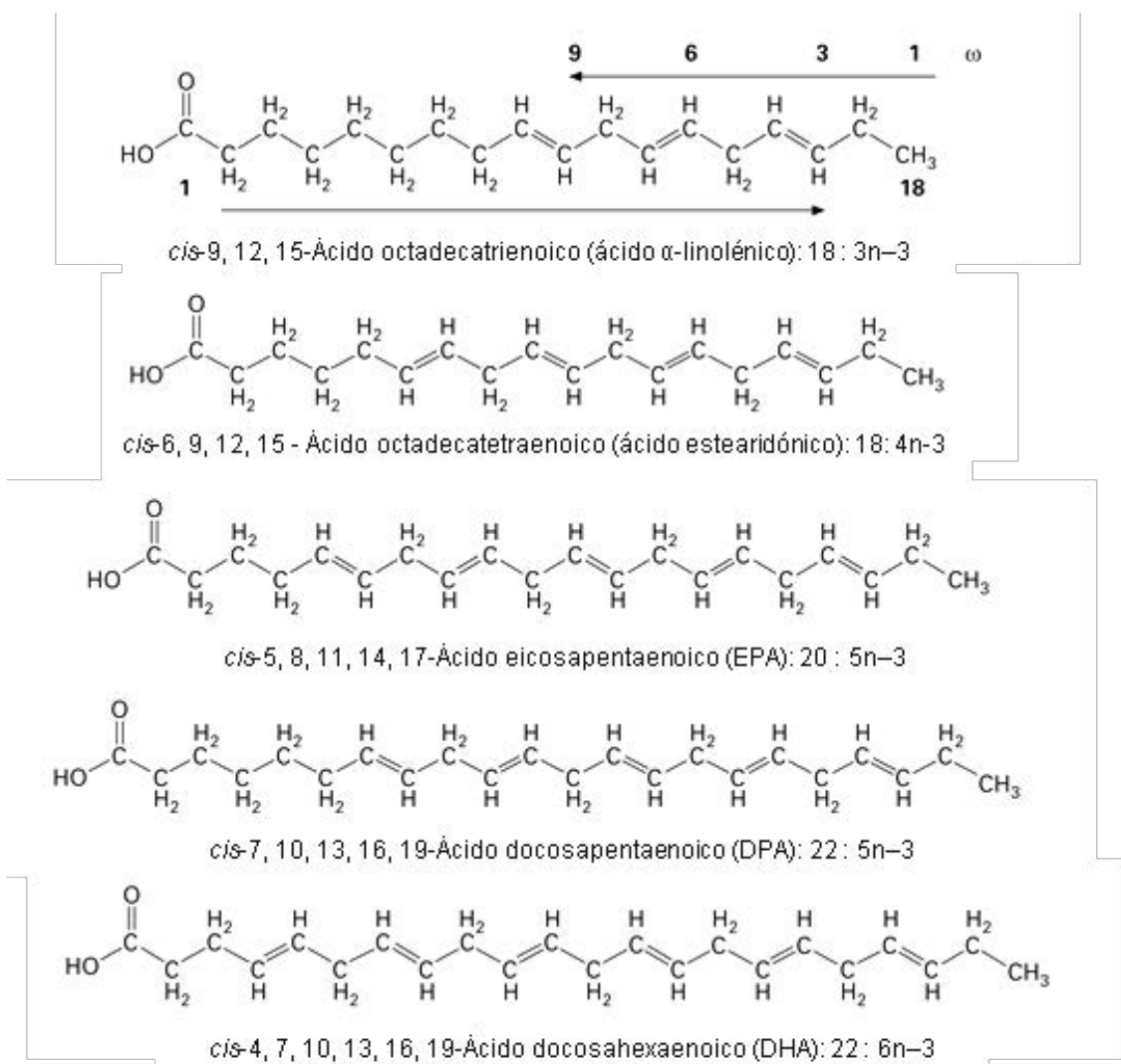


Figura 2. 1. Estructuras de los principales ácidos grasos omega-3. La numeración por encima del primer ácido graso representa el formato de etiquetado omega (ω), mientras que la numeración bajo el primer ácido graso representa el método de número IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Fuente: Hall y Tulbek (2008).

El ALA, el ácido graso omega-3 más simple, se sintetiza a partir del ácido linoleico (AL) por desaturación. Al igual que otros animales, los humanos no pueden sintetizar el ALA, pero pueden metabolizarlo (Jacobsen *et al.*, 2013); los otros ácidos grasos omega-3 derivan de este ácido graso a través de una serie de reacciones de desaturación, elongación y finalmente β -oxidación (Dyall, 2015). Sin embargo, la vía de conversión del ALA a EPA está en competencia directa con la conversión de AL en ácido araquidónico, pues se usan las mismas enzimas (Jacobsen *et al.*, 2013). Estudios en humanos con ingestión aguda de ALA han demostrado que se produce conversión a EPA y DPA, pero es mucho más limitada a DHA (Calder, 2013).

Los AGPI son particularmente abundantes en pescados y mariscos (Ghasemifard *et al.*, 2014). Los aceites vegetales, como la soja y la canola, y otras semillas, como la linaza y la chía, son fuentes comunes de ácidos grasos omega-3 de cadena corta (Hernandez y de Jong, 2011). En general el contenido de ácidos omega-3 en aceites de pescado es superior a los aceites vegetales, excepto por el aceite de linaza y de chía (Tabla 2. 3).

Tabla 2. 3. Lípidos (g/100 g de aceite) en diferentes tipos de semillas y aceites de pescado.

Aceite	AGPIs	ω-3	ω-6	ω-6:ω-3	Referencia
Girasol	67,5	0,1	63,2	632	
Maíz	55,6	0,9	50,4	56	
Soja	63,2	7,3	51,5	7,05	
Palma	15,1	0,3	10,1	33,66	
Aceituna	12,7	0,7	7,8	11,14	Rubio-Rodríguez <i>et al.</i> , 2010
Hígado de bacalao	56,8	19,8	0,9	0,04	
Arenque	22,1	11,9	12	1,01	
Salmón	63,1	35,3	1,06	0,03	
Sardina	55,1	28,1	2,2	0,07	
Linaza	69,0	53,0	16,0	0,3	Tvrzicka <i>et al.</i> , 2011
Chía	85,9	64,4	21,5	0,33	Timilsena <i>et al.</i> , 2017
Chía	80,6	60,1	20,5	0,34	Ayerza, 2009

2.1.5.1. *Importancia nutricional de los ácidos grasos omega-3*

El ALA debe ser considerado como un componente dietético importante, basado en los mecanismos potenciales por los cuales los lípidos omega-3 pueden prevenir las ECV.

Algunos de estos mecanismos incluyen la supresión de citocinas inflamatorias, la reducción de la formación de apolipoproteína B, el bloqueo del factor de activación plaquetaria, la mejora de la flexibilidad de los vasos sanguíneos y la prevención de la aterosclerosis (Hall y Tulbek, 2008). También se ha establecido una relación de causa-efecto entre la ingesta dietética de ALA y la reducción de la concentración de colesterol en la sangre (Jiménez-Colmenero, 2013).

El EPA y DHA, son ácidos grasos a los que se les han atribuido efectos benéficos en la salud humana debido a que disminuyen el riesgo de ECV, tienen un efecto positivo en la función cardíaca, la hemodinámica, participan activamente en los procesos de formación y funcionamiento neuronal y óptico e inhiben el crecimiento de células cancerígenas y tumorales (Jiménez *et al.*, 2013). También hay evidencias de que la síntesis de DHA a partir de ALA puede ser suficiente para mantener la función cerebral. Por ejemplo, en los vegetarianos y veganos, en los que la única fuente de DHA es derivado del ALA y cuyos niveles de DHA en plasma son 0-40% más bajos que los omnívoros, tienen tasas de enfermedades neurológicas comparables con los omnívoros (Domenichiello *et al.*, 2015).

Se han propuesto ingestas de omega-3 de entre 1100 y 3800 mg/día, incluyendo en este intervalo entre 1100 y 1600 mg/día de ALA para mujeres y varones respectivamente, 1300 y 1400 mg/día para mujeres lactantes y gestantes respectivamente; y al menos 400 mg/día de ácidos grasos omega-3 de cadena larga (Hall y Tulbek, 2008). Por otro lado, la OMS recomienda mantener una proporción de ácidos grasos omega-6: omega-3 entre 5:1 a 10:1. Países como Suecia recomienda una proporción de 5:1, Canadá recomienda de 4:1 a 10:1, y Japón cambió su recomendación de 4:1 a 2:1; debido a que las rutas metabólicas del omega-3 y omega-6 involucran las mismas enzimas elongasas y desaturasas (Hernandez y de Jong, 2011), además, estos AGPI son precursores de mediadores lipídicos potentes, denominados eicosanoides. Mientras los eicosanoides derivados de omega-6 promueven respuestas inflamatorias, vasoconstricción y reacciones trombóticas, los eicosanoides derivados de omega-3 inhiben estas reacciones (Pawelczyk *et al.*, 2015); por lo que una producción excesiva y desequilibrada o deficiente de eicosanoides puede dar como resultado la aparición de varias situaciones patológicas como trombosis, artritis inflamatoria o supresión inmune (Hernandez y de Jong, 2011). Adicionalmente, en las dietas occidentales se observa una ingesta elevada de ácidos grasos omega-6 y una muy baja de omega-3, generando un desequilibrio importante en la ingesta de estos AGPI. Esta

situación dietética se ha asociado con un aumento en el riesgo de desarrollar ECV y más recientemente, hepatopatía grasa no alcohólica (Rincón-Cervera *et al.*, 2016).

2.1.5.2. *Enriquecimiento de alimentos con ácidos grasos omega-3*

La mayoría de alimentos funcionales desarrollados inicialmente fueron los de fortificación con vitaminas y/o minerales como vitamina C, vitamina E, ácido fólico, zinc, hierro y calcio. Posteriormente, el enfoque se centró en alimentos fortificados con diversos micronutrientes, como ácidos grasos omega-3, fitoesteroles y fibra soluble para promover la buena salud o prevenir enfermedades como el cáncer (Siró *et al.*, 2008).

La ingesta de las cantidades de ácidos grasos omega-3 propuestas son difíciles de conseguir sin modificar drásticamente la dieta, sobre todo en poblaciones con bajo consumo de pescado azul (Hall y Tulbek, 2008). Muchos estudios han proporcionado evidencia de que el consumo regular y la suplementación dietética con AGPI omega-3 de cadena larga ofrecen numerosos beneficios para la salud, incluidas la prevención de ECV, hipertensión y enfermedades inflamatorias (Dyall, 2015; Manuelli *et al.*, 2017; Ruxton *et al.*, 2004). En la mayoría de los casos, el aceite de pescado es la fuente natural de los ácidos grasos omega-3 que se incorporan a diversos productos (Rubio-Rodríguez *et al.*, 2010), sin embargo la disminución de estos ácidos grasos durante el almacenamiento por la oxidación de lípidos sigue siendo un obstáculo en la aplicación de esta estrategia (Cherian, 2013). Otro inconveniente del uso del aceite de pescado es su olor y sabor, que alteran las propiedades sensoriales de los alimentos. Es por ello que se ha propuesto la microencapsulación como una solución para proteger el aceite de pescado de la oxidación y enmascarar el sabor (Lee y Ying, 2008), aunque también se han propuesto fuentes alternativas, como microorganismos marinos o plantas transgénicas (Rubio-Rodríguez *et al.*, 2010). Una alternativa para aumentar el aporte de ácidos grasos omega-3 a la dieta es la utilización de la chía, que es la fuente botánica más rica de ALA conocida (Jiménez-Colmenero, 2013), con un 60-65% de este ácido graso en el aceite (Morales *et al.*, 2012), además no tiene el inconveniente de las características organolépticas como el sabor y el olor de las fuentes marinas (Segura-Campos *et al.*, 2014).

2.1.5.3. Declaraciones de propiedades saludables relacionadas con los ácidos grasos omega-3

Diferentes normativas consideran las declaraciones de propiedades saludables de manera específica para cada tipo de ácido graso omega-3, un resumen de estas declaraciones en diferentes países se presenta en la Tabla 2. 4.

Tabla 2. 4. Declaraciones de propiedades saludables aprobadas relacionadas con los ácidos grasos omega-3.

Nutriente/alimento	Declaración
Unión Europea	
ALA	ALA contribuye al mantenimiento de los niveles de colesterol en la sangre.
EPA y DHA	El EPA y el DHA contribuyen a la función normal del corazón.
DHA y EPA	El DHA y el EPA contribuyen al mantenimiento de la presión arterial normal.
DHA y EPA	El DHA y el EPA contribuyen al mantenimiento de los niveles normales de triglicéridos en la sangre.
DHA	La ingesta materna de DHA contribuye al desarrollo normal del cerebro del feto y de los lactantes amamantados.
DHA	La ingesta materna de DHA contribuye al desarrollo normal del ojo del feto y de los lactantes amamantados.
ALA y LA, ácidos grasos esenciales	Los ácidos grasos esenciales son necesarios para el crecimiento normal y el desarrollo de los niños.
Australia/Nueva Zelanda	
EPA y DHA	Las dietas que contienen 500 mg de EPA y DHA por día contribuyen a la salud del corazón.
Canadá	
DHA	El DHA, un ácido graso omega-3, es compatible con el desarrollo físico normal del cerebro, los ojos y los nervios, principalmente en niños menores de 2 años.

Fuente: Adaptado de Jones y Jew (2016).

En la Unión Europea, según el Reglamento (UE) N° 116/2010, que modifica el Reglamento (CE) N° 1924/2006, se permiten para los ácidos grasos omega-3, las siguientes declaraciones nutricionales y condiciones.

El término **fuentes de ácidos grasos omega-3** o cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, solamente se podrá usar si el producto contiene

al menos 0,3 g de ácido α -linolénico por 100 g y por 100 kcal, o al menos 40 mg de la suma de ácido eicosapentanoico y ácido decosahexanoico por 100 g y por 100 kcal.

El término **alto contenido de ácidos grasos omega-3** o cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, solamente se podrá usar si el producto contiene al menos 0,6 g de ácido α -linolénico por 100 g y por 100 kcal, o al menos 80 mg de la suma de ácido eicosapentanoico y ácido decosahexanoico por 100 g y por 100 kcal.

En los Estados Unidos y otros países, las declaraciones de propiedades saludables de ácidos grasos específicos no están permitidas en alimentos envasados (de Deckere y Verschuren, 2000). La etiqueta nutricional debe indicar las cantidades de grasa total y grasas saturadas por porción, mientras que la lista de grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas es voluntaria (FDA, 2014a); sin embargo, se permiten las declaraciones del contenido de nutrientes para ALA para productos de la pesca (Tabla 2. 5).

Tabla 2. 5. Declaraciones respecto al ácido graso α -linolénico permitidos por la FDA en productos de la pesca.

Declaración de contenido de nutrientes para ALA	Condiciones para realizar la declaración ¹
Alto	≥ 320 mg de ALA por cantidad de referencia habitualmente consumida (RACC) ($\geq 20\%$ de 1,6 g/día)
Buena fuente	≥ 160 mg de ALA por RACC ($\geq 10\%$ de 1,6 g/día)
Más	≥ 160 mg de ALA más por RACC que un alimento de referencia apropiado ($\geq 10\%$ de 1,6 g/día)

¹ Las declaraciones de contenido de nutrientes deben cumplir con todas las reglamentaciones aplicables de la FDA con respecto a la realización de dichas declaraciones.

Fuente: FDA (2014b).

2.2. Aceites vegetales

Los aceites vegetales representan alrededor del 79% del consumo de aceite comestible en todo el mundo (Li *et al.*, 2013). Los aceites vegetales desempeñan funciones importantes en los alimentos porque además de proporcionar características como sabor y textura a los alimentos (Norton y Norton, 2010), actúan como portadores de vitaminas liposolubles (A, D, E y K), proporcionan energía y ácidos grasos esenciales insaturados (Li *et al.*, 2013).

Los aceites básicos se extraen generalmente por prensado, mediante extracción con disolventes, o mediante ambos procesos. Los aceites crudos son principalmente triacilgliceroles (generalmente > 95%), acompañados de niveles más bajos de ácidos libres, monoacilgliceroles, diacilgliceroles, fosfolípidos (1-3%), esteroides libres y/o acilados (1000-5000 mg/kg en total), tocoles (300- 2000 mg/kg) e hidrocarburos tales como alcanos, escualeno y carotenos (Gunstone, 2006).

2.2.1. Aceite de oliva

La oliva (*Olea europea*) se produce principalmente alrededor del Mediterráneo, donde se ha establecido durante siglos (Bockisch, 1998). El cultivo del olivo probablemente se originó ancestralmente en Irán y Mesopotamia o en el norte de África, contribuyendo en la economía, la cocina y la salud de los habitantes de las regiones costeras de Grecia y las islas griegas, Chipre, Siria, Líbano, el sur de Italia, Francia, España y las costas del norte de África (Boskou, 2015). La composición química promedio de la fruta de la aceituna es: 50% de agua, 1,6% de proteína, 22% de aceite, 19% de carbohidratos, 5,8% de celulosa, 1,5% de minerales (ceniza). Otros componentes importantes son pectinas, ácidos orgánicos, pigmentos y glucósidos de fenoles (Boskou, 2006). La composición del aceite de oliva varía según la región, la altitud, el momento de la cosecha, la variedad, así como el proceso de extracción. La composición general de ácidos grasos del aceite de oliva varía entre 55-83% de ácido oleico; 3,5-21% de ácido linoleico; 7,5-20% de ácido palmítico y 0,5-5% de ácido esteárico (Fan y Eskin, 2015).

2.2.2. Aceite de chía

La chía (*Salvia hispanica* L) es una planta de la familia lamiácea, que puede crecer hasta 1 m de altura. Sus hojas están dispuestas en oposición, sus flores son pequeñas (3-4 mm) y pueden ser blancas o moradas, con pequeñas corolas y partes de flores fusionadas que contribuyen a una alta tasa de autopolinización. El color de la semilla varía de negro, gris y negro manchado a blanco, y la forma es oval con un tamaño que varía de 1 a 2 mm aproximadamente (Mohd Ali et al., 2012) (Figura 2. 2).

Esta planta es nativa del sur de México y norte de Guatemala (Marineli *et al.*, 2014), y es cultivada con diferentes propósitos en Argentina, Bolivia, Colombia, Perú, Guatemala, México, Estados Unidos, Australia, Sudeste de Asia, Canadá, Chile, Nueva Zelanda, Ecuador, Paraguay y Nicaragua (Coates, 2011; Imran *et al.*, 2016; Jamboonsri *et al.*, 2011). La chía se cultiva en climas tropicales y subtropicales, desde zonas libres de heladas hasta regiones donde ocurren heladas cada año, y desde el nivel del mar hasta los 2500 m (Coates, 2011). Sin embargo Jamboonsri *et al.* (2011) demostraron que nuevas líneas de chía de floración temprana pueden producir semillas en climas templados. La producción comercial de campo para semillas de chía se ha estimado en 550-600 kg/ha (Imran *et al.*, 2016).



Figura 2. 2. Semillas de chía oscura y blanca. Fuente: Valdivia-López y Tecante (2015).

La composición de la semilla de chía es variable y depende de la región donde crece (Tabla 2. 6). Ayerza (2009) determinó que las diferencias en la composición de las semillas de diferentes ecosistemas se deben a los efectos de uno o más factores ambientales. Los efectos de la luz, la temperatura, el tipo de suelo y la nutrición, que pueden afectar a la proteína de la semilla y la cantidad y calidad del aceite. Ayerza y Coates (2009) también determinaron que el efecto del genotipo influye más en el rendimiento de la semilla que en el contenido de proteínas, aceite, ácidos grasos y compuestos fenólicos.

La semilla de chía contiene porcentajes proteicos mayores que otras semillas como avena (15,3%), trigo (14%), maíz (14%), cebada (9,2%) o arroz (8,5%); y a diferencia de la

mayoría de los otros cereales, la chía no tiene ningún aminoácido limitante en la dieta adulta (Capitani *et al.*, 2012; Peiretti y Meineri, 2008).

La chía tendría 2,3; 2,6; 8,3 y 9,8 veces más fibra por cada 100 g de porción comestible que trigo, avena, maíz y arroz, respectivamente; también tiene un alto contenido en calcio, fósforo, potasio y magnesio (335 a 860 mg/100 g), un menor contenido de sodio, hierro y zinc (4,58 a 16 mg /100 g) (Valdivia-López y Tecante 2015) y es fuente de niacina y vitaminas A y C. Además puede ser una fuente importante de antioxidantes naturales, por la presencia de quercetina, kaempferol, ácidos cafeico, ácido clorogénico, ácido cinámico y miricetina, especialmente en extractos de semillas de chía (Reyes-Caudillo *et al.*, 2008).

Tabla 2. 6. Composición química de las semillas de chía de diferente procedencia.

Origen	Humedad	Proteínas	Aceite	Carbohidratos	Fibra dietética	Cenizas	Referencia
Argentina	-	16,5	33,5	-	-	-	Ayerza, 2009
Argentina	7,2	21,8	31,7	33,4	-	4,4	Martínez <i>et al.</i> , 2012
Bolivia	-	24,2	26,4	-	-	-	Ayerza, 2009
Chile	5,8	25,3	30,2	34,6	37,5	4,1	da Silva Marineli <i>et al.</i> , 2014
Chile	6,2	19,9	27,9	8,6	33,0	4,5	Jiménez <i>et al.</i> , 2013
Ecuador	-	23,6	26,7	-	-	-	Ayerza, 2009
Ecuador	5,7	19,0	34,2	-	23,2	-	Ayerza, 2013
México	5,3	18,5	32,7	18,7	20,1	4,9	Porrás-Loaiza <i>et al.</i> , 2014

Aunque las semillas de chía tienen menor contenido de grasa en comparación con otras semillas como sésamo (49,67%) y girasol (51,46%) (Porrás-Loaiza *et al.*, 2014), las altas concentraciones de AGPI que contiene (Reyes-Caudillo *et al.*, 2008) han hecho que adquiera importancia para la salud y la nutrición humana (Ayerza, 2011).

El aceite de chía se puede obtener utilizando diferentes métodos como la extracción por prensado de las semillas, la extracción enzimática, con solventes y/o con fluidos supercríticos. A nivel industrial se utiliza la compresión, fría o caliente y la extracción con solventes (Uribe *et al.*, 2011). El rendimiento de aceite y la composición de ácidos

grasos (Tabla 2. 7) se ven afectados por factores como la variedad de la semilla, el método de pretratamiento, las condiciones de almacenamiento de la semilla y el método de reducción de tamaño de la semilla (Imran *et al.*, 2016).

La relación omega-3: omega-6 de 3:1 en el aceite de chía es ideal para mantener una buena salud, pues esta relación entre los ácidos grasos insaturados es de gran importancia en el equilibrio de las grasas en el cuerpo (Porras-Loaiza *et al.*, 2014; Timilsena *et al.*, 2017). Del mismo modo, su menor contenido en ácidos grasos saturados (ácido palmítico y esteárico), hacen que el aceite de chía sea una opción de alimento saludable (Imran *et al.*, 2016). El aceite extraído de semillas de chía también contiene varios compuestos fenólicos con actividad antioxidante, como tocoferoles, fitoesteroles y carotenoides (de Falco *et al.*, 2017).

Tabla 2. 7. Composición porcentual en ácidos grasos de aceite de chía de diferente procedencia.

Origen	Palmítico (16:0)	Esteárico (18:0)	Oleico (18:1)	Linoleico (18:2)	Linolénico (18:3)	Referencia
Argentina	6,89	2,36	6,73	22,50	60,35	Ayerza, 2009
Argentina	7,10	2,10	6,30	19,4	65,20	Guiotto <i>et al.</i> , 2014
Argentina	7,30	2,80	7,40	22,00	60,50	Martínez <i>et al.</i> , 2012
Australia	6.21	1.89	5.68	21,46	64,39	Timilsena <i>et al.</i> , 2017
Bolivia	7,11	3,44	8,32	20,45	60,10	Ayerza, 2009
Chile	7,29	3,84	8,91	19,36	51,82	Jiménez <i>et al.</i> , 2013
Chile	7,07	3,36	7,04	18,23	62,80	da Silva Marineli <i>et al.</i> , 2014
Cuba	8,50	3,70	7,80	20,90	58,10	Vicente Murillo <i>et al.</i> , 2013
Ecuador	9,66	4,34	9,29	20,30	60,05	Ayerza, 2009
Ecuador	6,2-6,5	3,65-4,1	6,7-6,8	17,5-18,4	63,3-64,5	Ayerza, 2013
Guatemala	5,90	4,40	5,50	17,50	66,70	Ixtaina <i>et al.</i> , 2011a
México	6,0-7,06	2,79-5,21	7,7-8,7	18,9-20,1	59,9-63,2	Porras-Loaiza <i>et al.</i> , 2014

En relación a las características físico-químicas del aceite de chía (Tabla 2. 8), el índice de refracción es similar al de aceite de oliva (1,47) y la soja (1,47) (Firestone, 2013;

Segura-campos *et al.*, 2014), y comparable al de linaza (1,48) y aceite de pescado (1,48) (Timilsena *et al.*, 2017). La gravedad específica de aceite de chía es superior a los de oliva (0,91), girasol y soja (0,92) (Firestone, 2013; Volli y Purkait, 2014). El índice de saponificación es similar al de otros aceites vegetales, entre estos el aceite de girasol (186-196), aceite de soja (188-195) y aceite de oliva virgen (184-196) (Firestone, 2013). El índice de yodo es mayor que el de la mayoría de los aceites vegetales, como el aceite de linaza (187), el aceite de colza (94-120), el aceite de girasol (118-141), el aceite de oliva (75-94) y el aceite de soja (118-139) (Firestone, 2013; Timilsena *et al.*, 2017). Los valores relativamente altos de gravedad específica, índice de refracción e índice de yodo observados se relacionan con una concentración relativamente alta de AGPI, particularmente omega-3 y omega-6 (Timilsena *et al.*, 2017).

Tabla 2. 8. Características fisicoquímicas de aceite de chía.

Parámetros	Valores	
Índice de refracción (40 °C)	1,48	
Gravedad específica (25 °C)	0,93	
Viscosidad a 40 ° C (mPa.s)	41,5	
Índice de acidez (mg de KOH / g de aceite)	2,54	
pH	5,41	
Acidez titulable (g ácido oleico / g de aceite)	0,96	
Índice de saponificación (mg de KOH / g de aceite)	197	
Índice de yodo (g I ₂ / 100 g de aceite)	204	
Índice de peróxido (meq O ₂ / kg de aceite)	4,33	
Materia insaponificable (%)	1,12	
Color	L*	67,48
	a*	-6,56
	b*	28,27

Fuente: Adaptado de Timilsena *et al.* (2017).

La viscosidad del aceite de chía es mayor al aceite de soja (31,61) y de girasol (33,01). El pH es más alto que el del aceite de girasol (4,27) y aceite de soja (4,07) (Volli y Purkait, 2014). El índice de acidez oscila entre 0,7 y 1,6 (Dąbrowski *et al.*, 2017; Ixtaina *et al.*, 2011a), siendo generalmente superior al del aceite de soya (0,56) y girasol (0,99), y algo inferior al de sésamo (2,12) (Volli y Purkait, 2014). El valor de índice de peróxido del

aceite de chía oscila entre 0,7 a 1 (Guiotto *et al.*, 2014; Ixtaina *et al.*, 2011b); Martínez *et al.*, 2012), inferior al de aceite de girasol 1,5 (Guiotto *et al.*, 2014).

Dentro del espacio de color CIE L*a*b*, el color del aceite de chía es diferente a otros aceites vegetales; tiene un valor de b* más alto que el de los aceites vegetales posiblemente debido a la presencia de un mayor contenido de sustancias carotenoides (Timilsena *et al.*, 2017).

2.3. Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AEs) son compuestos volátiles, naturales y complejos, caracterizados por un fuerte olor y están formados por metabolitos secundarios de las plantas (Albayrak y Aksoy, 2012). Los AEs se pueden obtener a partir de flores, brotes, semillas, hojas, ramas, cortezas, madera, frutos y raíces (Burt, 2004) mediante diferentes métodos como destilación de agua, destilación de agua y vapor o destilación de vapor, maceración y “*enfleurage*”, prensado en frío y extracción con solventes o fluidos supercríticos. La denominación de los AEs se relaciona habitualmente con el nombre de la planta de la que proceden y el olor es similar al de la parte de la planta de la que se obtiene, aunque el aroma es generalmente más intenso (Ríos, 2016).

Por otro lado la Organización Internacional de Normalización (ISO) ha definido a los aceites esenciales como el producto obtenido de una materia prima natural de origen vegetal, por destilación con vapor de agua, mediante procesos mecánicos del epicarpio de cítricos o por destilación seca, después de la separación de la fase acuosa -si es que la hubo- por procesos físicos, especificando que el aceite esencial puede someterse a tratamientos físicos que no producen cambios significativos en su composición (ISO, 2013).

Además los AEs son compuestos reconocidos generalmente como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) (Jayasena y Jo, 2013), y sus componentes como sustancias aromatizantes, de acuerdo con la Decisión de la Comisión Europea 2002/113/CE (Comisión Europea, 2002; Ramos *et al.*, 2014).

2.3.1. Composición de los aceites esenciales

Los AEs son mezclas de más de 200 constituyentes y se agrupan básicamente en dos fracciones: volátiles y no volátiles. Alrededor del 90-95% del AE total está constituido por una fracción volátil que como grupo principal contiene terpenos y terpenoides, los cuales se pueden subdividir en alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, éteres y fenoles, mientras que el otro grupo consiste en compuestos aromáticos, los fenilpropanoides. Por otro lado, el residuo no volátil constituye aproximadamente el 5-10% del aceite total, que contiene principalmente hidrocarburos, ácidos grasos, esteroides, carotenoides, ceras, cumarinas y flavonoides (Adelakun *et al.*, 2016; Jayasena y Jo, 2013).

2.3.1.1. Terpenos

Los terpenos son las moléculas más representativas de los AEs y constituyen el 90% de estos. Los terpenos son hidrocarburos formados por varias unidades de isopreno, de fórmula molecular $(C_5H_8)_n$, o $CH_2=C(CH_3)-CH=CH_2$ (para $n=1$), y los terpenos que contienen oxígeno se denominan terpenoides (Gayán *et al.*, 2012; Jayasena y Jo, 2013).

Los terpenos se clasifican según el número de unidades de isopreno, como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos con 2, 3, 4, 6 y 8 unidades de isopreno, respectivamente (Ríos, 2016). Según los grupos funcionales que tengan pueden ser alcoholes (mentol, linalool), fenoles (timol, carvacrol), aldehídos (geranial, citral), cetonas (alcanfor, carvona), ésteres (acetato de linalilo, acetato de citronelilo), éteres (1,8-cineol), peróxidos (ascaridol) y carburos (limoneno, *p*-cimeno, γ -terpineno) (Asbahani *et al.*, 2015; Dima y Dima, 2015; Gayán *et al.*, 2012; Pavela, 2015).

Los principales componentes de los AEs están formados por mono y sesquiterpenos (Ríos, 2016).

Los monoterpenos, se pueden dividir en tres subgrupos, acíclicos, monocíclicos y bicíclicos con modificaciones químicas por adición (oxidación) o eliminación (reducción) de dobles enlaces y/o por la adición de oxígeno para formar alcoholes (-OH), cetonas (-CO), aldehídos (-CHO) y ésteres (-OCO-) (Zachariah y Leela, 2006). En la Figura 2.3, se presentan ejemplos de este tipo de compuestos.

Los sesquiterpenos, al poseer cinco carbonos más que los monoterpenos, tienen un potencial mucho mayor para la diversidad estructural y estereoquímica. Los sesquiterpenos forman la mayor clase de terpenoides, son menos volátiles y tienen menos

propiedades organolépticas directas que los monoterpenos, aunque son una parte importante de la mayoría de los aceites esenciales que influyen sutilmente en el olor (Zachariah y Leela, 2006). Ejemplos de sesquiterpenos se presentan en la Figura 2. 4.

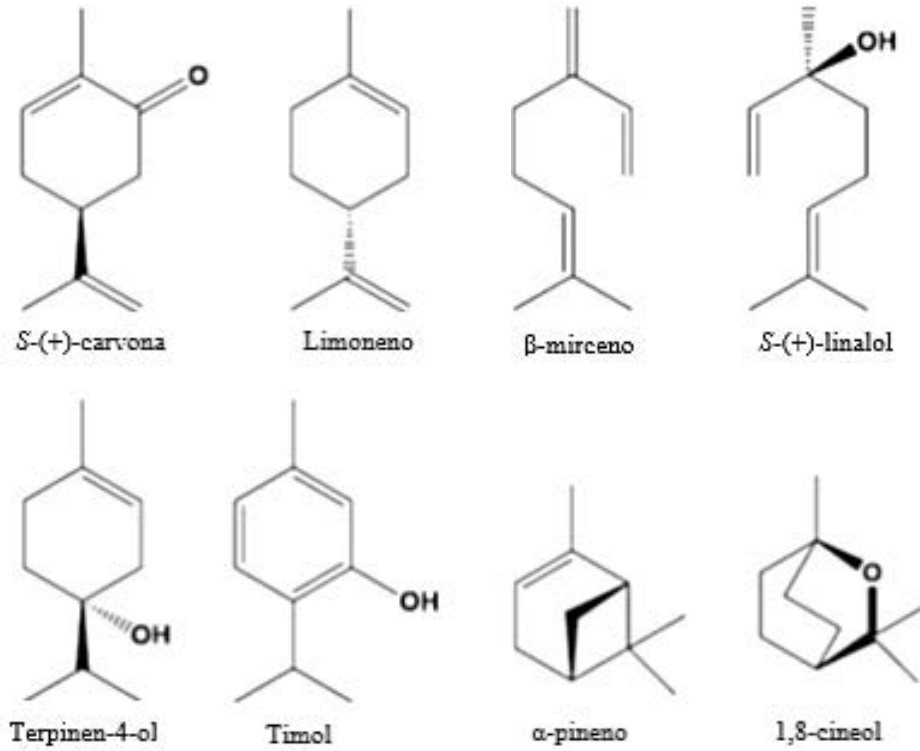


Figura 2. 3. Fórmula estructural de monoterpenos alifáticos, hidrocarbonados y oxigenados. Fuente: Ríos (2016).

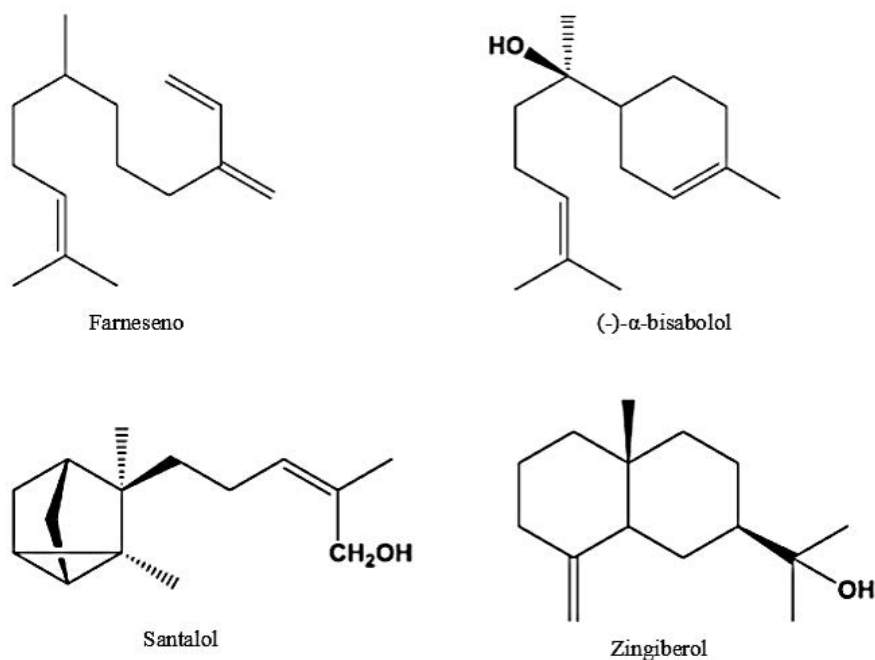


Figura 2. 4. Fórmula estructural de sesquiterpenos alifáticos, mono y bicíclicos, hidrocarbonados y oxigenados. Fuente: Ríos (2016).

2.3.1.2. Fenilpropanoides

Los fenilpropanoides se consideran la segunda clase más grande de volátiles de las plantas después de los terpenoides. Esta clase de compuestos se deriva principalmente de la fenilalanina (Sun *et al.*, 2016).

Los compuestos fenólicos y polifenólicos son metabolitos secundarios que se producen en las plantas a través de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y, en menor medida, la tirosina y se da por la vía del ácido shikímico (Shahidi, 2015). Se dividen en varios grupos y se basan en el número de átomos de carbono constitutivos, en conjunción con la estructura del esqueleto fenólico básico (Adelakun *et al.*, 2016). El esqueleto de los fenilpropanos consta de un anillo aromático de 6 carbonos con cadena lateral de 3 carbonos. La cadena lateral siempre contiene un doble enlace, pero sólo ocasionalmente un grupo funcional (por ejemplo, cinamaldehído en aceite esencial de canela). Los anillos aromáticos pueden estar sustituidos con hasta cuatro átomos de oxígeno, que luego se modifican mediante la adición de un anillo metilendioxi (Zachariah y Leela, 2006), en la Figura 2. 5 se presentan ejemplos de fenilpropanoides.

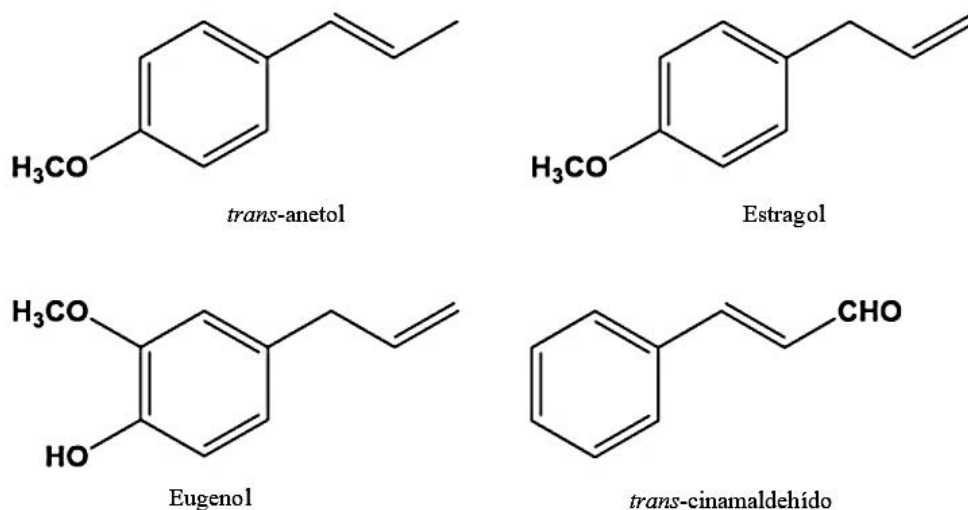


Figura 2. 5. Fórmula estructural de fenilpropanos, con cadena lateral unida o no a un grupo funcional. Fuente: Ríos (2016).

2.3.2. Componentes activos

En general, las propiedades de los extractos de plantas como antioxidantes y eliminadoras de radicales se asocian con la presencia de compuestos fenólicos que poseen la capacidad de donar hidrógeno al radical (Albayrak y Aksoy, 2012). Por otro lado, la bioactividad o actividad antimicrobiana de los AEs se atribuye generalmente a los compuestos fenólicos que son capaces de entrar en la capa lipídica de la membrana de los microorganismos y alterar su fluidez, además de causar una fuga de los constituyentes intracelulares y la disipación del gradiente de H⁺ transmembrana (Bevilacqua *et al.*, 2012).

Las características y propiedades de los compuestos activos de los AE utilizados en esta tesis son el carvacrol, el timol y el eugenol. El carvacrol y el timol son de naturaleza monoterpénica que contiene funciones de metilo e isopropilo en posición *para* en un anillo de fenol, teniendo como única diferencia en su fórmula la posición del grupo hidroxilo (Baser, 2008). Estos compuestos son isómeros y exhiben actividades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antitumorales y antiinflamatorias. También actúan como antioxidantes, captadores de radicales libres y agentes antilípidos peroxidantes (Beena *et al.*, 2013).

El **carvacrol** (5-isopropil-2-metilfenol) con fórmula (C₁₀H₁₄O), sinónimos: isopropil- *o*-cresol, *p*-cimen-2-ol, 2-hidroxi-*p*-cimeno, 2-metil-5-[1-metiletil]-fenol e iso-timol (De Vincenzi *et al.*, 2004). Es un isoprenil fenol con una elevada actividad antimicrobiana, especialmente por su carácter hidrófobo, que le permite acumularse en la membrana

celular y por su capacidad de formar enlaces hidrógeno y liberar protones que causan un cambio conformacional de la membrana, que produce la muerte celular (Ben Arfa *et al.*, 2006). En su actividad antimicrobiana es esencial su estructura química con la presencia del grupo hidroxilo y un sistema de electrones deslocalizados (Cacciatore *et al.*, 2015).

El **timol** (2-isopropil-5-metilfenol) es un fenol monoterpeno, conocido también como hidroxi cimeno. El timol se biosintetiza por la aromatización del γ -terpineno a *p*-cimeno, seguido de la hidroxilación de *p*-cimeno (Marchese *et al.*, 2016). Su efectividad antioxidante se basa en la viabilidad de donar rápidamente el átomo de hidrógeno fenólico, formando así radicales más estables. Estos antioxidantes primarios eliminan los radicales libres reactivos de alquilo, alcoxi o peroxilo, lo que conduce a una estabilidad elevada del producto que los contiene (Turek y Stintzing, 2013).

El **eugenol** (4-alil-2-metoxifenol) con fórmula ($C_{10}H_{12}O_2$) (Alma *et al.*, 2007), es un metoxifenol, que posee un grupo hidroxilo libre, pero el sistema deslocalizado es diferente al del carvacrol debido a la presencia de los grupos metoxilo. Se comercializa como un líquido incoloro a ligeramente amarillento, y se encuentra en los AEs como canela y clavo (Ben Arfa *et al.*, 2006; Chatterjee y Bhattacharjee, 2013).

El modo de acción antibacteriana del eugenol es a través de la disrupción de la membrana citoplásmica, con incremento de su permeabilidad; la naturaleza hidrófoba del eugenol, al igual que el carvacrol, le permite penetrar la membrana celular bacteriana y alterar la estructura celular, lo que posteriormente provoca la fuga de componentes intracelulares (Devi *et al.*, 2010). El eugenol también tiene elevada actividad antioxidante, pues tiene la capacidad de reaccionar con los radicales libres e hidroxilos, transformándolos en formas más estables (Ahmad Mir *et al.*, 2017; Kaufman, 2015).

2.3.3. Propiedades antimicrobianas

La actividad antimicrobiana de los AEs no puede explicarse por un solo mecanismo específico sino por el efecto combinado de los diferentes componentes. Por sus mecanismos de acción, los AEs son generalmente más activos frente a microorganismos Gram-positivos que frente a los Gram-negativos (Corrales, Fernandez y Han, 2014).

La acción inhibitoria de los compuestos aromáticos está, en la mayoría de los casos, relacionada con la hidrofobicidad, que está directamente correlacionada con el logP (Ben Arfa *et al.*, 2006), que se define como el logaritmo del coeficiente de partición, es una

medida de la solubilidad diferencial de un compuesto en dos disolventes inmiscibles. El sistema solvente más utilizado es el octanol/agua (Karcher y Devillers, 1990). Cuando uno de los disolventes es agua y el otro es un disolvente no polar, el valor de log P es una medida de lipofilicidad o hidrofobicidad (Comer y Tam, 2001).

Generalmente, los compuestos más hidrófobos son los más tóxicos y la membrana citoplásmica suele ser el sitio primario de acción tóxica. Las interacciones entre los compuestos antimicrobianos y la membrana celular afectan tanto al ordenamiento de lípidos como a la estabilidad de la bicapa, lo que resulta en una disminución de la integridad de la membrana y un aumento del flujo pasivo de protones a través de esta (Ben Arfa *et al.*, 2006).

Los componentes fenólicos de los AEs son los principales responsables de sus propiedades antibacterianas (Burt, 2004). La función hidroxilo libre en los compuestos fenólicos y la presencia de un sistema de electrones deslocalizados, permitiría que los compuestos actúen como intercambiadores de protones, reduciendo los gradientes de iones H^+ y K^+ a través de la membrana citoplasmática; permitiendo la fuga de constituyentes celulares vitales de los sistemas microbianos, produciendo un desequilibrio del agua, el agotamiento de la concentración de ATP intracelular, lo que finalmente conduce a la muerte celular (Ben Arfa *et al.*, 2006; Prakash *et al.*, 2015). La importancia del grupo hidroxilo en la estructura fenólica fue confirmada por la mayor actividad antimicrobiana cuando se comparó carvacrol o eugenol con su respectivo éter metílico; de esta forma, la actividad antimicrobiana de los miembros de los géneros *Thymus* y *Origanum*, *Ocimum basilicum* L. y *Cinnamomum zeylanicum* Breyne se asocian principalmente a la presencia de timol, carvacrol, eugenol y cinamaldehído, respectivamente (Sharifi-Rad *et al.*, 2017).

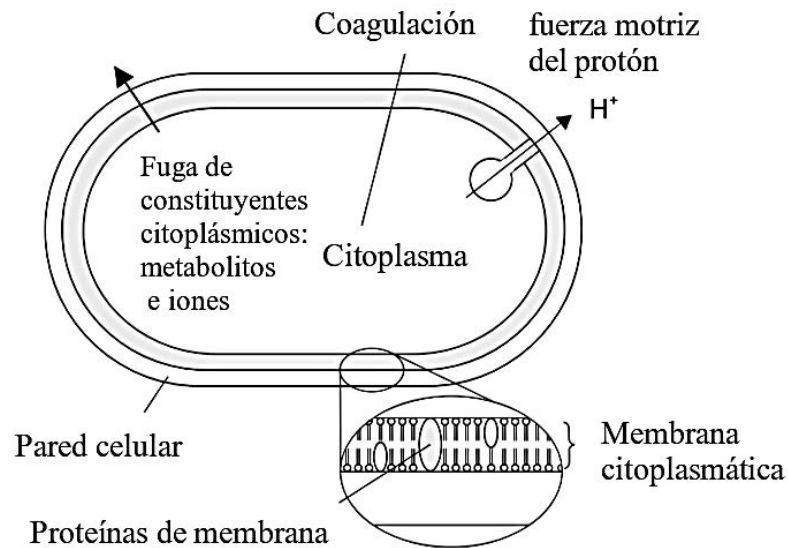


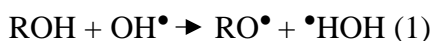
Figura 2. 6. Lugares y mecanismos de acción de los componentes de los AEs en la célula bacteriana: degradación de la pared celular, daño a la membrana citoplasmática, daño a las proteínas de membrana, pérdida de constituyentes celulares, coagulación del citoplasma y alteración de la fuerza motriz del protón. Fuente: Burt (2004).

Como se observa en la (Figura 2. 6), los mecanismos de acción de los AEs inciden sobre diferentes estructuras de la célula microbiana: 1) degradación de la pared celular; 2) afectación de la bicapa fosfolipídica de la membrana citoplasmática, tanto en la organización de los lípidos como la estabilidad de la bicapa; 3) daño a las proteínas de la membrana, dando lugar a una mayor permeabilidad de la membrana celular y un aumento del flujo pasivo protónico, generando la pérdida de constituyentes celulares; 4) alteración de la fuerza motriz de los protones, del flujo de electrones y del transporte activo; y 5) coagulación del contenido de las células. Además, estos aceites pueden afectar a una variedad de sistemas enzimáticos incluyendo las enzimas involucradas en la regulación energética y de síntesis de componentes estructurales e inactivar o destruir material genético (Ben Arfa *et al.*, 2006; Jayasena y Jo, 2013). La inhibición del crecimiento bacteriano puede ser causada por interacciones aditivas, sinérgicas o antagonistas entre los componentes fitoquímicos de los AEs, incluso a bajas concentraciones (Adelakun *et al.*, 2016).

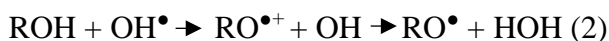
2.3.4. Propiedades antioxidantes

La actividad antioxidante de los AEs es otra propiedad biológica de gran interés, ya que pueden preservar los alimentos de los efectos tóxicos de los oxidantes (Miguel, 2010a). En general, las propiedades antioxidantes y eliminadoras de radicales de los extractos de plantas se asocian con la presencia de compuestos fenólicos que poseen la capacidad de donar hidrógeno al radical. Un gran número de compuestos fenólicos simples, pueden actuar como antioxidantes; sin embargo, su propiedad antioxidante depende de algunos prerequisites estructurales importantes, en particular del número y la disposición de los grupos hidroxilo, del grado de conjugación estructural y la presencia de donantes y receptores de electrones subsistentes en la estructura del anillo (Albayrak y Aksoy, 2012).

Javan y Javan (2014) sugieren dos vías posibles de reacción a través de las cuales los compuestos fenólicos pueden eliminar los radicales libres, en primer lugar, mediante la rápida donación del átomo de hidrógeno a una forma radical, formando un nuevo radical, más estable que el inicial (mecanismo que conduce a la ruptura directa del enlace O-H).



En segundo lugar, por el mecanismo de rotura de cadena, mediante el cual el antioxidante primario dona un electrón al radical libre presente en el sistema (por ejemplo, lípido u otro radical), dando lugar a una abstracción indirecta de H.



Cualquiera que sea el mecanismo implicado, los radicales formados necesitan ser relativamente estables, de modo que las reacciones 1 y 2 podrían ser termodinámicamente favorables, en el sentido de que es más fácil eliminar un átomo de hidrógeno de R-OH que de H-OH, y reacciona lentamente con otras moléculas, sin tener efectos tóxicos como es el estrés oxidativo.

Por lo tanto, y en función de su modo de acción, los antioxidantes pueden clasificarse como primarios y secundarios o co-antioxidantes. Los antioxidantes primarios son capaces de donar un átomo de hidrógeno rápidamente a un radical lipídico, formando un nuevo radical, que es más estable. Los antioxidantes secundarios reaccionan con los radicales iniciadores (o inhiben las enzimas iniciadoras), o reducen el nivel de oxígeno (sin generar especies radicales reactivas) (Miguel, 2010a).

Por otro lado, componentes terpenoides no fenólicos comunes en los AEs como el limoneno, linalool y citral, reaccionan con los radicales peroxilo del cumeno con

constantes de velocidad bastante bajas en comparación a los antioxidantes fenólicos (Baschieri *et al.*, 2017).

2.3.5. Aplicación de los aceites esenciales

Los AEs se han utilizado desde la antigüedad en los alimentos, la agricultura y la medicina; con diferentes fines, como antimicrobianos, como agentes aromatizantes, como insecticidas y en aplicaciones cosméticas (Sultanbawa, 2016). En la industria alimentaria pueden tener posibles aplicaciones: como saborizantes en bebidas carbonatadas y refrescos cítricos; como constituyentes de envases con actividad antimicrobiana (Adelakun *et al.*, 2016). A este respecto, se han realizado estudios en los que se propone el uso de AEs para mejorar la vida útil de la carne en uso combinado con nisina, *biofilm* o envasado al vacío; en pescado, frutas y vegetales en uso combinado con envasado en atmósfera modificada o *biofilm*; y en productos alimenticios a base de cereales en uso combinado con un envasado en atmósfera modificada (Dini, 2016); como constituyentes de envases y películas comestibles a base de caseinato de sodio como protectores de la oxidación del aceite de girasol (Atarés *et al.*, 2010); como agentes antimicrobianos para la conservación de alimentos y bebidas en forma de nanoemulsiones (Sugumar *et al.*, 2016); como repelente frente a varias especies de insectos y otros tipos de artrópodos, en productos alimenticios como granos almacenados, frutas y otros materiales celulósicos vulnerables a la infestación por diversas plagas. Para ello se mezclan con materiales fijadores con el fin de incrementar el tiempo de efectividad, ya que disminuye su tasa de volatilidad (Adelakun *et al.*, 2016).

2.4. Emulsiones

Una emulsión es una dispersión de un líquido (la fase dispersa, discontinua o interna) como pequeñas gotitas esféricas en otro líquido inmisible circundante (la fase continua o externa), generalmente aceite y agua (Dickinson, 2009). Las emulsiones se clasifican típicamente según la distribución espacial de las fases de aceite y agua entre sí. Los dos tipos principales de emulsiones son aceite en agua (O/W) y agua en aceite (W/O) (McClements, 2010). Las emulsiones alimentarias del tipo O/W serían la leche, la crema, los aderezos, la mayonesa, las sopas, las salsas y las bebidas lácteas. Ejemplos del tipo W/O son la mantequilla y la margarina (Berton-Carabin y Schroën, 2015). Hay

emulsiones más complejas que constan de tres o más fases, son las emulsiones múltiples. Los dos tipos principales son, emulsiones dobles de agua en aceite en agua (W1/O/W2) y aceite en agua en aceite (O1/W/O2), que son más adecuadas que las simples para encapsular compuestos (Tatar *et al.*, 2017).

2.4.1. Formación de la emulsión

Para crear una emulsión normalmente se requiere energía para aplicar fuerzas de cizalla que dividan la fase dispersa en pequeñas gotas en la fase continua, dando como resultado un aumento en el área interfacial del sistema. La barrera de energía para esta expansión de superficie es la energía interfacial libre o tensión interfacial, cuya reducción se consigue mediante el uso de emulsionantes que se adsorben en la interfase y alteran los enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua (Wilde, 2009). La ruptura de gotas se produce en distintas etapas, la deformación y ruptura de las gotas, seguida por la estabilización desde la adsorción de emulsionantes a la interfase recién producida. Si la interfase no se estabiliza antes de que otra gota colisione con ella, las gotas pueden unirse y formar una de mayor tamaño (Lee *et al.*, 2013).

La presión de Laplace (ΔP_L), es responsable de mantener la forma esférica de la gota, y está determinada por la ecuación: $\Delta P_L = 2\gamma/r$; donde ΔP_L aumenta si el tamaño de la gota (r : radio) disminuye, por lo que para deformar las gotitas más pequeñas se debe usar una mayor energía en el proceso de formación de la emulsión. Por otro lado, ΔP_L tiende a decrecer con la disminución de la tensión interfacial (γ), por lo que la adición de tensioactivos y emulsionantes disminuye la cantidad de energía necesaria para la formación de emulsiones (Santana *et al.*, 2013).

La homogeneización o emulsificación es el proceso de convertir dos líquidos inmiscibles en una emulsión, por extensión, los dispositivos mecánicos utilizados en esta operación se denominan homogeneizadores (Pichot, 2010). La formación de un tipo particular de emulsión alimentaria puede implicar el uso de una homogeneización primaria, directamente a partir de dos líquidos inmiscibles, utilizando un tipo de homogeneizador primario como un mezclador de alto cizallamiento y una homogeneización secundaria de la emulsión preexistente, utilizando otro tipo de homogeneizador como el de válvulas de alta presión (McClements, 2016) (Figura 2. 7).

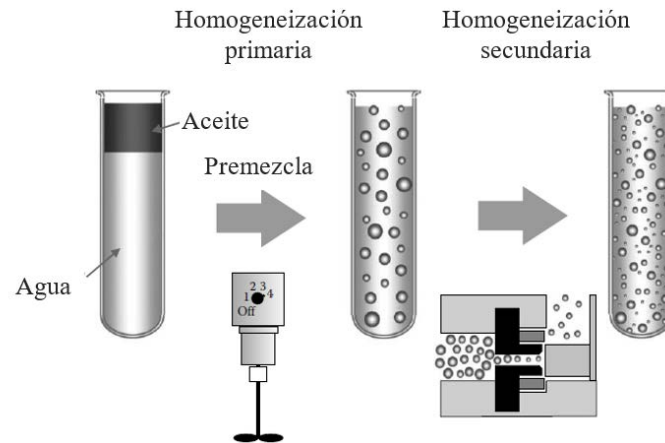


Figura 2. 7. Etapas de formación de una emulsión. Fuente: McClements (2016).

2.4.2. Dispositivos de homogeneización

Se dispone de una gran variedad de homogeneizadores diferentes, basados en procesos mecánicos como los sistemas de rotor-estator, los homogeneizadores de válvula de alta presión, de ultrasonidos y de membrana (Schubert *et al.*, 2009). En muchas aplicaciones, se combinan dos técnicas, por ejemplo, el rotor-estator o dispersor de alta cizalla y el homogeneizador de alta presión o de ultrasonido (Turchiuli *et al.*, 2013). La elección de un tipo particular de homogeneizador y de las condiciones de operación utilizadas, depende de las características de los materiales que se homogeneizan (viscosidad, tensión interfacial o sensibilidad al cizallamiento) y de las propiedades finales requeridas de la emulsión (concentración y tamaño de las gotas, viscosidad) (McClements, 2010).

2.4.2.1. Sistemas de rotor-estator

Los dispositivos rotor-estator consisten en un disco estático (estator) y un disco giratorio (rotor), donde todos los ingredientes se mezclan a altas velocidades de rotación, entre 1000 y 25000 rpm (Santana *et al.*, 2013). El fluido, al entrar en el centro del sistema, se acelera por la acción del rotor, sometiéndolo a altas fuerzas tangenciales. Luego sale a través de las aberturas radiales del rotor hasta el espacio entre el rotor y el estator donde surgen altas fuerzas de corte y flujo turbulento, permitiendo la disrupción de las gotitas (Turchiuli *et al.*, 2013) (Figura 2. 8). La eficacia del mezclador depende de su capacidad para recircular la mezcla a través del recipiente y, por lo tanto, de su diseño. El tamaño

de las gotas de la emulsión está en función de la velocidad de rotación y/o el tiempo de emulsificación (Pichot, 2010), siendo del orden de 1 a 2 μm de diámetro (Friberg *et al.*, 2004; Santana *et al.*, 2013).

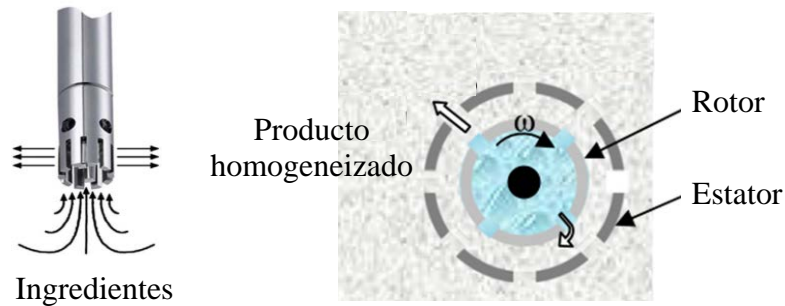


Figura 2. 8. Principio de formación de la emulsión en dispersores rotor-estator. Fuente: Adaptado de Balcão *et al.* (2015) y Turchiuli *et al.* (2013).

2.4.2.2. Homogeneizadores de válvula de alta presión

En los homogeneizadores de alta presión el fluido denominado emulsión gruesa, es forzado, con una bomba de desplazamiento positivo, a través de un pequeño orificio entre la válvula y el asiento (Figura 2. 9), finalmente el fluido sale del homogeneizador a baja velocidad y a presión atmosférica. La presión de funcionamiento se controla ajustando la distancia entre la válvula y el asiento (Friberg *et al.*, 2004).

El gradiente de presión resultante entre la entrada y la salida de la válvula genera intensas fuerzas de corte y tensión extensional a través del espacio de la válvula. La energía cinética, generada por la energía de presión aplicada, es responsable de la disrupción de las partículas en el rango submicrométrico (Santana *et al.*, 2013). En este proceso de alta presión, la emulsificación es causada por turbulencia, efectos de cavitación y fuerzas de alto cizallamiento (Balcão *et al.*, 2015).

Además de la presión, otros parámetros operativos como la temperatura, el número de pases, el diseño de la válvula y el impacto y el caudal, también podrían afectar la eficiencia de los homogeneizadores de alta presión (Su, 2008). El efluente del homogeneizador normalmente se enfría para minimizar el daño térmico al producto causado por el calor de fricción generado debido a la alta velocidad del fluido que eleva la temperatura del producto entre 2,0 y 2,5 $^{\circ}\text{C}$ por 10 MPa (Diels y Michiels, 2006).

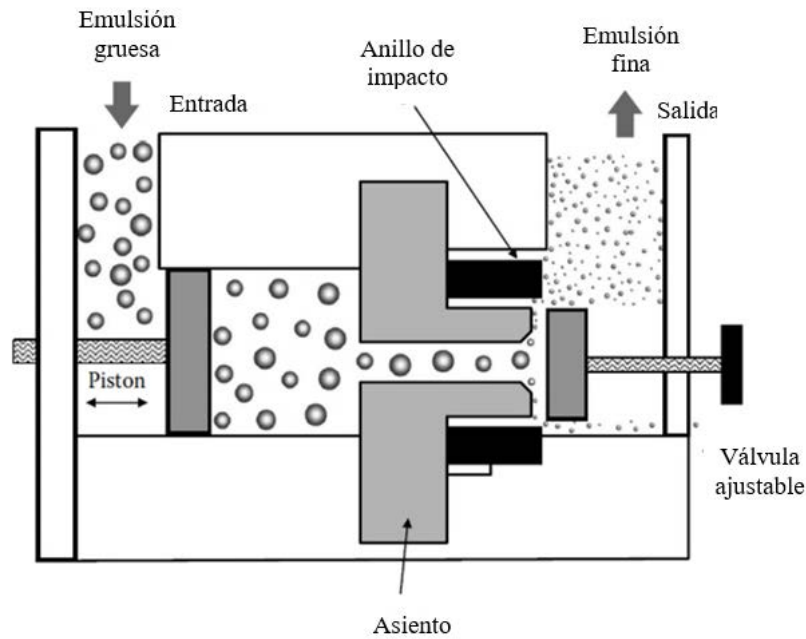


Figura 2. 9. Esquema de homogeneizador de válvulas de alta presión. Fuente: McClements (2016).

En la industria láctea, el producto puede pasar a través de una segunda válvula, ya que, aunque la mayor parte de la reducción del glóbulo graso se lleva a cabo en la primera etapa, existe una tendencia al agrupamiento de los glóbulos de grasa debido a la cobertura superficial incompleta de la proteína y la válvula de la segunda etapa permite la separación de esos grupos en glóbulos grasos individuales (Goff, 2013).

Desde que en el año 1900 Auguste Gaulin presentó la homogeneización para su aplicación en la industria láctea (Diels y Michiels, 2006; Donsì *et al.*, 2009; Hayes y Kelly, 2003; Patrignani y Lanciotti, 2016), utilizando presiones de hasta 30 MPa, la homogeneización convencional extendió el rango de presión hasta 50 MPa (Dong *et al.*, 2015; Martínez-Monteagudo *et al.*, 2016; Patrignani y Lanciotti, 2016), o entre ~20-60 MPa (Dumay *et al.*, 2013). Actualmente se cuentan con homogeneizadores que trabajan a 150-200 MPa y se denominan de alta presión u homogeneización a ultra alta presión (UHPH) cuando la presión es de 200-400 MPa (Dong *et al.*, 2015; Dumay *et al.*, 2013; Martínez-Monteagudo *et al.*, 2016; Patrignani y Lanciotti, 2016). La principal diferencia entre estas tecnologías es la presión del proceso, que está en función de la geometría de la válvula, el tamaño de la abertura y la velocidad de flujo (Martínez-Monteagudo *et al.*, 2016). La tecnología de homogeneización a alta presión, tiene una geometría de cámara de reacción

diferente que puede soportar presiones 10 a 15 veces más altas que los homogeneizadores clásicos (Diels y Michiels, 2006). La diferencia en el tamaño de gota se relaciona directamente con la densidad de energía, así cuanto mayor es la densidad de energía, más pequeñas son las gotas (Su, 2008).

2.4.3. Emulsificantes o emulsionantes

Los emulsionantes son moléculas de superficie activa que se absorben en la superficie de gotitas recién formadas durante la homogeneización, formando una membrana protectora, que evita que las gotas se acerquen lo suficiente como para agruparse (O' Dwyer *et al.*, 2013; Piorkowski y McClements, 2013). Los emulsionantes son sustancias que poseen dos grupos distintos en la misma molécula, un grupo hidrofóbico y un grupo hidrofílico; por lo que se denominan moléculas anfifílicas, las cuales disminuyen la tensión interfacial y, por lo tanto, facilitan la disrupción de las gotitas (Balcão *et al.*, 2015).

Generalmente, se distinguen dos categorías principales de emulsionantes, los emulsionantes de bajo peso molecular (LMWE) y los biopolímeros anfifílicos. Los LMWE, como los monoacilgliceroles y polisorbatos, constan de una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica, que generalmente contiene al menos una cadena de acilo. Los biopolímeros anfifílicos utilizados como emulsionantes alimenticios están constituidos principalmente por proteínas (Berton-Carabin y Schroën, 2015).

Un sistema emulsionante eficaz debe cumplir una serie de criterios para evitar la coalescencia de las gotas y garantizar una buena estabilidad de la emulsión: (1) debe estar presente en una concentración suficiente para cubrir toda la superficie de aceite-agua formada; (2) debe recubrir rápidamente la superficie de las gotas formadas, antes que éstas colisionen entre sí; y (3) las moléculas emulsionantes adsorbidas deben formar un revestimiento que evite que las gotas se acerquen y se fusionen (Pittia y Gharsallaoui, 2015); así el tamaño de las gotitas producidas durante la homogeneización también depende de las características del emulsionante (McClements, 2016).

Para conferir estabilidad a largo plazo, este polímero debe estar presente a una concentración suficiente para cubrir completamente la interfase aceite-agua y debe permanecer permanentemente unido a la superficie, con al menos una parte de la molécula que sobresale de la superficie en el medio acuoso. La estabilización estérica se complementa, cada vez más, con la estabilización electrostática en emulsiones que

contienen proteínas adsorbidas a valores de pH muy alejados del punto isoeléctrico (pI) de la proteína (Dickinson, 2009).

2.4.3.1. Caseinato de sodio

Ciertas proteínas activas en la superficie se usan como emulsionantes debido a su capacidad para absorberse en una interfase, ayudar a la formación de la emulsión, reducir la tensión superficial, proporcionar una capa viscoelástica, mejorar la estabilidad, repeler los metales de transición de las gotas de lípidos y producir propiedades fisicoquímicas deseables durante el procesamiento, almacenamiento y utilización de la emulsión (O' Dwyer *et al.*, 2013).

Los caseinatos son considerados buenos emulsificantes porque son hidrosolubles, tienen cadenas parcialmente extendidas y un alto grado de separación entre cadenas hidrófilas e hidrófobas (Cretu *et al.*, 2009). El caseinato de sodio (NaCas) es ampliamente utilizado como emulsionante (Farfán *et al.*, 2015). Se produce por precipitación de la leche a una acidez próxima al punto isoeléctrico de la caseína (pI a pH 4,6), seguida de la neutralización del precipitado con hidróxido sódico (Ritzoulis *et al.*, 2015). Deriva de la caseína micelar que está compuesta por cuatro proteínas principales (α_{s1} , α_{s2} , β y κ caseína), la α_{s1} y β caseína constituyen la mayor fracción de la proteína y son las principales responsables de la propiedad emulsionante de NaCas (Sharma *et al.*, 2017), que a su vez está relacionada con su alto contenido de aminoácidos hidrófobos, tales como la prolina, tirosina y triptófano, lo que la convierte en un bloque copolímero anfifílico natural (Pan *et al.*, 2014). El caseinato de sodio se dispersa en medios acuosos de pH neutro formando partículas de 20-50 nm (Ritzoulis *et al.*, 2015).

2.4.4. Estabilidad de la emulsión

La estabilidad de una emulsión es la capacidad que tiene para resistir cambios en sus propiedades a lo largo del tiempo. Una emulsión estable es aquella en la que las gotitas de la fase dispersa permanecen suficientemente pequeñas y bien separadas, de modo que el movimiento browniano las mantiene uniformemente dispersas a lo largo de la fase continua (Dickinson, 2009).

Una emulsión puede volverse inestable debido a diferentes tipos de procesos físicos y químicos. La inestabilidad física da lugar a una alteración en la distribución espacial o en la organización estructural de las moléculas, mientras que la inestabilidad química

produce una alteración en el tipo de moléculas presentes. El cremado, floculación, coalescencia, coalescencia parcial, inversión de fase y maduración de Ostwald son ejemplos de inestabilidad física, mientras que la oxidación y la hidrólisis son ejemplos comunes de inestabilidad química de las emulsiones (McClements, 2016).

2.4.4.1. Estabilidad física de las emulsiones

Para la mayoría de las emulsiones alimenticias, la estabilidad física a largo plazo es crítica (Liang *et al.*, 2014). La separación de las emulsiones puede ocurrir por diversos mecanismos, como se ilustra en la (Figura 2. 10). El cremado, la agregación (floculación y coagulación), la maduración de Ostwald y la coalescencia son los mecanismos responsables de la desestabilización de la emulsión (Petrut *et al.*, 2016).

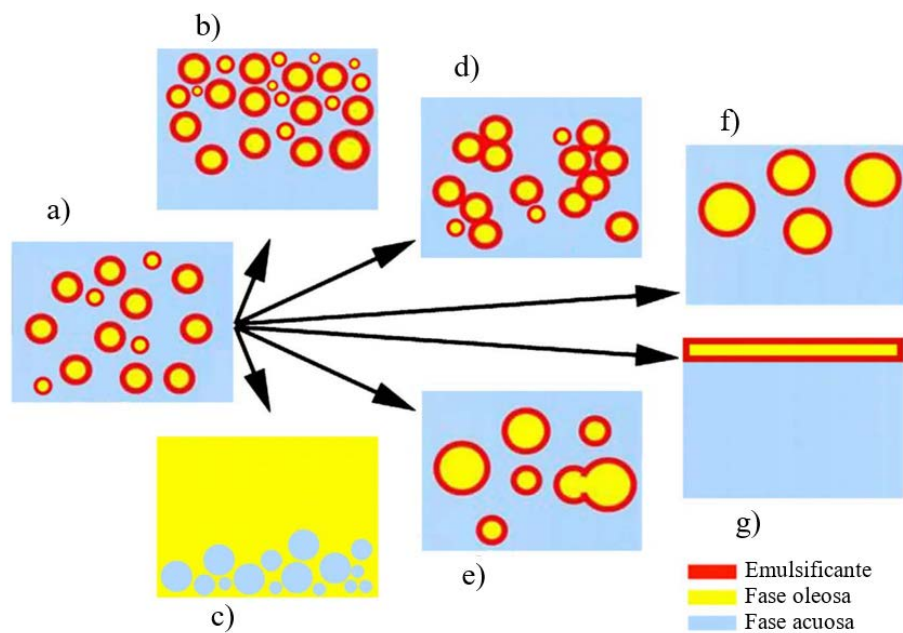


Figura 2. 10. Representación esquemática de una emulsión O/W (a) y de los procesos de inestabilidad que ocurren como el cremado (b), sedimentación (c), floculación (d), coalescencia (e), y maduración de Ostwald (f), que conducen a la separación completa (g). Fuente: Adaptado de Balcão *et al.* (2015).

El cremado/sedimentación ocurre por la diferencia de densidad entre la fase dispersa y continua (Silset, 2008), forzando el paso de la fase menos densa a la parte superior de la emulsión. La velocidad V_s de cremado de una gotita con radio r en un fluido de viscosidad η_c es estimado por la ley de Stokes:

$$V_s = \frac{2g\Delta\rho r^2}{9\eta_c}$$

donde g es la aceleración debida a la gravedad y $\Delta\rho$ es la diferencia de densidad entre la gotita y la fase continua (Wilde, 2009; Fredrick *et al.*, 2010). El cremado se puede reducir disminuyendo el tamaño de las gotitas, minimizando la diferencia de densidad entre las fases dispersa y continua o aumentando la viscosidad de la fase continua, prolongando así la vida útil de la emulsión (Wilde, 2009).

La floculación es el proceso mediante el cual dos o más gotitas se unen entre sí, para formar un agregado, en el que las gotitas conservan su integridad individual. Es el resultado del desequilibrio entre las fuerzas atractivas y repulsivas entre las gotitas, dando como resultado una fuerza de atracción neta. Puede ser causado por varios mecanismos, siendo el más común a través de fuerzas electrostáticas (Wilde, 2009; McClements, 2016). La floculación de las gotitas puede ser ventajosa o perjudicial para la calidad de la emulsión, dependiendo de la naturaleza del producto alimenticio. Por lo general, se considera como un fenómeno de inestabilidad, ya que acelera la velocidad de separación gravitatoria de las emulsiones diluidas, reduciendo su vida útil, provoca un aumento pronunciado en la viscosidad de la emulsión, e incluso puede conducir a la formación de un gel. En otros productos, la posibilidad de crear una red de flóculos de manera controlada puede ser ventajosa para modificar o controlar la textura y hacerla más deseable (Pichot, 2010).

La coalescencia puede ocurrir si dos gotas están muy cerca durante cierto tiempo, ya sea por agregación o en una capa de crema. Generalmente, una película muy delgada de la fase continua impide el contacto aceite-aceite, sin embargo, esta película puede romperse espontáneamente, si el diámetro de la película es mayor la película es más delgada y por tanto menor será la tensión interfacial de aceite-agua. Tan pronto como la película se rompe, las dos gotas se unen para formar una gota más grande. Ello se debe a que localmente la presión de Laplace es bastante alta, de forma que el aceite fluirá a lugares donde la presión es menor, por lo que adopta una forma esférica, que produce una presión de Laplace lo más baja posible (Fredrick *et al.*, 2010).

El cremado, la sedimentación y la floculación son todos fenómenos reversibles mediante la aplicación de alto cizallamiento. Un fenómeno mucho más severo e irreversible es la coalescencia, un proceso en el que las gotas se fusionan entre sí (Silset, 2008). El

cremado, la floculación y la coalescencia pueden tener lugar en paralelo o en secuencia en cada emulsión. Todos ellos conducen finalmente a la descomposición de la emulsión y la separación de fases, por lo que es esencial distinguir estos procesos y aprender a controlarlos (Su, 2008).

La maduración de Ostwald ocurre cuando la fase oleosa tiene una solubilidad apreciable dentro de la fase acuosa, es el crecimiento de grandes gotas de aceite a expensas de pequeñas gotas. Este proceso hace que las gotitas más pequeñas se contraigan y las más grandes crezcan, dando lugar, con el tiempo, a un aumento total neto en el tamaño medio de las gotitas. La maduración de Ostwald es normalmente despreciable en emulsiones alimentarias que contienen triacilglicerol de cadena larga en la fase oleosa, como aceite de maíz y de girasol, debido a que la solubilidad mutua de estos triacilglicerol y agua es tan baja que la tasa de transporte de masa es insignificante. Sin embargo, es importante en las emulsiones O/W que contienen más fases de aceite solubles en agua, por ejemplo, triacilglicerol de cadena corta y de aceites esenciales (Chang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2009).

2.4.4.2. *Estabilidad química de las emulsiones*

Existen muchos tipos de reacciones químicas o bioquímicas que pueden tener efectos adversos sobre la calidad de las emulsiones alimentarias, produciendo por ejemplo atenuación del color, pérdida del sabor, oxidación de lípidos e hidrólisis de los biopolímeros (McClements, 2016).

Las enzimas pueden utilizarse para modificar los biopolímeros utilizados como estabilizantes o emulsionantes, de manera que aumenten su estabilidad al pH, la sal y la temperatura; incrementando la funcionalidad de las emulsiones utilizadas comúnmente como vehículos de ingredientes funcionales (Zeeb *et al.*, 2014). Además, uno de los cambios químicos más importantes que ocurren en las grasas y aceites es la lipólisis, proceso en el que los enlaces éster de estos compuestos son hidrolizados por ciertas enzimas, o por una combinación de temperatura y humedad. El resultado de la lipólisis es la liberación de ácidos grasos libres, que pueden ser perjudiciales para la calidad de los alimentos, porque conduce a la generación de sabores y olores desagradables, lo que se conoce como "rancidez hidrolítica" (McClements, 2016).

Las emulsiones alimentarias pueden contener aditivos para mejorar sus atributos sensoriales, incluyendo sabor y color. Muchos de estos aditivos son susceptibles a la degradación química que puede conducir a la pérdida de la calidad general del producto. Un ejemplo serían los carotenoides (β -caroteno, zeaxantina, luteína o licopeno), que son pigmentos naturales, solubles en aceites y ampliamente utilizados en la industria alimentaria (de Paz *et al.*, 2014), pero debido a su estructura altamente insaturada son propensos a la isomerización y/o la oxidación (Courraud *et al.*, 2013).

Una de las formas más comunes de inestabilidad en los alimentos que contienen grasas es la oxidación de los lípidos. La adición de omega-3 a los sistemas alimentarios hará al producto más susceptible a la oxidación debido a su naturaleza poliinsaturada (Jacobsen, 2011). La oxidación de los lípidos conduce al desarrollo de "sabores no deseados" (rancidez) y productos de reacción potencialmente tóxicos. Además, también puede promover la inestabilidad física de algunas emulsiones, afectando así al sabor, el aroma, la textura, la vida útil y el color (Ye *et al.*, 2009). La oxidación lipídica de los aceites no solo puede producir olores rancios, sabores desagradables y decoloración; sino que también disminuyen la calidad nutricional y la seguridad, debido a los productos de degradación que producen efectos dañinos para la salud humana (Li *et al.*, 2013).

La oxidación de lípidos en emulsiones es compleja ya que pueden producirse reacciones de oxidación o transferencia de electrones en las diferentes fases del sistema; aunque las reacciones básicas de oxidación de los lípidos son exactamente las mismas que cualquier aceite (Jacobsen, 2016) y se generan a través de tres vías diferentes: 1) reacciones en cadena no enzimática mediadas por radicales libres; 2) no enzimáticas, fotooxidaciones no radicales y 3) reacciones enzimáticas (Miguel, 2010b). La primera vía conduce a la iniciación de reacciones en cadenas destructivas, de rápido crecimiento, que generan hidroperóxidos y compuestos volátiles, generalmente a través de un proceso de tres fases: iniciación, propagación y terminación. Un ejemplo de la segunda vía es la oxidación estequiométrica del ácido oleico por oxígeno singlete para producir hidroperóxidos alílicos a través de la adición de oxígeno en cada extremo del doble enlace. La tercera vía implica la acción de las lipoxigenasas en diversos sustratos (Miguel, 2010a).

La oxidación primaria es un proceso de creación de radicales libres, que resulta en la formación de hidroperóxidos. Estos productos intermedios transitorios sin olor y sabor son inestables y se descomponen durante la oxidación de lípidos para formar productos de oxidación secundaria, tales como aldehídos, cetonas, hidrocarburos y alcoholes, que

son pequeñas moléculas volátiles, asociadas a la rancidez oxidativa (O'Dwyer *et al.*, 2013).

Según las versiones tradicionales, la abstracción de hidrógeno en las reacciones en cadena de radicales libres controla la propagación, y que los hidroperóxidos son siempre el intermedio clave, no formándose los productos hasta después de que los hidroperóxidos se descompongan. Sin embargo, la química fundamental de los radicales libres demuestra que los radicales orgánicos peroxilo (LOO●) y alcoxilo (LO●), también experimentan reacciones independientes de reordenación, adición y escisión o eliminación en competencia con las abstracciones de hidrógeno en las reacciones en cadena de radicales. Esto significa que los productos finales distintos de los hidroperóxidos pueden acumularse en las primeras etapas de la oxidación de los lípidos y que los productos secundarios pueden generarse sin pasar por hidroperóxidos (Schaich, 2013).

2.4.4.3. Factores que influyen en la oxidación de lípidos en emulsiones

En las emulsiones O/W, los lípidos están dispersos en la fase acuosa rodeados por una película interfacial, en consecuencia, son varios los factores adicionales que intervienen en el proceso de oxidación lipídica (Figura 2. 11).

Es posible que los **aceites líquidos** insaturados experimenten oxidación, y esto, a su vez, puede conducir a reacciones químicas entre el aceite oxidado y un emulsionante proteínico. El efecto global de la reacción puede alterar las propiedades funcionales de la emulsión y su valor nutritivo, así como también crear sabores indeseables (Friberg *et al.*, 2004). La estabilidad oxidativa es variable entre los diferentes tipos de lípidos, por ejemplo, los ácidos grasos se oxidan más rápidamente en la forma libre que sus ésteres de glicerilo, posiblemente debido a una mayor capacidad de captar metales traza del ambiente y los fosfolípidos muestran una mayor susceptibilidad a la oxidación que los triacilglicerolos. La distribución posicional estereoespecífica de los ácidos grasos en las moléculas de triacilglicerolos tiene un rol en la susceptibilidad de los lípidos a la oxidación, se cree que la ubicación de AGPI en la posición *sn*-2 de la columna vertebral de glicerol ayuda a su estabilidad contra la oxidación (Shahidi y Zhong, 2010), de igual manera, la posición del doble enlace en un ácido graso insaturado influye en su estabilidad oxidativa, cuanto más cerca esté el doble enlace al extremo metilo, mayor será su

estabilidad. En una emulsión O/W, el lípido también es muy susceptible a la oxidación cuando se encuentra en la superficie (Adachi *et al.*, 2009).

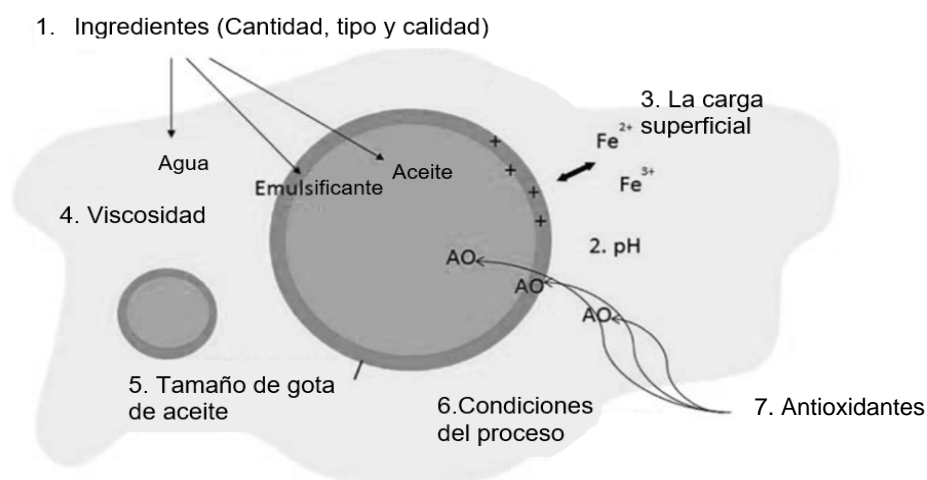


Figura 2. 11. Factores que influyen en la oxidación de los lípidos en emulsiones alimentarias. Fuente: Jacobsen (2016).

En las emulsiones, la **fase acuosa** activa o desactiva los iniciadores hidrófilos de la oxidación, permite la difusión del oxígeno atmosférico y eventualmente participa en la protección contra la oxidación (Kamal-Eldin, 2003). Además puede contener prooxidantes y antioxidantes, que normalmente no se encuentran en los aceites (Chen *et al.*, 2013).

Los **emulsionantes** pueden afectar la oxidación de lípidos de diferentes maneras. Además de influir en la estructura y el espesor de la interfase, los emulsionantes afectarán la carga de ésta (Jacobsen, 2016). Se ha demostrado que una membrana interfacial gruesa puede actuar como una barrera que disminuye la capacidad del hierro, presente en la fase acuosa, para descomponer los hidroperóxidos lipídicos, que a su vez podrían oxidar los ácidos grasos en el interior de la gota de aceite. Además, la interfase de las gotas de la emulsión O/W con una carga catiónica puede inhibir la oxidación de los lípidos al repeler electrostáticamente los metales prooxidativos de los lípidos en el núcleo de la gota de la emulsión (Shaw *et al.*, 2007). El grosor de la interfase depende del tamaño y de la conformación del grupo de la cabeza y cola del emulsionante o de las condiciones en las que los biopolímeros pueden formar capas alrededor de las gotas de emulsión (Waraho *et al.*, 2011).

El **pH** afecta la estabilidad química de las emulsiones de diferentes formas, incluida la reactividad, la solubilidad, la partición y las interacciones de varias especies reactivas. La oxidación de lípidos generalmente produce una disminución del pH en sistemas no tamponados, debido a la formación de ácidos volátiles y no volátiles. Un aspecto principal de la intervención del pH sobre la estabilidad oxidativa de la emulsión es su influencia sobre la solubilidad, estabilidad química y el estado redox de los iones metálicos y antioxidantes (Kamal-Eldin, 2003). Prácticamente todos los alimentos contienen cierta cantidad de metales traza y la solubilidad de éstos generalmente aumentan al disminuir el pH, lo que potencialmente puede promover la oxidación (Jacobsen, 2011). La proteína en la interfase de la gota de aceite aumenta la estabilidad de la emulsión, impartiendo una carga eléctrica en la superficie de la gota cuando el pH no es equivalente al punto isoeléctrico de la proteína (Hu *et al.*, 2004). Las gotas de emulsión recubiertas de proteína son aniónicas a valores de pH superiores a su punto isoeléctrico y catiónicas a valores de pH inferiores (Chen *et al.*, 2013).

Cuando las gotas de la emulsión tienen una **carga superficial** negativa, atraerán los metales traza altamente pro-oxidativos cargados positivamente, promoviendo la oxidación de lípidos. Por el contrario, las gotas cargadas positivamente pueden repeler a los metales traza y es probable que la oxidación se reduzca (Jacobsen, 2016). Los metales de la fase acuosa interactúan con los hidroperóxidos (LOOH), que se concentran en la superficie de la gota, y producen radicales peroxilo (LOO●) y alcoxilo (LO●). El hierro, metal de transición, es un fuerte prooxidante y su capacidad para descomponer los hidroperóxidos depende de su ubicación en relación con la superficie de la fase lipídica emulsionada, ya que la oxidación generalmente ocurre en la interfase aceite-agua (Charoen *et al.*, 2012).

La estructura de la emulsión se determina principalmente por la distribución del **tamaño** de las gotas de aceite, usualmente, se prefiere un tamaño pequeño de gota de aceite para aumentar la estabilidad física de las emulsiones, que por otra parte favorece la formación de un área interfacial grande, sugiriéndose que la oxidación de lípidos se inicia en esta interfase (Jacobsen, 2011); también aumenta la relación entre los ácidos grasos oxidables localizados cerca de la interfase y los integrados en el núcleo hidrofóbico, lo que incrementa la velocidad de oxidación. Sin embargo, cuando el tamaño de gota disminuye, el número de moléculas de lípidos por gota también disminuye y eso podría limitar las cadenas de propagación; la adsorción de compuestos tensioactivos en la interfase también

se ve favorecida, dando como resultado membranas que podrían proteger a los lípidos, al actuar como barreras a la penetración y difusión de las moléculas que inician la oxidación de los lípidos (Kamal-Eldin, 2003). En general, la investigación sugiere que el tamaño de gota de la emulsión, y por lo tanto el área superficial interfacial, tiene un impacto mínimo en las tasas de oxidación en emulsiones (Chen *et al.*, 2013; Waraho *et al.*, 2011).

El **proceso de emulsificación**, que implica la agitación mecánica intensa durante la homogeneización del aceite y la fase acuosa, con homogeneizadores de válvula de alta presión o molinos coloidales, puede promover la oxidación de lípidos debido al alto esfuerzo cortante, la elevación de la temperatura local, la incorporación de oxígeno y la creación de un gran área superficial interfacial. Cuando los lípidos se dispersan en la fase acuosa de una emulsión O/W, las tasas de oxidación son generalmente más altas que las encontradas en los aceites sin emulsionar. Por lo tanto, los parámetros de la emulsificación deben optimizarse para limitar el aumento de la temperatura y la incorporación de aire (Kamal-Eldin, 2003).

La adición de **antioxidantes** es un posible medio para inhibir la oxidación de los lípidos, pero debido a la complejidad de las emulsiones alimentarias, un gran número de factores puede afectar su eficacia. En las emulsiones, el antioxidante se dividirá en la fase oleosa, en la fase acuosa o en la interfase (Jacobsen, 2016). La presencia de una interfase puede permitir que el aceite y los componentes solubles en agua interactúen (Waraho *et al.*, 2010). En 1980, Porter citado por Decker *et al.* (2017) propuso la paradoja polar, que establecía que los antioxidantes polares funcionan mejor en aceites, mientras que los antioxidantes no polares son más efectivos en emulsiones de aceite en agua, debido a que los antioxidantes polares con solubilidad significativa en agua se ubicarían en la fase acuosa de las emulsiones, no pudiendo interactuar con los radicales de ácidos grasos no polares. En el caso de los antioxidantes no polares se retendrían en la gota de la emulsión, donde pueden eliminar radicales libres solubles en lípidos. Por lo tanto, sugirió que la química de la oxidación está en la interfase de las gotas de lípidos y que los antioxidantes que residen allí serían los más efectivos.

2.4.5. Potenciales aplicaciones de las emulsiones en alimentos

Las aplicaciones potenciales de las emulsiones O/W en la industria alimentaria son diversas, como la producción de productos bajos en calorías y grasas, para enmascarar

sabores extraños, para la prevención de oxidación, la protección por encapsulación y liberación de ingredientes volátiles o sensibles (sabores, minerales, vitaminas, etc.), la mejora de las características sensoriales y la protección de compuestos bioactivos (Giroux *et al.*, 2013). Adicionalmente se aplican en películas o films de recubrimiento comestibles (Wijaya *et al.*, 2017).

De manera específica, las emulsiones se aplican en bebidas o alimentos fortificados en los que se encapsula vitamina E (Raikos, 2017) o sustancias carotenoides (Chaari *et al.*, 2018). A las bebidas, también se les agrega AEs como saborizantes, en las que primero se prepara un concentrado de emulsión y luego se diluye en una solución de azúcar (Friberg *et al.*, 2004). En otros alimentos, como la lechuga, se ha estudiado la adición de AEs incorporados en nanoemulsiones, como una alternativa natural a los productos químicos en el control de seguridad de los productos (Bhargava *et al.*, 2015). Igualmente se han aplicado emulsiones con ácidos grasos esenciales omega-3 de diferentes orígenes en queso (Calligaris *et al.*, 2015; Ye *et al.*, 2009), o como vehículo de componentes antioxidantes en el queso Chihuahua durante su proceso y su maduración (Pimentel-González *et al.*, 2015).

2.5. Queso

Según el Real Decreto 1113/2006, se entiende por queso el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido de la leche, de la leche total o parcialmente desnatada, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, coagulados total o parcialmente por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, antes del desuerado o después de la eliminación parcial de la parte acuosa, con o sin hidrólisis previa de la lactosa, siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche. También según este Real Decreto se entiende por queso fresco el que está dispuesto para el consumo al finalizar el proceso de fabricación (España, 2015).

Los quesos frescos se pueden obtener mediante distintos procesos. En el método tradicional, a la leche pasteurizada se añade cuajos y/o fermentos y una vez coagulada la cuajada se corta para favorecer la eliminación del suero (desuerado), se vierte en moldes para dar forma al queso y ayudar a que los gránulos de la cuajada se aglomeren, y posteriormente se envasa (Ramírez-López y Vélez-Ruiz, 2012). Los quesos frescos se

caracterizan por ser blandos, blancos, de pH casi neutro y con 60 a 80% de contenido de humedad (Evert-Arriagada *et al.*, 2013).

2.5.1. Producción y consumo queso

La producción de queso en España según datos del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (Tabla 2. 9), presenta en los últimos años, tanto en la producción total de queso como en la de queso fresco, una tendencia al alza, apreciándose cierta estabilización entre el año 2015 y 2016, siendo el queso fresco el principal producto en esta categoría (MAPAMA, 2017a).

Tabla 2. 9. Producción total de queso y queso fresco en España (miles t).

Año	Queso total	Queso fresco
2012	322,6	127,8
2013	361,9	143,4
2014	387,7	153,6
2015	467,1	185,1
2016	461,0	182,7

Fuente: Adaptado de MAPAMA (2017a).

En la Tabla 2. 10, se presenta el consumo de diferentes quesos en España desde el año 2008 al 2016, donde el queso fresco es el de mayor consumo. En el año 2014 el queso fresco, fue el más vendido con un volumen de ventas de 100.394,18 t, que corresponde al 28,9% del total. No obstante, hubo un retroceso en el consumo per cápita a lo largo de este periodo en 6,9%, situándose en 2,24 kg/persona/año (MAGRAMA, 2015). El consumo per cápita de queso durante el año 2015 fue de 7,78 kg, se incrementó de forma muy leve un 0,3% en comparación con el año 2014, aunque la compra de queso fresco en los hogares se redujo un 2,7% (MAGRAMA, 2016). En el año 2016 el consumo per cápita de queso fue de 8,02 kg, siendo el consumo de queso fresco de 2,22 kg/persona/año, produciéndose el mayor consumo en hogares con más de tres personas y con hijos medianos y pequeños. Las Islas Canarias, la Región de Murcia y el Principado de Asturias fueron las comunidades autónomas con un mayor consumo. Por el contrario, Navarra, País Vasco y La Rioja se sitúan como las CCAA con menor consumo relativo (MAPAMA, 2017b).

Tabla 2. 10. Evolución del consumo de queso en España (miles t).

Año	Fresco	Semi curado	Fundido	Tierno	Curado	Oveja	Otros	Total
2008	107,3	67,8	42,3	24,1	16,1	15,6	65,8	339
2009	106,5	67,7	43	24,2	16,2	15,7	65,7	339
2010	112,6	74,8	42,8	22,2	15,9	17,2	74,5	360
2011	116,7	77,8	42,2	22,7	16,3	17,3	75,0	368
2012	113,3	77	43,5	21,4	17,5	17,2	76,1	366
2013	109,1	77,9	43,8	22,2	17,9	18,6	75,5	365
2014	100,4	78,5	41,8	19,6	17,2	17,7	72,8	348
2015	97,7	78,2	43,1	20,1	17,3	17,4	73,2	347
2016	97,8	82,3	41,6	21,9	17,3	17,6	73,5	352

Fuente: Statista (2018).

2.5.2. Variantes de queso

El creciente interés, por parte de los consumidores, en productos alimenticios que contienen menos grasas saturadas, ha incentivado a la investigación y la producción de variantes de queso bajos en grasa, en los que los ingredientes lácteos son parcial o totalmente sustituidos, como se describe a continuación.

2.5.2.1. Queso de imitación/análogos

El queso de imitación es un término que generalmente se aplica a los productos fabricados mezclando agua, aceite vegetal y proteínas, generalmente cuajo de caseína, en presencia de sales emulsionantes para obtener un producto homogéneo que tenga propiedades similares al queso (El-Bakry *et al.*, 2010).

Los análogos de queso son productos similares al queso, en los que la grasa de la leche, la proteína de la leche o ambas se sustituyen total o parcialmente por componentes no basados en la leche. Se fabrican mezclando varias grasas/aceites comestibles, proteínas, otros ingredientes y agua en una mezcla uniforme y homogénea con ayuda de calor, cizalla mecánica y sales emulsionantes (Cunha *et al.*, 2010), con técnicas similares a las de la fabricación del queso fundido (Bachmann, 2001).

2.5.2.2. Queso con bajo contenido en grasa

Desde hace varias décadas hay presencia en el mercado de productos reducidos en grasa, y continuamente surgen nuevos productos que permiten a los consumidores limitar su consumo de grasas dentro de los niveles recomendados. La cantidad de ingesta de grasas se considera igualmente importante para el equilibrio de ácidos grasos saturados a insaturados, por lo que las dietas abundantes en grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas se consideran saludables (Farbod *et al.*, 2014). El término “queso bajo en grasa” abarca una amplia gama de quesos, incluidos quesos blandos, semiduros y duros, muchos de estos productos son aceptados por los consumidores como productos deseables. Estos productos a menudo difieren sustancialmente de los quesos con grasa total, ya que la proporción de humedad/caseína, el pH y la sal/humedad, son factores que influyen en los cambios bioquímicos y microbiológicos que controlan el desarrollo del sabor y la textura (Banks y Weimer, 2007).

2.5.2.3. Quesos fortificados

La fortificación de los alimentos con ácidos grasos omega-3 es una de las tendencias de crecimiento más rápido en la industria alimentaria (Hughes *et al.*, 2012). Los derivados lácteos, como el queso, podrían ser buenos candidatos para dicha fortificación, ya que la mejora de sus propiedades saludables tendría un gran impacto en una gran parte de la población, debido a su alta frecuencia de consumo. La adición en la leche de diferentes aceites que contienen naturalmente ácidos grasos omega-3, antes de la elaboración del queso, es una de las estrategias más empleadas (Calligaris *et al.*, 2015). Esta adición puede ser directa o formando parte de una emulsión. Por otro lado, la sustitución de la grasa de la leche con aceites vegetales también puede contribuir a un equilibrio más saludable de grasas saturadas/insaturadas en el queso (Stratulat *et al.*, 2015).

A continuación, en la Tabla 2. 11 se presentan quesos enriquecidos con omega-3 de diferentes orígenes, en los que para su elaboración la grasa butírica fue sustituida por grasa de otro origen y quesos de imitación, en cuya elaboración no se utiliza leche.

Tabla 2. 11. Quesos fortificados o con sustitución de grasa láctea y quesos de imitación.

Tipo de queso	Grasa/aceite	Leche	Referencia
Queso fresco	Aceite de canola	Sí, desnatada	Lobato-Calleros <i>et al.</i> , 2007
Queso fresco	Aceite de hígado de bacalao, ácidos grasos palmítico y esteárico	Sí, desnatada	Calligaris <i>et al.</i> , 2015
Queso Feta iraní	Mantequilla, aceite de oliva y de pescado	No	Farbod <i>et al.</i> , 2014
Requeijão cremoso	Grasa vegetal hidrogenada	Sí, entera	Cunha <i>et al.</i> , 2010
Cheddar	Aceite linaza	Sí, desnatada	Stratulat <i>et al.</i> , 2015
Queso fundido	Aceite de soya y aceite de pescado	No	Ye <i>et al.</i> , 2009
Queso fundido	Aceite de palma hidrogenado y aceite de colza	No	El-Bakry <i>et al.</i> , 2010

2.6. Referencias

- Adachi, S., Minten, S., y Kobayashi, T. 2009. Oxidation of Lipid in Bulk and Dispersion Systems. *Japan Journal of Food Engineering*, 10: 9-15.
- Adelakun, O. E., Oyelade, O. J., y Olanipekun, B. F. 2016. Use of essential oils in food preservation. *En Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. V.R. Preedy, editor. Elsevier Inc., London. 71-84.
- Ahmad Mir, S., Ahmad Masoodi, F., y Raja, J. 2017. Influence of natural antioxidants on microbial load, lipid oxidation and sensorial quality of rista—A traditional meat product of India. *Food Bioscience*, 20: 79-87.
- Albayrak, S. y Aksoy, A. 2012. Essential oil composition and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus cappadocicus* Boiss. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37: 605-614.
- Alcock, J. y Lin, H. C. 2015. Fatty acids from diet and microbiota regulate energy metabolism. *F1000Research*, 4: 1-11.
- Alma, M. H., Ertaş, M., Nitz, S., y Kollmannsberger, H. 2007. Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.). *BioResources*, 2: 265-269.
- Annunziata, A. y Vecchio, R. 2011. Functional foods development in the European market: A consumer perspective. *Journal of Functional Foods*, 3: 223-228.
- Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., y Chalier, P. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in*

- Applied Microbiology*, 43: 149-154.
- Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Mousadik, A. El, Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R., y Elaissari, A. 2015. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483: 220-243.
- Atarés, L., Bonilla, J., y Chiralt, A. 2010. Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 100: 678-687.
- Ayerza, R y Coates, W. 2009. Some Quality Components of four Chia (*Salvia hispanica* L.) Genotypes Grown under Tropical Coastal Desert Ecosystem Conditions. *Asian Journal of Plant Sciences*, 8: 301-307.
- Ayerza, R. 2009. The seed's protein and oil content, fatty acid composition, and growing cycle length of a single genotype of chia (*Salvia hispanica* L.) as affected by environmental factors. *Journal of Oleo Science*, 58: 347-354.
- Ayerza, R. 2011. The seed's oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) var. Iztac 1, grown under six tropical ecosystems conditions. *Interciencia*, 36: 620-625.
- Ayerza, R. 2013. Seed composition of two chia (*Salvia hispanica* L.) genotypes which differ in seed color. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25: 495-500.
- Bachmann, H. P. 2001. Cheese analogues: A review. *International Dairy Journal*, 11: 505-515.
- Balcão, V. M., Glasser, C. A., Chaud, M. V., y Vila, M. M. D. C. 2015. Water-in-Oil-in-Water Nanoencapsulation Systems. *En Microencapsulation and Microspheres for Food Applications*. L.M.. Sagis, editor. Elsevier, London. 95-129.
- Banks, J. y Weimer, B. 2007. Producing low fat cheese. *En Improving the Flavour of Cheese*. Bart C. Weimer, editor. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 520-536.
- Baschieri, A., Ajvazi, M. D., Tonfack, J. L. F., Valgimigli, L., y Amorati, R. 2017. Explaining the antioxidant activity of some common non-phenolic components of essential oils. *Food Chemistry*, 232: 656-663.
- Baser, K. H. C. 2008. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design*, 14: 3106-3120.
- Beena, Kumar, D., y Rawat, D. S. 2013. Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23: 641-645.
- Berton-Carabin, C. C. y Schroën, K. 2015. Pickering Emulsions for Food Applications: Background, Trends, and Challenges. *Annual Review of Food Science and*

Technology, 6: 263-297.

- Betoret, E., Betoret, N., Vidal, D., y Fito, P. 2011. Functional foods development: Trends and technologies. *Trends in Food Science and Technology*, 22: 498-508.
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., y Sinigaglia, M. 2012. Use of natural antimicrobials and high pressure homogenization to control the growth of *Saccharomyces bayanus* in apple juice. *Food Control*, 24: 109-115.
- Bhagat, U. y Das, U. N. 2015. State of the art paper Potential role of dietary lipids in the prophylaxis of some clinical conditions. *Archives of Medical Science*, 4: 807-818.
- Bhargava, K., Conti, D. S., da Rocha, S. R. P., y Zhang, Y. 2015. Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. *Food Microbiology*, 47: 69-73.
- Bigliardi, B. y Galati, F. 2013. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science and Technology*, 31: 118-129.
- Bockisch, M. ed. 1998. Vegetable Fats and Oils. *En Fats and Oils Handbook*. AOCS Press, Illinois. 174-214.
- Bogue, J., Collins, O., y Troy, A. J. 2017. Market analysis and concept development of functional foods. *En Developing New Functional Food and Nutraceutical Products*. D. Bagchi y S. Nair, editores. Elsevier Inc., London. 29-45.
- Boskou, D. 2006. Characteristics of the Olive Tree and Olive Fruit. *En Olive Oil Chemistry and Technology*. D. Boskou, editor. AOCS Press, Illinois. 13-19.
- Boskou, D. 2015. Olive oil: Properties and processing for use in food. *En Specialty Oils and Fats in Food and Nutrition: Properties, Processing and Applications*. G. Talbot, editor. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 3-37.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94: 223-53.
- Cacciatore, I., Di Giulio, M., Fornasari, E., Di Stefano, A., Cerasa, L. S., Marinelli, L., Turkez, H., Di Campi, E., Di Bartolomeo, S., Robuffo, I., y Cellini, L. 2015. Carvacrol codrugs: A new approach in the antimicrobial plan. *Plos One*, 10: 1-20.
- Calder, P. C. 2013. Nutritional benefits of omega-3 fatty acids. *En Food enrichment with omega-3 fatty acids*. C. Jacobsen, N.S. Nielsen, A.F. Horn, y A.-D.M. Sørensen, editores. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 1-26.
- Calligaris, S., Ignat, A., Biasutti, M., Innocente, N., y Nicoli, M. C. 2015. Cheese fortification using saturated monoglyceride self-assembly structures as carrier of omega-3 fatty acids. *International Journal of Food Science and Technology*, 50: 2129-2134.

- Capitani, M. I., Spotorno, V., Nolasco, S. M., y Tomás, M. C. 2012. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, 45: 94-102.
- Chaari, M., Theochari, I., Papadimitriou, V., Xenakis, A., y Ammar, E. 2018. Encapsulation of carotenoids extracted from halophilic Archaea in oil-in-water (O/W) micro- and nano-emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 161: 219-227.
- Chang, Y., McLandsborough, L., y McClements, D. J. 2012. Physical properties and antimicrobial efficacy of thyme oil nanoemulsions: Influence of ripening inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 12056-12063.
- Charoen, R., Jangchud, A., Jangchud, K., Harnsilawat, T., Andrew, E., y Julian, D. 2012. Influence of interfacial composition on oxidative stability of oil-in-water emulsions stabilized by biopolymer emulsifiers. *Food Chemistry*, 131: 1340-1346.
- Chen, B., McClements, D. J., y Decker, E. A. 2013. Oxidation in Different Food Matrices: How Physical Structure Impacts Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions and Bulk Oils. *En Lipid Oxidation: Challenges in Food Systems*. A. Logan, U. Nienaber, y X. Pan, editores. AOCS Press, Urbana. 129-154.
- Cherian, G. 2013. Egg enrichment with omega-3 fatty acids. *En Food Enrichment with Omega-3 Fatty Acids*. C. Jacobsen, N.S. Nielsen, A.F. Horn, y A.-D.M. Sørensen, editores. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 288-298.
- Coates, W. 2011. Whole and Ground Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds, Chia Oil - Effects on Plasma Lipids and Fatty Acids. *En Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*. V.R. Preedy, R.R. Watson, y Vinood B. Patel, editores. Elsevier Inc., San Diego. 309-315.
- Codex Alimentarius. 2010. Directrices para el uso de declaraciones nutricionales y saludables. *CAC/GL 23-1997*, 1-9.
- Comer, J., Tam, K. 2001. Lipophilicity Profiles: Theory and Measurement. *En Pharmacokinetic Optimization in Drug Research: Biological, Physicochemical, and Computational Strategies*. B. Testa, H. van de Waterbed, G. Folkers, R. Guy, editores. Wiley-VCH, Weinheim. 275-304
- Comisión Europea. 2002. Decisión de la Comisión Europea 2002/113/CE, por la que se modifica la Decisión 1999/217/CE por lo que respecta al repertorio de sustancias aromatizantes utilizadas en o sobre los productos alimenticios. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L 49/1-L 49/160.
- Comisión Europea. 2006. Reglamento (CE) N° 1924/2006 del parlamento europeo y del consejo del 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 404/9-L 404/25.

- Comisión Europea. 2010. Reglamento (UE) N° 116/2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a la lista de declaraciones nutricionales. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 37/16-L 37/18.
- Comisión Europea. 2012. Reglamento (UE) N° 432/2012 de la comisión del 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 1-52.
- Courraud, J., Berger, J., Cristol, J.-P., y Avallone, S. 2013. Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during *in vitro* digestion. *Food chemistry*, 136: 871-7.
- Cretu, R., Dima, S., y Olteanu, M. 2009. Stability and colour evolution of emulsions with sodium caseinate. *Revista de Chimie*, 60: 683-688.
- Cunha, C. R., Dias, A. I., y Viotto, W. H. 2010. Microstructure, texture, colour and sensory evaluation of a spreadable processed cheese analogue made with vegetable fat. *Food Research International*, 43: 723-729.
- Dąbrowski, G., Konopka, I., Czaplicki, S., y Tańska, M. 2017. Composition and oxidative stability of oil from *Salvia hispanica* L. seeds in relation to extraction method. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119: 1-9.
- Decker, E. A., McClements, D. J., Bourlieu-lacanal, C., Durand, E., Figueroa-Espinoza, M. C., Lecomte, J., y Villeneuve, P. 2017. Hurdles in Predicting Antioxidant Efficacy in Oil-in-water emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 67: 183-194.
- de Deckere, E. A. M. y Verschuren, P. M. 2000. Functional fats and spreads. *En Functional foods Concept to product*. G.R. Gibson y C.M. Williams, editores. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 233-257.
- Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., y Pandian, S. K. 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130: 107-115.
- Dickinson, E. 2009. Hydrocolloids and emulsion stability. *En Handbook of Hydrocolloids*. G.O. Phillips y P.A. Williams, editores. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 23-49.
- Diels, A. M. J. y Michiels, C. W. 2006. High-pressure homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms. *Critical reviews in microbiology*, 32: 201-16.
- Dima, C. y Dima, S. 2015. Essential oils in foods: Extraction, stabilization, and toxicity. *Current Opinion in Food Science*, 5: 29-35.
- Dini, I. 2016. Use of Essential Oils in Food Packaging. *En Essential Oils in Food*

- Preservation, Flavor and Safety. V.R. Preedy, editor. Elsevier Inc., London. 139-147.
- Domenichiello, A. F., Kitson, A. P., y Bazinet, R. P. 2015. Is docosahexaenoic acid synthesis from α -linolenic acid sufficient to supply the adult brain? *Progress in Lipid Research*, 59: 54-66.
- Dong, P., Georget, E. S., Aganovic, K., Heinz, V., y Mathys, A. 2015. Ultra high pressure homogenization (UHPH) inactivation of *Bacillus amyloliquefaciens* spores in phosphate buffered saline (PBS) and milk. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1-11.
- Donsì, F., Ferrari, G., y Maresca, P. 2009. High-Pressure Homogenization for Food Sanitization. *En Global Issues in Food Science and Technology*. G. Barbosa-Cánovas, A. Mortimer, D. Lineback, W. Spiess, K. Buckle, y P. Colonna, editores. Elsevier Inc., London. 309-352.
- Dumay, E., Chevalier-Lucia, D., Picart-Palmade, L., Benzaria, A., Gràcia-Julià, A., y Blayo, C. 2013. Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. *Trends in Food Science & Technology*, 31: 13-26.
- Dyall, S. C. 2015. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: A review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7: 1-15.
- EFSA. 2010. Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, *trans* fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal*, 8: 1-107.
- EFSA. 2018. Nutrition and Health Claims - European Commission. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/claims/register/public/?event=register.home
- El-Bakry, M., Duggan, E., O'Riordan, E. D., y O'Sullivan, M. 2010. Effects of emulsifying salts reduction on imitation cheese manufacture and functional properties. *Journal of Food Engineering*, 100: 596-603.
- España. 2015. Real Decreto 1113/2006 de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos. Última modificación: 12 de septiembre de 2015. *Boletín Oficial del Estado*, 1-7.
- Evert-Arriagada, K., Hernández-Herrero, M. M., Gallardo-Chacón, J. J., Juan, B., y Trujillo, A. J. 2013. Effect of high pressure processing on volatile compound profile of a starter-free fresh cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19: 73-78.
- de Falco, B., Amato, M., y Lanzotti, V. 2017. Chia seeds products: an overview. *Phytochemistry Reviews*, 16: 745-760.
- Fan, L. y Eskin, N. A. M. 2015. The use of antioxidants in the preservation of edible oils. *En Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. F. Shahidi, editor. Elsevier

- Ltd., Cambridge. 373-388.
- Farbod, F., Kalbasi, A., Moini, S., Emam-Djomeh, Z., Razavi, H., y Mortazavi, A. 2014. Optimization of operational parameters to fortify iranian UF-feta cheese with fish oil using response surface methodology. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38: 1898-1910.
- Farfán, M., Villalón, M. J., Ortíz, M. E., Nieto, S., y Bouchon, P. 2015. *In vivo* postprandial bioavailability of interesterified-lipids in sodium-caseinate or chitosan based O/W emulsions. *Food Chemistry*, 171: 266-271.
- FDA. 2014a. Nutrition Labeling Summary Sheets. Disponible en: <https://www.fda.gov/iceci/inspections/inspectionguides/ucm114703.htm>.
- FDA. 2014b. Food Labeling: Nutrient Content Claims; Alpha-Linolenic Acid, Eicosapentaenoic Acid, and Docosahexaenoic Acid Omega-3 Fatty Acids. *Federal Register*, 79: 23262-23273.
- FDA. 2018. Label Claims for Conventional Foods and Dietary Supplements. Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/LabelingNutrition/ucm111447.htm>
- Figueiredo, P. S., Inada, A. C., Marcelino, G., Cardozo, C. M. L., Freitas, K. de C., Guimarães, R. de C. A., de Castro, A. P., do Nascimento, V. A., y Hiane, P. A. 2017. Fatty acids consumption: The role metabolic aspects involved in obesity and its associated disorders. *Nutrients*, 9: 1-32.
- Firestone, D. 2013. Characteristics of Oils and Fats of Plant Origin. *En Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes*. D. Firestone, editor. AOCS Press, Illinois. 1-225.
- Fredrick, E., Walstra, P., y Dewettinck, K. 2010. Factors governing partial coalescence in oil-in-water emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 153: 30-42.
- Friberg, S. E., Larsson, K., y Sjöblom, J. eds. 2004. Food Emulsions. 4th Ed. Marcel Dekker, Inc., New York. 900 pp.
- FSANZ. 2017a. Standard 1.2.7: Nutrition, health and related claims. *Food Standards Gazette*, 1-12.
- FSANZ. 2017b. 2016-17 Annual report. 102 pp.
- Gayán, E., Torres, J. A., y Paredes-Sabja, D. 2012a. Hurdle approach to increase the microbial inactivation by high pressure processing: Effect of essential oils. *Food Engineering Reviews*, 4: 141-148.
- Ghasemifard, S., Turchini, G. M., y Sinclair, A. J. 2014. Omega-3 long chain fatty acid «bioavailability»: A review of evidence and methodological considerations. *Progress in Lipid Research*, 56: 92-108.
- Ghosh, D. 2011. Australia and New Zealand regulations on nutrition , health and related claims made on foods. *En Functional foods Concept to product*. M. Saarela, editor.

Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 64-72.

- Giroux, H. J., Constantineau, S., Fustier, P., Champagne, C. P., St-Gelais, D., Lacroix, M., y Britten, M. 2013. Cheese fortification using water-in-oil-in-water double emulsions as carrier for water soluble nutrients. *International Dairy Journal*, 29: 107-114.
- Goff, H. D. 2013. Dairy Product Processing Equipment. *En Handbook of Farm, Dairy and Food Machinery*. K. Myer, editor. Elsevier Inc., London. 199-221.
- Guiotto, E. N., Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., y Tomás, M. C. 2014. Effect of storage conditions and antioxidants on the oxidative stability of sunflower–chia oil blends. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91: 767-776.
- Gunstone, F. 2006. Vegetable sources of lipids. *En Modifying lipids for use in food*. F.D. Gunstone, editor. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 11-27.
- Hall III, C. y Tulbek, M. C. 2008. Omega-3-enriched bread. *En Technology of functional cereal products*. B.R. Hamaker, editor. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 362-387.
- Hayes, M. G. y Kelly, A. L. 2003. High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. *Journal of Dairy Research*, 70: 297-305.
- Hernandez, E. M. 2016. Specialty Oils: Functional and Nutraceutical Properties. *En Functional Dietary Lipids: Food Formulation, Consumer Issues and Innovation for Health*. T.A.B. Sanders, editor. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 69-101.
- Hernandez, E. M. y de Jong, L. 2011. Applications of Omega-3 Fats in Foods. *En Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease*. E.M. Hernandez y M. Hosokawa, editores. AOCS Press, Illinois. 151-176.
- Hooper, L., Martin, N., Abdelhamid, A., y Smith, G. D. 2015. Reduction in saturated fat intake for cardiovascular disease (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 6-9.
- Hu, M., McClements, D. J., y Decker, E. A. 2004. Impact of chelators on the oxidative stability of whey protein isolate-stabilized oil-in-water emulsions containing w-3 fatty acids. *Food Chemistry*, 88: 57-62.
- Hughes, B. H., Brian Perkins, L., Calder, B. L., y Skonberg, D. I. 2012. Fish Oil Fortification of Soft Goat Cheese. *Journal of Food Science*, 77: 128-133.
- Imran, M., Nadeem, M., Manzoor, M. F., Javed, A., Ali, Z., Akhtar, M. N., Ali, M., y Hussain, Y. 2016. Fatty acids characterization, oxidative perspectives and consumer acceptability of oil extracted from pre-treated chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Lipids in Health and Disease*, 15: 1-13.
- ISO. 2013. ISO 9235:2013 Aromatic natural raw materials -- Vocabulary. International

Organization for Standardization. 14 pp.

- Ixtaina, V. Y., Martínez, M. L., Spotorno, V., Mateo, C. M., Maestri, D. M., Diehl, B. W. K., Nolasco, S. M., y Tomás, M. C. 2011a. Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24: 166-174.
- Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., y Tomás, M. C. 2011b. Oxidative Stability of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seed Oil: Effect of Antioxidants and Storage Conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89: 1077-1090.
- Jacobsen, C. 2011a. Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) as food ingredients. *En Functional foods: Concept to product*. M. Saarela, editor. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 401-424.
- Jacobsen, C. 2016. Oxidative stability and shelf life of food emulsions. *En Oxidative stability and shelf life of foods containing oils and fats*. M. Hu y C. Jacobsen, editores. AOCS Press, Cambridge. 287-312.
- Jacobsen, C., Horn, A. F., y Nielsen, N. S. 2013. Enrichment of emulsified foods with omega-3 fatty acids. *En Food enrichment with omega-3 fatty acids*. C. Jacobsen, N.S. Nielsen, A.F. Horn, y A.-D.M. Sørensen, editores. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 336-352.
- Jamboonsri, W., Phillips, T. D., Geneve, R. L., Cahill, J. P., y Hildebrand, D. F. 2011. Extending the range of an ancient crop, *Salvia hispanica* L.—a new ω 3 source. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59: 171-178.
- Javan, A. J. y Javan, M. J. 2014. Electronic structure of some thymol derivatives correlated with the radical scavenging activity: Theoretical study. *Food Chemistry*, 165: 451-459.
- Jayasena, D. D. y Jo, C. 2013. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 34: 96-108.
- Jiménez-Colmenero, F. 2013. Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Research International*, 52: 64-74.
- Jiménez, P., Masson, L., y Quitral, V. 2013. Composición química de semillas de chía, linaza y rosa mosqueta y su aporte en ácidos grasos omega-3. *Revista chilena de nutrición*, 40: 155-160.
- Jones, P. J. H. y Jew, S. 2016. Health Claims and Nutrition Marketing. *En Functional Dietary Lipids: Food Formulation, Consumer Issues and Innovation for Health*. T.A.B. Sanders, editor. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 287-302.
- Kamal-Eldin, A. ed. 2003. Lipid Oxidation Pathways. 1st Ed. AOCS Press, Illinois. 323 pp.

- Kaufman, T. S. 2015. The multiple faces of Eugenol. A versatile starting material and building block for organic and bio-organic synthesis and a convenient precursor toward bio-based fine chemicals. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26: 1055-1085.
- Khan, R. S., Grigor, J., Winger, R., y Win, A. 2013. Functional food product development – Opportunities and challenges for food manufacturers. *Trends in Food Science & Technology*, 30: 27-37.
- Lee, L. L., Niknafs, N., Hancocks, R. D., y Norton, I. T. 2013. Emulsification: Mechanistic understanding. *Trends in Food Science & Technology*, 31: 72-78.
- Lee, S. J. y Ying, D. Y. 2008. Encapsulation of fish oils. *En Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals*. N. Garti, editor. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 370-403.
- Li, H., Fan, Y., Li, J., Tang, L., Hu, J., y Deng, Z. 2013. Evaluating and predicting the oxidative stability of vegetable oils with different fatty acid compositions. *Journal of Food Science*, 78: 633-641.
- Li, Y., Le Maux, S., Xiao, H., y McClements, D. J. 2009. Emulsion-based delivery systems for tributyrin, a potential colon cancer preventative agent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 9243-9249.
- Liang, Y., Gillies, G., Patel, H., Matia-Merino, L., Ye, A., y Golding, M. 2014. Physical stability, microstructure and rheology of sodium-caseinate-stabilized emulsions as influenced by protein concentration and non-adsorbing polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 36: 245-255.
- Liu, A. G., Ford, N. A., Hu, F. B., Zelman, K. M., Mozaffarian, D., y Kris-Etherton, P. M. 2017. A healthy approach to dietary fats: Understanding the science and taking action to reduce consumer confusion. *Nutrition Journal*, 16: 1-15.
- Liu, J. J., Green, P., John Mann, J., Rapoport, S. I., y Sublette, M. E. 2015. Pathways of polyunsaturated fatty acid utilization: Implications for brain function in neuropsychiatric health and disease. *Brain Research*, 1597: 220-246.
- Lobato-Calleros, C., Reyes-Hernández, J., Beristain, C. I., Hornelas-Uribe, Y., Sánchez-García, J. E., y Vernon-Carter, E. J. 2007. Microstructure and texture of white fresh cheese made with canola oil and whey protein concentrate in partial or total replacement of milk fat. *Food Research International*, 40: 529-537.
- MAGRAMA. 2015. Informe del consumo de alimentación en España 2014. 139 pp.
- MAGRAMA. 2016. Informe del consumo de alimentación en España 2015. 230 pp.
- Manjula, K. y Bhagath, Y. B. 2017. New generation functional foods-a prospectus on processing technology assistance in development and production – A review. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 9: 64-76.

- Manuelli, M., Della Guardia, L., y Cena, H. 2017. Enriching diet with n-3 PUFAs to help prevent cardiovascular diseases in healthy adults: Results from clinical trials. *International Journal of Molecular Sciences*, 18: 1-16.
- MAPAMA. 2017a. Estadística láctea anual. Disponible en: <http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/ganaderia/estadistica-industrias-lacteas/estadistica-lactea-anual/>
- MAPAMA. 2017b. Informe del consumo de alimentación en España 2016. 242 pp.
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., Gortzi, O., Izadi, M., y Nabavi, S. M. 2016. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210: 402-414.
- Martínez-Monteaugudo, S. I., Yan, B., y Balasubramaniam, V. M. 2016. Engineering process characterization of high-pressure homogenization- from laboratory to industrial scale. *Food Engineering Review*, 9: 143-169.
- Martínez, M. L., Marín, M. a., Salgado Faller, C. M., Revol, J., Penci, M. C., y Ribotta, P. D. 2012. Chia (*Salvia hispanica* L.) oil extraction: Study of processing parameters. *LWT - Food Science and Technology*, 47: 78-82.
- McClements, D. J. 2010. Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1: 241-269.
- McClements, D. J. 2016. Food Emulsions: Principles, Practices, and techniques. 3rd Ed. CRC Press Taylor, Boca Ratón. 672 pp.
- Miguel, M. G. 2010a. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules*, 15: 9252-9287.
- Miguel, M. G. 2010b. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25: 291-312.
- Mohd Ali, N., Yeap, S. K., Ho, W. Y., Beh, B. K., Tan, S. W., y Tan, S. G. 2012. The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012: 1-9.
- Morales, J., Valenzuela, R., González, D., González, M., Tapia, G., Sanhueza, J., y Valenzuela, A. 2012. Nuevas fuentes dietarias de ácido alfa-linolénico: una visión crítica. *Revista Chilena de Nutrición*, 39: 79-87.
- Te Morenga, L. y Montez, J. M. 2017. Health effects of saturated and trans-fatty acid intake in children and adolescents: Systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, 12: 1-20.
- Nettleton, J. A., Lovegrove, J. A., Mensink, R. P., y Schwab, U. 2016. Dietary fatty acids: Is it time to change the recommendations? *Annals of Nutrition and Metabolism*, 68: 249-257.

- Norton, J. E. y Norton, I. T. 2010. Designer colloids-towards healthy everyday foods? *Soft Matter*, 6: 3735-3742.
- O' Dwyer, S. P., O' Beirne, D., Eidhin, D. N., y O' Kennedy, B. T. 2013. Effects of sodium caseinate concentration and storage conditions on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 138: 1145-52.
- Oliveira, D., Machín, L., Deliza, R., Rosenthal, A., Walter, E. H., Giménez, A., y Ares, G. 2016. Consumers' attention to functional food labels: Insights from eye-tracking and change detection in a case study with probiotic milk. *LWT - Food Science and Technology*, 68: 160-167.
- Ottaway, P. B. y Jennings, S. 2011. EU legislation and functional foods: a case study. *En Functional foods Concept to product*. M. Saarela, editor. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 25-40.
- Pan, K., Chen, H., Davidson, P. M., y Zhong, Q. 2014. Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: Physical and antilisterial properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 1649-1657.
- Pavela, R. 2015. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*, 76: 174-187.
- Pawelczyk, T., Trafalska, E., Pawelczyk, A., y Kotlicka-Antczak, M. 2015. Differences in omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acid consumption in people at ultra-high risk of psychosis, first-episode schizophrenia, and in healthy controls. *Early Intervention in Psychiatry*, 11: 498-508.
- de Paz, E., Martín, Á., Bartolomé, A., Largo, M., y Cocero, M. J. 2014. Development of water-soluble β -carotene formulations by high-temperature, high-pressure emulsification and antisolvent precipitation. *Food Hydrocolloids*, 37: 14-24.
- Peiretti, P. G. y Meineri, G. 2008. Effects on growth performance, carcass characteristics, and the fat and meat fatty acid profile of rabbits fed diets with chia (*Salvia hispanica* L.) seed supplements. *Meat Science*, 80: 1116-1121.
- Petrut, R. F., Danthine, S., y Blecker, C. 2016. Assessment of partial coalescence in whippable oil-in-water food emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 229: 25-33.
- Pichot, R. 2010. Stability and Characterisation of Emulsions in the presence of Colloidal Particles and Surfactants. Tesis doctoral. Universidad de Birmingham. 188 pp.
- Pimentel-González, D. J., Aguilar-García, M. E., Aguirre-Álvarez, G., Salcedo-Hernández, R., Guevara-Arauz, J. C., y Campos-Montiel, R. G. 2015. The process and maturation stability of Chihuahua cheese with antioxidants in multiple emulsions. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39: 1027-1035.
- Piorkowski, D. T. y McClements, D. J. 2013. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, 42: 5-41.

- Pittia, P. y Gharsallaoui, A. 2015. Conventional product formation. *En Food Waste Recovery: Processing Technologies and Industrial Techniques*. C.M. Galanakis, editor. Elsevier Inc., London. 173-193.
- Porrás-Loaiza, P., Jiménez-Munguía, T. M., Sosa-Morales, M. E., Palou, E., y López-Malo, A. 2014. Original article physical properties, chemical characterization and fatty acid composition of Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *International Journal of Food Science and Technology*, 49: 571-577.
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P. K., y Dubey, N. K. 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. *Food Control*, 47: 381-391.
- Pravst, I. 2012. Functional Foods in Europe: A Focus on Health Claims. *En Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry*. B. Valdez, editor. InTech, Rijeka. 165-208.
- PREDIMED. 2018. Prevención con dieta mediterránea. Disponible en: [http://predimed-es.weebly.com/](http://predimed.es.weebly.com/).
- Raikos, V. 2017. Encapsulation of vitamin E in edible orange oil-in-water emulsion beverages: Influence of heating temperature on physicochemical stability during chilled storage. *Food Hydrocolloids*, 72: 155-162.
- Ramírez-López, C. y Vélez-Ruiz, J. F. 2012. Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6: 131-148.
- Ramos, M., Beltrán, A., Peltzer, M., Valente, A. J. M., y Garrigós, M. del C. 2014. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *LWT - Food Science and Technology*, 58: 470-477.
- Ratnayake, W. M. N. y Galli, C. 2009. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: A background review paper. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 55: 8-43.
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., y Valdivia-López, M. A. 2008. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107: 656-663.
- Rincón-Cervera, M. Á., Valenzuela, R., Hernández-Rodas, M. C., Barrera, C., Espinosa, A., Marambio, M., y Valenzuela, A. 2016. Vegetable oils rich in alpha linolenic acid increment hepatic n-3 LCPUFA, modulating the fatty acid metabolism and antioxidant response in rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 111: 25-35.

- Ríos, J. L. 2016. Essential oils: What they are and how the terms are used and defined. *En Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. V.R. Preedy, editor. Elsevier Inc., London. 3-10.
- Ritzoulis, C., Karayannakidis, P. D., y Rosenthal, J. C. 2015. Proteins as texture modifiers. *En Modifying Food Texture*. J. Chen y A. Rosenthal, editores. Elsevier Ltd., Cambridge. 51-69.
- Roberfroid, M. 2011. Defining functional foods and associated claims. *En Functional foods Concept to product*. M. Saarela, editor. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 3-24.
- Roberfroid, M. B. 2000. Defining functional foods. *En Functional foods Concept to product*. G.R. Gibson y C.M. Williams, editores. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 9-27.
- Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., de Diego, S. M., Sanz, M. T., y Carballido, J. R. 2010. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11: 1-12.
- Ruxton, C. H. S., Reed, S. C., Simpson, M. J. A., y Millington, K. J. 2004. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: A review of the evidence. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 17: 449-459.
- Sabouri, S. y Corredig, M. 2016. Acid induced destabilization of emulsions prepared with sodium caseinate-epigallocatechin-gallate complexes. *Food Hydrocolloids*, 61: 113-118.
- Sanders, T. A. B. 2016. Introduction: The Role of Fats in Human Diet. *En Functional Dietary Lipids Food Formulation, Consumer Issues and Innovation for Health*. T.A.B. Sanders, editor. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 1-20.
- Santana, R. C., Perrechil, F. A., y Cunha, R. L. 2013. High- and low-energy emulsifications for food applications: A focus on process parameters. *Food Engineering Reviews*, 5: 107-122.
- Schaich, K. 2013. Challenges in Elucidating Lipid Oxidation Mechanisms: When, where, and how do products arise? *En Lipid Oxidation*. A. Logan, U. Nienaber, y X. (Shawn) Pan, editores. AOCS Press, Urbana. 1-52.
- Schubert, H., Engel, R., y Kempa, L. 2009. Principles of Structured Food Emulsions: Novel Formulations and Trends. *En Global Issues in Food Science and Technology*. G. Barbosa-Cánovas, A. Mortimer, D. Lineback, W. Spiess, K. Buckle, y P. Colonna, editores. Elsevier Inc., London. 143-150.
- Segura-Campos, M. R., Ciau-Solís, N., Rosado-Rubio, G., Chel-Guerrero, L., y Betancur-Ancona, D. 2014. Physicochemical characterization of chia (*Salvia hispanica*) seed oil from Yucatán, México. *Agricultural Sciences*, 5: 220-226.

- Shahidi, F. 2015. Antioxidants: principles and applications. *En Handbook of antioxidants for food preservation*. F. Shahidi, editor. Elsevier Ltd., Cambridge. 1-14.
- Shahidi, F. y Zhong, Y. 2010. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*, 39: 4067-4079.
- Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M. R., Oluwaseun Ademiluyi, A., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi, S. A., y Iriti, M. 2017. Biological activities of essential oils: From plant chemocology to traditional healing systems. *Molecules*, 22: 5-55.
- Sharma, M., Mann, B., Sharma, R., Bajaj, R., Athira, S., Sarkar, P., y Pothuraju, R. 2017. Sodium caseinate stabilized clove oil nanoemulsion: Physicochemical properties. *Journal of Food Engineering*, 212: 38-46.
- Shaw, L. A., McClements, D. J., y Decker, E. A. 2007. Spray-dried multilayered emulsions as a delivery method for ω -3 fatty acids into food systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 3112-3119.
- Silset, A. 2008. Emulsions (w/o and o/w) of Heavy Crude Oils. Characterization, Stabilization, Destabilization and Produced Water Quality. Tesis doctoral. Norwegian University of Science and Technology. 79 pp.
- da Silva Marineli, R., Aguiar Moraes, É., Alves Lenquiste, S., Teixeira Godoy, A., Nogueira Eberlin, M., y Maróstica Jr, M. R. 2014. Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 59: 1304-1310.
- Siri-Tarino, P. W., Chiu, S., Bergeron, N., y Krauss, R. M. 2015. Saturated fats versus polyunsaturated fats versus carbohydrates for cardiovascular disease prevention and treatment. *Annual Review of Nutrition*, 35: 517-543.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., y Lugasi, A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*, 51: 456-467.
- Statista. 2018. Consumo de queso en España. Disponible en: <https://es.statista.com/buscar/?q=consumo de queso>
- Stratulat, I., Britten, M., Salmieri, S., Fustier, P., St-Gelais, D., Champagne, C. P., y Lacroix, M. 2015. Enrichment of cheese with vitamin D₃ and vegetable omega-3. *Journal of Functional Foods*, 13: 300-307.
- Su, J. 2008. Formation and Stability of Food-Grade Water- in-Oil-in-Water Emulsions. Tesis doctoral. Massey University. 213 pp.
- Sugumar, S., Ghosh, V., Mukherjee, A., y Chandrasekaran, N. 2016. Essential oil-based nanoemulsion formation by low- and high-energy methods and their application in food preservation against food spoilage microorganisms. *En Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. V.R. Preedy, editor. Elsevier Inc., London. 93-100.

- Sultanbawa, Y. 2016. Essential Oils in Food Applications. *En Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. V.R. Preedy, editor. Elsevier Inc., London. 155-160.
- Sun, P., Schuurink, R. C., Caissard, J. C., Huguene, P., y Baudino, S. 2016. My way: noncanonical biosynthesis pathways for plant volatiles. *Trends in Plant Science*, 21: 884-894.
- Tatar, B. C., Summu, G., y Sahin, S. 2017. Rheology of Emulsions. *En Advances in Food Rheology and Its Applications*. J. Ahmed, editor. Elsevier Ltd., Duxford. 437-457.
- Timilsena, Y. P., Vongsvivut, J., Adhikari, R., y Adhikari, B. 2017. Physicochemical and thermal characteristics of Australian chia seed oil. *Food Chemistry*, 228: 394-402.
- Tokuşoğlu, Ö. 2013. The physicochemical, microbiological, organoleptic properties and antioxidant activities of functional cream cheeses fortified with lutein. *International Journal of Dairy Technology*, 66: 1-8.
- Turchiuli, C., Lemarié, N., Cuvelier, M.-E., y Dumoulin, E. 2013. Production of fine emulsions at pilot scale for oil compounds encapsulation. *Journal of Food Engineering*, 115: 452-458.
- Turek, C. y Stintzing, F. C. 2013. Stability of essential oils: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12: 40-53.
- Tvrzicka, E., Kremmyda, L. S., Stankova, B., y Zak, A. 2011. Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease - a review. part 1: Classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical Papers*, 155: 117-130.
- Uribe, J. A. R., Perez, J. I. N., Kauil, H. C., Rubio, G. R., y Alcocer, C. G. 2011. Extraction of oil from chia seeds with supercritical CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids*, 56: 174-178.
- Valdivia-López, M. Á. y Tecante, A. 2015. Chia (*Salvia hispanica*): A Review of Native Mexican Seed and its Nutritional and Functional Properties. *En Advances in Food and Nutrition Research*. J. Henry, editor. Elsevier Inc., London. 53-75.
- Vicente Murillo, R., Rodríguez Leyes, E., González Canavaciolo, V. L., López Hernández, O. D., Rivera Amita, M. M., y Gonzales Sanabia, M. L. 2013. Características preliminares del aceite de semillas de *Salvia hispanica* L. cultivadas en Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18: 3-9.
- Vicentini, A., Liberatore, L., y Mastrocola, D. 2016. Functional foods: Trends and development. *Italian Journal of Food Science*, 28: 338-352.
- De Vincenzi, M., Stamatii, A., De Vincenzi, A., y Silano, M. 2004. Constituents of aromatic plants: Carvacrol. *Fitoterapia*, 75: 801-804.
- Volli, V. y Purkait, M. K. 2014. Physico-chemical properties and thermal degradation

- studies of commercial oils in nitrogen atmosphere. *Fuel*, 117: 1010-1019.
- Wang, D. D. y Hu, F. B. 2017. Dietary fat and risk of cardiovascular disease: Recent controversies and advances. *Annual Review of Nutrition*, 37: 423-446.
- Waraho, T., Cardenia, V., Decker, E. A., y McClements, D. J. 2010. Lipid oxidation in emulsified food products. *En Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications*. E.A. Decker, R.J. Elias, y D.J. McClements, editores. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 306-34.
- Waraho, T., McClements, D. J., y Decker, E. A. 2011. Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends in Food Science & Technology*, 22: 3-13.
- Wijaya, W., Patel, A. R., Setiowati, A. D., y Van der Meeren, P. 2017. Functional colloids from proteins and polysaccharides for food applications. *Trends in Food Science and Technology*, 68: 56-69.
- Wilde, P. 2009. Emulsions and nanoemulsions using. *En Dairy-Derived Ingredients: Food and Nutraceutical Uses*. M. Corredig, editor. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 539-564.
- Ye, A., Cui, J., Taneja, A., Zhu, X., y Singh, H. 2009. Evaluation of processed cheese fortified with fish oil emulsion. *Food Research International*, 42: 1093-1098.
- Zachariah, T. J. y Leela, N. K. 2006. Volatiles from herbs and spices. *En Handbook of Herbs and Spices*. K.V. Peter, editor. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 177-218.
- Zeeb, B., Fischer, L., y Weiss, J. 2014. Stabilization of food dispersions by enzymes. *Food & Function*, 5: 198.

Capítulo III

Materiales y métodos

3.1. Determinación de la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales

3.1.1. Aceites esenciales y preparación de soluciones

En este estudio se emplearon aceites esenciales (AEs) de orégano, tomillo, albahaca, salvia, limón, mandarina, laurel, canela, clavo, romero y valeriana; que fueron adquiridos en la empresa Esencias Martínez Lozano S.A. (Murcia, España). La selección de estos AEs se hizo en función de su aplicación potencial en productos lácteos.

Las soluciones madre (40 mg/mL) de cada AE fueron preparados con una solución al 6% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España) y al 0,5% de Tween 80 (Scharlab S.L., Madrid, España), para luego hacer diluciones de 20; 10; 4; 2; 1; 0,5; 0,125; 0,0625; 0,031 y 0,015 mg/mL en caldo Mueller-Hinton (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) para bacterias, y en caldo Sabouraud (Oxoid) para hongos y levaduras.

3.1.2. Cepas microbianas, conservación y preparación de inóculo

Se seleccionaron cepas microbianas, patógenas, indicadores o alterantes que pudieran tener relevancia en el producto con base láctea a estudiar, como: *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Enteritidis (CECT 4155), *Listeria monocytogenes* (CECT 4031),

Staphylococcus aureus (CECT 4630), *Escherichia coli* (CECT 405), *Pseudomonas aeruginosa* (CECT 116), *Lactococcus lactis* (CECT 185), *Lactobacillus plantarum* (CECT 220), la levadura *Kluyveromyces marxianus* (CECT 1017), y los mohos *Aspergillus niger* (CECT 2088) y *Penicillium sp* (CECT 20566). Las cepas se adquirieron en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia (Valencia, España). Las cepas liofilizadas se recuperaron en caldo tripticasa soja (TSB, Oxoid). El cultivo de trabajo se conservó en tubo inclinado con medio de cultivo según la cepa microbiana, en refrigeración a 4 °C, por un tiempo máximo de 2 meses.

En el caso de las bacterias y levaduras, para asegurar que estaban en fase estacionaria, el inóculo estándar se preparó a partir del segundo subcultivo realizado en medio tripticasa soja agar (TSA, Oxoid) a 37 °C por 24 h para bacterias y en medio agar extracto de malta (MEA, Oxoid) en el caso de la levadura incubando a 30 °C por 48 h. La suspensión se preparó en 10 mL de una solución con un 0,9% de NaCl, hasta conseguir una turbidez equivalente a 10^8 UFC/mL, turbidez expresada en escala de McFarland y medida en fotómetro Densimat (bioMérieux, Madrid, España), para posteriormente diluirlo en caldo Mueller Hinton o Sabouraud, para obtener un inóculo de aproximadamente 10^6 UFC/mL en las bacterias y 10^4 UFC/ml en la levadura. En el caso de los mohos, se cultivaron en medio MEA durante 7-10 días, hasta su total esporulación, en frascos Roux. Las esporas, se recuperaron con una solución de un 0,05% de Tween 80. Posteriormente se filtró en un embudo Büchner, con placa filtrante con un diámetro de poro entre 40-60 μm , con la finalidad de separar los fragmentos de hifas presentes (AENOR, 2008). Posteriormente se diluyó en caldo Sabouraud, para obtener un inóculo de aproximadamente 10^4 esporas/mL.

3.1.3. Determinación *in vitro* de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales

La técnica consiste en determinar la menor concentración de un compuesto que inhibe el crecimiento microbiano, y con esta finalidad se prepararon diferentes concentraciones de AEs, diluidos en un caldo de cultivo al que se inoculó el microorganismo a ensayar.

La CMI de los AEs fue determinada por el método de microdilución en caldo (Albayrak y Aksoy, 2012; Gamazo *et al.*, 2005), evaluando las curvas de crecimiento obtenidas mediante el equipo Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd, Helsingfors, Finlandia). En las microplacas, se agregó 100 μL de las soluciones de AEs a las concentraciones de 40;

20; 10; 4; 2; 1; 0,5; 0,125; 0,0625; 0,031 y 0,015 mg/mL en caldo Mueller-Hinton y Sabouraud para bacterias y mohos y levaduras respectivamente, y 100 μ L de suspensión bacteriana de 10^6 UFC/mL o fúngica de 10^4 UFC/mL. Como control positivo se utilizó 0,85 mg/mL de amoxicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) para bacterias y 0,8 mg/mL de ketoconazol (Sigma-Aldrich) para mohos y levaduras, y como control negativo la solución de solvente de AEs y el caldo utilizado en cada caso. Las microplacas fueron incubadas en el equipo Bioscreen C a 37 °C por 24 h para las bacterias y 30 °C por 48 h para los mohos y levaduras. Las lecturas se realizaron a 600 nm de longitud de onda con una frecuencia de 15 min. El ensayo se realizó por duplicado.

La cinética de crecimiento microbiano (μ_{max}) y el tiempo de latencia se determinó aplicando el programa DMFit para Excel del software libre ComBase (USDA Agricultural Research Service y el Food Safety Centre de la Universidad de Tasmania, Australia), también se utilizó el software GraphPad Prism (V7.00 para Windows) para determinar el área de respuesta bajo la curva.

3.2. Determinación de capacidad antioxidante de aceites esenciales *in vitro*

Se utilizaron los 11 AEs señalados en el apartado 3.1.1, y se determinó la capacidad antioxidante empleando el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil y el método de decoloración del β -caroteno.

3.2.1. Ensayo del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Este método se basa en la teoría que los antioxidantes son donadores de hidrógeno y la capacidad del DPPH• (radical libre estable) de aceptar ese hidrógeno. En la Figura 3. 1 se explica el mecanismo por el cual el DPPH• acepta un electrón de un antioxidante y un átomo de hidrógeno (equivalente en hidruro) formando el DPPH reducido. Como consecuencia el color cambia de púrpura a amarillo por la formación de DPPH tras la absorción de hidrógeno. Esta reacción es estequiométrica con respecto al número de átomos de hidrógeno absorbidos. Por lo tanto, el efecto antioxidante se puede evaluar mediante espectrofotometría, siguiendo la disminución de la absorbancia a 517 nm (Moon y Shibamoto, 2009; Plank *et al.*, 2012).

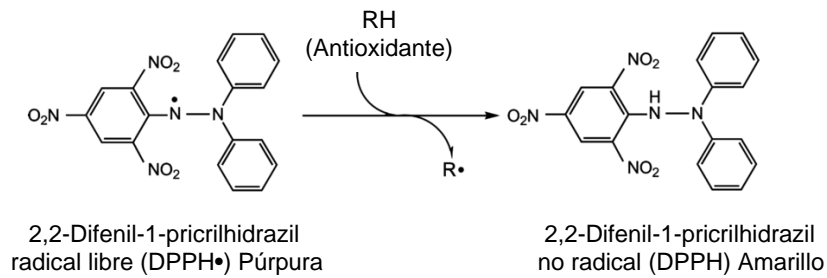


Figura 3. 1. Reacción entre DPPH• y un antioxidante para formar DPPH. Fuente: Moon y Shibamoto (2009).

El estudio de la capacidad antioxidante de los AEs se llevó a cabo en 2 fases. En una primera etapa se estudió la capacidad antioxidante de todos los AEs y se seleccionaron aquéllos con mayor actividad, y en una segunda etapa se determinó, en los AEs seleccionados, la concentración efectiva media (CE_{50}), que se define como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50% (Zhong y Shahidi, 2015).

Para la determinación de la capacidad antioxidante por DPPH se empleó el método propuesto por Albayrak y Aksoy (2012) con algunas modificaciones. Se prepararon soluciones de los diferentes AEs a una concentración de 1250 $\mu\text{g/mL}$ en metanol (Sigma-Aldrich). En viales ámbar se adicionó 0,1 mL de la solución de AE y se le agregó 2 mL de una solución 0,1 mM de DPPH (Sigma-Aldrich). La mezcla se incubó a 37 °C con agitación constante por 30 min, y al cabo de ese tiempo se midió la absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro (mod. UV2310, Dinko Instruments, España). Como blanco se utilizó DPPH y metanol sin aceite esencial, y como control positivo se utilizó 0,4 mg/mL de Butil-hidroxi-tolueno (BHT) y deButil-hidroxi-anisol (BHA) (Sigma-Aldrich). El ensayo se realizó por triplicado.

La actividad de captación de radicales libres se calculó como porcentaje de inhibición de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición = 100 \times \left(\frac{A_{blanco} - A_{muestra}}{A_{blanco}} \right)$$

donde, A_{blanco} es la absorbancia del blanco y $A_{muestra}$ es la absorbancia de la muestra.

Para determinar la CE_{50} , se seleccionaron los AEs que presentaron una mayor inhibición, Con esta finalidad se prepararon soluciones de aceite esencial a concentraciones de 60, 80, 200, 400, 800 y 2000 $\mu\text{g/mL}$ en metanol, para después proceder con la determinación de capacidad antioxidante por DPPH según la técnica descrita anteriormente. Cada muestra fue analizada por triplicado. El valor de la CE_{50} se calcula a partir de la gráfica de porcentaje de inhibición obtenida para cada AE.

3.2.2. Método de decoloración del β -caroteno

Mediante este método se determinó la actividad antioxidante total de los AEs. Para ello se utilizó un sistema β -caroteno/ácido linoleico, donde el ácido linoleico forma un radical peroxilo ($\text{LOO}\bullet$) en presencia de especies de oxígeno reactivo, este radical peroxilo reacciona con el β -caroteno, para formar un radical β -caroteno estable o epóxidos de β -caroteno (Moon y Shibamoto, 2009). Esta reacción ocasiona la oxidación y descomposición, en parte, del β -caroteno y como consecuencia el sistema pierde su color naranja característico (Amiri, 2010). Si hay un antioxidante en la solución de ensayo, éste reacciona competitivamente con el radical peroxilo, evitando la decoloración del β -caroteno. Los efectos antioxidantes se determinan por espectrofotometría a 470 nm, que es la absorbancia característica del β -caroteno (Moon y Shibamoto, 2009).

Para este ensayo se empleó el método propuesto por Köse *et al.* (2010). Se preparó una emulsión con 0,5 mg de β -caroteno (Sigma-Aldrich), que se disolvió en 1 mL de cloroformo (Sigma-Aldrich), al que se le agregó 25 μL de ácido linoleico (Sigma-Aldrich) y 400 mg de Tween 20 (Sigma-Aldrich); el cloroformo se evaporó usando inyección de nitrógeno a 40 °C, y al residuo se le agregó 100 mL de agua destilada. En viales de color ámbar se dispensaron alícuotas de 2,5 mL de la emulsión, a las que se añadió 0,5 mL de las soluciones de AEs de 2 mg/mL. Los tubos se incubaron a 50 °C por 1 h, y la absorbancia se midió a 470 nm al inicio y cada 30 min. El blanco utilizado fue la emulsión sin β -caroteno, el control sin AE y como control positivo se utilizó BHA y BHT (0,4 mg/mL).

La tasa de blanqueo (R) de β -caroteno se calculó según la siguiente ecuación:

$$R = \text{Ln}\left(\frac{a}{b}\right)/t$$

donde, a es la absorbancia a tiempo 0 y b la absorbancia en el tiempo t (30 y 60 min).

La actividad antioxidante (AA) se calculó en términos de porcentaje de inhibición en relación con el control, utilizando la siguiente ecuación:

$$AA = [(R_{control} - R_{muestra})/R_{control}] \times 100$$

3.3. Elaboración de emulsiones

3.3.1. Ingredientes

El caseinato de sodio con pureza del 91% se adquirió en la empresa EPI ingredients (Ancenis, Francia). En la ficha técnica del producto, suministrada por la empresa, se incluyeron los análisis físico-químicos y microbiológicos (Tabla 3. 1).

Tabla 3. 1. Especificaciones de los análisis físico-químicos y microbiológicos del caseinato de sodio utilizado en este estudio.

Características físico-químicas			
	Unidad	Valor objetivo	Resultado
Humedad	%	6	5,82
Granulometría	< 300 µm	98	99,96
pH		6,7 +/- 0,3	6,9
Proteína (N × 6,38)	%	≥88	91
Grasa	%	≤1,5	1
Antibióticos		ausencia	ausencia
Características microbiológicas			
Microorganismos mesófilos totales	UFC/g	≤ 5000	<100
Microorganismos termófilos	UFC/g	≤ 1000	<100
Enterobacterias	UFC/g	≤ 10	<10
Hongos y levaduras	UFC/g	≤ 20	<10
<i>Salmonella</i> spp	UFC/ 25 g	ausencia	ausencia
<i>Staphylococcus</i> coagulasa +	UFC/g	ausencia	ausencia
<i>Listeria monocytogenes</i>	UFC/ 25 g	ausencia	ausencia

Fuente: EPI Ingredients (2016).

Para la producción de la emulsión se utilizó aceite de oliva y aceite de chía. El aceite de oliva (Carbonell, Córdoba, España) utilizado fue una mezcla de aceite de oliva refinado

y aceite de oliva virgen (79% de ácido oleico), con 1% de grasas saturadas, 79% de ácidos grasos monoinsaturados y un 8% de ácidos grasos poliinsaturados.

El aceite de chía, adquirido del Grupo Nutracéutico Chiasa SL. (Valencia, España), se obtuvo por prensado en frío de las semillas de chía (*Salvia hispanica* L) y sin adición de aditivos. La Tabla 3. 2 muestra su contenido en ácidos grasos.

Tabla 3. 2. Contenido en ácidos grasos de aceite de chía.

Ácido graso	Valor (%)
Ácido alfa linolénico (omega 3)	>60
Ácido linoleico (omega 6)	15-20
Ácido oleico (omega 9)	<10
Palmítico	>5
Palmitoleico	<0,5
Esteárico	<10

Fuente: Grupo Nutracéutico Chiasa SL. (2016).

La formulación de la emulsión se preparó según el método de Hebishy (2013), que contiene un 20% de aceites vegetales y un 3% de caseinato de sodio como emulsificante. En este estudio se utilizó un 5% de aceite de chía y un 15% de aceite de oliva, además se incluyó un 0,5% de AE de clavo o de tomillo.

3.3.2. Preparación de las emulsiones

Las emulsiones se prepararon en dos etapas. En una primera etapa se obtuvieron las preemulsiones, que se prepararon disolviendo el NaCas en agua destilada, y para permitir una hidratación adecuada del emulsionante, la mezcla se almacenó a 4 °C por una noche. Previo a la incorporación de los aceites vegetales y del AE correspondiente, la mezcla se atemperó a 20 °C y se prehomogeneizó, utilizando un sistema rotor-estator Heildolph (modelo DiAx900, Schwabach, Alemania). En una segunda etapa, las preemulsiones se trataron mediante homogeneización convencional (HC), en un homogeneizador de dos etapas Tetra Alex (modelo SO5, Tetra Pak, Lund, Suecia) a 15 MPa. También se preparó una emulsión control sin la adición de AEs.

Las emulsiones preparadas se caracterizaron tras su elaboración y durante su almacenamiento a 4 °C (20 días) a nivel físico-químico y microbiológico. Los experimentos se repitieron 2 veces de manera independiente.

3.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria en las emulsiones

Para determinar la CMI de los AEs incorporados en las emulsiones se optó por la técnica de dilución en agar, utilizada en este tipo de matriz por otros investigadores (Hammer *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 2012). Se prepararon emulsiones como se describió anteriormente, incorporando los AEs de clavo, canela, tomillo y orégano, ya que fueron los que presentaron la mayor actividad antimicrobiana y antioxidante en el estudio *in vitro*. Se prepararon placas de Petri con agar Mueller Hinton (Oxoid) para bacterias y agar Sabouraud (Oxoid) para hongos y levaduras, con las emulsiones a una concentración final de 1, 2, 4, 8, 16 y 32 mg/mL, y sin AE en las placas control. Una vez solidificado el agar se inocularon 2 µL de la suspensión microbiana con 10⁷ UFC/mL de bacterias y levaduras y 10⁵ esporas/mL de mohos. Los microorganismos ensayados fueron los mismos de la determinación de CMI *in vitro*. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h en el caso de las bacterias y a 30 °C por 48 h los mohos y levaduras. Al cabo de ese tiempo las placas se observaron para determinar si hubo o no crecimiento microbiano. El experimento se llevó a cabo en tres ocasiones de manera independiente.

3.5. Caracterización de las emulsiones

3.5.1. Determinación del tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partícula en las emulsiones se determinó con el analizador de tamaño de partículas por difracción láser Beckman Coulter (LS 13 320 series, Beckman Coulter, Fullerton, CA, Estados Unidos). Se aplicó un modelo óptico basado en la teoría de Mie de dispersión de luz para partículas esféricas bajo las siguientes condiciones: índice de refracción de la mezcla de aceite (75% de aceite de oliva y 25% de aceite de chía) que fue de 1,471 y que se obtuvo mediante medida refractométrica (Spectronic Instruments, Inc. de Rochester, Nueva York, Estados Unidos), índice de refracción del líquido (agua) 1,332; índice de refracción imaginario 0 y velocidad de la bomba 20%.

Las medidas se realizaron el día de producción de la emulsión. Las muestras se diluyeron en agua destilada hasta obtener en el equipo una obscuración adecuada en la célula del difractor ~2%. Cada muestra se analizó por duplicado, para obtener las curvas de distribución de tamaño de partículas, el diámetro medio ponderado en función de la superficie ($D_{3,2}$, μm), el diámetro medio ponderado en función del volumen ($D_{4,3}$, μm), el área superficial específica (SSA, m^2/mL), el valor de *span* o índice de dispersión relativo y los valores D_{10} , D_{50} , y D_{90} .

3.5.2. Determinación de la viscosidad

El análisis reológico se desarrolló utilizando un reómetro rotacional (Haake Rheo Stress 1, Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Alemania) acoplado a un baño termostático (Thermo Haake Phoenix C25P, Thermo Electron Corporation), usando un sensor de cilindros concéntricos (Z34 DIN, Thermo Electron Corporation). Las curvas de flujo, esfuerzo cortante frente a gradiente de velocidad, se determinaron en función del incremento y, posterior disminución de la velocidad de cizallamiento entre 0,1 y 100 s^{-1} durante 1 min. Los datos se procesaron con el programa Rheowin 3 Data Manager (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Alemania), y las curvas de flujo se ajustaron al modelo de Ostwald de Waele: $\tau = K (\dot{\gamma})^n$, donde τ es el esfuerzo cortante (Pa), K el índice de consistencia ($\text{Pa} \times \text{s}^n$), $\dot{\gamma}$ la velocidad de cizallamiento (s^{-1}), obteniéndose el índice de comportamiento de flujo (n). Las medidas se realizaron por duplicado a una temperatura de 21 °C, en las emulsiones almacenadas a 4 °C en los días 1, 10 y 20.

3.5.3. Estabilidad física

Para determinar la estabilidad física de las emulsiones se utilizó el analizador de exploración vertical Turbiscan™ Classic MA 2000 (Formulation, Toulouse, Francia). La tecnología del Turbiscan, MLS-Multiple Light Scattering o Dispersión de Luz Múltiple, consiste en el envío de fotones en toda la altura de la muestra, contenida en una célula de cristal, desde una fuente de luz infraroja (NIR) de 880 nm. Estos fotones, después de haber sido dispersados muchas veces por las partículas que conforman la suspensión, son recogidos por dos detectores situados en el cabezal óptico del equipo a 0° (detector de transmisión) y a 135° (detector de *backscattering*). El *backscattering* se relaciona directamente con el tamaño y la concentración de las partículas. La propagación

de la luz a través de la dispersión concentrada se puede utilizar para caracterizar la estabilidad fisicoquímica de la emulsión (Juliano *et al.*, 2011). Por lo tanto, cualquier cambio debido a una variación del tamaño de partícula, por floculación, o coalescencia, o una variación local de la fracción de volumen, por fenómenos de migración como cremado o sedimentación, es detectado por el Turbiscan MA 2000 (Fernández-Ávila *et al.*, 2015).

La estabilidad física de las emulsiones almacenadas a 4 °C se midió por triplicado durante su tiempo de vida útil, en los días 0, 1, 2, 6, 8, 10 y 20. La evolución de la retrodispersión (Δ BS), expresado en porcentaje, se determinó con el software Turbisoft 2.1.0.52.1, de forma que un cambio importante en el perfil de *backscattering* de las emulsiones convencionales puede ser indicativo de un proceso de desestabilización.

3.5.4. Análisis microbiológico

El recuento total de mesófilos se realizó en medio plate count agar (PCA), la incubación fue a 30 °C por 48 h, y en el caso de recuento total de psicrótrofos en el mismo medio, pero la incubación fue a 7 °C por 10 días. Los análisis se efectuaron por duplicado cada 5 días.

3.5.5. Estabilidad oxidativa

3.5.5.1. Determinación de hidroperóxidos

Los productos de la oxidación primaria, hidroperóxidos, se determinaron mediante el método propuesto por Hu *et al.* (2004). La reacción se basa en la capacidad de los hidroperóxidos para oxidar los iones ferrosos (Fe^{2+}) a férricos (Fe^{3+}). Los iones férricos formados reaccionan con el tiocianato de amonio, dando como resultado un complejo coloreado que se puede medir espectrofotométricamente entre 500-510 nm (Li *et al.*, 2013). Se mezcló 0,3 mL de la emulsión con 1,5 mL de una solución isooctano/2-propanol en una relación 3:1 (v/v). Se agitó en vortex durante 10 s, 3 veces, y posteriormente se centrifugó a 1000 g por 2 min. Se tomaron 200 μL de la fase orgánica y se añadió 2,8 mL de solución metanol/1-butanol en una relación 2:1 (v/v), seguido de 15 μL de tiocianato de amonio 3,97 M y 15 μL de una solución mezcla a base de BaCl_2 0,132 M y de FeSO_4 0,144 M. Después de 20 min en reposo a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 500 nm.

La concentración de hidroperóxido se determinó utilizando una curva de calibración preparada con una solución al 80% de hidroperóxido de cumeno (Sigma-Aldrich), con concentraciones que van de 0,25 a 0,0078 mM/L de solución.

3.5.5.2. Determinación de malondialdehído (MDA) mediante TBARS

El MDA, producto de la oxidación secundaria, es un dialdehído, el cual es mutagénico para los seres humanos porque puede formar aductos con proteínas y ADN. El método mediante TBARS (Sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico), usualmente utilizado, se realiza por la medida espectrofotométrica a 532-535 nm del color rosa que adquiere el aducto de MDA con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (Papastergiadis *et al.*, 2012).

El procedimiento que se siguió fue el propuesto por Sorensen y Jorgensen (1996). Se pipeteó 3 mL de la emulsión en un tubo de 25 mL, al que le agregó 6 mL de una solución de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich) al 7,5% y se agitó en vórtex por 10 s, dejándose reposar la mezcla por 20 min para después filtrarse en papel Whatman nº 1. Se tomó 2 mL del filtrado y se mezcló con 2 mL de una solución de TBA (Sigma-Aldrich) al 0,8% en tubos de vidrio, que se pusieron en un baño de agua a 70 °C durante 40 min, al cabo del cual se enfrió en un baño de hielo durante 5 min. La lectura de absorbancia se realizó a una longitud de onda de 532 nm. El blanco se hizo con 2 mL de TBA y 2 mL de agua destilada.

El índice de TBARS (μg de MDA/mL de emulsión) se determinó utilizando una curva de calibración con solución de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) (Sigma-Aldrich) al 97%, en un rango de 0,0081 a 0,081 μg de MDA/mL.

3.6. Elaboración de análogo de queso fresco (AQF)

La elaboración del AQF se llevó a cabo en la planta piloto del Servei Planta de Tecnologia dels Aliments (SPTA-UAB), en el área destinada para elaboración de queso a 21 °C de temperatura ambiente. Previamente, las instalaciones, equipos y utensilios se limpiaron y se desinfectaron. Se hicieron 2 producciones independientes por cada AE utilizado (clavo y tomillo). En cada producción se hicieron 2 tratamientos: un AQF se elaboró con AE emulsionado y otro AQF con AE sin emulsionar. Adicionalmente se elaboró AQF control sin AE. El procedimiento seguido para su elaboración se presenta en la Figura 3. 2.

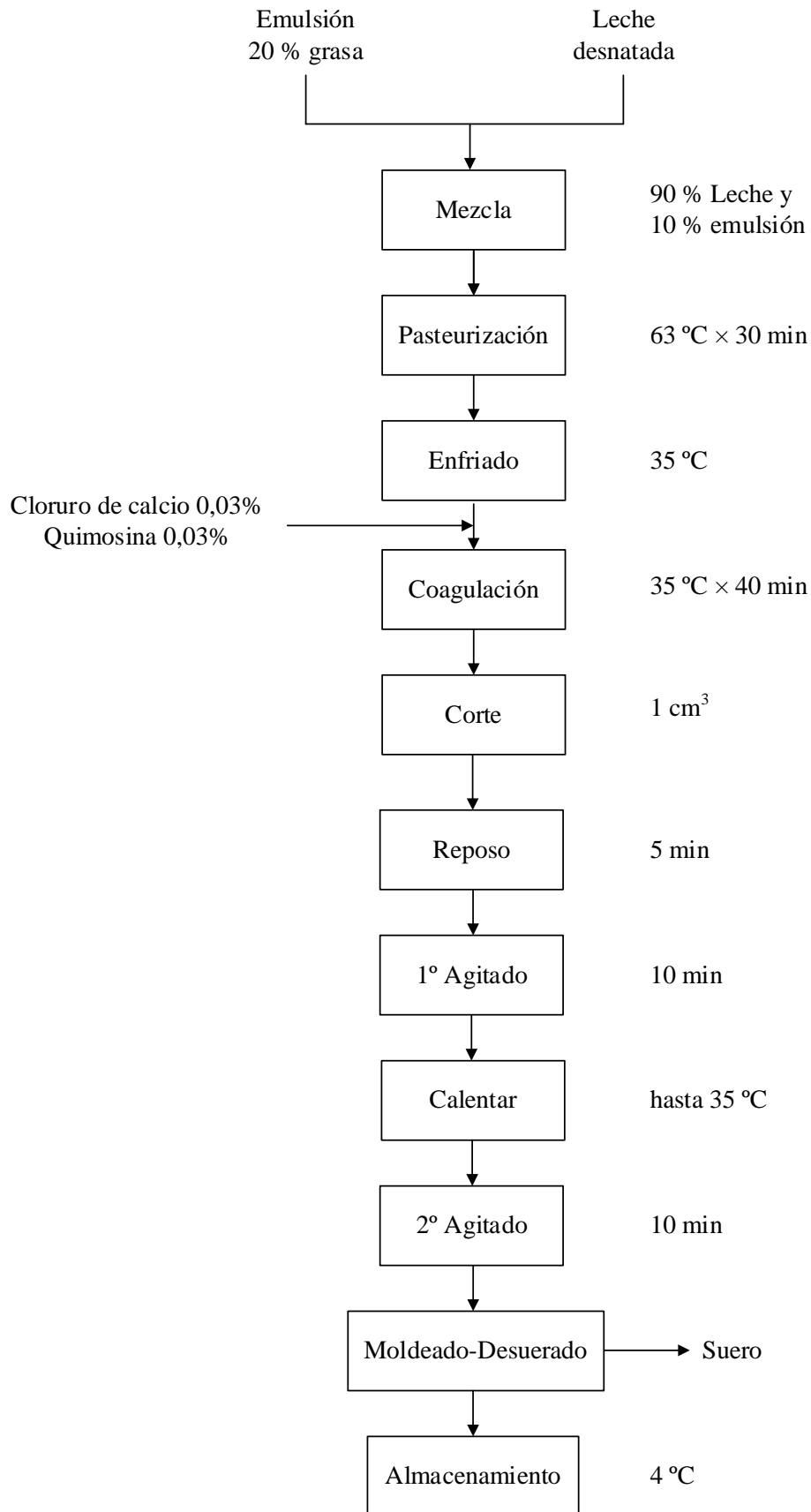


Figura 3. 2. Diagrama de flujo de elaboración de queso fresco a partir de leche desnatada y emulsiones de aceites vegetales.

Para elaborar los AQFs con AEs emulsionados, se utilizaron las emulsiones elaboradas con aceites vegetales (20%), NaCas (3%) y 0,5% de AE de clavo o tomillo y homogeneizadas a 15 MPa. Para elaborar los AQFs con AEs de clavo o tomillo sin emulsionar, estos AEs fueron agregados directamente en un 0,05% a la mezcla leche desnatada/emulsión. La leche desnatada utilizada fue previamente pasteurizada a 72 °C por 2 s. La mezcla leche desnatada/emulsión se pasteurizó (63 °C × 30 min) y se enfrió a 35 °C, luego se agregó un 0,03% de solución de cloruro de calcio al 50% (Sigma-Aldrich) y después de 5 min 0,03% de quimosina con actividad ~600 IMCU/mL (quimosina Chy-Max® Extra, CHR Hansen, Dinamarca). Después de la coagulación y el corte se obtuvieron cubos de cuajada de 1 cm de lado. Para agilizar el desuerado se agitó por 10 min. A consecuencia del agitado la cuajada se enfría, por lo que fue calentada hasta 35 °C y luego se realizó el segundo agitado por 10 min. Inmediatamente después se procedió al moldeado, utilizando moldes y envases para queso fresco de 400 g de capacidad (Ets A. Coquard, Villefranche sur Saône, Francia). Transcurridos 20 min del moldeado, se procedió al volteado, la eliminación del suero drenado y el cerrado de los envases. Finalmente, los quesos se almacenaron a temperatura de refrigeración a 4 °C.

3.7. Caracterización del análogo de queso fresco

3.7.1. Composición

La composición del AQF se determinó el día 1 por triplicado, aplicando los métodos estándar para la grasa (ISO, 2008), para proteína (IDF, 2002), para sólidos totales (IDF, 2004). El contenido en ácidos grasos se determinó por cromatografía de gases con detección de llama por ignición (CG-FID), aplicando el método AOCS Ce 2-66 (AOCS, 2017) para preparar ésteres metílicos de ácidos grasos y el método AOCS Ce 1-62 (AOCS, 2005) para determinar la composición de ácidos grasos mediante cromatografía de gases. El rendimiento se calculó como la relación porcentual entre la masa del queso sobre la masa de la mezcla leche desnatada/emulsión. El pH se determinó sobre una muestra de queso previamente triturado que se obtuvo por mezcla con agua destilada (1:1, p/v), utilizándose pH metro MicropH 2001 (Crison, Alella, España).

3.7.2. Análisis microbiológico

Se tomaron 10 g de muestra de AQF al que se agregó 90 mL de agua de peptona (Oxoid) y cuando fue necesario se prepararon diluciones decimales, realizándose siembras en placa mediante el método de inclusión y en superficie. Se realizó recuento de diferentes grupos microbianos durante la vida útil del producto, recuento total de mesófilos aerobios realizado en PCA (Oxoid) e incubando a 30 °C por 48 h, el recuento total de psicrótrofos en el mismo medio, pero incubando a 7 °C por 10 días. Recuento de mohos y levaduras en agar Rosa de Bengala y Cloranfenicol (Oxoid) con una incubación a 25 °C por 5 días. Recuento de enterobacterias en agar Cristal Violeta, Rojo neutro, Bilis y Glucosa (VRBG, Oxoid) con incubación a 37 °C por 24 h. Recuento de coliformes y *E. coli* en medio agar Brilliance *E. coli* (Oxoid) con incubación a 37 °C por 24 h. Recuento de *Pseudomonas* en medio agar *Pseudomonas* cetrinida (Oxoid) con incubación a 30 °C por 48 h. Y recuento de *St. aureus* en medio agar Baird-Parker (Oxoid) incubado a 37 °C por 48 h.

3.7.3. Color

Se determinó utilizando un colorímetro Hunter Lab (MiniScan XETM, Hunter Associates Laboratory Inc., Reston, Virginia, EE.UU.), usando el iluminador D65, con observador de 10°, para determinar los valores L*, a* y b*, definidos por la Commission Internationale de l'Éclairage (CIE). EL AQF se cortó de manera transversal por la mitad y las mediciones se llevaron a cabo colocando el colorímetro directamente sobre el AQF, las lecturas se hicieron en 7 puntos diferentes de la superficie interna del producto. El valor L* representa la luminosidad (cuyos valores oscilan de 0 (negro) a 100 (blanco), y los parámetros a* (rojo-verde) y b* (amarillo-azul) representan los componentes cromáticos, los cuales no tienen límites numéricos específicos. Con los datos obtenidos se calculó la diferencia de color total (ΔE) de los AQF en relación al AQF control (sin AE), mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

3.7.4. Textura

La caracterización de la textura del AQF se realizó mediante un ensayo de compresión uniaxial, y para ello se utilizó un analizador de textura TA-XT2 (Stable Microsystems, Surrey, Reino Unido). El análisis se llevó a cabo a 21°C y consistió en comprimir un cubo de AQF de 1,5 cm de lado con un cilindro de compresión de 36 mm de diámetro que desciende a velocidad constante de 10 mm/s y fuerza de contacto de 5 g hasta un nivel de deformación superior al punto de fractura (80% de la altura original del AQF) y con 30 mm de distancia de retorno. Los parámetros reológicos obtenidos son el módulo de Young o de elasticidad (E), la tensión o esfuerzo (σ_f) y la deformación (ϵ_f). El estrés y la deformación real se calcularon según Calzada y Peleg (1978).

3.7.5. Oxidación

3.7.5.1. Determinación de hidroperóxidos y MDA por el método TBARS

La determinación de hidroperóxidos (oxidación primaria) y de MDA por el método de TBARS (oxidación secundaria), se realizaron como se indica para las emulsiones en los apartados 3.5.5.1 y 3.5.5.2. Cada muestra fue analizada por triplicado. Las determinaciones se realizaron a los días 1, 7 y 11.

3.7.5.2. Determinación de MDA por HPLC

La cromatografía líquida (HPLC) ofrece una mayor especificidad y sensibilidad para determinar MDA en alimentos. En este estudio se utilizó la técnica de determinación de MDA por HPLC descrita por Papastergiadis *et al.* (2012) con algunas modificaciones.

Para la extracción de MDA de las muestras, se pesaron 5 g de AQF a los que se agregó 15 mL de TCA al 7,5%, se mezcló con vórtex por 1 min, luego se filtró con papel de filtro Whatman n° 1. Se tomó 1 mL del filtrado y se le agregó 3 mL de una solución 40 mM de TBA (disuelto en solución tampón acetato 2 M, pH 2,0). La mezcla se llevó a un baño de agua en ebullición por 40 min, posteriormente se enfrió en un baño con agua helada y se agregó 1 mL de metanol de grado HPLC (Sigma-Aldrich).

Para la cuantificación de MDA en las muestras se preparó una curva de calibración a partir de una solución madre de 10 mM de TEP disuelto en TCA al 7,5%. Esta solución fue agregada a la mezcla de 5 g de AQF con 15 mL de TCA al 7,5%, de tal manera que

las concentraciones finales de TEP en los tubos fueron 2,5, 1,25, 0,625, 0,3, 0,15, 0,03 y 0,015 mM, el procedimiento continuó como en la extracción de MDA de las muestras.

Se tomaron 20 µL de las muestras y se inyectó en una columna ODS - 2,5 µm (4,6 × 200 mm) (Scharlab, Barcelona, España) del equipo de HPLC con Bomba Serie 200 (PerkinElmer, Inc. Shelton CT, EE.UU.) conectada a un inyector automático Waters 717 (Milford, MA, EE.UU.) y a un detector de fluorescencia SAF0111 Serie 200 (PerkinElmer) y equipado con un software de recogida de datos Turbochrom 6.2 (PerkinElmer). La fase móvil utilizada se preparó a partir de una solución 50 mM de KH₂PO₄, metanol y acetonitrilo a pH 5,3 con una relación 72:17:11 (v/v/v), y el flujo de bombeo fue de 1 mL/min. La longitud de onda de excitación y de emisión se fijó en 525 y 545 nm respectivamente. La temperatura de análisis cromatográfico fue de 45 °C.

3.7.6. Análisis sensorial

Los AQFs se evaluaron mediante un análisis sensorial descriptivo en el día 3 de almacenamiento en refrigeración. Se determinaron los atributos de color, sabor y textura. Los catadores forman parte del personal del Departamento de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.8. Análisis estadístico

Los datos se trataron mediante el análisis de varianza (ANOVA) con el programa IBM SPSS para Windows, versión 23.0. La estadística descriptiva, el análisis de varianza (ANOVA), para la determinación de las comparaciones de las diferencias de medias, se utilizó el test de Duncan, con un nivel de significancia de $P < 0,05$. Los análisis de regresión y la bondad de ajuste de los modelos se verificó mediante el coeficiente de determinación R^2 .

3.9. Referencias

- AENOR. 2008. UNE-EN 1650. Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad fungicida o levuricida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en el área alimentaria, industrial, doméstica e institucional. Método de ensayo y requisitos (fase 2, etapa 1). 43pp.
- Albayrak, S. y Aksoy, A. 2012. Essential oil composition and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus cappadocicus* Boiss. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37: 605-614.
- Amiri, H. 2010. Antioxidant Activity of the Essential Oil and Methanolic Extract of *Teucrium orientale* (L.) subsp. *taylori* (Boiss.) Rech. f. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 9: 417-423.
- AOCS. 2017. AOCS Official Method Ce 2-66. Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids. American Oil Chemists' Society. AOCS Press, Champaign.
- AOCS. 2005. AOCS Official Method Ce 1-62. Fatty Acid Composition by Gas Chromatography. American Oil Chemists' Society. AOCS Press, Champaign.
- Calzada, J. F., y Peleg, M. 1978. Mechanical interpretation of compressive stress-strain relationships on solids foods. *Journal of Food Science*, 41:1087-1092.
- Fernández-Ávila, C., Escriu, R., y Trujillo, A. J. 2015. Ultra-High Pressure Homogenization enhances physicochemical properties of soy protein isolate-stabilized emulsions. *Food Research International*, 75: 357-366.
- Gamazo, C. López-Goñi, I. Díaz, R. 2005. Manual práctico de Microbiología. 3ra Ed. Masson, S.A., Barcelona. 264 pp.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., y Riley, T. V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 985-990.
- Hebshy, E. H. E. 2013. Application UHPH in the production of submicron/nano-oil-in-water emulsions using vegetable oils and milk proteins as emulsifiers. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 241 pp.
- Hu, M., McClements, D. J., y Decker, E. A. 2004. Impact of chelators on the oxidative stability of whey protein isolate-stabilized oil-in-water emulsions containing ω -3 fatty acids. *Food Chemistry*, 88: 57-62.
- IDF. 2002. Milk and milk products. Determination of nitrogen content. Routine method using combustion according to the Dumas principle. IDF Standard 185. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

- IDF. 2004. Cheese and processed cheese – Determination of the total solids content (Reference Method). IDF Standard 004:2004. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- ISO. 2008. ISO 3433: 2008 Cheese: Determination of fat content-Van Gulik method. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- Juliano, P., Kutter, A., Cheng, L. J., Swiergon, P., Mawson, R., y Augustin, M. A. 2011. Enhanced creaming of milk fat globules in milk emulsions by the application of ultrasound and detection by means of optical methods. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18: 963-973.
- Köse, E. O., Deniz, I. G., Sarıkürkçü, C., Aktas, Ö., y Yavuz, M. 2010. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Sideritis erythrantha* Boiss. and Heldr. (var. *erythrantha* and var. *cedretorum* P.H. Davis) endemic in Turkey. *Food and chemical toxicology*, 48: 2960-2965.
- Li, H., Fan, Y., Li, J., Tang, L., Hu, J., y Deng, Z. 2013. Evaluating and predicting the oxidative stability of vegetable oils with different fatty acid compositions. *Journal of Food Science*, 78: 633-641.
- Liang, R., Xu, S., Shoemaker, C. F., Li, Y., Zhong, F., y Huang, Q. 2012. Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60: 7548-55.
- Moon, J.-K. y Shibamoto, T. 2009. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 1655-1666.
- Papastergiadis, A., Mubiru, E., Van Langenhove, H., y De Meulenaer, B. 2012. Malondialdehyde measurement in oxidized foods: Evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test in various foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 9589-9594.
- Sorensen, G., Jorgensen, S.S. (1996). A critical examination of some experimental variables in the 2-thiobarbituric acid (TBA) test for lipid oxidation in meat products. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 202: 205–210.
- Zhong, Y. y Shahidi, F. 2015. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. *En Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. F. Shahidi, editor. Elsevier Ltd., Cambridge. 287-333.

Capítulo IV

Actividad antioxidante y antimicrobiana in vitro de aceites esenciales

4.1. Introducción

Los conservantes y antioxidantes sintéticos de los alimentos se asocian con efectos adversos para la salud de las personas, tales como ser cancerígenos probables, o por dar lugar a diversas reacciones alérgicas en el caso de los consumidores con hipersensibilidad a ciertos productos. Debido a esta situación, y porque se quiere mantener los estándares de calidad alimentaria nutricional y sensorial de los alimentos, se está abogando por la aplicación de conservantes naturales en alimentos (Pisoschi *et al.*, 2018). Uno de los productos naturales que surgen como alternativa son los aceites esenciales (AEs), cuya demanda ha tenido un incremento debido a la amplia gama de usos en los productos alimenticios, farmacéuticos, cosméticos, perfumes, aromaterapia y agricultura (Dima y Dima, 2015).

Los AEs son compuestos complejos y volátiles, caracterizados por el olor de las plantas aromáticas del que se extraen (Wang *et al.*, 2017). Se sintetizan a través de vías metabólicas secundarias de las plantas como moléculas de comunicación y defensa. Las sustancias contenidas en los AEs se clasifican principalmente en dos grupos químicos, basados en la ruta metabólica de su síntesis: (i) terpenoides, que están representados

principalmente por monoterpenos y menos comúnmente por sesquiterpenos y (ii) fenilpropanoides de bajo peso molecular (Pavela y Benelli, 2016).

Un gran número de AEs poseen propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Wang *et al.*, 2017). Las características antimicrobianas, generalmente van acompañadas de una capacidad antioxidante confirmada. Entre los principales compuestos que imparten estas características a los AEs están los compuestos fenólicos (flavonoides y no flavonoides), terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, saponinas, tiosulfatos, y los glucosinolatos (Pisoschi *et al.*, 2018). La composición de los AEs, depende de la especie, la subespecie y la ubicación geográfica de la planta, el tiempo de cosecha y las técnicas de extracción (Dima y Dima, 2015).

En este estudio se determinó la capacidad antioxidante y la capacidad antimicrobiana *in vitro* de los AEs de albahaca, canela, clavo, laurel, limón, mandarina, orégano, romero, salvia, tomillo y valeriana; cuyo origen, nombre científico y principales componentes se presentan en la Tabla 4. 1. Para determinar la capacidad antimicrobiana se seleccionaron microorganismos patógenos, indicadores y alterantes de importancia en productos lácteos como son *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, la levadura *Kluyveromyces marxianus* y los mohos *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.*

Tabla 4. 1. Principales componentes de los aceites esenciales utilizados.

Aceite Esencial	Nombre Científico	Origen	Componentes	%
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i>	India	Estragol	76,6
			Linalool	18,98
Canela Hojas	<i>Cinnamomum zeilanicum</i> / <i>Cinnamomum verum</i>	Indonesia	Eugenol	77,89
			Benzoato de bencilo	3,18
			β -Cariofileno	2,15
			Acetato de eugenilo	1,46
			e-Cinamaldehído	1,25
			Linalool	1,23
			α -Felandreno	1,02
Clavo	<i>Syzygium aromaticum</i> / <i>Eugenia caryophyllata</i>	India	Eugenol	87,1
			β -Cariofileno	4,04
			α -Humuleno	1,76
			Isoeugenol	1,53
Laurel	<i>Laurus nobilis</i>	Países del Este	1,8-Cineol	44,25
			Acetato de terpenilo	9,18
			Sabineno	7,11
			β -Pino	5,46
			α -Pino	5,44
			Linalool	4,24
			Limoneno	4,12
			α -Terpineol	3,95
			Terpineno-4-ol	3,31
			Eugenol	0,99
Limón	<i>Citrus limon</i>	España	Limoneno	67,93
			β -Pino	11,03
			γ -Terpineno	8,53
			Sabineno	1,89
			α -Pino	1,82
			β -Mirceno	1,59
			Geraniol	1,14
Mandarina	<i>Citrus reticulata</i>	Italia	Limoneno	73,3
			γ -Terpineno	18,1
			α -Pino	2,8
			β -Mirceno	1,59
			β -Pino	1,55
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	España	Carvacrol	67,55
			<i>p</i> -Cimeno	7,31
			γ -Terpineno	6,94
			β -Cariofileno	4,17
			β -Mirceno	1,52
			α -Tujeno	1,4
			Borneol	1,07
			Timol	0,41
Eugenol	0,14			

Tabla 4.1. (Continuación).

Aceite Esencial	Nombre Científico	Origen	Componentes	%
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	España	1,8-Cineol	46,11
			α -Pino + α -Tujeno	13,32
			Alcanfor	11,5
			β -Pino	5,01
			Canfeno	4,77
			β -Cariofileno	3,09
			Borneol	2
			β -Mirceno	1,61
			<i>p</i> -Cimeno	1,37
			α -Terpineol	1,29
Salvia	<i>Salvia lavandulifolia</i>	España	Alcanfor	29,6
			1,8-Cineol	22,5
			Canfeno	6,8
			α -Pino	5,13
			Limoneno	4,47
			β -Pino	4,05
			Borneol	2,87
			Acetato de trans sabinilo	2,86
			β -Mirceno	2,76
			Acetato de linalilo	2,54
			Acet. de terp. + Sabinol	2,37
			Linalool	1,49
			Sabineno	1,34
			Acetato de bornilo	1,25
			β -Cariofileno	1,22
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	España	Timol	46,14
			<i>p</i> -Cimeno	16,3
			γ -Terpineno	8,84
			Linalool	4,04
			Carvacrol	3,69
			Terpineno-4-ol	2,41
			β -Cariofileno	2,1
			Borneol	1,75
			β -Mirceno	1,56
			α -Terpineno	1,35
			Canfeno	1,15
			α -Tujeno	1,09
			α -Pino	1,02
Valeriana	<i>Valeriana officinalis</i>	India	Acetato de bornilo	36,34
			Canfeno	26,67
			α -Pino	6,81
			β -Pino	4,64
			Acetato de mirtenilo	3,81
			Valerenal	2,26
			α -Fencheno	2,09
			Limoneno	1,96
			Borneol	1,54

Fuente: Esencias Martínez Lozano, S.A. (Murcia, España, 2014).

4.2. Resultados y discusión

4.2.1. Actividad antioxidante *in vitro* de los aceites esenciales

4.2.1.1. Método del radical DPPH

Este método se basa en que el DPPH es un radical libre estable a temperatura ambiente, que en presencia de una molécula antioxidante se reduce con el consecuente cambio de color violeta a un amarillo claro (Kedare y Singh, 2011).

La determinación de la actividad antioxidante de los AEs seleccionados se llevó a cabo en dos etapas. En una primera etapa se realizó un primer ensayo de discriminación entre los 11 AEs a una única concentración, 1,25 mg/mL, con la finalidad de determinar qué AEs tenían mayor actividad antioxidante. En una segunda etapa, entre los que presentaron mayor capacidad antioxidante se determinó la CE₅₀, en este caso los AEs se ensayaron a concentraciones de 60, 80, 200, 400, 800 y 2000 µg/mL.

En la primera etapa de este estudio, según su capacidad para inhibir el radical DPPH, se obtuvieron cuatro grupos de aceites esenciales. Los AEs que presentaron menor capacidad de inhibición fueron la albahaca, el limón, la mandarina, la salvia, el romero y la valeriana con menos de un 7% de inhibición, seguidos del laurel con un 13,7%, después un tercer grupo conformado por tomillo y orégano con una inhibición menor al 50%, y finalmente los que presentaron una mayor capacidad inhibitoria (~95%) fueron los de canela y clavo, comparables con los antioxidantes sintéticos BHA y BHT (Tabla 4. 2). Los cuatro últimos AEs se seleccionaron para la segunda etapa de determinación de la CE₅₀.

Entre el grupo de AEs que presentaron menor actividad antioxidante de alrededor de un 7% (albahaca, limón, mandarina, salvia, romero y valeriana), y relacionado con su composición, se puede comentar que, en el caso de la albahaca, se asocia principalmente al linaol presente aproximadamente en un 19%, el cual es un terpenoide no fenólico que tendría propiedades de barrido de radicales relevante y una capacidad excepcional para inhibir la peroxidación lipídica (Domingues y Duarte, 2016). Sin embargo, se ha determinado que su otro componente mayoritario, el estragol (77%), no presenta actividad antioxidante estimada por el método DPPH, debido a que este compuesto no es donante de protones y electrones, necesarios para la neutralización de este radical (Dawidowicz y Olszowy, 2014).

Tabla 4. 2. Porcentaje de inhibición *in vitro* de aceites esenciales por el método de inhibición del radical DPPH.

Aceite esencial	Actividad antioxidante (%)
Albahaca	6,92 ± 4,27 ^a
Canela	95,46 ± 2,85 ^d
Clavo	95,60 ± 1,83 ^d
Laurel	13,72 ± 4,57 ^b
Limón	5,84 ± 2,30 ^a
Mandarina	6,80 ± 2,27 ^a
Orégano	49,74 ± 3,17 ^c
Romero	4,85 ± 1,78 ^a
Salvia	6,56 ± 3,90 ^a
Tomillo	46,52 ± 4,89 ^c
Valeriana	6,13 ± 3,24 ^a
BHA	95,42 ± 1,02 ^d
BHT	93,82 ± 0,12 ^d

^{a-d} Valores en la misma columna con diferente superíndice indican diferencias significativas (P<0,05).

Cuando Dawidowicz y Olszowy (2014) analizaron el AE de limón con un 70% de limoneno y el AE de salvia, con un 29% de alcanfor, obtuvieron 13% de actividad antioxidante, mientras que para sus componentes principales limoneno y alcanfor, un 8 y 10% de inhibición respectivamente; por lo que asumen que las propiedades antioxidantes del AE no siempre dependen de la actividad antioxidante de su componente principal y que sus otros componentes pueden tener un efecto sinérgico en la actividad antioxidante. En nuestro estudio, pese a tener una composición similar (Tabla 4. 1) a los citados previamente, la actividad antioxidante fue inferior (Tabla 4. 2).

En el caso del AE de romero (46 % de 1,8-cineol, 13% de α -pineno + α -tujeno, 11% de alcanfor y 2% de borneol), mostró menor actividad antioxidante (4,8%), los resultados obtenidos fueron inferiores a los obtenidos por Bajalan *et al* (2017), quienes para 1,6 mg/mL de AE de romero compuesto por un 23% de 1,8-cineol, 20 % de α -pineno, 6% borneol y 4% de alcanfor, obtuvieron 11,03% de actividad antioxidante. La diferencia en los resultados podría deberse a la mayor concentración de AE utilizado por los investigadores, los autores también señalan que niveles más altos de alcanfor y borneol pueden aumentar la capacidad antioxidante; además el 1,8-cineol y el borneol que mostraron capacidad para neutralizar radicales libres (Anthony *et al.*, 2012).

Dosoky y Setzer (2018) indican que el AE de mandarina mostró una actividad moderada de eliminación de radicales, principalmente debido al alto contenido de *d*-limoneno; afirmación que coincide con Gao *et al.* (2011), quienes obtuvieron AE de mandarina con *d*-limoneno como el compuesto predominante, representando el 65,6-83,1%. Además, las concentraciones de compuestos volátiles como β -mirceno y γ -terpineno, se detectaron como relativamente altas. En nuestro estudio la composición de este AE es similar a la reportada por los investigadores y obtuvimos una actividad antioxidante de 6,8%.

Miguel (2010b) señala que la actividad antioxidante del AE laurel es limitada por la cantidad relativamente baja de compuestos fenólicos en estos aceites, sin embargo, la presencia de eugenol podría incrementar su actividad antioxidante. También indican que la actividad antioxidante de este AE se debe a la presencia de estragol y 1,8- cineol, que no son contrarios a los compuestos fenólicos. En nuestro estudio la actividad antioxidante del AE de laurel fue ~14% y tiene como su compuesto mayoritario al 1,8-cineol y una pequeña cantidad de eugenol (~1%) que estaría influenciando positivamente a su actividad antioxidante.

El AE de Valeriana presentó una baja actividad antioxidante, lo cual estaría relacionado con la falta de compuestos fenólicos; este AE contiene monoterpenos hidrocarbonados como canfeno, α -pineno, β -pineno y limoneno; al respecto Martins *et al.* (2014) hallaron que los AE que tienen estos monoterpenos como compuestos dominantes, mostraron una baja actividad antioxidante por el método del radical DPPH.

Para determinar la CE_{50} de los AEs seleccionados, se determinó su actividad antioxidante a concentraciones entre 60 y 2000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 4. 1). Se observó que entre las concentraciones de 800 a 2000 $\mu\text{g/mL}$, los AEs de canela y clavo alcanzaron prácticamente su máxima capacidad inhibitoria de radicales DPPH, incrementado aproximadamente de un 90 a un 94% en canela, y de un 91% a un 94% en clavo. Viuda-Martos *et al.* (2010) obtuvieron capacidades inhibitorias de radicales DPPH de AE de clavo de 97,85 y 98,75% para concentraciones de 5000 y 50000 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

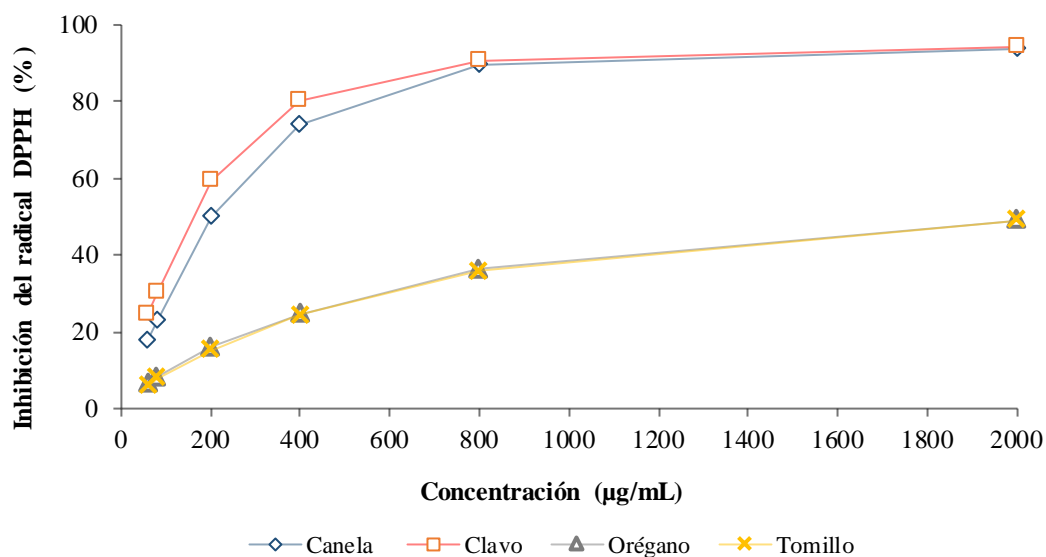


Figura 4. 1. Inhibición del radical DPPH (%) por los aceites esenciales de canela, clavo, orégano, y tomillo a concentraciones de 60, 80, 200, 400, 800 y 2000 µg/mL.

La CE_{50} es inversamente proporcional a la actividad antioxidante, y como se observa en la Tabla 4. 3, los AE de canela y clavo presentaron valores significativamente menores de CE_{50} que los de orégano y tomillo. Los resultados difieren cuantitativamente con los de Viuda-Martos *et al.* (2010), quienes obtuvieron una CE_{50} de 380, 1100 y 3900 µg/mL para AE de clavo, tomillo y orégano, respectivamente, aunque como en nuestro estudio, el clavo fue el AE que tuvo mayor capacidad inhibitoria y el orégano la menor.

El timol (2-iso-propil-5-metilfenol) y su isómero carvacrol (5-iso-propil-2-metilfenol) actúan como antioxidantes y captadores de radicales libres (Beena *et al.*, 2013), reduciendo el radical DPPH• estable de color púrpura en DPPH-H de color amarillo (Gavaric *et al.*, 2015); y son los principales compuestos presentes en los AEs de orégano y tomillo (Tabla 4. 1), siendo la actividad antioxidante del timol superior a la del carvacrol, atribuida a un mayor obstáculo estérico del grupo fenólico del timol (Ramos *et al.*, 2014). En el AE de tomillo, los valores de inhibición a 2000 µg/mL fueron similares a los obtenidos por Albayrak y Aksoy (2012), con un valor de alrededor de un 48% de actividad antioxidante, aunque la especie de tomillo de extracción de los AE es diferente. Sin embargo, según estos autores el tomillo que estudiaron, *Thymus cappadocicus*, presenta un perfil de componentes equivalente a *T. vulgaris*, especie utilizada en nuestro estudio.

Tabla 4. 3. Concentración efectiva media ($\mu\text{g/mL}$) de aceites esenciales mediante el método de inhibición del radical DPPH.

Aceite esencial	CE ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Canela	208,25 \pm 34,16 ^a
Clavo	158,83 \pm 15,45 ^a
Orégano	2554,11 \pm 124,67 ^b
Tomillo	2447,92 \pm 199,34 ^b

^{a,b} Valores en la misma columna con diferente superíndice indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

En los AEs de canela y clavo su mayor capacidad para inhibir al radical DPPH, se asocia al eugenol, principal componente de ambos (Tabla 4. 1). Dawidowicz y Olszowy (2014) determinaron una actividad antioxidante ~82% para eugenol y para un AE de clavo, demostrando que las propiedades antioxidantes de este AE dependen del eugenol y que los otros componentes no presentan actividad antioxidante o bien estas son mínimas.

Se han propuesto dos hipótesis sobre la actividad antioxidante del eugenol, la primera que este compuesto reduce dos o más DPPH•, a pesar de disponer de un solo hidrógeno en su grupo hidroxilo, y la segunda que plantea la formación de dímeros de eugenol (deshidrodieugenol) con dos grupos hidroxilo fenólicos originados a partir de radicales intermedios eugenilo (Cortés-Rojas *et al.*, 2014). Adicionalmente, Bortolomeazzi *et al.* (2010) indican que el margen de tiempo de la reacción entre el DPPH• y eugenol puede solaparse con la reacción entre el DPPH• y deshidrodieugenol, lo que puede contribuir a la actividad de eliminación de radicales por el eugenol.

4.2.1.2. Método de decoloración del β -caroteno

El método de decoloración de β -caroteno se basa en mediciones espectrofotométricas de decoloración del β -caroteno inducida por los productos de degradación oxidativa del ácido linoleico (Duarte-Almeida *et al.*, 2006). La actividad antioxidante determinada por el método de decoloración del β -caroteno, se debe principalmente a compuestos fenólicos. Según Amiri (2010), existe una relación entre la inhibición de la formación de hidroperóxido y la presencia de algún núcleo fenólico presente en los aceites esenciales.

Tabla 4. 4. Actividad antioxidante de los aceites esenciales por el método de decoloración del β -caroteno.

Aceite esencial	Actividad Antioxidante (%)
Albahaca	80,39 \pm 3,57 ^b
Canela	95,19 \pm 3,30 ^c
Clavo	97,52 \pm 1,65 ^c
Laurel	94,18 \pm 2,18 ^c
Limón	94,46 \pm 0,85 ^c
Mandarina	92,01 \pm 5,91 ^c
Orégano	92,50 \pm 5,88 ^c
Romero	64,26 \pm 8,03 ^a
Salvia	71,11 \pm 5,70 ^a
Tomillo	95,33 \pm 1,23 ^c
Valeriana	67,66 \pm 5,78 ^a
BHT	97,94 \pm 1,80 ^c
BHA	97,72 \pm 1,98 ^c

^{a-c}Valores en la misma columna con diferente superíndice indican diferencias significativas (P<0,05).

Todos los AEs, fueron testados a 2 mg/mL de concentración, y como se muestra en la Tabla 4. 4. se obtuvieron 3 grupos de AEs con actividades antioxidantes diferenciadas: los AEs que presentaron menor actividad antioxidante fueron los de romero, salvia y valeriana, seguidos de albahaca y finalmente los de mandarina, orégano, laurel, limón, canela, tomillo y clavo, que fueron los AEs que tuvieron mayor actividad antioxidante. Los antioxidantes BHA y BHT, se utilizaron con fines comparativos por ser de amplio uso en la industria alimentaria, a una concentración de 0,4 mg/mL de concentración, mostrando una elevada capacidad antioxidante, estadísticamente similar a la obtenida por el último grupo de AEs, resultado similar al obtenido por Köse *et al.* (2010).

De forma general, los resultados obtenidos en nuestro estudio fueron similares a los obtenidos por Anthony *et al.* (2012) que realizaron un estudio con diferentes AEs de diversos orígenes. Para el laurel de origen húngaro el valor fue de alrededor de un 96%, para clavo y canela de Sri Lanka 98,5% y 96% respectivamente, para tomillo de España de un 96% y para el orégano de Marruecos de un 96%. Sin embargo, en la albahaca de origen estadounidense obtuvieron una actividad antioxidante de un 96%, valor superior al encontrado en nuestro estudio que fue de aproximadamente de un 80%.

Los resultados obtenidos mediante el método del radical DPPH de los AEs de albahaca, laurel, limón, mandarina, romero, salvia y valeriana fueron diferentes a los obtenidos por el método de decoloración del β -caroteno. Al respecto, Dawidowicz y Olszowy (2014) también encontraron diferencias al aplicar estos métodos y afirman que esto no es extraño, pues mediante el método de decoloración del β -caroteno se evalúa la capacidad de neutralización radical por degradación homolítica del enlace O-H en el grupo hidroxilo que se produce en un antioxidante, mientras que en el método DPPH la eliminación de radicales está precedido por la disociación de este grupo. Asimismo, el método de DPPH se relaciona con el barrido de electrones y radicales, y el método de decoloración del β -caroteno se asocia con la peroxidación de lípidos (Moon y Shibamoto, 2009).

Miguel (2010b) reportaron que α - y γ -terpineno, que poseen restos 1,3- y 1,4-dieno, eran donantes de H a DPPH mucho más débiles que su capacidad para inhibir la peroxidación de lípidos, siendo su eficacia en la prevención del proceso de peroxidación lipídica igual a la de los compuestos fenólicos carvacrol y timol. Y según Martins et al. (2014) la capacidad blanqueadora de β -caroteno de los monoterpenos hidrocarbonados como α -pineno, sabineno, limoneno, β -mirceno, α y β -felandreno, se puede correlacionar con la presencia de grupos metileno activados. La mayoría de los compuestos señalados por estos investigadores forman parte de los AEs de nuestro estudio (Tabla 4. 1).

4.2.2. Actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales

Para determinar la CMI de los once AE sobre los 10 microorganismos elegidos (patógenos, indicadores y alterantes) se utilizó el método de microdilución en placa utilizando el equipo Bioscreen C, considerándose la CMI, aquella concentración de AE que no permite el crecimiento microbiano, lo cual se evidencia cuando la absorbancia de la solución, que es un indicador de turbidez y éste a su vez de crecimiento microbiano, no varía durante el tiempo de incubación.

En la Figura 4. 2 se muestran, como ejemplo de los resultados obtenidos mediante el equipo Bioscreen C, las curvas de crecimiento de *Staphylococcus aureus* frente a cada AE a una concentración de 0,5 mg/mL. Como se puede observar, con los AEs de orégano y tomillo la absorbancia permaneció constante, es decir se inhibió el crecimiento microbiano. A esta concentración, los AEs de canela y clavo tuvieron un limitado efecto inhibitorio, que se traduce en una prolongada fase de latencia de $10,03 \pm 0,33$ y $16,91 \pm 3,78$ h para canela y

clavo, respectivamente (Tabla 4. 8), mientras que el efecto inhibitor del resto de AEs fue muy reducido.

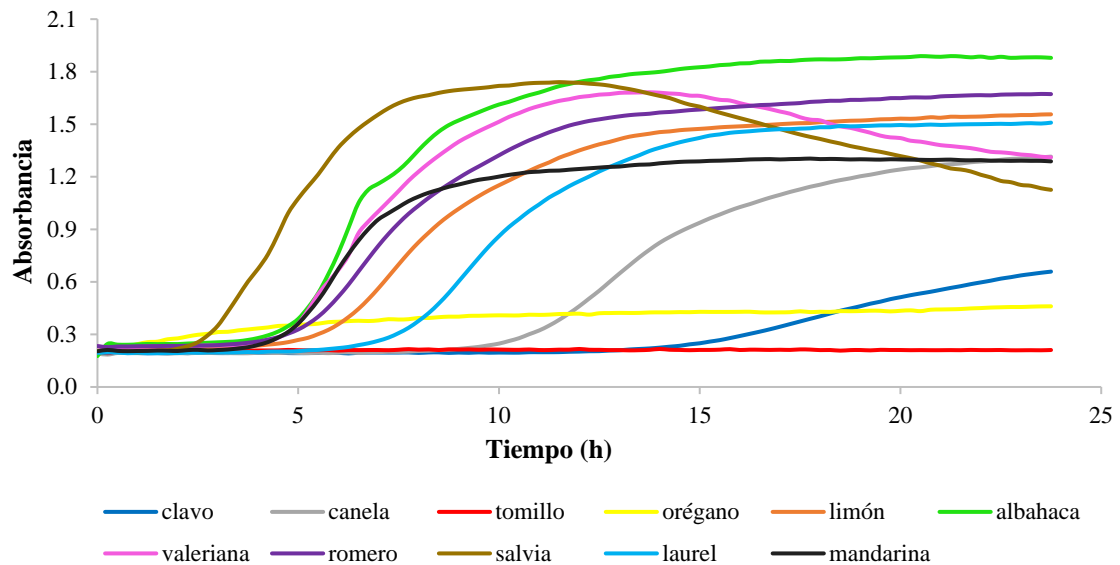


Figura 4. 2. Curvas de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en presencia de diferentes aceites esenciales a una concentración de 0,5 mg/mL durante un período de incubación de 24 h a 37 °C.

El análisis descrito en el párrafo anterior y en la Figura 4. 2 se realizó para todos los AEs, aplicados a las diferentes concentraciones frente a cada microorganismo. El resultado obtenido de forma cualitativa se presenta en la Tabla 4. 5, y en la Tabla 4. 6 se presenta el análisis cuantitativo que se realizó mediante el software GraphPad Prism, determinando el área bajo la curva que permitió ajustar los valores de la CMI para cada microorganismo. En algunos casos, no fue posible determinarlo de forma precisa porque las curvas presentaron formas anómalas. Los resultados para los diferentes microorganismos y AEs fueron muy variados. Se tiene que tener en cuenta que la actividad antibacteriana de un extracto vegetal depende del quimiotipo de la planta, de la preparación del extracto, del disolvente utilizado en su extracción y, por último, de la sensibilidad de los microorganismos (Albayrak y Aksoy, 2012).

Tabla 4. 5. Concentración mínima inhibitoria (mg/mL) de los aceites esenciales frente a los microorganismos.

Aceite esencial	Microorganismos									
	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. lactis</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>A. niger</i>	<i>Penicillium sp.</i>
Albahaca	5	10	10	20	> 20	5	20	2	10	5
Canela	1	1	1	1	>2	0,5	1	0,5	1	0,5
Clavo	1	1	1	1	>2	0,5	1	0,5	1	0,5
Laurel	5	10	10	10	> 20	5	> 20	5	5	5
Limón	5	> 20	> 20	10	> 20	20	>10	5	>20	10
Mandarina	> 20	20	> 20	20	> 20	5	>10	2	>20	>20
Orégano	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,25	0,25	0,125	0,5	0,5
Romero	5	> 20	20	20	> 20	10	10	2	10	20
Salvia	5	5	10	10	> 20	5	>10	2	10	20
Tomillo	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,25	0,25	0,125	1	0,5
Valeriana	20	10	> 20	10	20	1	>10	>5	20	5

Tabla 4. 6. Concentración mínima inhibitoria (mg/mL) de los aceites esenciales estimadas mediante el software GraphPad Prism.

Aceite esencial	Microorganismos								
	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. lactis</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>A. niger</i>
Albahaca	4,30	6,98	8,91			3,29			
Canela	0,61	0,91	0,84	0,74	1,66	0,34	0,58	0,28	0,34
Clavo	0,55	0,57	0,84	0,78	1,66	0,61		0,41	0,52
Laurel	5,36					3,55		2,36	6,17
Limón	3,97	21,08		5,75		17,22		3,04	
Mandarina	53,22				61,61	3,05		1,18	38,47
Orégano	0,33		0,37	0,29	0,59	0,19	0,23	0,10	0,27
Romero								1,80	9,51
Salvia	4,93	4,16	9,33		22,23		14,91	1,68	9,74
Tomillo	0,33		0,39	0,25	0,53	0,14		0,10	0,26
Valeriana	14,34					0,71		8,30	

La actividad antimicrobiana del AE de albaca fue baja, con CMI's generalmente superiores a 2 mg/mL, valores que están por encima de lo obtenidos por Li y Chang (2016). La baja actividad microbiana, se debe a que los componentes principales del AE de albahaca, el estragol (77%) y el linalool (17%) tienen una actividad antibacteriana muy limitada (Bagamboula *et al.*, 2004; Sharopov *et al.*, 2016).

Existen diferentes quimiotipos de AE de romero, con diversos compuestos principales y con diferentes actividades antimicrobianas, por lo que es difícil comparar los resultados entre los diferentes autores. Concretamente, en nuestro estudio con el AE de romero que tiene un 46% de 1,8-cineol, 13% de α -pineno + α -tujeno, y 11% de alcanfor, se obtuvo una CMI de 2 mg/mL para la levadura *K. marxianus*, 5 mg/mL para *E. coli* y > 10 mg/mL para el resto de microorganismos (Tabla 4. 5). En este AE no fue posible determinar adecuadamente el CMI con el método del área bajo la curva. Viuda-Martos *et al.* (2010) estudiaron un AE de romero con un quimiotipo definido por eucaliptol-alcanfor- α -pineno, observando que no mostró actividad antibacteriana contra *Listeria sp.* Otros autores, observaron que cuando el eucaliptol fue el compuesto más abundante, la eficacia del aceite de romero disminuyó considerablemente, cuando el alcanfor fue el componente principal, mostró una actividad moderada frente a *St. aureus*. Otros investigadores, atribuyeron la actividad antimicrobiana del AE de romero al ácido carnósico (Klančnik *et al.*, 2009). Por otro lado, Ojeda-Sana *et al.* (2013) determinaron la CMI de los compuestos del AE de romero en forma pura. En este estudio, el α -pineno fue el único compuesto capaz de inhibir a *St. aureus* y *E. coli* con una CMI de 0,8 μ L/mL. El 1,8-cineol fue activo frente a *E. coli* con una CMI de 8 μ L/mL, pero no fue activo contra *St. aureus*. El alcanfor y el borneol inhibieron a *St. aureus* con CMI's de 0,4 y 2 μ L/mL, respectivamente. El mirceno, componente principal del AE de romero de otro fenotipo, no mostró ninguna actividad antimicrobiana.

El AE de mandarina fue uno de los menos efectivos con una CMI igual o superior a 20 mg/mL en la mayoría de microorganismos, a excepción de *L. lactis*, y la levadura, que fueron los más sensibles con CMI's entre 1 y 5 mg/mL (Tabla 4. 5 y Tabla 4. 6). Nuestros resultados fueron muy diferentes a los obtenidos por Mandal y Mandal (2015) que obtuvieron valores de CMI para AE de mandarina de dos orígenes diferentes de entre 0,9-2,6 mg/mL para *P. aeruginosa*, de 0,6- 2,5 mg/mL para *St. aureus* y de 1,3 y 2 mg/mL para *E. coli*. Frente a *L. monocytogenes* y *St. aureus* la CMI fue de 10 mg/mL en el AE de

mandarina de la variedad Dancy. Los valores altos de CMI obtenidos en nuestro estudio estarían relacionados con la composición del AE, cuyo componente principal fue el limoneno, y que según Chutia *et al.* (2009) este componente contribuye principalmente al olor del aceite, mientras los que tienen actividad antimicrobiana son el linalool, óxido de cariofileno, α -pineno y α -terpineol.

Los AEs de orégano y tomillo presentaron las mayores actividades antimicrobianas, con CMI de entre 0,5 y 1,0 mg/mL para *P. aeruginosa*, y entre 0,1 y 0,5 mg/mL para el resto de bacterias y mohos (Tabla 4. 5. y 4.6). De forma general, los AE de clavo y canela se comportaron de manera equivalente, ya que se obtuvieron CMIs similares para todos los microorganismos estudiados (Tabla 4. 5. y 4.6), lo cual se corroboró al estimar los valores de tiempo de latencia (λ), especialmente, y velocidad máxima de crecimiento microbiano (μ_{max}) para 2 concentraciones por debajo de la CMI (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Fase de latencia (λ , h) y velocidad máxima (μ_{max} , Δ absorbancia/h) de desarrollo de bacterias y levaduras a dos concentraciones por debajo de la concentración mínima inhibitoria de aceites esenciales de tomillo y orégano.

Microorganismo	Concentración (mg/mL)	Aceite esencial	Fase de latencia	Velocidad máxima	Microorganismo	Concentración (mg/mL)	Fase de latencia	Velocidad máxima
<i>E. coli</i>	0,25	tomillo	8,93 ± 0,88	0,18 ± 0,15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,125	8,53 ± 0,20	0,02 ± 0,00
		orégano	11,09 ± 1,20	0,29 ± 0,01			8,94 ± 0,10	0,02 ± 0,00
	0,125	tomillo	3,04 ± 0,05	0,30 ± 0,00		0,0625	7,12 ± 0,15	0,01 ± 0,00
		orégano	3,11 ± 0,06	0,31 ± 0,00			6,85 ± 0,07	0,02 ± 0,00
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,25	tomillo	8,98 ± 0,27	0,04 ± 0,01	<i>Lactococcus lactis</i>	0,125	10,90 ± 1,19	0,01 ± 0,01
		orégano	8,01 ± 0,64	0,17 ± 0,18			11,72 ± 0,17	0,01 ± 0,00
	0,125	tomillo	5,25 ± 0,02	0,33 ± 0,01		0,0625	6,23 ± 0,45	0,06 ± 0,02
		orégano	5,42 ± 0,43	0,33 ± 0,00			6,56 ± 0,04	0,05 ± 0,00
<i>Salmonella Enteritidis</i>	0,25	tomillo	3,71 ± 0,06	0,32 ± 0,00	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,5	6,58 ± 1,89	0,13 ± 0,05
		orégano	3,81 ± 0,01	0,36 ± 0,01			9,98 ± 0,35	0,01 ± 0,00
	0,125	tomillo	3,09 ± 0,04	0,35 ± 0,00		0,25	6,05 ± 0,08	0,41 ± 0,01
		orégano	3,15 ± 0,09	0,38 ± 0,01			6,42 ± 0,01	0,10 ± 0,06
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,25	tomillo	16,74 ± 0,19	0,14 ± 0,06	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0,0625	22,46 ± 2,62	0,04 ± 0,01
		orégano	20,84 ± 0,44	0,06 ± 0,04			19,74 ± 0,22	0,06 ± 0,00
	0,125	tomillo	16,04 ± 0,00	0,19 ± 0,00		0,03125	19,15 ± 0,32	0,11 ± 0,01
		orégano	18,73 ± 0,08	0,16 ± 0,00			18,12 ± 0,02	0,14 ± 0,00

Los componentes principales que se asocian con los AEs de orégano y tomillo son el carvacrol y timol; en el AE de orégano prima el carvacrol con un 70,2% y el timol está presente en un 2,4%, mientras que el AE de tomillo tiene un 46% de timol y un 3,69% de carvacrol (Tabla 4. 1). Aunque el p-cimeno, fue el segundo componente mayoritario en los AEs de orégano y tomillo, se ha descrito que no muestra actividad antibacteriana incluso a concentración del 10% (v/v) (Bagamboula et al., 2004). La falta de actividad antimicrobiana del p-cimeno generalmente se atribuye a la falta de un grupo hidroxilo, factor importante en el mecanismo de acción antimicrobiano. Sin embargo, esta explicación es muy simple, ya que la baja solubilidad de este compuesto en soluciones acuosas impide una determinación cuantitativa de su actividad (Veldhuizen et al., 2006).

El efecto inhibitor de los AEs de tomillo y orégano ya fue observado por otros autores, con resultados bastante similares a los de nuestro estudio. Así, Guarda *et al.* (2011), que evaluaron la CMI en compuestos puros de carvacrol y timol, determinaron que en el caso del carvacrol para *St. aureus* y *A. niger* la CMI fue de 0,225 mg/mL y en *E. coli* algo superior (0,375 mg/mL), y para el timol la CMI determinada fue de 0,250 mg/mL. Por otro lado, Nikolić *et al.* (2014), que determinaron la CMI en AE de tomillo, obtuvieron valores de 0,16 mg/mL para *P. aeruginosa*, y 0,08 mg/mL para *St. aureus*, observando de forma similar a nuestro estudio, que en general los hongos parecen ser más sensibles a los aceites esenciales, lo cual se explicaría por su diferente organización celular. De hecho, Holley y Patel, (2005) sugieren que los esteroides presentes en membranas de levaduras y mohos, no confieren resistencia contra los AE.

La actividad antimicrobiana del carvacrol y timol, se relaciona con su estructura química. Ambos son isómeros estructurales que tienen un grupo hidroxilo en lugares diferentes del anillo fenólico, y justamente parece ser que la presencia de grupos hidroxilo, aunque no su localización, y la presencia de un sistema de electrones deslocalizados en los compuestos fenólicos, son importantes para su actividad antimicrobiana (Ben Arfa *et al.*, 2006; Cacciatore *et al.*, 2015; Jayasena y Jo, 2013; Xu *et al.*, 2008). Para evidenciar la importancia de los grupos hidroxilo, Veldhuizen *et al.* (2006) sustituyeron el grupo hidroxilo del carvacrol por un grupo amino y observaron que la actividad antimicrobiana fue 3 veces menor, a pesar de que no afectó a la hidrofobicidad, estructura espacial y solubilidad del compuesto. Estos autores concluyeron que, si bien el grupo hidroxilo de carvacrol no es esencial para la actividad antimicrobiana, sí que contribuye en el mecanismo de acción.

Otro aspecto a considerar, en la acción inhibitoria de los compuestos aromáticos es que se relaciona, en la mayoría de los casos, con la hidrofobicidad, que está directamente relacionada con el logP (Ben Arfa *et al.*, 2006). El carvacrol y timol son compuestos hidrófobos, y es probable que se disuelvan en el dominio hidrófobo de la membrana citoplasmática de las células bacterianas, entre las cadenas acilo lipídicas (Guarda *et al.*, 2011), que se confirmó en un estudio realizado por Lambert *et al.* (2001) en *St. aureus* y *P. aeruginosa*. Estos compuestos también son capaces de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas liberando los lipopolisacáridos, cambiando así la permeabilidad del ATP en la membrana citoplasmática (Guarda *et al.*, 2011), afectando tanto el ordenamiento como la estabilidad de la bicapa lipídica, y como consecuencia se incrementa el flujo pasivo de protones a través de la membrana (Xu *et al.*, 2008). Adicionalmente el mecanismo de acción del carvacrol frente a las bacterias se relaciona con la alteración de las proteínas integradas en la membrana (Bajpai *et al.*, 2012), la disrupción de lípidos, la síntesis de ARN, la actividad de ATPasa y la bomba de eflujo. Precisamente, la mayor resistencia de *P. aeruginosa*, podría estar asociada al mecanismo de bombeo de salida y actividad de la β -lactamasa (Tapia-Rodriguez *et al.*, 2017). En definitiva, el carvacrol provoca la desestabilización de la membrana bacteriana, la disminución en el potencial de la membrana, la disipación del gradiente de pH y una perturbación de las fracciones lipídicas de las membranas citoplasmáticas de las bacterias (Cacciatore *et al.*, 2015), produciéndose cambios en la composición de los ácidos grasos con un aumento del contenido de ácidos grasos insaturados (Baser, 2008).

Finalmente, otro aspecto a tener en cuenta es la acidez del compuesto fenólico, aunque solo es un ácido débil (pKa ligeramente superior a 10 para los fenoles alquilados), la capacidad de donar un protón podría estar involucrada en el mecanismo de trabajo del carvacrol, que está relacionado con la pérdida del gradiente de protones, y por lo tanto la fuerza motriz del protón sobre la membrana bacteriana. Este mecanismo consiste en que el carvacrol se puede difundir hacia adelante y hacia atrás a través de la membrana bacteriana, mientras se intercambia el protón ácido por otro catión en el lado citosólico de la membrana y el intercambio catiónico opuesto en el lado exterior (Veldhuizen *et al.*, 2006).

Los AEs de clavo y canela, también mostraron buen efecto frente a *P. aeruginosa* que fue la más resistente, presentando una CMI más alta (1,5 mg/mL) (Tabla 4. 5 y Tabla 4. 6). El componente principal de los AEs de clavo y canela fue el eugenol con un 87,1 y un 77,89%, respectivamente (Tabla 4. 1). Aparentemente los AE de clavo y canela se comportaron de

manera similar, ya que se obtuvieron CMI's similares para todos los microorganismos estudiados (Tabla 4. 5 y Tabla 4. 6), sin embargo, al estimar los valores de tiempo de latencia (λ), especialmente, y la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) microbiano para 2 concentraciones por debajo de la CMI, se observó que para algunos microorganismos el AE de canela fue más efectivo que el de clavo (*E. coli* y *L. monocytogenes*), mientras que en otros ocurre lo contrario (*St. aureus*, *L. lactis*, *Lb. plantarum* y *P. aeruginosa*). Estos resultados evidenciarían que estos AE no tienen la misma eficacia, y que para determinar la CMI exacta, se podría combinar los resultados obtenidos mediante el área bajo la curva y los valores relacionados con el crecimiento microbiano.

En el caso del AE de canela, los resultados fueron similares a los de Herman *et al.* (2013), en relación a la mayor resistencia de *P. aeruginosa*, sin embargo, al contrario de lo observado en nuestro estudio, *E. coli* fue más resistente que *St. aureus*. Por el contrario, Cardoso-Ugarte *et al.* (2016) obtuvieron una CMI muy superior a la determinada en nuestro estudio. La CMI del AE de canela fue 2,5 mg/mL para *L. monocytogenes* y 5 mg/mL para *St. aureus*, *E. coli*, y *Salmonella typhimurium*, los investigadores asociaron la actividad antibacteriana del AE de canela a la presencia de compuestos oxigenados como linalool y 1,8-cineol.

El eugenol, tiene un gran efecto en la pérdida de proteínas de la membrana celular de microorganismos Gram positivos y Gram negativos, debido en parte a su hidrofobicidad, que de forma similar al timol y carvacrol, le permite separar los lípidos de la membrana, desestabilizando la estructura celular y haciéndola más permeable (Oyedemi *et al.*, 2009). El eugenol mostró una menor eficacia antimicrobiana que el carvacrol, lo cual estaría relacionado con la hidrofobicidad del compuesto; Ben Arfa *et al.* (2006) determinaron en el eugenol un valor logP de 2,73 para *E. coli* y *St. aureus*, mientras que para el carvacrol el logP fue de 3,52. Estos valores se relacionan con la hidrofobicidad y según estos investigadores un compuesto con mayor hidrofobicidad es más tóxico, siendo la membrana citoplasmática el lugar primario de acción, el efecto lo producen particularmente los compuestos con logP mayor a 3. En nuestro estudio la CMI determinada para los AEs de canela y clavo fueron superiores a los AEs de tomillo y orégano, a excepción de los mohos que fueron similares. Se ha evidenciado que los AEs que poseen mayor actividad inhibitora frente a microorganismos patógenos, son aquellos que contienen altos porcentajes de compuestos fenólicos como carvacrol, timol y eugenol (Burt, 2004).

Las bacterias Gram negativas son menos sensibles a la acción del antimicrobiano, lo cual puede deberse a que la membrana externa que rodea la pared de lipopolisacáridos en estos microorganismos restringe la difusión de compuestos hidrófobos, necesitándose así una mayor concentración de antimicrobiano para obtener el mismo efecto que en las bacterias Gram positivas (Guarda *et al.*, 2011). Ello se observó en las bacterias lácticas, que fueron las más sensibles y en *P. aeruginosa* que fue el microorganismo más resistente. Sin embargo, en los resultados obtenidos en las CMI de los AEs de canela, clavo, tomillo y orégano en microorganismos patógenos, fue muy similar en las bacterias Gram positivas y negativas. Al respecto, Holley y Patel (2005) refieren que si bien las bacterias Gram-negativas tienen superficies más hidrófobas, lo cual las haría más resistentes a los AE, también tienen proteínas porinas en su membrana externa, que pueden crear canales lo suficientemente grandes como para permitir el paso restringido de compuestos de pequeña masa molecular como los compuestos fenólicos de AEs, permitiendo su acceso al espacio periplásmico, la capa de glicoproteína y la membrana citoplásmica.

Tabla 4.7. Fase de latencia (λ , h) y velocidad máxima (μ_{max} , Δ absorbancia/h) de desarrollo de bacterias y levaduras a dos concentraciones por debajo de la concentración mínima inhibitoria de aceites esenciales de tomillo y orégano.

Microorganismo	Concentración (mg/mL)	Aceite esencial	Fase de latencia	Velocidad máxima	Microorganismo	Concentración (mg/mL)	Fase de latencia	Velocidad máxima
<i>E. coli</i>	0,25	tomillo	8,93 \pm 0,88	0,18 \pm 0,15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,125	8,53 \pm 0,20	0,02 \pm 0,00
		orégano	11,09 \pm 1,20	0,29 \pm 0,01			8,94 \pm 0,10	0,02 \pm 0,00
	0,125	tomillo	3,04 \pm 0,05	0,30 \pm 0,00		0,0625	7,12 \pm 0,15	0,01 \pm 0,00
		orégano	3,11 \pm 0,06	0,31 \pm 0,00			6,85 \pm 0,07	0,02 \pm 0,00
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,25	tomillo	8,98 \pm 0,27	0,04 \pm 0,01	<i>Lactococcus lactis</i>	0,125	10,90 \pm 1,19	0,01 \pm 0,01
		orégano	8,01 \pm 0,64	0,17 \pm 0,18			11,72 \pm 0,17	0,01 \pm 0,00
	0,125	tomillo	5,25 \pm 0,02	0,33 \pm 0,01		0,0625	6,23 \pm 0,45	0,06 \pm 0,02
		orégano	5,42 \pm 0,43	0,33 \pm 0,00			6,56 \pm 0,04	0,05 \pm 0,00
<i>Salmonella Enteritidis</i>	0,25	tomillo	3,71 \pm 0,06	0,32 \pm 0,00	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,5	6,58 \pm 1,89	0,13 \pm 0,05
		orégano	3,81 \pm 0,01	0,36 \pm 0,01			9,98 \pm 0,35	0,01 \pm 0,00
	0,125	tomillo	3,09 \pm 0,04	0,35 \pm 0,00		0,25	6,05 \pm 0,08	0,41 \pm 0,01
		orégano	3,15 \pm 0,09	0,38 \pm 0,01			6,42 \pm 0,01	0,10 \pm 0,06
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,25	tomillo	16,74 \pm 0,19	0,14 \pm 0,06	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0,0625	22,46 \pm 2,62	0,04 \pm 0,01
		orégano	20,84 \pm 0,44	0,06 \pm 0,04			19,74 \pm 0,22	0,06 \pm 0,00
	0,125	tomillo	16,04 \pm 0,00	0,19 \pm 0,00		0,03125	19,15 \pm 0,32	0,11 \pm 0,01
		orégano	18,73 \pm 0,08	0,16 \pm 0,00			18,12 \pm 0,02	0,14 \pm 0,00

Tabla 4. 8. Fase de latencia (λ , h) y velocidad máxima (μ_{max} , Δ absorbancia/h) de desarrollo de bacterias y levaduras a dos concentraciones por debajo de la concentración mínima inhibitoria de aceites esenciales de canela y clavo.

Microorganismo	Concentración (mg/mL)	Aceite esencial	Fase de latencia (h)	Velocidad máxima	Microorganismo	Concentración (mg/mL)	Fase de latencia	Velocidad máxima
<i>E. coli</i>	0,5	canela	12,07 ± 0,00	0,07 ± 0,07	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,5	11,25 ± 0,50	0,01 ± 0,00
		clavo	5,19 ± 0,22	0,16 ± 0,00			16,00 ± 0,16	0,01 ± 0,00
	0,25	canela	3,49 ± 0,01	0,22 ± 0,01		0,25	7,69 ± 0,24	0,02 ± 0,00
		clavo	3,15 ± 0,58	0,27 ± 0,04			8,42 ± 0,10	0,02 ± 0,00
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,5	canela	8,54 ± 0,34	0,24 ± 0,01	<i>Lactococcus lactis</i>	0,25	9,33 ± 0,54	0,03 ± 0,01
		clavo	7,63 ± 1,34	0,24 ± 0,00			13,89 ± 0,05	0,01 ± 0,00
	0,25	canela	5,77 ± 0,24	0,31 ± 0,00		0,125	6,88 ± 0,03	0,06 ± 0,01
		clavo	5,60 ± 0,47	0,33 ± 0,00			8,97 ± 0,35	0,06 ± 0,00
<i>Salmonella Enteritidis</i>	0,5	canela	3,61 ± 0,01	0,27 ± 0,01	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	14,10 ± 0,79	0,23 ± 0,10
		clavo	3,62 ± 0,02	0,24 ± 0,00			16,31 ± 0,41	0,29 ± 0,07
	0,25	canela	3,18 ± 0,04	0,32 ± 0,00		1	7,81 ± 0,03	0,24 ± 0,06
		clavo	3,26 ± 0,00	0,33 ± 0,01			8,08 ± 0,02	0,24 ± 0,05
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5	canela	10,03 ± 0,33	0,14 ± 0,00	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0,25	21,12 ± 0,00	0,06 ± 0,00
		clavo	16,91 ± 3,78	0,07 ± 0,06			23,09 ± 1,13	0,11 ± 0,01
	0,25	canela	6,67 ± 0,02	0,18 ± 0,00		0,125	19,74 ± 0,80	0,12 ± 0,02
		clavo	8,69 ± 2,13	0,14 ± 0,03			18,83 ± 0,31	0,14 ± 0,00

4.3. Referencias

- Albayrak, S. y Aksoy, A. 2012. Essential oil composition and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus cappadocicus* Boiss. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37: 605-614.
- Amiri, H. 2010. Antioxidant activity of the essential oil and methanolic extract of *Teucrium orientale* (L.) subsp. *taylori* (Boiss.) Rech. f. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 9: 417-423.
- Anthony, K. P., Deolu-Sobogun, S. A., y Saleh, M. A. 2012. Comprehensive assessment of antioxidant activity of essential oils. *Journal of food science*, 77: C839-C843.
- Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., y Chalier, P. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 149-154.
- Bagamboula, C. F., Uyttendaele, M., y Debevere, J. 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21: 33-42.
- Bajalan, I., Rouzbahani, R., Pirbalouti, A. G., y Maggi, F. 2017. Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. *Industrial Crops & Products*, 107: 305-311.
- Bajpai, V. K., Baek, K. H., y Kang, S. C. 2012. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*, 45: 722-734.
- Baser, K. H. C. 2008. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design*, 14: 3106-3120.
- Beena, Kumar, D., y Rawat, D. S. 2013. Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23: 641-645.
- Bortolomeazzi, R., Verardo, G., Liessi, A., y Callea, A. 2010. Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 118: 256-265.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- Cacciatore, I., Di Giulio, M., Fornasari, E., Di Stefano, A., Cerasa, L. S., Marinelli, L., Turkez, H., Di Campli, E., Di Bartolomeo, S., Robuffo, I., y Cellini, L. 2015. Carvacrol codrugs: A new approach in the antimicrobial plan. *Plos One*, 10: 1-20.

- Cardoso-Ugarte, G. A., López-Malo, A., y Sosa-Morales, M. E. 2016. Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oils. *En Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. V.R. Preedy, editor. Elsevier Inc., London. 339-347.
- Chutia, M., Deka Bhuyan, P., Pathak, M. G., Sarma, T. C., y Boruah, P. 2009. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT - Food Science and Technology*, 42: 777-780.
- Cortés-Rojas, D. F., Fernandes de Souza, C. R., y Pereira Oliveira, W. 2014. Clove (*Syzygium aromaticum*): A precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4: 90-96.
- Dawidowicz, A. L. y Olszowy, M. 2014. Does antioxidant properties of the main component of essential oil reflect its antioxidant properties? The comparison of antioxidant properties of essential oils and their main components. *Natural Product Research*, 28: 1952-1963.
- Dima, C. y Dima, S. 2015. Essential oils in foods: Extraction, stabilization, and toxicity. *Current Opinion in Food Science*, 5: 29-35.
- Dosoky, N. S. y Setzer, W. N. 2018. Biological activities and safety of *Citrus* spp. Essential oils. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 1-25.
- Duarte, A., Luís, A., Oleastro, M., y Domingues, F. C. 2016. Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp. *Food Control*, 61: 115-122.
- Gao, B., Chen, Y., Zhang, M., Xu, Y., y Pan, S. 2011. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of *Pericarpium Citri Reticulatae* essential oil. *Molecules*, 16: 4082-4096.
- Guarda, A., Rubilar, J. F., Miltz, J., y Galotto, M. J. 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 146: 144-150.
- Holley, R. A. y Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22: 273-292.
- Jayasena, D. D. y Jo, C. 2013. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 34: 96-108.
- Kedare, S. B. y Singh, R. P. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48: 412-422.
- Klančnik, A., Guzej, B., Kolar, M. H., Abramovic, H., y Možina, S. S. 2009. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection*, 72: 1744-1752.

- Köse, E. O., Deniz, I. G., Sarıkürkçü, C., Aktas, Ö., y Yavuz, M. 2010. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Sideritis erythrantha* Boiss. and Heldr. (var. *erythrantha* and var. *cedretorum* P.H. Davis) endemic in Turkey. *Food and chemical toxicology*, 48: 2960-2965.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., y Nychas, G. J. E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 453-462.
- Li, Q. X. y Chang, C. L. 2016. Basil (*Ocimum basilicum* L.) Oils. *En Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. V.R. Preedy, editor. Elsevier Inc., London. 231-238.
- Mandal, S. y Mandal, M. 2016. Tangerine (*Citrus reticulata* L. var.) Oils. *En Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. V.R. Preedy, editor. Elsevier Inc., London. 803-811.
- Martins, M. do R., Arantes, S., Candeias, F., Tinoco, M. T., y Cruz-Morais, J. 2014. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 151: 485-492.
- Miguel, M. G. 2010. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25: 291-312.
- Moon, J.-K. y Shibamoto, T. 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 1655-1666.
- Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Fernandes, Â., Marković, T., Marković, D., Giweli, A., y Soković, M. 2014. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52: 183-190.
- Ojeda-Sana, A. M., van Baren, C. M., Elechosa, M. A., Juárez, M. A., y Moreno, S. 2013. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control*, 31: 189-195.
- Oyedemi, S. O., Okoh, A. I., Mabinya, L. V., Pirochenva, G., y Afolayan, A. J. 2009. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology*, 8: 1280-1286.
- Pavela, R. y Benelli, G. 2016. Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. *Trends in Plant Science*, 21: 1000-1007.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Georgescu, C., Turcu, V., Olah, N. K., y Mathe, E. 2018. An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143: 922-935.

- Ramos, M., Beltrán, A., Peltzer, M., Valente, A. J. M., y Garrigós, M. del C. 2014. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *LWT - Food Science and Technology*, 58: 470-477.
- Sharopov, F. S., Satyal, P., Ali, N. A. A., Pokharel, S., Zhang, H., Wink, M., Kukaniev, M. A., y Setzer, W. N. 2016. The essential oil compositions of *Ocimum basilicum* from three different regions: Nepal, Tajikistan, and Yemen. *Chemistry and Biodiversity*, 13: 241-248.
- Tapia-Rodriguez, M. R., Hernandez-Mendoza, A., Gonzalez-Aguilar, G. A., Martinez-Tellez, M. A., Martins, C. M., y Ayala-Zavala, J. F. 2017. Carvacrol as potential quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* and biofilm production on stainless steel surfaces. *Food Control*, 75: 255-261.
- Veldhuizen, E. J. A., Tjeerdsma-Van Bokhoven, J. L. M., Zweijter, C., Burt, S. A., y Haagsman, H. P. 2006. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 1874-1879.
- Viuda-Martos, M., Ruiz Navajas, Y., Sánchez Zapata, E., Fernández-lópez, J., y Pérez-Álvarez, J. A. 2010. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal*, 25: 13-19.
- Wang, H.-F., Yih, K.-H., Yang, C.-H., y Huang, K.-F. 2017. Anti-oxidant activity and major chemical component analyses of twenty-six commercially available essential oils. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25: 881-889.
- Xu, J., Zhou, F., Ji, B. P., Pei, R. S., y Xu, N. 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 47: 174-179.

Capítulo V

Emulsiones a base de caseinato de sodio y aceites de chía y oliva, con aceites esenciales incorporados

5.1. Introducción

Hoy en día, los consumidores son cada vez más conscientes de la nutrición y las propiedades sensoriales de los productos alimenticios, y los fabricantes de alimentos están interesados en buscar formas de agregar nutrientes a los productos, sin generar ningún impacto negativo en las propiedades sensoriales (Teng *et al.*, 2017). La incorporación de compuestos bioactivos en los alimentos es un paso clave hacia el desarrollo de nuevos alimentos funcionales que al ser ingeridos presentan claros beneficios fisiológicos para el consumidor (Salminen *et al.*, 2013); una forma de incorporarlos es a través de emulsiones, que son sistemas alimentarios ampliamente utilizados en la industria alimentaria para encapsular, proteger y liberar ciertos tipos de componentes funcionales (McClements, 2010).

Entre los compuestos funcionales de importancia que se incorporan en las emulsiones, se encuentran los ácidos grasos omega-3, que se asocian con numerosos beneficios potenciales para la salud cuando se consumen a niveles recomendados (Shahidi, 2011). Dichas recomendaciones, realizadas por diferentes organizaciones, tienen la intención de reducir el riesgo de enfermedades crónicas y promover la salud general de la población (Richter *et al.*, 2016). Entre las fuentes vegetales de ácidos grasos omega-3, destaca el

aceite de chía (*Salvia hispanica* L.), con ~60% de ácido α -linolénico (ALA), siendo el ácido graso predominante de este aceite (Guimarães-Inácio *et al.*, 2018). Por lo tanto, esta semilla oleaginosa se ha convertido en una nueva fuente de ácidos grasos omega-3, y su presencia en el mercado mundial está aumentando rápidamente en los últimos años (Julio *et al.*, 2018), siendo su cultivo de gran interés económico (Wang *et al.*, 2018).

Sin embargo, uno de los desafíos asociados con el desarrollo de alimentos funcionales que contienen ácidos grasos omega-3, se relaciona con la preservación adecuada de estos compuestos, ya que son muy susceptibles a la oxidación lipídica (Guimarães-Inácio *et al.*, 2018), generando sabores desagradables que afectan a las propiedades sensoriales de los alimentos enriquecidos (Wang *et al.*, 2018). Para superar estos inconvenientes, el desarrollo de sistemas de liberación como las emulsiones puede proporcionar una protección eficiente de estos compuestos sensibles y posibilitar su incorporación a matrices alimentarias (Julio *et al.*, 2015).

El método más utilizado para aumentar la estabilidad oxidativa de las emulsiones es el uso de antioxidantes (Poyato *et al.*, 2013), pero la creciente preocupación de los consumidores sobre los aditivos sintéticos han llevado a los investigadores a buscar alternativas naturales, como los AEs, para prevenir la oxidación de los lípidos (Johnson *et al.*, 2017; Shah *et al.*, 2013). Aparte de las actividades antioxidantes los AEs también pueden exhibir propiedades antimicrobianas, siendo una de las acciones más importantes de un AE minimizar o incluso eliminar microorganismos (Ribeiro-Santos *et al.*, 2017). A pesar de sus aplicaciones en alimentos y bebidas, la utilización de AEs a menudo es limitada debido a su baja solubilidad en agua, siendo su encapsulación en emulsiones aceite en agua (O/W) una manera de vencer esta limitación (Chang *et al.*, 2012). Por otro lado, entre los agentes emulsionantes naturales que se usan para producir emulsiones alimenticias, se incluyen las proteínas (Julio *et al.*, 2018) y entre las proteínas de origen animal, las proteínas lácteas también pueden funcionar como barrera frente a especies pro-oxidantes (Di Mattia *et al.*, 2010). Además, la propiedad emulsionante del NaCas, en concreto, está relacionada con su alto contenido de aminoácidos hidrófobos como la prolina, la tirosina y el triptófano, que lo convierten en un copolímero de bloques anfifílicos. Esta propiedad puede utilizarse para encapsular compuestos bioactivos hidrófobos (Pan *et al.*, 2014).

En este sentido, el objetivo de este estudio fue elaborar una emulsión con aceites vegetales utilizando aceites de chía y de oliva como fase oleosa, utilizando el NaCas como

emulgente y con la incorporación de AEs como potenciales antioxidantes y antimicrobianos naturales. Para ello, se diseñó un experimento con emulsiones a las que se incorporó diferentes AEs (clavo, canela, tomillo y orégano) en las que se determinó su CMI. Para continuar con el estudio se seleccionaron dos AEs en función de su actividad antioxidante y antimicrobiana, y de la intensidad de sabor y olor desarrollada en el producto final escogido, un análogo de queso fresco (AQF). Para esto, se elaboraron AQF conteniendo emulsiones con los AEs de clavo, canela, tomillo y orégano. La concentración de AEs utilizada se seleccionó considerando la CMI obtenida de estos AEs en las emulsiones. Con estos AQF se realizó un análisis sensorial por 4 catadores experimentados en queso fresco, manifestando que los AQF adicionados de AEs de clavo y tomillo presentaron un sabor y olor menos intenso en comparación a los que contenían AEs de canela y orégano, por lo que estos AEs fueron seleccionados para elaborar las emulsiones y evaluar sus características físicas y químicas (tamaño de partícula, pH, comportamiento reológico, estabilidad física, estabilidad oxidativa y evaluación microbiológica).

5.2. Resultados y discusión

5.2.1. Concentración mínima inhibitoria de aceites esenciales contenidos en emulsiones elaboradas con aceites de chía y oliva y caseinato de sodio como emulsionante

Los métodos de dilución son los más adecuados para la determinación de la CMI, el método de dilución en agar considerado como el de referencia para el estudio de la sensibilidad antimicrobiana, con resultados comparables a los métodos de difusión en disco y microdilución en caldo (Balouiri *et al.*, 2016; Gómez-Garcés *et al.*, 2009; Prakash *et al.*, 2015). En el presente estudio se empleó el método de dilución en agar para determinar la CMI de los AEs de las emulsiones debido a la opacidad de la emulsión que no permitió utilizar el método de microdilución en caldo, que se basa en la medición de la densidad óptica. En el método de dilución en agar, la CMI se corresponde con la concentración más baja de AE que inhibe el crecimiento visible de cada microorganismo en la placa de agar.

En la Figura 5.1 se muestran ejemplos de los resultados obtenidos. Las placas incubadas que contienen medio agar Mueller-Hinton mezclado con emulsiones con AE de canela a diferentes concentraciones (placas B-D: 2 a 32 mg/mL) y la muestra control sin AE (placa

A). En cada placa se inoculó por duplicado 2 μL de la suspensión de las 7 bacterias ensayadas. En la placa A sin AE, se puede apreciar el crecimiento de todos los microorganismos inoculados, además de otros contaminantes procedentes de la propia emulsión. En la placa B que contiene AE de canela a concentración de 2 mg/mL se observó crecimiento de todos los microorganismos inoculados, mientras que en la placa C con 16 mg/mL sólo creció *P. aeruginosa*. Finalmente, en la placa D con 32 mg/mL no se observó crecimiento microbiano, indicando en este caso que este valor era la CMI del AE de canela para *P. aeruginosa*. Estos estudios se realizaron para todos los microorganismos a diferentes concentraciones de AEs, cuyos resultados se resumen en la Tabla 5. 1.

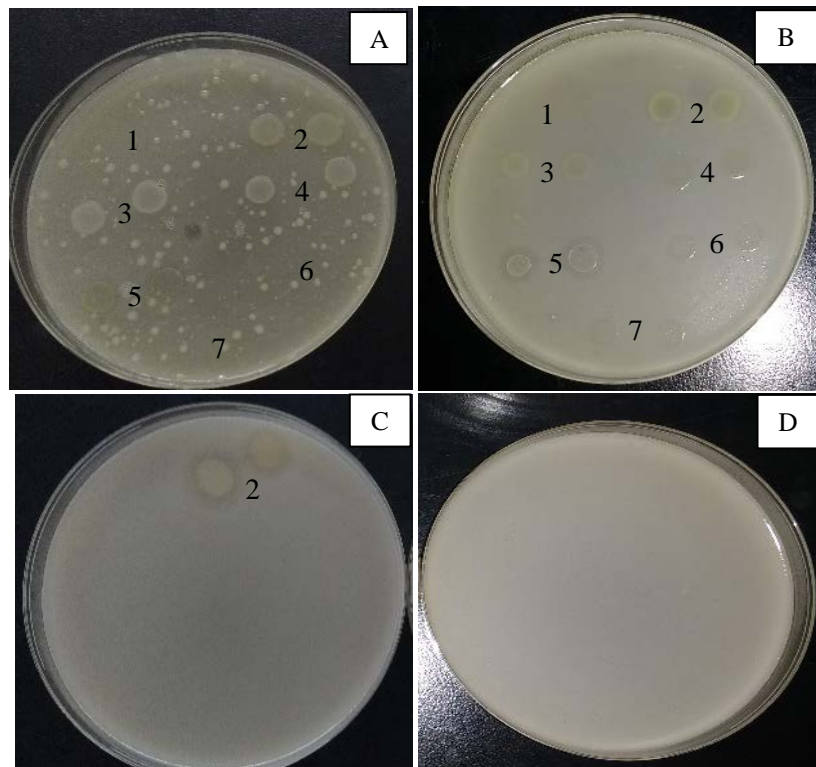


Figura 5.1. Inhibición de crecimiento de: (1) *L. monocytogenes*, (2) *P. aeruginosa*, (3) *S. Enteritidis*, (4) *E. coli*, (5) *St. aureus*, (6) *L. lactis* y (7) *Lb. plantarum*. Método de dilución en agar Mueller-Hinton con una emulsión que contiene AE de canela a diferentes concentraciones: (A) control sin AE, (B) 2 mg/mL, (C) 16 mg/mL y (D) 32 mg/mL.

Los estudios publicados que utilizan el método de dilución en agar, emplean diferentes solventes para incorporar los AE en el medio y diferentes volúmenes de inóculo (1-100 μL), que se inoculan en forma de gotas o de rayas sobre la superficie del agar (Hammer *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 2012). A pesar de estas variaciones, las CMI de los AEs

determinadas por este método, generalmente están en el mismo orden de magnitud (Burt, 2004), si bien cabe señalar que se ha demostrado que las CMI para un determinado AE en un aislado bacteriano particular son, por lo general, un poco más bajas en caldo que en agar (Guzej *et al.*, 2009; Hammer *et al.*, 1999).

En la Tabla 5. 1 se muestra la CMI de los cuatro aceites esenciales seleccionados de la etapa anterior (tomillo, canela, clavo y orégano) por presentar una mayor actividad antimicrobiana y antioxidante y que fueron agregados a las emulsiones elaboradas con 20% de aceites vegetales y 3% de NaCas como emulsionante. Las emulsiones con los cuatro AEs presentaron una CMI de 4 mg/mL para las levaduras, bacterias patógenas y alterantes, y de 8 mg/mL para mohos. *P. aeruginosa* fue el microorganismo más resistente con una CMI en la emulsión con orégano de 16 mg/mL, y de 32 mg/mL con los otros AEs.

Tabla 5. 1. Concentración mínima inhibitoria (CMI, mg/mL) de aceites esenciales de tomillo, canela, clavo y orégano incorporados en emulsiones O/W a base de caseinato de sodio y aceite de chía y oliva.

Microorganismos	Concentración Mínima inhibitoria (mg/mL)			
	Tomillo	Canela	Clavo	Orégano
<i>E. coli</i>	4	4	4	4
<i>L. monocytogenes</i>	4	4	4	4
S. Enteritidis	4	4	4	4
<i>St. aureus</i>	4	4	4	4
<i>P. aeruginosa</i>	32	32	32	16
<i>L. lactis</i>	4	4	4	4
<i>Lb. plantarum</i>	4	4	4	4
<i>K. marxianus</i>	4	4	4	4
<i>A. niger</i>	8	8	8	8
<i>Penicillium sp.</i>	8	8	8	8

En general, los AEs con mayores propiedades antibacterianas frente a patógenos contienen alto contenido de timol, carvacrol y eugenol (Ben Arfa *et al.*, 2006), los dos primeros presentes en orégano y tomillo en diferentes proporciones y el tercero en canela y clavo (Devi *et al.*, 2010; Gavaric *et al.*, 2015; Marchese *et al.*, 2016). Respecto a las

propiedades de los componentes activos de los aceites esenciales se discutieron en el capítulo anterior.

Como se puede observar, los valores de las CMI fueron superiores a las obtenidas en el ensayo realizado *in vitro* en el orden de 4 a 32 veces, según el microorganismo y AE utilizado. Estos resultados concuerdan con lo referido por Burt (2004), en estudios llevados a cabo con AEs en diferentes alimentos, en los que se comprobó que para lograr el mismo efecto antimicrobiano que en los ensayos *in vitro*, se debía incrementar significativamente la concentración de los AEs. Concretamente, la proporción efectiva de AEs necesaria fue de aproximadamente el doble en leche semidesnatada, 10 veces mayor en salchicha de hígado de cerdo, 50 veces en sopa y de 25 a 100 veces en queso de pasta blanda.

Ese incremento en la concentración de AE para inhibir a los microorganismos está condicionada también por la propia emulsión. La capacidad de las emulsiones para incorporar y/o liberar antimicrobianos, y por tanto su actividad antimicrobiana, depende fuertemente de su composición, el tamaño de partícula y su microestructura; es decir de la ubicación de los compuestos activos en el sistema y la concentración de éstos en la fase acuosa, dado que estos factores determinan los coeficientes de partición de equilibrio y la cinética del transporte molecular (McClements, 2010; Liang *et al.*, 2012). Además, las propiedades superficiales de las gotas de aceite, como la hidrofobicidad y la carga superficial, no solo tiene efecto en la estabilidad física de las emulsiones, sino también en la eficacia antimicrobiana (Shah *et al.*, 2013).

En el presente estudio, la composición de la emulsión con un alto contenido en grasa, concretamente de un 15% de aceite de oliva y un 5% de aceite de chía, podría ser una de las causas determinantes del incremento de la CMI en los ensayos realizados, como comprobaron Perricone *et al.* (2015) en su estudio con terpineol, un monoterpeno, que utilizaron en leche con diferentes contenidos de grasa, obteniendo reducciones microbianas de 7 log UFC/mL en leche desnatada, 4 log UFC/mL en leche baja en grasa y 3 log UFC/mL en leche entera. En otro estudio, Shah *et al.* (2013) estudiaron el efecto de eugenol frente a *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* Scott A en leche con tres niveles de grasa (completa ~4%, reducida 2% y descremada 0,5%), observando que a medida que aumentaban los niveles de grasa, se necesitó una mayor concentración de eugenol para inhibir el crecimiento microbiano. De forma similar, Holley y Patel (2005) en un estudio en quesos bajos (16%) y altos (30%) en grasa con AEs de clavo, canela, tomillo y laurel

frente a *L. monocytogenes* y *S. Enteritidis*, observaron que todos los AEs probados fueron más efectivos en quesos bajos en grasa, concluyendo que podría deberse a que la grasa del producto proporciona una capa protectora alrededor de las bacterias, o bien que la fracción lipídica pudo haber absorbido el agente antimicrobiano y, por lo tanto, disminuyó su concentración y eficacia en la fase acuosa. De manera general Si *et al.* (2006) concluyen que altos niveles de grasa y/o proteína en los alimentos protegen a la bacteria de la acción del AE, influyendo de manera significativa en su efectividad antimicrobiana.

Si se concreta al efecto de las características de la emulsión, Burt (2004) refiere un estudio en el que se evaluó el crecimiento de *L. monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica* en emulsiones O/W, observando que dependiendo del tamaño medio de gota de la emulsión, las bacterias podían crecer en películas, en colonias o como células planctónicas, y además apuntó que el crecimiento colonial restringe la difusión del oxígeno y que las células situadas dentro de una colonia pueden estar protegidas en cierta medida por las células externas de los sustratos en la emulsión. Por lo tanto, las bacterias que se desarrollan dentro de las colonias quedarían protegidas de la acción de los AEs. El tamaño de las gotas de la emulsión, también afecta a la disponibilidad de los AEs; así, Salvia-Trujillo *et al.* (2014) mostraron que la administración de diferentes compuestos aromáticos es más rápida en nano emulsiones que en macro emulsiones debido a su tamaño de gota reducido, de forma que el área interfacial queda más expuesta a las células microbianas. Ello se confirma, en el estudio de Donsì *et al.* (2011) que obtuvieron una reducción entre 2 y 4 ciclos logarítmicos de la población de *E. coli* después de estar en contacto durante 24 h con una nano emulsión conteniendo limoneno y estabilizada con lecitina de soja o ésteres de azúcar procesados por homogenización a alta presión (300 MPa, 5 ciclos).

Sin embargo, hay otros factores a tener en consideración; Chang *et al.* (2012) observaron que, en una nano emulsión con tomillo, la efectividad de *Zygosaccharomyces bailii* se reducía, debido a la partición del AE en la fase oleosa de las nano emulsiones. Según estos investigadores, dependiendo de la concentración relativa y del coeficiente de partición aceite-agua, los componentes antimicrobianos de un AE se repartirán entre la fase oleosa, la fase acuosa y las paredes celulares de los microorganismos, de forma que a medida que aumenta la cantidad total de la fase oleosa en una emulsión, más AE aparecerá en ella, por lo tanto, habrá una menor disponibilidad de los AE en la fase acuosa, que es donde se encuentran los microorganismos. Además de la grasa y las

proteínas, el pH de los alimentos es un factor importante que afecta la actividad de los AEs (Hyldgaard *et al.*, 2012). Al respecto, Gutierrez *et al.* (2009) estudiaron el efecto del pH (de 7,06 a 4,43) sobre la eficacia antimicrobiana de diferentes AEs en un medio modelo que consistía en un extracto de carne mezclado con suero de tomate. A medida que se redujo el pH, la fase de latencia aumentó y la tasa de crecimiento disminuyó para *Listeria spp* y *Lactobacillus sakei*, situándose la mayor eficacia de los AE a pH 5,32 o 5,92. Así, pues parece que un pH bajo puede aumentar la estabilidad de los AEs (Calo *et al.*, 2015), ya que la hidrofobicidad de algunos AE, como el tomillo, aumenta, y aunque tienden a dividirse en la fase lipídica del alimento, también se pueden disolver fácilmente en los lípidos de la membrana bacteriana y entrar en las células (Holley y Patel, 2005; Perricone *et al.*, 2015).

5.2.2. Evaluación microbiológica de las emulsiones

Una de las maneras de determinar la calidad de un alimento o para predecir su vida útil, es utilizar microorganismos indicadores. El recuento en placa, es un método que se puede utilizar para seleccionar selectivamente grupos de microorganismos, como mesófilos, psicrótrofos, entre otros, con mayor probabilidad de causar deterioro en un alimento (Montville y Matthews, 2008). En este estudio para determinar la vida útil de las emulsiones se ha seguido la evolución de microorganismos mesófilos y psicrótrofos durante el almacenamiento a 4 °C (Figura 5. 2).

El recuento inicial de microorganismos mesófilos y psicrótrofos fue muy elevado tanto en las emulsiones control como en las que se adicionó AEs, no apreciándose diferencias estadísticas. Estos recuentos fueron normales si se tiene en consideración que las emulsiones tras su elaboración no fueron sometidas a ningún tratamiento que permitiera la reducción de la microbiota presente en las materias primas, especialmente del NaCas utilizado como emulgente.

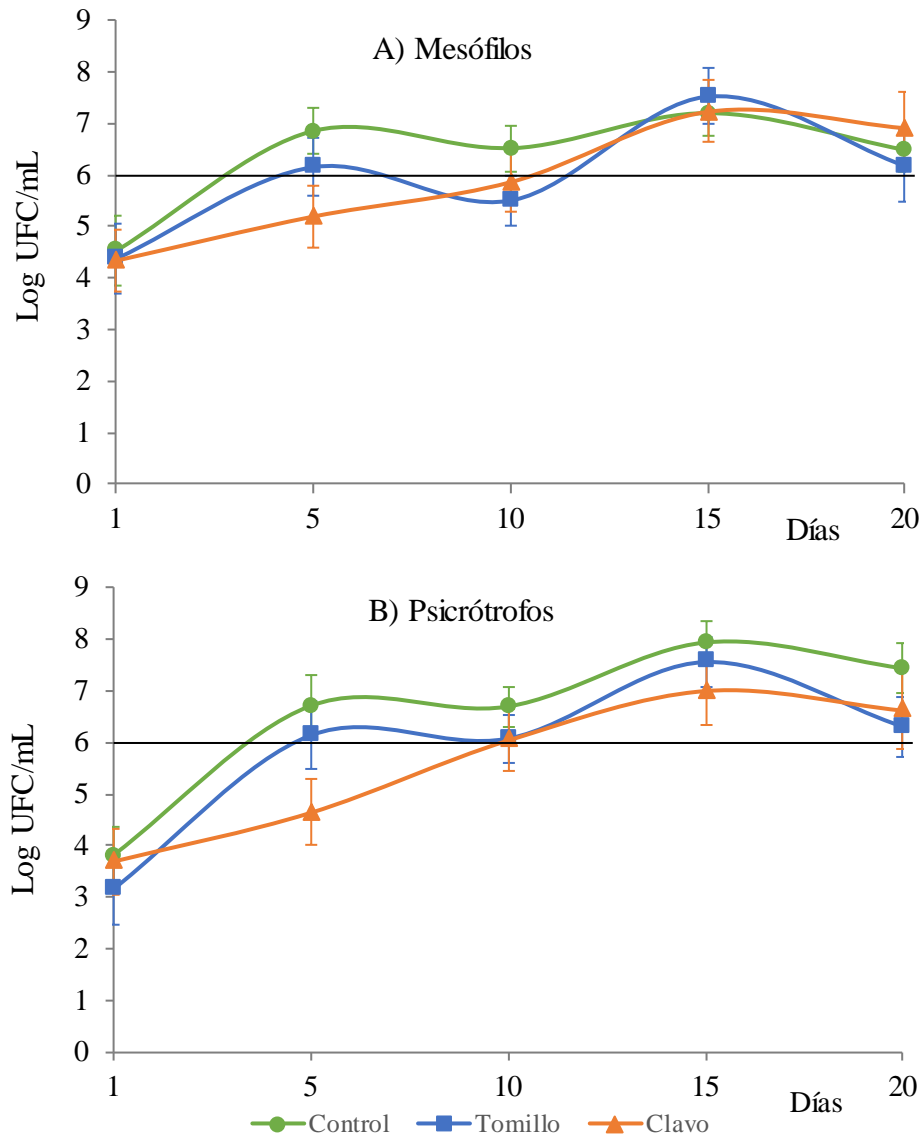


Figura 5. 2. Evolución de microorganismos aerobios mesófilos (A) y psicrótrofos (B) en emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y con incorporación o no de aceites esenciales de tomillo y clavo durante el almacenamiento a 4 °C.

Durante su conservación, la evolución de mesófilos y psicrótrofos de las emulsiones con AEs fue similar a la obtenida en la emulsión control, si bien los recuentos fueron menores especialmente en el día 5. Evaluando los parámetros de crecimiento bacteriano, utilizando la herramienta DMFIT, las curvas de crecimiento no mostraron fase de latencia en el AQF control y con tomillo. Sin embargo, la emulsión con clavo presentó por una parte un mayor tiempo de latencia, y una menor velocidad máxima de crecimiento o μ_{max} especialmente en los psicrótrofos. También el tomillo tuvo un cierto efecto inhibitorio especialmente en relación al recuento de mesófilos. Al evaluar el desarrollo de psicrótrofos, en la emulsión con clavo la μ_{max} fue de 0,30 (log UFC/mL/día); 0,61 en el

tomillo y 0,59 en el control (Tabla 5. 2). Considerando los parámetros cinéticos y el recuento inicial obtenido, la vida útil de la emulsión control y de la emulsión con AE de tomillo es de 4-5 días y de la emulsión con clavo es de 9 días.

A las emulsiones se les adicionó un 0,5% de AE, porque gran parte de la microbiota fue susceptible (CMI) a concentraciones de 0,4% (4 mg/mL) y para minimizar el efecto negativo en las características organolépticas al adicionar la emulsión en el producto final, por sus sabores y aromas muy intensos. Sin embargo, el efecto inhibitorio fue muy leve, debido probablemente a la mayor resistencia a estos AEs de los microorganismos presentes en la emulsión elaborada.

Tabla 5. 2. Recuento inicial, final (log (UFC/mL), fase de latencia (λ , días) y velocidad máxima (μ_{max} , (log UFC/mL/día)) de microorganismos mesófilos y psicrótrofos en emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y con incorporación o no de aceites esenciales de tomillo y clavo durante el almacenamiento a 4 °C.

Grupo microbiano	Emulsión	Parámetros cinéticos de crecimiento bacteriano			
		Valor Inicial (log UFC/mL)	Valor final (log UFC/mL)	λ (días)	μ_{max} (log UFC/mL/día)
Mesófilos	Control	4,77 ± 0,65	7,22 ± 0,70		0,22 ± 0,12
	Tomillo	4,54 ± 0,71	6,79 ± 0,83		0,18 ± 0,11
	Clavo	4,37 ± 0,43	7,08 ± 0,42	1,89 ± 4,28	0,22 ± 0,11
Psicrótrofos	Control	3,80 ± 0,62	7,35 ± 0,36		0,59 ± 0,20
	Tomillo	3,16 ± 0,80	6,65 ± 0,46		0,61 ± 0,27
	Clavo	3,72 ± 0,29	6,82 ± 0,22	2,03 ± 2,10	0,30 ± 0,09

Existen muy pocos datos bibliográficos sobre la calidad microbiológica de las emulsiones crudas o no higienizadas, ya que normalmente estas emulsiones se aplican a diferentes productos que reciben un tratamiento de conservación. Fernandez-Avila y Trujillo (2017) en emulsiones O/W por homogeneización convencional (15 MPa) a partir de aceite de soja y un concentrado de proteína de soja como emulgente, obtuvieron recuentos microbiológicos (mesófilos aerobios totales) de $\sim 2,7 \pm 0,5$ log UFC/g, valores de recuentos que son más bajos que los encontrados en el presente estudio. En principio, si el agua utilizada en la elaboración de la emulsión tiene buenas características microbiológicas, y si durante la elaboración de la emulsión se trabaja con buenas condiciones higiénicas, la calidad microbiológica final de la emulsión la marcaría

principalmente la calidad microbiológica del emulgente utilizado, en este caso el NaCas, ya que el emulgente proteico se deja hidratar toda la noche en agua a temperatura de refrigeración.

5.2.3. Caracterización fisicoquímica de las emulsiones

5.2.3.1. pH

En la Tabla 5. 3 se presentan los valores de pH de las emulsiones con AEs de clavo y tomillo y de la emulsión control sin AE, en la que se observa que la incorporación del AE no tuvo efecto sobre el pH de las emulsiones tras su elaboración, no apreciándose diferencias significativas entre la emulsión control y las adicionadas de AEs en los diferentes días. Por otro lado, si se analiza la evolución del pH de las emulsiones durante el almacenamiento a 4 °C, puede observarse una disminución de pH en todas las emulsiones, disminución que fue significativa en el día 20 del muestreo en las emulsiones control y con tomillo, pero no en el caso de las que contienen clavo.

Tabla 5. 3. pH de emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y aceites esenciales de tomillo y clavo durante el almacenamiento a 4 °C.

Día	Control	Tomillo	Clavo
1	6,95 ± 0,18 ^b	6,87 ± 0,20 ^b	6,80 ± 0,15
10	6,82 ± 0,03 ^{ab}	6,81 ± 0,13 ^{ab}	6,74 ± 0,02
20	6,71 ± 0,16 ^a	6,56 ± 0,13 ^a	6,70 ± 0,13

^{a,b} Valores en la misma columna con diferente superíndice indican diferencias significativas (P < 0,05).

La importancia de la determinación del pH de las emulsiones estabilizadas con proteínas radica en que éstas son especialmente sensibles al pH del medio, debido a que los emulsionantes proteicos generalmente tienen una alta floculación en su punto isoeléctrico (pI) (Carneiro *et al.*, 2013; Owens *et al.* 2018). En el caso concreto de las emulsiones con caseinato, la carga neta de las gotas a pH inferior y superior al pI (~4,6), es positiva y negativa, respectivamente (Julio *et al.*, 2016; Sabouri y Corredig, 2016). La alta repulsión electrostática entre las gotitas de aceite tiende a conducir a una mayor estabilidad de la emulsión, mientras que en condiciones de pH cercanas al pI de la proteína (o alta fuerza iónica) domina la floculación/agregación de las gotas que conduce a la coalescencia e

inestabilidad (Lam y Nickerson, 2013; Sabouri y Corredig, 2016). En el presente estudio el pH de las emulsiones fue muy cercano a pH 7, valor alejado del pI del caseinato. Farshchi *et al.* (2013) elaboraron emulsiones estabilizadas con NaCas como emulgente preparadas a pH 5; 5,5; 6 y 6,5 y observaron que la mayoría de las emulsiones a pH 5, es decir, cerca del pI de la caseína, eran más susceptibles a la coalescencia que las de pH más elevados.

El pH también influye en la oxidación lipídica de la emulsión, ya que la carga del emulsionante afectará la carga de la interfase (Jacobsen y Sørensen, 2015). En un estudio realizado por Kargar *et al.* (2011) observaron que la velocidad de oxidación fue más lenta a pH 7 que a pH 3, debido a que a pH 7 el NaCas tiene carga negativa ($\text{pH} > \text{pI}$), lo que le permitió unirse en la fase continua a las sustancias prooxidantes cargadas positivamente, retardando su acción. Otro factor a considerar es que a pH bajos hay mayor solubilidad del hierro en la fase acuosa (Qiu *et al.*, 2015).

5.2.3.2. *Distribución del tamaño de partícula*

La importancia de la determinación del tamaño de partícula de las emulsiones se basa en que esta influye en la estabilidad frente al cremado y la coalescencia (Hebishy *et al.*, 2015), en la actividad antimicrobiana (Moghimy *et al.*, 2017), y en las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de las emulsiones (Julio *et al.*, 2015).

En el presente estudio se determinó la distribución del tamaño de partícula (Figura 5. 3) y diversos índices de dicha distribución que se muestran en la Tabla 5. 4. Para ello se empleó una técnica de difracción láser, debido a que es un método de medición directa del tamaño de partícula, y que además se correlaciona con diferentes procesos de desestabilización en emulsiones (Petrut *et al.*, 2016).

Una de las maneras de clasificar las emulsiones es por su tamaño de partícula. Al respecto McClements (2016), afirma que, en la práctica, el límite de tamaño preciso utilizado para distinguir los tipos de emulsiones es bastante arbitrario, ya que no hay un cambio drástico en las propiedades fisicoquímicas para un tamaño particular. Sin embargo, distintos autores han sugerido diversos tamaños para identificar a las emulsiones convencionales, y así por ejemplo Araiza-Calahorra *et al.* (2018) afirman que estas emulsiones pueden situarse en el intervalo de 0,2-100 μm . De forma similar, para McClements (2010) los diámetros medios de las gotas, están típicamente en el intervalo de 0,1 a 100 μm .

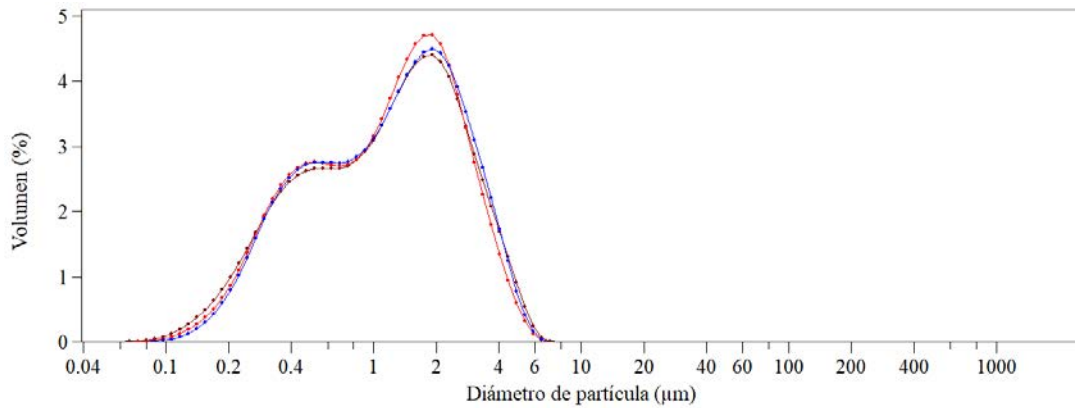


Figura 5. 3. Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones elaboradas por homogeneización convencional (15 MPa): control (●), con aceite esencial de clavo (●) y tomillo (●).

Como se puede observar en la Figura 5. 3, la distribución de tamaño de partícula de las emulsiones de nuestro estudio está comprendida entre 0,06 y 8 µm aproximadamente, presentando una distribución bimodal con picos en 1,92 y 0,520 µm. La distribución de tamaño de partícula obtenida para la emulsión de estudio fue bastante similar a la obtenida por Hebishy *et al.* (2017), quienes estudiaron una emulsión de características similares a las nuestras, elaborada con NaCas al 3% y 20% de fase oleosa (3 aceite de girasol:1 aceite de oliva), y tratada a 15 MPa, obteniendo una curva de distribución de partícula multimodal, con la mayor parte distribuidas entre 0 y 8 µm de diámetro, y dos picos secundarios de 15 y 25 µm aproximadamente.

En la distribución bimodal obtenida, el pico de las partículas de menor tamaño se corresponde a las partículas iniciales presentes en la solución justo después de la formulación y la homogeneización, mientras que el pico de mayor tamaño se corresponde a los agregados de grasa formados por coalescencia parcial (Morley, 2011; Petrut *et al.*, 2016), por lo que en esta emulsión predominarían los agregados de grasa sobre las partículas formadas inicialmente. Una distribución monomodal estrecha se relaciona con una mejor estabilidad a largo plazo (Piorkowski y McClements, 2013), por lo que la distribución de tamaño de partícula que presentan las emulsiones del presente estudio indicarían que la emulsión tendería a ser inestable en el tiempo.

Otro parámetro asociado con la distribución del tamaño de partícula es el valor de *span*, o índice de dispersión relativo, es un parámetro adimensional que indica la uniformidad de la distribución del tamaño de partícula, definido como $(D_{90} - D_{10})/D_{50}$ (de Campo *et al.*,

2017; Eisinaite *et al.*, 2017). Por lo tanto, cuanto menor es el valor de *span*, la distribución de tamaño de partícula es más estrecha, considerándose que una emulsión es monodispersa si tiene un valor de *span* inferior a 1 (Madadlou *et al.*, 2009; Ramakrishnan *et al.*, 2012). En este estudio todas las emulsiones fueron polidispersas, como indican sus curvas de distribución y los valores de *span* mayores a 1, con diferencias significativas entre emulsiones, siendo la emulsión control la menos dispersa, seguida de la emulsión con AE de tomillo y la de AE de clavo (Tabla 5.4).

Tabla 5. 4. Índices de distribución del tamaño de partícula y área superficial específica de las emulsiones elaboradas con caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y aceite esencial de tomillo y clavo.

Parámetro	Control	Clavo	Tomillo
D _{3,2} (μm)	0,74 ± 0,07 ^{ab}	0,71 ± 0,02 ^a	0,77 ± 0,05 ^b
D _{4,3} (μm)	1,45 ± 0,14	1,49 ± 0,02	1,51 ± 0,07
D ₁₀ (μm)	0,32 ± 0,03 ^{ab}	0,31 ± 0,01 ^a	0,33 ± 0,02 ^{bc}
D ₅₀ (μm)	1,22 ± 0,12	1,22 ± 0,03	1,25 ± 0,05
D ₉₀ (μm)	2,94 ± 0,29	3,14 ± 0,03	3,14 ± 0,16
Span	2,16±0,10 ^a	2,33±0,05 ^c	2,24±0,05 ^b
SSA (m ² /mL)	8,17 ± 0,46	8,43 ± 0,29	7,82 ± 0,31

^{a-c} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas (P < 0,05).

El diámetro medio ponderado en superficie (D_{3,2}) es muy sensible a la presencia de pequeñas gotas, ya que tienen una mayor superficie específica y se usa principalmente en el análisis del tamaño de partícula; mientras que el tamaño medio ponderado por volumen (D_{4,3}) permite detectar los procesos de coalescencia y floculación, es decir los cambios en la distribución del tamaño de las gotas, debido a que es más sensible que (D_{3,2}) para analizar los procesos de desestabilización (Hebishy, 2013; Julio *et al.*, 2018).

En nuestro estudio no se apreciaron diferencias entre las emulsiones en los dos parámetros evaluados, obteniéndose valores entre 1,45 y 1,51 μm para D_{4,3} y entre 0,71 y 0,77 μm para D_{3,2} (Tabla 5. 4). Los valores obtenidos, especialmente en el D_{3,2} son superiores a los obtenidos por Hebishy *et al.* (2017) en emulsiones tratadas por homogeneización convencional a 15 MPa, con un 20% de aceite y con diferentes concentraciones de NaCas (1, 3 y 5%) como emulsionante, cuyos valores fueron de 0,58, 0,60 y 0,57 para el índice D_{3,2}, con los diferentes contenidos de proteína, respectivamente. Sin embargo, los valores

$D_{4,3}$ fueron inferiores a los obtenidos por Farshchi *et al.* (2013), que elaboraron una emulsión con un 20% de aceite de girasol, un 1% de NaCas y un 0,2% de goma de algarrobo, tratada a 20 MPa, y que fueron de 10 μm . Esta diferencia, podría estar relacionada con una a cantidad insuficiente del emulgente utilizado en relación a la cantidad de aceite en la emulsión y/o con la presencia de otros hidrocoloides utilizados en el estudio (Chen *et al.*, 2016; Mora-Gutierrez *et al.*, 2010). Salvia-Trujillo *et al.* (2013) también prepararon emulsiones por sistemas convencionales de emulsificación a 10.000 rpm durante 2 min, mezclando 4% de aceite de maíz y 1,5% de surfactante Tween 20, obteniendo valores de $D_{4,3}$ de 23 μm y $D_{3,2}$ de 14 μm , muy superiores a los de nuestro estudio. Por lo tanto, en las emulsiones elaboradas por métodos convencionales hay una gran variabilidad en el tamaño de partícula, que depende de la composición de la emulsión y de los sistemas de emulsificación utilizados.

Los parámetros D_{10} , D_{50} y D_{90} son los puntos de distribución del tamaño de gota debajo del cual se encuentran el 10, 50 y 90% de las partículas, respectivamente (Trentin *et al.*, 2011). En este estudio no se observaron diferencias significativas para los valores de D_{50} y D_{90} de las diferentes emulsiones, mientras que el 10% de las partículas de emulsiones con AE de clavo fueron ligeramente más pequeñas (Tabla 5. 4).

El aumento en el diámetro de partícula está relacionado con una disminución en el área de superficie específica de las partículas (SSA). Cuanto mayor es el tamaño de las partículas menor será su área de superficie específica (Madadlou *et al.*, 2009). Aunque en el presente estudio no hay diferencias significativas en el SSA de las emulsiones (Tabla 5. 4), se apreció cierta relación entre los valores de SSA y los de $D_{3,2}$; Hebishy *et al.* (2015) con una emulsión similar a la del presente estudio, también obtuvo un valor similar de SSA (7,67).

5.2.3.3. *Comportamiento reológico*

La reología en las emulsiones está estrechamente relacionada con la textura, el sabor y la sensación en la boca de los alimentos obtenidos a partir de éstas, características que son muy importantes para la aceptación de los alimentos por parte del consumidor (Tatar *et al.*, 2017). Se ha demostrado que el comportamiento reológico de las emulsiones difiere ampliamente según su composición, estructura, interacciones con las gotas, tamaño de la

gota, etc. (Herrero *et al.*, 2018). Cualquier variación en las propiedades reológicas de la fase continua influye en la reología de la emulsión completa (Tatar *et al.*, 2017).

Para describir el comportamiento de flujo de las emulsiones de este estudio se utilizó el modelo Ostwald-de Waele, modelo con el que los datos se ajustaron bien, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,999$. A partir de este modelo, se determinó el índice de consistencia (K) y el índice de comportamiento al flujo (n).

Tabla 5. 5. Índice de consistencia e índice de comportamiento al flujo de emulsiones O/W obtenidas por homogeneización convencional (15 MPa) a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y aceites esenciales de tomillo y clavo durante el almacenamiento en refrigeración.

Parámetro	Emulsión	Días de almacenamiento a 4 °C		
		1	10	20
Índice de comportamiento al flujo (n)	Control	0,672 ± 0,041 ^a	0,746 ± 0,006 ^{b,y}	0,804 ± 0,067 ^{b,y}
	Clavo	0,656 ± 0,061 ^a	0,709 ± 0,014 ^{ab,xy}	0,718 ± 0,006 ^{b,x}
	Tomillo	0,611 ± 0,062 ^a	0,672 ± 0,055 ^{a,x}	0,761 ± 0,01 ^{b,xy}
Índice de consistencia (K, Pa × s ⁿ)	Control	0,042 ± 0,008 ^b	0,026 ± 0,005 ^{a,x}	0,018 ± 0,009 ^{a,x}
	Clavo	0,042 ± 0,000 ^c	0,037 ± 0,001 ^{b,y}	0,033 ± 0,003 ^{a,y}
	Tomillo	0,034 ± 0,004 ^b	0,031 ± 0,005 ^{b,xy}	0,021 ± 0,001 ^{a,x}

^{a-c} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

^{x,y} Valores en la misma columna con diferente superíndice indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

En la Tabla 5. 5, se aprecia que el índice de comportamiento al flujo (n) para todos los casos fue < 1 , valores que indican que estamos frente a fluidos pseudoplásticos, resultado que coincide con lo observado por Hebshy *et al.* (2017) en una emulsión O/W con 20% de fase oleosa elaborada por homogeneización convencional (15 MPa), en la que obtuvieron un cambio en el comportamiento de flujo de newtoniano a pseudoplástico cuando la concentración de NaCas aumentó de 1 a 3%. También coincide parcialmente con lo observado por Julio *et al.* (2015) quienes elaboraron emulsiones O/W con 10% de aceite de chía y con NaCas (2, 5 y 10%), tratadas a 40 y 60 MPa por 4 pases. Las emulsiones con 2 y 5% de emulgente presentaron un comportamiento newtoniano, probablemente debido a la baja concentración de proteína libre presente en la fase acuosa; mientras que la emulsión con 10% fue de tipo pseudoplástico. La pseudoplasticidad de los sistemas estabilizados con NaCas se justifica con el hecho de que cuando se aplican

grandes tensiones, se produce una disrupción mecánica de la red estructural, de forma que la fase acuosa queda dentro de la estructura entre las gotitas (Julio *et al.*, 2016).

Durante el almacenamiento en refrigeración de las emulsiones se produjo un incremento significativo de n , que en el caso de la emulsión control sin AE fue significativo a los 10 días, mientras que las que contenían AEs fue entre los 10 y 20 días (Tabla 5. 5). Dicha tendencia también se observó en un estudio realizado con nanoemulsiones por Liang *et al.* (2012), en las que las propiedades reológicas presentan tendencias similares a las emulsiones convencionales (McClements, 2010). Liang *et al.* (2012) indican que el incremento en el valor de n se debió la pérdida de la estructura de la emulsión por un aumento del diámetro de partícula durante el almacenamiento, teniendo en consideración que las emulsiones con tamaños de partícula más pequeños presentan viscosidades mayores que las emulsiones con tamaño de partícula más grande.

El índice de consistencia (K) inicial de todas las emulsiones fueron similares, sin encontrarse diferencias significativas. Durante el almacenamiento, contrariamente a lo ocurrido con el valor de n , el valor de K disminuyó en todas las emulsiones, especialmente en la emulsión control, en la que se produjo cierta disminución de la viscosidad, que también pudiera estar relacionada con la disminución del pH de la emulsión (ver Tabla 5. 5 y Tabla 5. 3). Ello coincidiría, pero en sentido inverso, con lo observado por Madadlou *et al.* (2009) que obtuvieron un mayor índice de consistencia (K) y que relacionaron con un aumento en la viscosidad aparente de la emulsión junto con un aumento del pH, debido probablemente al hinchamiento de las micelas de caseína.

5.2.3.4. Estabilidad física de las emulsiones

Una de las características que se evalúan en las emulsiones es su estabilidad física, es decir, la capacidad que tienen o no para mantenerse en una sola fase. Las emulsiones convencionales son sistemas termodinámicamente inestables y tienden a ser ópticamente turbias u opacas, ya que dispersan la luz debido a que la dimensión de la gota es similar a la longitud de onda de la luz (Araiza-Calahorra *et al.*, 2018). En este estudio, la estabilidad de las emulsiones se midió con el sistema óptico Turbiscan Lab®, que puede detectar los fenómenos de sedimentación, agregación y coalescencia en las emulsiones. Según Julio *et al.* (2018) los perfiles de retrodispersión (% BS, *Backscattering*) son la huella macroscópica de una emulsión en un momento determinado. La evolución del

perfil de BS de las emulsiones convencionales puede mostrar procesos de desestabilización por cremado, evidenciado por la variación de la concentración de las gotitas entre la zonas superior e inferior del tubo de la muestra, registrado a través de cambios en los perfiles de BS en diferentes zonas de la longitud del tubo durante el almacenamiento. En concreto, la desestabilización por cremado se resume en una disminución en BS, debido a la menor concentración de gotitas en la parte inferior del tubo y la migración de gotitas a la parte superior, que produce un aumento en los valores de BS (Capitani *et al.*, 2016).

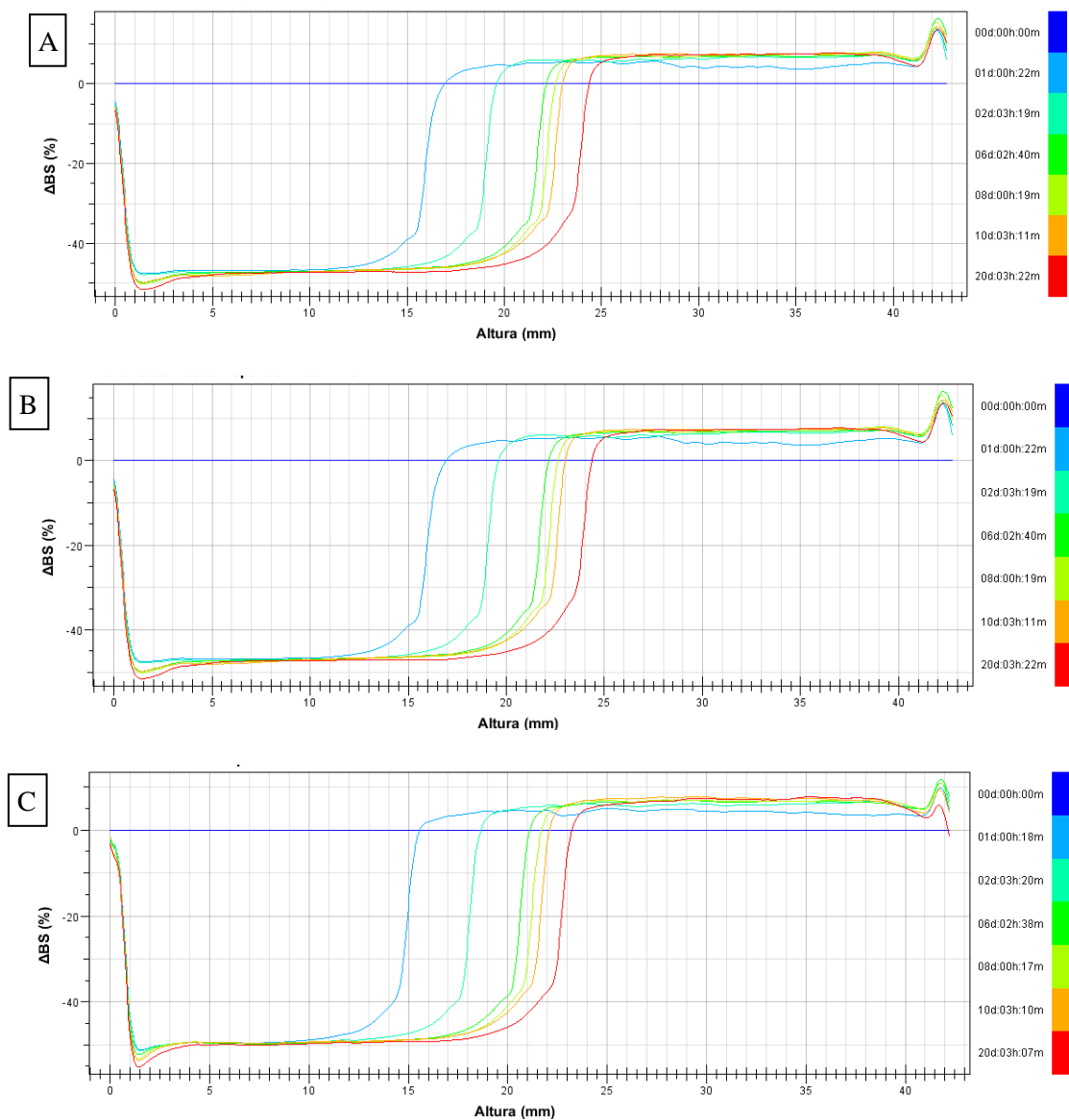


Figura 5.4. Incremento de retrodispersión (ΔBS) en emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y aceites esenciales de tomillo y clavo, durante el almacenamiento a 4 °C. (A) Emulsión control, (B) emulsión con AE de tomillo y (C) emulsión con AE de clavo.

Los resultados de la estabilidad de las emulsiones de este estudio se muestran en la Figura 5.4, observándose una disminución en la variación del *Backscattering* (ΔBS) en la parte inferior del tubo, que indica que el haz de luz prácticamente no tiene interferencia para atravesar el tubo que contiene a la emulsión, debido a la migración de partículas hacia la parte superior del tubo, que tiene como consecuencia un proceso de clarificación de la emulsión en la parte inferior y de cremado en la parte superior.

Durante las primeras 24 h de almacenamiento, las emulsiones sufrieron rápidamente el fenómeno de cremado, que se intensificó durante los siguientes días de muestreo. Por otra parte, la inclusión de AEs en las emulsiones no ocasionó variaciones considerables en su estabilidad, ya que el comportamiento en las emulsiones con AE de tomillo, clavo y el control fueron similares. Si bien, algunas moléculas fenólicas encontradas en los AEs, debido a su estructura química, han demostrado tener actividad superficial que pudiera afectar el grado de dispersión y la estabilidad física de la fase dispersa (Di Mattia *et al.*, 2009), en nuestro estudio, los AEs a la concentración utilizada (0,5%), no interfirieron en la estabilidad de la emulsión.

La tendencia de estas emulsiones a desestabilizarse con el tiempo, es debido a una variedad de mecanismos, como la separación gravitacional, la floculación, la coalescencia y la maduración de Ostwald, y aunque solo uno de estos mecanismos es suficiente para desestabilizar completamente la emulsión, en realidad ocurren en combinación, ya que la aparición de uno puede promover otro (Petrut *et al.*, 2016). Las emulsiones producidas con tecnologías convencionales, como sistemas de emulsificación rotor-estator y homogeneización a baja presión, son particularmente propensas a la separación gravitacional y a la agregación debido al tamaño relativamente grande de las gotas formadas durante el proceso de emulsificación (McClements, 2010), siendo además, termodinámicamente inestables debido a la tensión interfacial relativamente alta asociada con el contacto entre las fases de aceite y agua (Wang *et al.* (2015). Otra de las causas que producen la disminución de la estabilidad de una emulsión, son los cambios en la conformación de la proteína, debido a que las proteínas forman enlaces no covalentes, del tipo hidrógeno y enlaces hidrofóbicos con proteínas vecinas en la interfase (Lam y Nickerson, 2013). Sin embargo, si se comparan las emulsiones convencionales con las nanoemulsiones se aprecian diferencias notables en el comportamiento de estabilidad, que se debe fundamentalmente a diferencias en el tamaño de partícula. En el caso de emulsiones convencionales, con concentraciones de proteína de alrededor del 4% se

desestabilizan por fenómenos de floculación en una semana, mientras que en las nanoemulsiones, no se llegan a detectar cambios significativos durante 2 meses (Montes de Oca-Ávalos *et al.* (2017).

El NaCas, emulsionante utilizado en este estudio, fue seleccionado por su excelente estabilidad térmica y propiedades emulsionantes, ya que contiene proteínas fosforiladas (α_{s1} , α_{s2} , β - y κ -caseínas), que estabilizan las gotas de aceite contra la coalescencia a través de la repulsión electrostática y estérica (Liang *et al.*, 2014). Sin embargo, la agregación de las gotas depende de la interacción entre diferentes fracciones de proteínas adsorbidas en la superficie de las diferentes gotas. Dicha agregación de gotas está influenciada por la cobertura de la superficie de la proteína, el espesor de la película, la carga superficial, el pH, la fuerza iónica y la viscosidad, entre otros (Felix *et al.*, 2017; O' Dwyer *et al.*, 2013).

Los resultados del presente estudio concuerdan con los de un estudio anterior realizado también en nuestros laboratorios por Hebishy *et al.* (2017) quienes estudiaron emulsiones elaboradas por homogeneización convencional (15 MPa), utilizando 20% de aceites vegetales (15% girasol y 5% oliva) y 1, 3 y 5% de NaCas. En aquel estudio se observó que las emulsiones elaboradas con 1% de NaCas fueron más estables frente al cremado que aquellas producidas con un 5% de proteína, debido al fenómeno denominado *depletion flocculation*, haciendo que el exceso del material emulgente no adsorbido en la fase acuosa produzca un incremento en las fuerzas de atracción entre partículas, causando la floculación, que da como resultado un mayor cremado. Sin embargo, las emulsiones con 5% de NaCas presentaron una mayor estabilidad frente a la oxidación lipídica en comparación a aquellas elaboradas con 1% de NaCas, justificándose su uso aun cuando éstas presenten una menor estabilidad física. En otro estudio realizado por Julio *et al.* (2015) en emulsiones O/W elaboradas con aceite de chía (10%), con NaCas (2, 5 y 10%) y tratadas a 40 y 60 MPa por 4 pases, las emulsiones elaboradas con 2% de NaCas fueron físicamente más estables que las que tenían 5%, debido a un aumento del emulsionante no adsorbido, formándose posteriormente (*depletion flocculation*), sin embargo, las emulsiones con 10% de NaCas, presentaron una elevada estabilidad física que fue atribuida a una reestabilización de la emulsión por la formación de un gel fuerte formado por una red de partículas, que aumentó su viscosidad evitando el cremado de la emulsión. Ye (2008), también observó una disminución en la estabilidad al cremado de emulsiones con 30% aceite, cuando la concentración de proteína total del sistema se incrementó por

encima del 2%. Un incremento sucesivo en la concentración de emulsionantes puede llevar a la ocurrencia de una concentración crítica de floculación, dando como resultado una estabilidad reducida de la emulsión (Domian *et al.*, 2014).

5.2.3.5. Estabilidad oxidativa de las emulsiones

Actualmente, la tendencia de la industria alimentaria es eliminar los aceites hidrogenados y usar cada vez más ácidos grasos insaturados bioactivos, que son más susceptibles a los procesos oxidativos (Johnson *et al.*, 2017). En este estudio se utilizó aceite de chía y aceite de oliva como fase oleosa de la emulsión, que, por su alta insaturación, especialmente el de chía, podrían ser sensibles a la oxidación.

Son diversos los factores que pueden influir potencialmente en la estabilidad física y oxidativa de las emulsiones, entre ellos: la composición de ácidos grasos, el pH, la composición iónica, el tipo y concentración de antioxidantes y prooxidantes, las propiedades interfaciales de las gotas de emulsión, las características de las gotas de lípidos, su concentración y sus propiedades físicas (Poyato *et al.*, 2013). Al intervenir tantos factores, la estrategia basada en la formación de productos de oxidación (primaria o secundaria) parece adecuada para estudiar todos los tipos de sistemas, ya que los productos de oxidación pueden detectarse mediante métodos fisicoquímicos (Laguerre *et al.*, 2007). En el presente estudio se han determinado la formación de hidroperóxidos y de malondialdehído (MDA) como indicadores de oxidación primaria y secundaria, respectivamente.

Los hidroperóxidos, al ser los primeros compuestos formados durante el proceso de oxidación se utilizan para evaluar el estado de oxidación de los lípidos de los alimentos, siempre y cuando no se encuentre en un estado oxidativo avanzado (Eymard *et al.*, 2009), pues se considera productos de oxidación primarios que generan la información más relevante sobre la intensidad de la lipoperoxidación. (Laguerre *et al.*, 2007)

El MDA es uno de los aldehídos más abundantes generados durante la oxidación secundaria de los lípidos, que se forma principalmente a partir de la oxidación del ácido linolénico, y también probablemente es uno de los compuestos más utilizados como marcador de la oxidación secundaria (Barriuso *et al.*, 2012). En este estudio se utilizó el método de TBARS por espectrofotometría para evaluar los procesos de oxidación secundaria de las emulsiones tras su elaboración y durante su almacenamiento a 4 °C.

Este método espectrofotométrico ha sido criticado por diferentes autores por no ser selectivo para el MDA, ya que también se ha descrito que reacciona con otros aldehídos, carbohidratos, aminoácidos y ácidos nucleicos, sobrestimando los valores de oxidación. Sin embargo, es un método ampliamente utilizado por su sencillez y buenos resultados obtenidos en queso, aceites vegetales y en productos de carne y pescado (Papastergiadis *et al.*, 2012).

El alto contenido en ácidos grasos omega-3 y 6 de la emulsión de este estudio, la hace especialmente susceptible a la oxidación lipídica, siendo el ácido linolénico, seguido de los ácidos linoleico y oleico los que tienen una mayor capacidad para promover la oxidación de lípidos en emulsiones O/W (Di Mattia *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2013). En este tipo de emulsiones, la oxidación se inicia en la interfase y está influenciada tanto por la presencia de compuestos prooxidantes y antioxidantes, como por las interacciones entre los diferentes componentes del sistema. Además, según Sivapratha y Sarkar (2018), se podrían inducir efectos genotóxicos y citotóxicos adversos en humanos debido a la formación de productos de degradación como MDA, acroleína, hexanal y propanal.

Durante el almacenamiento y en los días en que se realizó el seguimiento, el contenido de hidroperóxidos en la emulsión control fue ligeramente mayor al de las emulsiones con AEs de clavo y tomillo, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (Tabla 5.6).

Tabla 5. 6. Hidroperóxidos (mmol/kg aceite) y TBARS (μg de malonaldehído/kg aceite) en emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva y aceites esenciales de tomillo y clavo, durante el almacenamiento en refrigeración.

Parámetro	Emulsión	Días de almacenamiento a 4 °C		
		1	10	20
Hidroperóxidos (mmol/kg aceite)	Control	0,22 \pm 0,05	0,21 \pm 0,02	0,17 \pm 0,05
	Tomillo	0,12 \pm 0,08	0,16 \pm 0,09	0,10 \pm 0,06
	Clavo	0,14 \pm 0,09	0,20 \pm 0,09	0,15 \pm 0,06
TBARS (μg de MDA/kg aceite)	Control	0,27 \pm 0,06 ^a	0,23 \pm 0,08 ^a	0,20 \pm 0,03 ^b
	Tomillo	0,29 \pm 0,04 ^a	0,24 \pm 0,01 ^a	0,14 \pm 0,01 ^b
	Clavo	0,26 \pm 0,01 ^a	0,23 \pm 0,02 ^a	0,18 \pm 0,04 ^b

^{a,b} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

En las emulsiones elaboradas los valores de TBARS obtenidos fueron muy reducidos y la incorporación de AEs no tuvo un efecto significativo en la evolución de la oxidación secundaria (Tabla 5. 6). Estos valores de TBARS se mantuvieron estables en todas las emulsiones estudiadas durante 10 días de almacenamiento con una disminución, en todos los casos, a los 20 días de almacenamiento. También Cofrades *et al.* (2014) observaron, en una emulsión que contenía aceite de chía, cierto efecto antioxidante al inicio del almacenamiento, que lo relacionaron con los componentes bioactivos (tocoferoles, polifenoles, carotenoides, fosfolípidos) presentes en el aceite de chía y de antioxidantes naturales, como los compuestos fenólicos.

Los resultados obtenidos en la oxidación secundaria son similares a los obtenidos por Hebishy (2013) en emulsiones elaboradas con aceites de girasol y oliva, en los que además no se apreciaron diferencias significativas entre las emulsiones elaboradas con 1, 3 o un 5% de NaCas. Fernandez-Avila y Trujillo (2016) también hallaron valores de TBARS similares y bajos en emulsiones convencionales producidas utilizando 20% de aceite de soja y 4% de aislado proteico de soja como emulgente.

Varios estudios han comparado el efecto del tipo de emulsionante sobre la oxidación de lípidos, mostrando una mayor estabilidad aquellas en las que se utiliza caseína (Jacobsen, 2016). Cofrades *et al.* (2014) demostraron que el NaCas, utilizado como emulsionante hidrófilo en emulsiones de aceite de chía, es altamente eficaz contra la oxidación de lípidos. O'Dwyer *et al.* (2013) en emulsiones O/W con 20% aceite y tratadas a 34 MPa, hallaron que las estabilizadas con 2 y 3% de NaCas presentaron valores de hidroperóxidos más bajos que las elaboradas con 1%. En otro estudio, Kargar *et al.* (2011) elaboraron emulsiones O/W con una fase oleosa de 5 y 30%, con NaCas como emulsionante, observando que un incremento del 0,1 al 2% disminuyó la velocidad de oxidación de lípidos de la emulsión.

Según Kargar *et al.* (2011) la capacidad antioxidante del NaCas se relacionaría con la formación de una capa interfacial gruesa alrededor de las gotitas de aceite, pues el caseinato se adsorbe en la interfase aceite-agua con una cobertura superficial máxima de $\sim 3 \text{ mg/m}^2$ (Liang *et al.*, 2014). Esta cobertura podría proteger a los lípidos al actuar como barrera de la penetración y difusión de los iniciadores de la oxidación de los lípidos (Kamal-Eldin, 2003; McClements, 2010). Las emulsiones estabilizadas por proteínas se caracterizan por una mayor viscosidad, por lo que es probable que una membrana más

rígida pueda obstaculizar la migración de hidroperóxidos desde el interior de la gota de lípido a la fase acuosa (Di Mattia *et al.*, 2011).

También se ha descrito la importancia de un exceso de emulsionante proteico y la actividad antioxidante. Sun y Gunasekaran (2009) determinaron que el uso de proteína de suero al 0,2% es suficiente para cubrir la superficie de gotitas de aceite en emulsiones O/W con un contenido de aceite del 5%, y que el incremento en la adición de la proteína de suero (1 y 2%) produce agregados proteicos en la fase acuosa que contribuyen a la disminución en la formación de hidroperóxidos. Se ha sugerido que la proteína no adsorbida, es decir el exceso de proteína, puede interactuar con los prooxidantes en la fase acuosa (O' Dwyer *et al.*, 2013), debido a que los aminoácidos, tirosina e histidina del NaCas, pueden eliminar radicales libres. Los residuos de metionina en la β -caseína también eliminan radicales, y además el NaCas tiene muchos grupos fosfato, como los residuos de fosfoserina que pueden actuar como agentes quelantes de los metales de transición (Kargar *et al.*, 2011; Miquel y Farré, 2007; Mora-Gutierrez *et al.*, 2010; Qiu *et al.*, 2015; Tong *et al.*, 2000). Estos agregados proteicos son habituales debido a la escasa solubilidad de algunos aislados proteicos comerciales, por lo que usualmente la cantidad necesaria para estabilizar emulsiones es mayor a la cantidad de emulsionante que se requiere solo para cubrir el área interfacial (Fernandez-Avila y Trujillo, 2016).

Por otra parte, diversos autores han demostrado una disminución de la oxidación de los lípidos al incrementar el contenido de aceite en las emulsiones. Así, Fernandez-Avila y Trujillo (2016) observaron que al incrementar en una emulsión el contenido de aceite de 10 a 20%, se producía una disminución significativa en la oxidación. De manera similar, Sun y Gunasekaran (2009) y Kargar *et al.* (2011) hallaron una disminución en la oxidación de lípidos, tanto de hidroperóxidos como de productos de oxidación secundaria, cuando la fracción de volumen de aceite aumentó de un 5 a un 40% y de un 5 a un 30%, respectivamente. Esto podría explicarse por la mayor viscosidad que presentan las emulsiones al incrementar su contenido de aceite, que produce menos cremado y por tanto hay una menor cantidad de grasa en contacto con el oxígeno. Por otro lado la disminución de la fase acuosa, disminuye la concentración de los prooxidantes potenciales, como los iones de hierro, por área interfacial, y en consecuencia disminuyen la cantidad de radicales libres (Fernandez-Avila y Trujillo, 2016; Kargar *et al.*, 2011; Sun y Gunasekaran, 2009).

Aunque los AEs y sus componentes activos carvacrol y timol (tomillo), y eugenol (clavo), mostraron una elevada actividad antioxidante *in vitro*, en las emulsiones elaboradas, su actividad fue reducida, o bien quedó totalmente enmascarada por el efecto antioxidante, anteriormente descrito del NaCas.

5.3. Referencias

- Araiza-Calahorra, A., Akhtar, M., y Sarkar, A. 2018. Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: From encapsulation to bioaccessibility. *Trends in Food Science and Technology*, 71: 155-169.
- Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., y Chalier, P. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 149-154.
- Balouiri, M., Sadiki, M., y Koraichi Ibsouda, S. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6: 71-79.
- Barriuso, B., Astiasarán, I., y Ansorena, D. 2012. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. *European Food Research and Technology*, 236: 1-15.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- Calo Rivera, J., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., y Ricke, S. C. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, 54: 111-119.
- de Campo, C., Pereira dos Santos, P., Haas Costa, T. M., Paese, K., Stanisçuaski Guterres, S., de Oliveira Rios, A., y Hickmann Flôres, S. 2017. Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material: Characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*, 234: 1-9.
- Capitani, M. I., Nolasco, S. M., y Tomás, M. C. 2016. Stability of oil-in-water (O/W) emulsions with chia (*Salvia hispanica* L.) mucilage. *Food Hydrocolloids*, 61: 537-546.
- Carneiro, H. C. F., Tonon, R. V., Grosso, C. R. F., y Hubinger, M. D. 2013. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, 115: 443-451.
- Chang, Y., McLandsborough, L., y McClements, D. J. 2012. Physical properties and antimicrobial efficacy of thyme oil nanoemulsions: Influence of ripening inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 12056-12063.
- Chen, L., Chen, J., Yu, L., y Wu, K. 2016. Improved emulsifying capabilities of hydrolysates of soy protein isolate pretreated with high pressure microfluidization. *LWT - Food Science and Technology*, 69: 1-8.
- Cofrades, S., Santos-López, J. a., Freire, M., Benedí, J., Sánchez-Muniz, F. J., y Jiménez-Colmenero, F. 2014. Oxidative stability of meat systems made with W1/O/W2 emulsions prepared with hydroxytyrosol and chia oil as lipid phase. *LWT - Food Science and Technology*, 59: 941-947.

- Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., y Pandian, S. K. 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130: 107-115.
- Domian, E., Brynda-Kopytowska, A., y Oleksza, K. 2015. Rheological properties and physical stability of o/w emulsions stabilized by OSA starch with trehalose. *Food Hydrocolloids*, 44: 49-58.
- Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., y Ferrari, G. 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Science and Technology*, 44: 1908-1914.
- Eisinaite, V., Juraite, D., Schroën, K., y Leskauskaite, D. 2017. Food-grade double emulsions as effective fat replacers in meat systems. *Journal of Food Engineering*, 213: 54-59.
- Eymard, S., Baron, C. P., y Jacobsen, C. 2009. Oxidation of lipid and protein in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during processing and storage. *Food Chemistry*, 114: 57-65.
- Farshchi, A., Ettelaie, R., y Holmes, M. 2013. Influence of pH value and locust bean gum concentration on the stability of sodium caseinate-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*, 32: 402-411.
- Felix, M., Romero, A., y Guerrero, A. 2017. Influence of pH and Xanthan Gum on long-term stability of crayfish-based emulsions. *Food Hydrocolloids*, 72: 372-380.
- Fernandez-Avila, C. y Trujillo, A. J. 2016. Ultra-high pressure homogenization improves oxidative stability and interfacial properties of soy protein isolate-stabilized emulsions. *Food Chemistry*, 209: 104-113.
- Fernandez-Avila, C. y Trujillo, A. J. 2017. Enhanced stability of emulsions treated by Ultra-high pressure homogenization for delivering conjugated linoleic acid in Caco-2 cells. *Food hydrocolloids*, 71: 271-281.
- Gavaric, N., Mozina, S. S., Kladar, N., y Bozin, B. 2015. Chemical profile, antioxidant and antibacterial activity of thyme and oregano essential oils, thymol and carvacrol and their possible synergism. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18: 1013-1021.
- Gómez-Garcés, J. L., Aracil, B., y Gil, Y. 2009. Comparación entre dilución en agar y otras 3 técnicas para la determinación de la sensibilidad de 228 aislamientos clínicos de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27: 331-337.

- Guimarães-Inácio, A., Lopes Francisco, C. R., Rojas, V. M., de Souza Leone, R., Valderrama, P., Bona, E., Leimann, F. V., Tanamati, A. A. C., y Gonçalves, O. H. 2018. Evaluation of the oxidative stability of chia oil-loaded microparticles by thermal, spectroscopic and chemometric methods. *LWT - Food Science and Technology*, 87: 498-506.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., y Bourke, P. 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*, 26: 142-150.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., y Riley, T. V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 985-990.
- Hebshy, E., Buffa, M., Guamis, B., Blasco-Moreno, A., y Trujillo, A. J. 2015. Physical and oxidative stability of whey protein oil-in-water emulsions produced by conventional and ultra high-pressure homogenization: Effects of pressure and protein concentration on emulsion characteristics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 32: 79-90.
- Hebshy, E., Buffa, M., Juan, B., Blasco-Moreno, A., y Trujillo, A. J. 2017. Ultra high-pressure homogenized emulsions stabilized by sodium caseinate: Effects of protein concentration and pressure on emulsions structure and stability. *LWT - Food Science and Technology*, 76: 57-66.
- Hebshy, E. H. E. 2013. Application UHPH in the production of submicron/nano-oil-in-water emulsions using vegetable oils and milk proteins as emulsifiers. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 241 pp.
- Herrero, A. M., Ruiz-Capillas, C., Pintado, T., Carmona, P., y Jiménez-Colmenero, F. 2018. Elucidation of lipid structural characteristics of chia oil emulsion gels by Raman spectroscopy and their relationship with technological properties. *Food Hydrocolloids*, 77: 212-219.
- Holley, R. A. y Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22: 273-292.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., y Meyer, R. L. 2012. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3: 1-24.
- Jacobsen, C. y Sørensen, A. D. M. 2015. The use of antioxidants in the preservation of food emulsion systems. *En Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. F. Shahidi, editor. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 389-412.
- Johnson, D. R., Gisder, J., Lew, L., Goddard, J. M., y Decker, E. A. 2017. Is oxygen reduction a viable antioxidant strategy for oil-in-water emulsions? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119: 1-11.

- Julio, L. M., Copado, C. N., Diehl, B. W. K., Ixtaina, V. Y., y Tomás, M. C. 2018. Chia bilayer emulsions with modified sunflower lecithins and chitosan as delivery systems of omega-3 fatty acids. *LWT - Food Science and Technology*, 89: 581-590.
- Julio, L. M., Ixtaina, V. Y., Fernández, M. A., Torres Sánchez, R. M., Wagner, J. R., Nolasco, S. M., y Tomás, M. C. 2015. Chia seed oil-in-water emulsions as potential delivery systems of ω -3 fatty acids. *Journal of Food Engineering*, 162: 48-55.
- Julio, L. M., Ixtaina, V. Y., Fernández, M., Torres Sánchez, R. M., Nolasco, S. M., y Tomás, M. C. 2016. Development and characterization of functional O/W emulsions with chia seed (*Salvia hispanica* L.) by-products. *Journal of Food Science and Technology*, 53: 3206-3214.
- Kamal-Eldin, A. ed. 2003. Lipid Oxidation Pathways. 1st Ed. AOCS Press, Illinois. 323 pp.
- Kargar, M., Spyropoulos, F., y Norton, I. T. 2011. The effect of interfacial microstructure on the lipid oxidation stability of oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 357: 527-533.
- Klančnik, A., Guzej, B., Kolar, M. H., Abramovic, H., y Možina, S. S. 2009. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection*, 72: 1744-1752.
- Laguerre, M., Lecomte, J., y Villeneuve, P. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46: 244-282.
- Lam, R. S. H. y Nickerson, M. T. 2013. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. *Food chemistry*, 141: 975-984.
- Liang, R., Xu, S., Shoemaker, C. F., Li, Y., Zhong, F., y Huang, Q. 2012. Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60: 7548-55.
- Liang, Y., Gillies, G., Patel, H., Matia-Merino, L., Ye, A., y Golding, M. 2014. Physical stability, microstructure and rheology of sodium-caseinate-stabilized emulsions as influenced by protein concentration and non-adsorbing polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 36: 245-255.
- Madadlou, A., Mousavi, M. E., Emam-Djomeh, Z., Sheehan, D., y Ehsani, M. 2009. Alkaline pH does not disrupt re-assembled casein micelles. *Food Chemistry*, 116: 929-932.
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., Gortzi, O., Izadi, M., y Nabavi, S. M. 2016. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210: 402-414.

- Di Mattia, C. D., Sacchetti, G., Mastrocola, D., y Pittia, P. 2009. Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil O/W emulsions. *Food Research International*, 42: 1163-1170.
- Di Mattia, C. D., Sacchetti, G., Mastrocola, D., Sarker, D. K., y Pittia, P. 2010. Surface properties of phenolic compounds and their influence on the dispersion degree and oxidative stability of olive oil O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, 24: 652-658.
- Di Mattia, C. D., Sacchetti, G., y Pittia, P. 2011. Interfacial behavior and antioxidant efficiency of olive phenolic compounds in o/w olive oil emulsions as affected by surface active agent type. *Food Biophysics*, 6: 295-302.
- McClements, D. J. 2010. Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1: 241-269.
- McClements, D. J. 2016. Food Emulsions: Principles, Practices, and techniques. 3rd Ed. CRC Press Taylor, Boca Ratón. 672 pp.
- Miquel, E. y Farré, R. 2007. Effects and future trends of casein phosphopeptides on zinc bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*, 18: 139-143.
- Moghimi, R., Aliahmadi, A., y Rafati, H. 2017. Ultrasonic nanoemulsification of food grade trans-cinnamaldehyde: 1,8-Cineol and investigation of the mechanism of antibacterial activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 35: 415-421.
- Montes de Oca-Ávalos, J. M., Candal, R. J., y Herrera, M. L. 2017. Colloidal properties of sodium caseinate-stabilized nanoemulsions prepared by a combination of a high-energy homogenization and evaporative ripening methods. *Food Research International*, 100: 143-150.
- Montville, T. J. y Matthews, K. R. 2008. Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. *En Food Microbiology: an Introduction*. T.J. Montville y K.R. Matthews, editores. ASM Press, Washington. 77-94.
- Mora-Gutierrez, A., Attaie, R., y Farrell, H. M. 2010. Lipid oxidation in algae oil-in-water emulsions stabilized by bovine and caprine caseins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 5131-5139.
- Morley, W. G. 2011. Reducing saturated fat using emulsion technology. *En Reducing Saturated Fats in Foods*. G. Talbot, editor. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 131-157.
- O' Dwyer, S. P., O' Beirne, D., Eidhin, D. N., y O' Kennedy, B. T. 2013. Effects of sodium caseinate concentration and storage conditions on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 138: 1145-52.
- Owens, C., Griffin, K., Houryieh, H., y Williams, K. 2018. Creaming and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized by whey protein-xanthan-locust bean complexes: Impact of pH. *Food Chemistry*, 239: 314-322.

- Pan, K., Chen, H., Davidson, P. M., y Zhong, Q. 2014. Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: Physical and antilisterial properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 1649-1657.
- Papastergiadis, A., Mubiru, E., Van Langenhove, H., y De Meulenaer, B. 2012. Malondialdehyde measurement in oxidized foods: Evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test in various foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 9589-9594.
- Perricone, M., Arace, E., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., y Bevilacqua, A. 2015. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1-7.
- Petrut, R. F., Danthine, S., y Blecker, C. 2016. Assessment of partial coalescence in whippable oil-in-water food emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 229: 25-33.
- Piorkowski, D. T. y McClements, D. J. 2013. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, 42: 5-41.
- Poyato, C., Navarro-Blasco, I., Calvo, M. I., Cavero, R. Y., Astiasarán, I., y Ansorena, D. 2013. Oxidative stability of O/W and W/O/W emulsions: Effect of lipid composition and antioxidant polarity. *Food Research International*, 51: 132-140.
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P. K., y Dubey, N. K. 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. *Food Control*, 47: 381-391.
- Qiu, C., Zhao, M., Decker, E. A., y McClements, D. J. 2015. Influence of protein type on oxidation and digestibility of fish oil-in-water emulsions: Gliadin, caseinate, and whey protein. *Food Chemistry*, 175: 249-257.
- Ramakrishnan, S., Ferrando, M., Aceña-Muñoz, L., Lamo-Castellví, S., y Güell, C. 2012. Fish oil microcapsules from o/w emulsions produced by premix membrane emulsification. *Food and Bioprocess Technology*, 6: 3088-3101.
- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Ramos de Melo, N., y Sanches-Silva, A. 2017. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 61: 132-140.
- Richter, C. K., Skulas-Ray, A. C., y Kris-Etherton, P. M. 2016. Recommended Intake of Fish and Fish Oils. *En Fish and Fish Oil in Health and Disease Prevention*. S. Raatz y D. Bibus, editores. Elsevier Inc., London. 27-47.
- Sabouri, S. y Corredig, M. 2016. Acid induced destabilization of emulsions prepared with sodium caseinate-epigallocatechin-gallate complexes. *Food Hydrocolloids*, 61: 113-118.

- Salminen, H., Helgason, T., Kristinsson, B., Kristbergsson, K., y Weiss, J. 2013. Formation of solid shell nanoparticles with liquid ω -3 fatty acid core. *Food Chemistry*, 141: 2934-2943.
- Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O., y McClements, D. J. 2013. Influence of particle size on lipid digestion and β -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chemistry*, 141: 1472-80.
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., y Martín-Belloso, O. 2014. Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against *Escherichia coli* of lemongrass oil-loaded nanoemulsions. *Food Control*, 37: 292-297.
- Shah, B., Davidson, P. M., y Zhong, Q. 2013. Nanodispersed eugenol has improved antimicrobial activity against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in bovine milk. *International Journal of Food Microbiology*, 161: 53-9.
- Shahidi, F. 2011. Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease. *En Omega-3 Oils: Applications in Functional Foods*. E.M. Hernandez y M. Hosokawa, editores. AOCS Press, Illinois. 1-29.
- Si, W., Gong, J., Chanas, C., Cui, S., Yu, H., Caballero, C., y Friendship, R. M. 2006. *In vitro* assessment of antimicrobial activity of carvacrol, thymol and cinnamaldehyde towards *Salmonella* serotype Typhimurium DT104: effects of pig diets and emulsification in hydrocolloids. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 1282-1291.
- Sivapratha, S. y Sarkar, P. 2018. Oxidative stability and effect of stress factors on flaxseed oil-in-water emulsions stabilized by sodium caseinate–sodium alginate–chitosan interfacial membrane. *Chemical Papers*, 72: 1-14.
- Sun, C. y Gunasekaran, S. 2009. Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 23: 165-174.
- Tatar, B. C., Summu, G., y Sahin, S. 2017. Rheology of Emulsions. *En Advances in Food Rheology and Its Applications*. J. Ahmed, editor. Elsevier Ltd., Duxford. 437-457.
- Teng, J., Hu, X., Wang, M., y Tao, N. 2017. Fabrication of chia (*Salvia hispanica* L.) seed oil nanoemulsions using different emulsifiers. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42: 1-9.
- Tong, L. ., Sasaki, S., McClements, D. J., y Decker, E. A. 2000. Antioxidant activity of whey in a salmon oil emulsion. *Food Chemistry and Toxicology*, 65: 1325-1329.
- Trentin, A., De Lamo, S., Güell, C., López, F., y Ferrando, M. 2011. Protein-stabilized emulsions containing beta-carotene produced by premix membrane emulsification. *Journal of Food Engineering*, 106: 267-274.

- Wang, Y. Z., Fu, S. G., Wang, S. Y., Yang, D. J., Wu, Y. H. S., y Chen, Y. C. 2018. Effects of a natural antioxidant, polyphenol-rich rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, on lipid stability of plant-derived omega-3 fatty-acid rich oil. *LWT - Food Science and Technology*, 89: 210-216.
- Wang, Z., Neves, M. A., Isoda, H., y Nakajima, M. 2015. Preparation and characterization of micro/nano-emulsions containing functional food components. *Japan Journal of Food Engineering*, 16: 263-276.
- Ye, A. 2008. Interfacial composition and stability of emulsions made with mixtures of commercial sodium caseinate and whey protein concentrate. *Food Chemistry*, 110: 946-952.
- Yi, J., Zhu, Z., Dong, W., McClements, D. J., y Decker, E. A. 2013. Influence of free fatty acids on oxidative stability in water-in-walnut oil emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115: 1013-1020.

Capítulo VI

Análogo de queso fresco enriquecido con omega 3 y 6, por sustitución de grasa de la leche con emulsiones de aceite de chía y oliva, y con aceites esenciales incorporados

6.1. Introducción

La incorporación de AGPI omega-3 en alimentos de consumo frecuente puede ser una manera de mejorar el perfil nutricional de la dieta occidental, sin que el consumidor cambie drásticamente su dieta habitual (Wang *et al.*, 2018). Es así que entre los alimentos funcionales se pueden encontrar los fortificados con ácidos grasos omega-3 para promover la buena salud o prevenir enfermedades (Siró *et al.*, 2008). Un alimento de gran consumo en España es el queso, en especial el queso fresco (MAGRAMA, 2015 y 2016; MAPAMA, 2017 y 2018). Por lo que una estrategia a aplicar en este tipo de productos, sería cambiar la composición de ácidos grasos saturados por ácidos grasos cis-AGPI y/o cis-AGMI, conservando los beneficios nutricionales y cardiometabólicos de la leche (Givens (2017). Los ácidos grasos poliinsaturados más importantes desde el punto de vista de salud humana y nutrición pertenecen a las familias del omega-6 y omega-3 (Ratnayake y Galli, 2009). La ingesta de las cantidades de ácidos grasos omega-3 recomendados son difíciles de conseguir sin modificar drásticamente la dieta, sobre todo en poblaciones con bajo consumo de pescado azul (Hall y Tulbek, 2008). Por lo que una alternativa para aumentar el aporte de ácidos grasos omega-3 a la dieta, es la chía que es la fuente botánica más rica de ALA conocida (Jiménez-Colmenero, 2013), con 65% de

este ácido graso en el aceite (Morales *et al.*, 2012), que además no tiene el inconveniente de conferir características organolépticas desagradables de sabor y el olor del aceite procedente de fuentes marinas (Segura-Campos *et al.*, 2014).

Con esta finalidad, en este estudio se propone la producción de un producto análogo de queso fresco (AQF), en el que la grasa láctea se reemplazó por una emulsión que contiene aceites vegetales de chía y oliva ricos en ácidos grasos omega-3 y omega-6, respectivamente. Para ello se tuvo en consideración que en otros estudios muchos compuestos lipófilos bioactivos se han incorporado a los quesos mediante emulsiones simples, ya que permite aumentar su retención en la cuajada, manteniendo su bioactividad y la estabilidad química del queso durante el almacenamiento (Jalilzadeh *et al.*, 2015; Stratulat *et al.*, 2014; Stratulat *et al.*, 2015). Sin embargo, reemplazar la grasa láctea por aceites con alto contenido de ácidos grasos insaturados, presenta el inconveniente de tener un producto con una elevada propensión a la oxidación, que generarían por un lado la pérdida de los AGPI, y por tanto un deterioro de su calidad nutricional, y por otro lado la generación de compuestos tóxicos productos de la oxidación (Bodoira *et al.*, 2017, Yang *et al.*, 2013). Para prevenir estas reacciones indeseables surge la necesidad de utilizar antioxidantes entre los que existen compuestos de origen natural. El queso es un producto que permite incluir ingredientes funcionales, porque tiene un pH y un contenido de grasa relativamente altos, una consistencia sólida y una gran capacidad de amortiguación (Giroux *et al.*, 2013). En este estudio, en concreto, se utilizaron aceites esenciales (AEs) de clavo y tomillo, como una alternativa a los antioxidantes sintéticos, cuyo uso está en discusión debido a su cuestionable seguridad (Delgado *et al.*, 2014). Los compuestos activos de estos AEs, que principalmente son eugenol, carvacrol y timol, son compuestos fenólicos que además presentan actividad antimicrobiana (Goñi *et al.*, 2015), propiedad que también se evaluará en este estudio a través de la evaluación de la calidad microbiológica en los AQF que incorporan los AEs, teniendo en cuenta que el queso fresco es un producto lácteo, especialmente si no tiene microorganismos iniciadores, que proporciona un medio idóneo de crecimiento para los microorganismos debido a su pH y su contenido alto en humedad proteína y grasa, características que reducen su tiempo de vida útil (Evert-Arriagada *et al.*, 2012). La pasteurización de la leche generalmente elimina a los posibles patógenos que podrían estar presentes en el sustrato lácteo de partida, y disminuye considerablemente la población de microorganismos alterantes. Sin

embargo, pueden producirse contaminaciones posteriores debido a manipulaciones no higiénicas.

El objetivo del presente estudio fue elaborar un AQF a partir de leche desnatada, sustituyendo la grasa de la leche con emulsiones elaboradas con caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, que se caracterizaron en el capítulo V. Los AEs seleccionados, fueron el tomillo y el clavo, que se incorporaron de dos maneras diferentes: a) integrados en la emulsión y b) añadiéndolos de forma independiente en la mezcla de la leche desnatada y la emulsión.

En total se elaboraron cinco AQF: los denominados Tom1 y Cla1, producidos con emulsiones donde los AEs se incluyeron en la elaboración de las emulsiones obtenidas mediante homogeneización convencional (15 MPa), y los denominados Tom2 y Cla2, donde los AEs respectivos se agregaron como un ingrediente más a la mezcla de leche desnatada/emulsión, y finalmente el AQF control que se elaboró a partir de leche desnatada y la emulsión de aceites, pero sin la adición de AEs. La cantidad de AE utilizada en este estudio se estableció en concordancia a los resultados obtenidos de actividad antimicrobiana de los AEs en las emulsiones (sección 5.2.1.), considerando también el efecto de la concentración de los AEs en las características sensoriales del producto final; para determinar este efecto se realizaron producciones de AQF según el procedimiento descrito en el Capítulo III de materiales y métodos, incluyendo en la mezcla de la leche desnatada/emulsión una concentración de 0,05 y 0,5% de los AEs de canela, clavo, orégano o tomillo. Los AQF se analizaron sensorialmente por 4 catadores, con experiencia en la evaluación de queso fresco, con el objetivo de evaluar el impacto de la concentración de los AEs en el olor y sabor, resultados que se detallarán en la sección 6.2.6 de Análisis sensorial.

6.2. Resultados y discusión

6.2.1. Parámetros de coagulación del análogo de queso fresco

En los primeros ensayos de elaboración del AQF se utilizaron concentraciones de quimosina y de CaCl_2 habituales para elaborar un queso fresco (0,03% de quimosina y 0,01% de CaCl_2 al 35%), pero en estas condiciones, y en la mezcla de leche desnatada:emulsión (9:1) no coaguló, incluso después de transcurrir 1 h a 32 °C. En quesería, es una práctica común agregar a la leche CaCl_2 (por ejemplo, 0,01%), es decir

40 mg de Ca/L leche, ya que incrementa las concentraciones de calcio soluble, coloidal e ionizado y reduce el pH de la leche, produciendo efectos positivos en las diversas fases de la coagulación (Fox y Cogan, 2004).

Para identificar el motivo de la falta de coagulación, en primer lugar, se descartó que fuera la calidad de la leche desnatada usada, que cuajó adecuadamente tras realizar diferentes ensayos con la concentración estándar de quimosina y de CaCl₂. En segundo lugar, para descartar el posible efecto de la inclusión de la emulsión O/W en la leche desnatada o bien de los AEs sobre la coagulación, se realizaron una serie de pruebas, en las que se utilizaron emulsiones con y sin AEs, con la concentración estándar de quimosina al 0,03% y 0,01% de CaCl₂ al 35%, apreciando tras 1 hora de incubación a 32 °C que no coagulaban.

Con base en los resultados obtenidos en los ensayos de coagulación y apoyados en la bibliografía, se dedujo que el NaCas presente en la emulsión O/W adicionada a la leche desnatada fue lo que obstaculizó la coagulación. Si bien el caseinato de sodio es un buen emulsionante, puede dificultar e incluso inhibir la coagulación de la leche durante la elaboración de queso (Stratulat *et al.*, 2013). Gaygadzhiev *et al.* (2011a) estudiaron ampliamente el efecto del NaCas en la coagulación de la leche, sugiriendo que la inhibición del desarrollo de la estructura gelificada se debe a que el NaCas, ya sea adsorbido en la interfase aceite-agua o libre en el suero de leche, podría asociarse con los iones de calcio disponibles e interrumpir el equilibrio de fosfato de calcio de la leche. También, se sugiere que las caseínas libres en la leche se adsorben sobre las micelas de caseína alteradas por el cuajo, causando fuerzas de repulsión estéricas de largo alcance, inhibiendo su autoasociación (Gaygadzhiev *et al.*, 2011b).

Ante esta situación, una alternativa factible era la adición de mayores cantidades de CaCl₂, pues como se señaló anteriormente promueve la agregación inducida por cuajo. Se realizaron una serie de pruebas en las que se utilizó 0,03% de quimosina y cantidades variables de CaCl₂ con la finalidad de determinar la concentración y la cantidad a adicionar óptima. También se modificaron otros parámetros como la temperatura de coagulación (32 y 35 °C) y el pH de la mezcla leche desnatada/emulsión (pH original de la mezcla y ajustado a 6,65) (Tabla 6. 1).

En los ensayos de coagulación se consideró un coágulo firme cuando se obtuvo un corte limpio, sin residuos en el cuchillo, y una separación limpia del gel de la pared de la cuba de quesería, transcurridos 40 min de incubación tras la adición de quimosina. El coágulo

fue firme, sin ajustar el pH, cuando se utilizó un 0,03% de CaCl₂ al 50%, lo que equivale a 0,15 g/L de CaCl₂ a una temperatura de 35 °C. También fue firme cuando con el objetivo de mejorar la actividad de la quimosina se disminuyó el pH a 6,5, incluso a menores concentraciones de CaCl₂ (Tabla 6. 1). Finalmente, se optó por aplicar los parámetros de coagulación especificados en el ensayo T10, en el que se utilizó un 0,03% de una solución de CaCl₂ al 50%, una temperatura de coagulación de 35 °C y un tiempo final de coagulación de 40 min.

Tabla 6. 1. Ensayos de coagulación de la mezcla leche desnatada:emulsión O/W, empleando diferentes concentraciones de CaCl₂, aplicadas en diferentes proporciones en la mezcla final y como coagulante un 0,03% de quimosina con actividad ~600 IMCU/mL.

Ensayo	CaCl ₂ (%)		Temperatura/tiempo de coagulación	pH	Coagulación
	Solución preparada	Cantidad adicionada			
T1	50	0,01	32 °C / 40 min	No ajustado	No coaguló
T2		0,03			Débil
T3	35	0,01			No coaguló
T4		0,03			No coaguló
T5	50	0,01	32 °C / 40 min	Ajustado a 6,5	Firme
T6		0,03			Firme
T7	35	0,01			Débil
T8		0,03			Firme
T9	50	0,02	35 °C / 40 min	No ajustado	Débil
T10		0,03			Firme
T11		0,03			Débil

6.2.2. Composición química y pH del análogo de queso fresco

La composición de los AQF se presenta en la Tabla 6. 2, donde se puede observar que el contenido en sólidos totales en los AQF fue de aproximadamente un 27,3%, siendo el Tom2 el que mostro valores inferiores, aunque no de forma significativa. Estos valores son los normales en un queso fresco, y oscila entre un 25 y 30% (Almena-Aliste y Mietton, 2014). El porcentaje medio de proteínas fue de ~12,3%, siendo el AQF Tom2 y relacionado parcialmente con el menor contenido en sólidos totales, el que presentó un menor contenido proteico.

Generalmente los quesos frescos debido al método de elaboración tienen un alto contenido de humedad, en nuestro estudio entre 72 y 73%. Este contenido puede estar condicionado por el proceso tecnológico seguido. Así, Zamora *et al.* (2015) que elaboraron queso a partir de leche pasteurizada y leche tratada por homogeneización convencional y posteriormente pasteurizada, observaron que este último tratamiento aumentó el contenido de humedad del queso, que lo relacionaron con cambios en la estructura de las proteínas, grasas y en el agua ligada debido al proceso de homogeneización. En nuestro estudio, la alta humedad obtenida se relaciona con la elevada cantidad de caseína de la formulación utilizada (Kindstedt, 2014).

Tabla 6. 2. Composición (%), pH y rendimiento (%) de los análogos de queso fresco elaborados con emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y aceites esenciales de tomillo y clavo.

Análogo de queso fresco ¹	Sólidos totales	Proteína	Grasa	pH	Rendimiento
Control	27,87 ± 0,81	12,80 ± 0,10	8,47 ± 0,02	6,88 ± 0,05	21,53 ± 0,33
Tom1	27,83 ± 0,99	12,93 ± 0,19	9,13 ± 0,10	6,92 ± 0,08	20,99 ± 0,91
Tom2	26,68 ± 0,43	12,13 ± 0,33	9,50 ± 0,71	6,91 ± 0,08	22,43 ± 0,65
Cla1	27,04 ± 1,08	12,82 ± 0,44	8,65 ± 0,21	6,84 ± 0,01	21,22 ± 0,63
Cla2	27,32 ± 0,41	12,34 ± 0,04	9,15 ± 0,49	6,83 ± 0,00	22,42 ± 0,49

¹ Control: control; Tom1: con aceite esencial de tomillo emulsionado; Tom2: con aceite esencial de tomillo sin emulsionar; Cla1: con aceite esencial de clavo emulsionado; Cla2: con aceite esencial de clavo sin emulsionar.

El contenido en grasa de los AQF, obtenidos a partir de una mezcla emulsión/leche desnatada de un 2% de grasa, osciló entre un 8,5 y 9,5% (Tabla 6. 2). El proceso de homogeneización es importante en la retención de grasa/aceite, tanto en queso fresco como en los análogos. Zamora *et al.* (2015) en la elaboración de queso fresco, partieron de leche con un 3,5% de grasa y obtuvieron un queso con 15,5% de grasa, observando un mayor contenido de grasa en aquéllos elaborados con leche homogeneizada a 15 MPa. Estos investigadores consideran que, al reducirse el tamaño de glóbulo graso durante el proceso de homogeneización, se reducen las pérdidas de grasa durante la elaboración del queso, ya que las nuevas partículas lipoproteicas creadas por homogeneización poseen un buen recubrimiento proteico superficial, y actúan como nuevas partículas que forman parte del entramado tridimensional del gel. Calligaris *et al.* (2013) también consiguieron un incremento en el contenido de grasa en quesos obtenidos a partir de leche

homogeneizada a 50 MPa, ya que según estos autores las presiones de homogeneización utilizadas mejoraron la capacidad emulsionante de la proteína permitiendo que la grasa quedase más atrapada en la cuajada. De forma similar, Calligaris *et al.* (2015) obtuvieron un contenido de grasa significativamente más alto en análogos de queso obtenidos con leche enriquecida con aceite emulsionado mediante homogeneización, respecto a aquéllos en los que el aceite se incorporó de manera directa.

El pH de los AQF fue de ~6,8-6,9 no presentándose diferencias significativas entre los productos estudiados. La incorporación de AEs tampoco tuvo efecto sobre el pH de los AQF. EL pH elevado de los AQF se debe a que la coagulación se produce por vía enzimática. Como en el queso, el pH depende fundamentalmente de la intensidad del drenaje de la cuajada en la cuba y de los ingredientes utilizados durante la elaboración. Si se hubieran utilizado fermentos lácticos una cuajada bien drenada puede alcanzar un pH alrededor de 5,15 a 5,35 (Almena-Aliste y Miettton, 2014). Además, las micelas de caseína tienen una gran capacidad tamponante debido a su alto contenido de fosfato de calcio (Kindstedt, 2014). Esta capacidad estaría incrementada en el AQF de este estudio por la adición de caseinato de sodio en la emulsión.

El rendimiento de los AQF osciló entre un 21 y 23%, aparentemente Tom1 y Cla1, así como el control tienen menor rendimiento, sin embargo, estas diferencias no son significativas (Tabla 6. 2). El rendimiento obtenido en nuestro estudio fue muy superior al obtenido por Cipolat-Gotet *et al.* (2013) en un queso fresco de coagulación enzimática con un fermento láctico, o por Lobato-Calleros *et al.* (2007) en un análogo de queso elaborado con aceite de canola o con leche entera, que en ambos casos fue de un 15%. También fue inferior en un producto obtenido en un estudio similar al nuestro, concretamente el de Stratulat *et al.* (2015) que elaboraron un análogo de queso mezclando leche desnatada enriquecida con concentrado proteico de leche y una emulsión a base de aceite de linaza (30%) y caseinato de calcio (3%), obteniendo un rendimiento del 13,5%, resultado que fue similar al obtenido en queso elaborado con leche entera. Sin embargo, fueron bastante similares a los obtenidos por Calligaris *et al.* (2013) que agregaron aceite de pescado y de linaza directamente a la leche desnatada, que posteriormente trataron a 20 MPa, obteniendo rendimientos similares entre los quesos de leche entera (23,8%) y los análogos de queso con aceite de pescado (24,6%) y con aceite de linaza (24,1%). También obtuvieron un elevado rendimiento en quesos ricos en omega-3 por la incorporación de aceite de hígado de bacalao de manera directa con un rendimiento de

~21%, y como parte de una emulsión con un rendimiento de ~26% (Calligaris *et al.*, 2015).

Diferentes factores pueden explicar el elevado rendimiento de los AQF del presente estudio. Por una parte, puede ser debido a que las moléculas primarias del agua tienden a unirse fuertemente a las proteínas por múltiples enlaces de hidrógeno y, en consecuencia, su cantidad se relaciona con el contenido de proteína. Además, el tipo de proteínas absorbidas en la membrana de los glóbulos grasos influye en la capacidad de retención de agua de la matriz del queso, así la absorción de fosfocaseinato nativo y de caseinato de sodio reduce la micro-sinéresis (Zamora *et al.*, 2011). También es importante tener en consideración el tipo de corte realizado a la cuajada y el desuerado aplicado por volteo.

La Tabla 6. 3 muestra el contenido en ácidos grasos en los diferentes tipos de AQF, apreciándose que los AQF adicionados de AEs presentaron un mayor contenido de ácidos grasos en comparación al AQF control, hecho que se puede relacionar con la menor cantidad de grasa de este AQF. Por otra parte, los AQF elaborados presentaron un perfil de ácidos grasos con claro predominio de ácidos grasos insaturados (~86%) frente a saturados (~14%). Entre los ácidos grasos mayoritarios, cabe destacar al ácido oleico, con un valor entre 4600 y 6000 mg/100 g. Este ácido graso monoinsaturado es uno de los principales en las dietas occidentales (Liu *et al.*, 2017; Wang y Hu, 2017), una mayor ingesta de ácido oleico junto con una ingesta limitada de grasas saturadas son beneficiosas y pueden ayudar a proteger frente las ECV (Hernandez, 2016).

El otro grupo de ácidos grasos de relevancia en los AQF, son los poliinsaturados, que provienen principalmente del ácido α -linolénico (omega-3) del aceite de chía. En la emulsión se utilizó un 5% de aceite de chía, que en la mezcla emulsión/leche desnatada representa 0,5%. Esta cantidad de aceite de chía equivaldría a ~2,2-2,4 g de aceite de chía/100 g de queso, y entre ~1,3-1,4 g de omega-3/100 g de queso (considerando 60% de omega-3 en el aceite de chía; ver Tabla 3. 2). Tras el análisis, la cantidad de omega-3 presente en los AQF osciló entre 1000 y 1400 mg/100 g, lo que supone una elevada retención del ácido graso omega-3.

Tabla 6. 3. Composición en ácidos grasos (mg/100 g de AQF) de los análogos de queso fresco elaborados con emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y aceites esenciales de tomillo y clavo.

Ácido graso	Análogo de queso fresco ¹				
	Control	Tom1	Tom2	Cla1	Cla2
C(4:0) Butírico	1,5	1,8	2	1,7	1,8
C(6:0) Caproico	1,1	0,9	1	0,9	0,9
C(8:0) Caprílico	1,1	0,9	1	1,7	1,8
C(10:0) Cáprico	1,2	0,9	2	1,7	1,8
C(12:0) Láurico	1,8	1,8	2	2,6	2,7
C(14:0) Mirístico	8,5	9,1	11	11,3	10,8
C(14:1) Miristoleico	1,2	0,9	1	0,9	0,9
C(15:0) Pentadecanoico	1,8	1,8	2	1,7	1,8
C(16:0) Palmítico	722,1	835,4	926,4	814,9	835,2
C(16:1) Palmitoleico	51	60,1	67,7	59,8	60,3
C(17:0) Margárico	6,2	9,1	11	7,8	9
C(17:1) Margaroleico	10,2	10,9	12,9	12,1	11,7
C(18:0) Estéarico	261,7	309,4	343,3	297,9	306,9
C(18:1) <i>Trans</i> -Oleico	6,2	4,6	4	6,1	6,3
C(18:1) <i>Cis</i> -Oleico	4603	5414,5	6019,8	5213,3	5355
C(18:2) <i>Trans</i> -Linoleico	8,5	10,9	11,9	10,4	10,8
C(18:2) <i>Cis</i> -Linoleico	735,6	937,3	995	866	918
C(18:3) <i>Trans</i> -Linolénico	2,3	1,8	3	2,6	2,7
C(20:0) Aráquico	30,1	37,3	41,8	36,4	36,9
C(18:3) Alfa-Linolénico	1021,2	1401,4	1432,8	1264,4	1377
C(20:1) Gadoleico	19,8	23,7	26,9	22,5	24,3
C(20:2) Eicosadienoico	1,3	0,9	1	0,9	0,9
C(20:4) Araquidónico	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
C(20:5) Eicosapentaenoico (EPA)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
C(21:0) Heneicosanoico	1,1	0,9	2	1,7	0,9
C(22:0) Behénico	9,7	10,9	11,9	11,3	11,7
C(22:1) Erúcico	4	3,6	6	< 1	0,9
C(22:5) Docosapentanoico (DPA)	1,5	1,8	2	2,6	1,8
C(22:6) Docosahexanoico (DHA)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
C(24:0) Lignocérico	3,1	0,9	2	0,9	0,9
C(24:1) Nervónico	4,8	6,4	7	6,1	6,3
Ácidos grasos totales	7521,0	9100,0	9950,1	8660,0	9000,0
Resumen de los grupos de ácidos grasos					
Σ saturados	1052,3	1226,7	1364,2	1197,7	1228,5
Σ monoinsaturados	4692,3	5516,4	6134,2	5317,2	5460,3
Σ poliinsaturados	1775,4	2356,9	2451,7	2145,1	2311,2
Σ ω-3 (linolénico + EPA + DPA + DHA)	1024,3	1402,3	1434,8	1265,2	1377,9
Σ ω-6 (linoleico + araquidónico)	735,6	937,3	995	866	918
% monoinsaturados sobre el total	62,6	60,6	61,6	61,4	60,7
% poliinsaturados sobre el total	23,4	25,9	24,6	24,8	25,7
% insaturados sobre el total	85,9	86,5	86,3	86,2	86,4

¹ Tom1: con aceite esencial de tomillo emulsionado; Tom2: con aceite esencial de tomillo sin emulsionar; Cla1: con aceite esencial de clavo emulsionado; Cla2: con aceite esencial de clavo sin emulsionar.

Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas (2011) fortificaron un queso fresco añadiendo, bajo la forma de microencapsulado de aceite de pescado y de aceite de linaza 1 g de omega-3/100 g de queso, obteniendo cantidades de omega-3 en el queso control de 116 mg/100 g, en queso con aceite de linaza de sólo 162 mg/100 g y en queso con aceite de pescado de 849 mg/100 g; con una retención de omega-3 de 16 y 85% para aceite de linaza y aceite de pescado respectivamente. En otra investigación, Calligaris *et al.* (2015) elaboraron quesos frescos fortificados con omega-3 agregados bajo la forma de aceite de hígado de bacalao, emulsionado con monoglicéridos saturados como agente estructurante y cotensioactivos a diferentes concentraciones, a una concentración final de aceite en la leche de 1%, obtuvieron una retención de hasta un 75% del aceite rico en omega-3. En nuestro estudio, por los resultados obtenidos pareciera que la retención de omega-3 es mayor al 85%.

Son diferentes las causas por las que se recomienda un balance en la proporción omega-3 a omega-6. Una de ellas es la competencia enzimática, concretamente de las elongasas y desaturasas en la metabolización de los ácidos grasos omega-3 y omega-6. Otro motivo, es que pueden producir tipos de eicosanoides antagonistas, de forma que una producción o deficiencia excesiva y desequilibrada puede provocar la aparición de diversas patologías como trombosis, artritis o supresión inmunitaria. Diversas organizaciones han emitido recomendaciones de ingesta sobre la proporción de ácidos grasos omega-6:omega-3 que van desde 2:1 hasta 10:1 (Hernandez y de Jong, 2011). La proporción más baja entre estos ácidos grasos parece reducir el riesgo de muchas enfermedades crónicas de alta prevalencia en las sociedades occidentales, así como en los países en desarrollo (Stratulat *et al.*, 2015). En el presente estudio, el producto presentó un mayor contenido de ácidos grasos omega-3 que omega-6, siendo la proporción de omega-6:omega-3 de 0,7:1; de forma que para cumplir con las recomendaciones, los ácidos grasos omega-6 pueden ser complementados con otros alimentos de la dieta habitual.

Según los Reglamentos (CE) N° 116/2010 y N° 432/2012, y en base a la composición de ácidos grasos de los AQF (Tabla 6. 3), se podrían realizar en la etiqueta las siguientes declaraciones nutricionales y de salud:

- *Bajo contenido de grasas saturadas*, pues la suma de ácidos grasos saturados y de ácidos grasos *trans* en el producto no es superior a 1,5 g/100 g (Reglamento (CE) N°

116/2010). En nuestro estudio la media obtenida de ácidos grasos saturados en los AQF fue de ~1,21 g/100 g.

- *Alto contenido de grasas insaturadas*, ya que al menos un 70% de los ácidos grasos presentes en el producto proceden de grasas insaturadas y las grasas insaturadas aportan más del 20% del valor energético del producto (Reglamento (CE) N° 116/2010). En nuestro estudio, en promedio el 86,3% de los ácidos grasos son insaturados y el 45,2% de las calorías procederían de las grasas insaturadas del AQF.
- *Alto contenido de grasas monoinsaturadas*, porque al menos un 45% de los ácidos grasos proceden de grasas monoinsaturadas y las grasas monoinsaturadas aportan más del 20% del valor energético del producto (Reglamento (CE) N° 116/2010). En nuestro estudio, en promedio el 61,6% de los ácidos grasos son monoinsaturados y 32,1% de las calorías provienen de las grasas monoinsaturadas del AQF.
- *Alto contenido de ácidos grasos omega-3*, ya que el producto contiene al menos 0,6 g de ácido α -linolénico por 100 g (Reglamento (CE) N° 116/2010). En nuestro estudio la media obtenida de ácidos grasos omega-3 en los AQF fue de 1,25 g/100 g.
- *El ácido alfa-linolénico contribuye a mantener niveles normales de colesterol en la sangre*, porque el AQF de nuestro estudio tiene alto contenido de ácido alfa-linolénico (Reglamento (UE) N° 432/2012).
- *Un menor consumo de grasas saturadas contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo*, para alimentos con un contenido bajo o reducido de ácidos grasos saturados (Reglamento (UE) N° 432/2012).
- *La sustitución de grasas saturadas por grasas insaturadas en la dieta contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo (los ácidos grasos monoinsaturados o poliinsaturados son grasas insaturadas)*, para ácidos grasos monoinsaturados o poliinsaturados (Reglamento (UE) N° 432/2012).
- *La sustitución de grasas saturadas por grasas insaturadas en la dieta contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo. El ácido oleico es una grasa insaturada*, para el ácido oleico (Reglamento (UE) N° 432/2012).

6.2.3. Evaluación de la textura y color de los análogos de queso fresco

6.2.3.1. Textura

La medición reológica en este estudio se realizó mediante un ensayo de compresión uniaxial, donde se aplica sobre el AQF una fuerza normal hasta originar su ruptura estructural. Los parámetros obtenidos fueron: el esfuerzo por fractura (σ_f) que describe la fuerza requerida para fracturar la matriz, la deformación por fractura (ϵ_f) que describe la deformación requerida para inducir la fractura del producto, y el módulo de elasticidad que describe la elasticidad del producto por debajo del punto de fractura (Evert-Arriagada *et al.*, 2014; O'Callaghan y Guinee, 2004). Un valor numérico bajo de σ_f indica una mayor fracturabilidad, y valores elevados de ϵ_f indican una gran deformabilidad.

Tabla 6. 4. Esfuerzo por fractura (kPa), deformación por fractura (–) y módulo de elasticidad (kPa) de los análogos de queso fresco elaborados con emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y aceites esenciales de tomillo y clavo durante el almacenamiento a 4 °C.

Parámetro	AQF ¹	Días de almacenamiento a 4 °C			
		1	3	7	11
Esfuerzo por fractura (σ_f)	Control	7,70 ± 0,92 ^a	7,93 ± 0,33 ^{a,xy}	10,06 ± 0,07 ^{b,y}	10,21 ± 0,03 ^{b,yz}
	Tom1	8,37 ± 0,66	8,70 ± 1,02 ^{yz}	9,62 ± 0,45 ^y	9,67 ± 0,41 ^{xy}
	Tom2	6,63 ± 0,63 ^a	7,05 ± 0,31 ^{ab,x}	8,02 ± 0,44 ^{bc,x}	8,99 ± 0,47 ^{c,x}
	Cla1	8,41 ± 1,16 ^a	9,53 ± 0,18 ^{ab,z}	10,28 ± 0,25 ^{b,y}	10,63 ± 0,10 ^{b,z}
	Cla2	8,24 ± 0,88 ^a	8,21 ± 0,37 ^{a,xyz}	8,99 ± 0,93 ^{ab,xy}	10,35 ± 0,22 ^{b,yz}
Deformación por fractura (ϵ_f)	Control	0,56 ± 0,05	0,52 ± 0,04	0,54 ± 0,05	0,52 ± 0,01
	Tom1	0,59 ± 0,03	0,50 ± 0,04	0,51 ± 0,06	0,51 ± 0,01
	Tom2	0,60 ± 0,06	0,52 ± 0,05	0,54 ± 0,04	0,53 ± 0,03
	Cla1	0,59 ± 0,05 ^b	0,50 ± 0,03 ^{ab}	0,49 ± 0,02 ^a	0,52 ± 0,05 ^{ab}
	Cla2	0,60 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,52 ± 0,07	0,52 ± 0,01
Módulo de elasticidad (kPa)	Control	13,77 ± 0,66 ^{a,xy}	15,73 ± 1,60 ^{ab,xy}	18,07 ± 0,02 ^{b,y}	20,54 ± 0,20 ^{c,yz}
	Tom1	15,39 ± 0,88 ^{a,y}	17,20 ± 1,78 ^{ab,yz}	18,96 ± 0,66 ^{b,y}	19,39 ± 0,13 ^{b,y}
	Tom2	11,04 ± 1,46 ^{a,x}	12,70 ± 0,79 ^{ab,x}	14,61 ± 0,37 ^{b,x}	17,51 ± 0,43 ^{c,x}
	Cla1	14,55 ± 0,82 ^{a,y}	19,39 ± 0,70 ^{b,z}	21,35 ± 0,38 ^{c,z}	20,93 ± 0,16 ^{bc,z}
	Cla2	13,90 ± 1,42 ^{a,xy}	16,62 ± 0,61 ^{b,yz}	18,10 ± 0,47 ^{bc,y}	20,53 ± 0,91 ^{c,yz}

¹ Control: control; Tom1: con aceite esencial de tomillo emulsionado; Tom2: con aceite esencial de tomillo sin emulsionar; Cla1: con aceite esencial de clavo emulsionado; Cla2: con aceite esencial de clavo sin emulsionar.

^{a-c} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas (P<0,05).

^{x-z} Valores en la misma columna con diferente superíndice indican diferencias significativas (P<0,05).

La Tabla 6.4 muestra que todos los AQF tras su elaboración presentaron valores de esfuerzo por fractura y de deformación por fractura similares. Durante el almacenamiento los valores de esfuerzo por fractura (σ_f) aumentaron (menos fracturables) en todos los AQF, siendo significativo para la mayoría de ellos a partir del día 7 de almacenamiento, excepto en Tom1 cuyo valor de σ_f no presentó cambios significativos. En general, entre los diferentes AQF, no se apreciaron diferencias estadísticas durante el almacenamiento, aunque el Tom2, desde el principio mostró valores inferiores, que posiblemente se relaciona con el menor contenido en sólidos solubles, y más concretamente con el menor contenido en proteína. El incremento de dureza que se produce en la mayoría de los quesos frescos, y que se ha observado también en los AQF se debe a la sinéresis que se produce durante su almacenamiento (Gurdian *et al.*, 2017b). Por el contrario, en los valores de ϵ_f , aunque se apreció una tendencia a disminuir durante el almacenamiento en todos los AQF, es decir a tener menor deformabilidad, no se observaron diferencias significativas. El módulo de elasticidad de los AQF, está relacionado con la tendencia creciente en el esfuerzo de fractura y la relativa disminución de la deformación, observándose un incremento durante su almacenamiento en refrigeración, en todos los AQF; siendo los valores significativamente menores en el Tom2, especialmente si se compara con los AQF control y con clavo. En general, los resultados son similares a los obtenidos por Calligaris *et al.* (2013), quienes determinaron que la fortificación de queso con aceite de pescado y de linaza no afectó la textura del queso, y que las diferencias en términos de contenido de grasa entre los quesos fortificados y sin fortificar no fueron suficientes para inducir modificaciones de textura.

Diferentes factores pueden afectar a la textura del queso fresco y por similitud a los AQF. Entre los que cabe mencionar el contenido en grasa, proteína y agua, y su disposición en la matriz. Los glóbulos grasos nativos o las reservas de grasa libre se deforman fácilmente, lo que lleva a quesos más blandos y más fracturables. Cuando la grasa se homogeniza, se producen dos fenómenos principales que contribuyen a un queso más firme. Por un lado que el tamaño de los glóbulos grasos se reduce drásticamente, lo que resulta en una disminución de su deformabilidad, y por otro lado la membrana del glóbulo graso sufre modificaciones en su composición proteica, ya que las caseínas adsorbidas sobre la superficie del glóbulo graso después de la homogeneización pueden formar enlaces proteína-proteína con la matriz de caseína, lo que aumenta la rigidez del queso (Zamora *et al.*, 2011). Además, si se reduce el contenido de grasa se produce un alto grado

de entrecruzamiento de las moléculas de proteínas en forma de redes tridimensionales que incrementan la resistencia a la deformación (Lobato-Calleros *et al.*, 2007).

6.2.3.2. Color

Las medidas de color L*, a* y b* se determinaron según el espacio de color CIELAB, donde L* se relaciona con la cromaticidad clara/oscura (cambio de 0% oscuro a 100% claro), a* con la cromaticidad de verde/rojo (de -60 verde a 60 rojo) y b* con la cromaticidad azul/amarillo (de -60 azul a 60 amarillo) (Pinho *et al.*, 2004).

Tabla 6. 5. Variación de los parámetros L*, a* y b de los análogos de queso fresco elaborados con emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y aceites esenciales de tomillo y clavo durante el almacenamiento a 4 °C.

Color	AQF ¹	Días de almacenamiento a 4 °C			
		1	3	7	11
L*	Control	95,96 ± 0,30	95,98 ± 0,18	95,77 ± 0,41	95,50 ± 0,30
	Tom1	96,27 ± 0,20	95,90 ± 0,03	95,68 ± 0,52	95,60 ± 0,77
	Tom2	96,17 ± 0,34	95,74 ± 0,04	95,57 ± 0,23	95,49 ± 0,45
	Cla1	96,01 ± 0,00	96,06 ± 0,29	95,53 ± 0,31	95,47 ± 0,31
	Cla2	95,79 ± 0,02	95,86 ± 0,01	95,62 ± 0,20	95,43 ± 0,36
a*	Control	-0,44 ± 0,01 ^b	-0,40 ± 0,13 ^b	-0,38 ± 0,04 ^b	-0,34 ± 0,04 ^b
	Tom1	-0,86 ± 0,08 ^a	-0,74 ± 0,26 ^{ab}	-0,82 ± 0,05 ^a	-0,77 ± 0,03 ^a
	Tom2	-0,86 ± 0,09 ^a	-0,82 ± 0,17 ^{xa}	-0,81 ± 0,06 ^a	-0,75 ± 0,08 ^a
	Cla1	-0,84 ± 0,02 ^a	-0,77 ± 0,02 ^{ab}	-0,74 ± 0,05 ^a	-0,70 ± 0,11 ^a
	Cla2	-0,85 ± 0,03 ^a	-0,68 ± 0,06 ^{ab}	-0,74 ± 0,05 ^a	-0,73 ± 0,17 ^a
b*	Control	8,81 ± 0,25 ^b	9,09 ± 0,36 ^c	9,29 ± 0,51 ^b	9,46 ± 0,58 ^b
	Tom1	7,56 ± 0,16 ^a	7,70 ± 0,40 ^{ab}	7,75 ± 0,16 ^a	7,88 ± 0,21 ^a
	Tom2	7,58 ± 0,12 ^a	7,48 ± 0,10 ^a	7,58 ± 0,04 ^a	7,68 ± 0,16 ^a
	Cla1	7,88 ± 0,035 ^a	8,35 ± 0,36 ^{bc}	8,20 ± 0,06 ^a	8,34 ± 0,06 ^a
	Cla2	8,00 ± 0,25 ^a	8,39 ± 0,27 ^{bc}	8,19 ± 0,14 ^a	8,35 ± 0,10 ^a
ΔE	Tom1	1,18 ± 0,26	1,29 ± 0,27	1,35 ± 0,78	1,32 ± 0,11
	Tom2	1,17 ± 0,25	1,59 ± 0,23	1,60 ± 0,01	1,60 ± 0,31
	Cla1	1,24 ± 0,05	1,17 ± 0,40	1,54 ± 0,32	1,63 ± 0,04
	Cla2	1,21 ± 0,19	1,07 ± 0,42	1,61 ± 0,05	1,63 ± 0,02

¹Tom1: con aceite esencial de tomillo emulsionado; Tom2: con aceite esencial de tomillo sin emulsionar; Cla1: con aceite esencial de clavo emulsionado; Cla2: con aceite esencial de clavo sin emulsionar.

^{a-c} Valores en la misma columna con diferente superíndice indican diferencias significativas (P<0,05).

Si bien en la luminosidad (L^*) no se apreciaron diferencias significativas, ni tras su elaboración, ni durante el almacenamiento, ni en función de la adición de los aceites esenciales, en los valores a^* y b^* , se observaron pequeños cambios en su tendencia relacionadas con la adición de AEs y su almacenamiento a 4 °C. El valor a^* de los AQF fueron negativos, lo que indica una tendencia hacia tonalidades verdosas, especialmente en los AQF con AE. Tras su elaboración y durante el almacenamiento se produjo una pequeña disminución de la tonalidad verdosa en todos los AQF, aunque no fue significativa. Los valores de b^* de los AQF mostraron una tendencia hacia tonalidades amarillentas, especialmente en los quesos control y que se mantuvo durante el almacenamiento, sin embargo, este aumento no fue significativo (Tabla 6. 5). Si bien, se apreciaron diferencias tanto en el valor a^* como b^* entre el AQF control y los AQF con AEs, el valor ΔE fue inferior a 2, por lo tanto, las diferencias no serían del todo perceptibles para el ojo humano (Francis y Clydesdale, 1975). Por otro lado, se confirmó que no había diferencias estadísticas entre los AQF con AEs.

Los valores de luminosidad son ligeramente superiores a los obtenidos en queso fresco tratado a 500 MPa de presión por Evert-Arriagada *et al.* (2014) y similar a los obtenidos por Zamora *et al.* (2011) en queso fresco. Gaygadzhiev *et al.* (2009) observaron que los glóbulos de grasa estabilizados con NaCas, presentaron una intensidad dispersada total de luz mayor que el de las micelas de caseína, debido a su mayor índice de refracción.

El color depende de cómo un material refleja, absorbe o transmite la luz. En el queso la luz penetra en las capas superficiales y es dispersada por los glóbulos de grasa láctea y las bolsas de suero acumuladas en las oquedades u ojos mecánicos. Por otra parte, la homogeneización desencadena una disminución significativa de los componentes rojo y amarillo en la leche, disminución que también se ve reflejada en el queso (Zamora *et al.*, 2011). Por lo tanto, coincidirían nuestros resultados en relación con la tendencia al verde que se intensificaría por la adición de los aceites vegetales y los aceites esenciales. De hecho, Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas (2012) observaron un incremento en las tonalidades verdosas del queso como consecuencia de la adición de aceite de linaza, aunque su detección, como en nuestro caso, sólo se determinó en las mediciones analíticas instrumentales. Por contra, según Hughes *et al.* (2012) la fortificación de queso de cabra con aceite de pescado no produjo modificaciones en el color.

6.2.4. Estabilidad oxidativa

No solo la naturaleza y composición de los lípidos como sustrato de la reacción tienen un impacto en el proceso de oxidación de los lípidos, sino también el tipo y la concentración de proteínas, la presencia de antioxidantes y prooxidantes en la matriz alimentaria, así como sus características fisicoquímicas. El proceso de oxidación en los alimentos es complejo, por lo que es conveniente combinar diferentes métodos para analizar el estado oxidativo de una matriz alimentaria (Barriuso *et al.*, 2012).

Tabla 6. 6. Hidroperóxidos (mmol/kg aceite), TBARS (μg MDA/g AQF) y malondialdehído ($\mu\text{g/g}$ AQF) en análogos de queso fresco elaborados con emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva, y aceites esenciales de tomillo y clavo durante el almacenamiento a 4 °C.

Parámetro	AQF	Días de Almacenamiento a 4 °C			
		1	3	7	11
Hidroperóxidos (mmol/kg aceite)	Control	4,06 \pm 1,41 ^{a,z}	5,83 \pm 0,88 ^{a,z}	5,05 \pm 0,35 ^{a,z}	8,72 \pm 0,13 ^{b,z}
	Tom1	0,17 \pm 0,04 ^{a,y}	0,77 \pm 0,06 ^{b,y}	0,34 \pm 0,01 ^{a,x}	0,35 \pm 0,17 ^{a,y}
	Tom2	0,30 \pm 0,02 ^{a,y}	1,09 \pm 0,42 ^{b,xy}	0,48 \pm 0,27 ^{ab,x}	0,40 \pm 0,09 ^{ab,y}
	Cla1	1,14 \pm 0,04 ^{a,x}	2,04 \pm 0,00 ^{a,x}	1,45 \pm 0,90 ^{a,x}	1,73 \pm 0,73 ^{a,x}
	Cla2	1,12 \pm 0,26 ^{a,x}	2,03 \pm 0,57 ^{a,x}	1,51 \pm 0,70 ^{a,x}	1,81 \pm 0,53 ^{a,x}
TBARS (μg MDA/g)	Control	0,542 \pm 0,06 ^{b,zy}	0,383 \pm 0,05 ^{a,z}	0,381 \pm 0,03 ^{a,z}	0,392 \pm 0,03 ^{a,y}
	Tom1	0,085 \pm 0,02 ^{b,x}	0,025 \pm 0,01 ^{a,y}	0,065 \pm 0,01 ^{b,y}	0,080 \pm 0,01 ^{b,x}
	Tom2	0,110 \pm 0,01 ^{b,x}	0,030 \pm 0,00 ^{a,xy}	0,060 \pm 0,01 ^{ab,y}	0,095 \pm 0,04 ^{b,x}
	Cla1	0,085 \pm 0,01 ^{c,x}	0,040 \pm 0,00 ^{a,xy}	0,070 \pm 0,00 ^{b,y}	0,080 \pm 0,00 ^{c,x}
	Cla2	0,075 \pm 0,01 ^{b,x}	0,050 \pm 0,01 ^{a,x}	0,080 \pm 0,00 ^{b,x}	0,075 \pm 0,01 ^{b,x}
MDA ($\mu\text{g/g}$)	Control	0,264 \pm 0,087 ^{b,z}	ND	0,203 \pm 0,054 ^{ab,z}	0,105 \pm 0,018 ^{a,z}
	Tom1	0,012 \pm 0,004 ^{a,y}	ND	0,012 \pm 0,003 ^{a,y}	0,013 \pm 0,004 ^{a,y}
	Tom2	0,013 \pm 0,003 ^{a,y}	ND	0,009 \pm 0,003 ^{a,y}	0,014 \pm 0,004 ^{a,y}
	Cla1	0,022 \pm 0,002 ^{ab,x}	ND	0,019 \pm 0,002 ^{a,x}	0,023 \pm 0,002 ^{b,x}
	Cla2	0,024 \pm 0,001 ^{a,x}	ND	0,025 \pm 0,009 ^{a,x}	0,023 \pm 0,005 ^{a,x}

¹Tom1: con aceite esencial de tomillo emulsionado; Tom2: con aceite esencial de tomillo sin emulsionar; Cla1: con aceite esencial de clavo emulsionado; Cla2: con aceite esencial de clavo sin emulsionar.

^{a-c} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas (P<0,05).

^{x-z} Valores en la misma columna con diferente superíndice indican diferencias significativas (P<0,05).

ND: No determinado

En nuestro estudio, la oxidación primaria y secundaria en los AQF con AEs obtuvieron valores significativamente menores que en el control (Tabla 6. 6). Nuestros resultados fueron similares a los obtenidos por Da Silva Dannenberg *et al.* (2016) que estudiaron la

actividad antioxidante del AE del árbol de pimienta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) al 0,7, 1,4 y 2% adicionado en queso fresco tipo Minas, obteniendo en los quesos con AEs valores inferiores a los del control, tanto en hidroperóxidos como en TBARS.

Entre los AQF con AEs, los que contenían tomillo, presentaron un menor contenido en los tres parámetros evaluados que los de clavo, no apreciándose diferencias entre los 2 métodos de adición de los AEs. En el caso de los hidroperóxidos, durante el almacenamiento de los AQF, en las muestras control los valores se mantuvieron estables hasta el día 7, en los adicionados con clavo de AE se mantuvieron estables, y en el tomillo, si bien aumentó del día 1 al 3, posteriormente disminuyeron y se mantuvieron estables hasta el final de su conservación. Estos resultados, permiten concluir que la incorporación de AEs durante la elaboración tiene un efecto protector de la oxidación de los AQF.

El malondialdehído (MDA) es un dialdehído de tres carbonos que se produce a partir de la descomposición de los hidroperóxidos derivados de la oxidación de ambos AGPI omega-3 y omega-6, además de tener un potencial de toxicidad para los humanos. Por lo tanto, la cuantificación del MDA en los alimentos se utiliza como un indicador de seguridad y calidad (Papastergiadis *et al.*, 2014), estableciéndose un nivel máximo de TBARS de 5 mg de MDA/kg para alimentos de buena calidad (Gurdian *et al.*, 2017b). La Tabla 6. 6 muestra los niveles de TBARS en los AQF, observándose que los valores registrados fueron muy inferiores al nivel máximo establecido, tanto al inicio como al final de la conservación de los AQF. El contenido de TBARS en los AQF con AEs disminuyó y después aumentó entre los días 3 y 7 de almacenamiento, a diferencia del AQF control en el que los valores de TBARS disminuyeron al día 3 para después mantenerse. Sin embargo, el principal problema del análisis de TBARS mediante espectrofotometría es su falta de especificidad. El TBA reacciona con diferentes compuestos y no sólo con aquellos formados como resultado de la oxidación lipídica, requiriéndose especialmente en alimentos complejos un análisis más específico del complejo TBA-MDA (Papastergiadis *et al.*, 2012). La cromatografía líquida (HPLC) ofrece una mayor especificidad y sensibilidad en la determinación de MDA en alimentos y sistemas biológicos que el método espectrofotométrico lo sobreestima, como se ve reflejado en los resultados obtenidos (Tabla 6. 6).

En la concentración de MDA, al igual que en la de TBARS espectrofotométrica, se observó que los AQF con AEs presentaron valores muy inferiores a los obtenidos para los AQF control. De forma similar a los hidroperóxidos, los AQF que contenían tomillo,

presentaron un menor contenido que los de clavo, no apreciándose, diferencias entre los 2 métodos de adición. Si bien en los AQF control el contenido en MDA disminuyó durante su conservación en refrigeración, en los AQF con AEs se mantuvieron constantes durante este período.

Papastergiadis *et al.* (2014) evaluaron los procesos oxidativos en queso, obteniendo valores de 0,2 μg MDA/g de queso, relacionando esta baja concentración con la concentración moderada-baja de ácidos grasos insaturados presentes habitualmente en los productos lácteos. El valor de MDA es comparable al obtenido en el AQF control, a pesar de que en nuestro estudio los AQF contienen un elevado contenido de ácidos grasos insaturados por la incorporación de aceite de oliva y chía. La relación entre el tipo de ácidos grasos y la oxidación fue determinada por Stratulat *et al.* (2015), que en análogo de queso elaborado a partir de una emulsión con 3% de caseinato de calcio y 30% de aceite de linaza, adicionada a leche desnatada pasteurizada y enriquecida con concentrado de proteína de leche y estandarizada con natas funcionales o nata de leche con una relación proteína-grasa de 0,8; obtuvieron valores de TBARS en el día 0 de aproximadamente 0,25 μg MDA/g de análogo de queso, mientras que en el queso control elaborado con leche entera sólo fue de 0,089 μg MDA/g de queso.

Otro factor a considerar en el proceso de oxidación se relaciona con la protección de los ácidos grasos insaturados adicionados a los AQF. Por una parte, Ye *et al.* (2009) demostraron que la fortificación de queso con aceite de pescado encapsulado produjo una menor oxidación de los AGPI omega-3, que en los que se adicionó aceite de pescado directamente. Por otra parte, Hughes *et al.* (2012) obtuvieron en queso de cabra al que se agregó entre un 1,6 y 2,7% de aceite de arenque, valores de TBARS de 0,9 μg MDA/g de queso, algo superior a los obtenidos en nuestro estudio, pero que los investigadores consideraron reducidos, y que se debió a que el aceite de pescado quedó atrapado y protegido en la cuajada a través de interacciones proteína-lípido.

6.2.5. Estabilidad microbiana

El recuento de microorganismos mesófilos es un método estándar que permite evaluar la calidad higiénica de los alimentos, proporcionando así una estimación de su vida útil (Fernandes *et al.*, 2017). En los diferentes AQF se evaluó su estabilidad microbiológica por muestreo secuencial durante su almacenamiento a temperaturas de refrigeración (4

°C), estableciéndose el final de la vida útil cuando los recuentos microbiológicos de aerobios mesófilos totales y psicrótrofos alcanzaron recuentos de 6 log UFC/g. También se realizó el recuento de otros microorganismos, entre ellos *Escherichia coli* que es un microorganismo indicador de contaminación fecal y algunos serotipos patógenos para humanos se asocian a productos lácteos (D'Amico, 2014). Además, se realizó el análisis de estafilococos, enterobacterias y levaduras, ya que constituyen una parte importante de la microbiota contaminante de la superficie del queso (Litopoulou-Tzanetaki, 2007), otro microorganismos estudiados fueron los del género *Pseudomonas*, pues se encuentran entre los microorganismos psicrótrofos predominantes en la leche y productos lácteos (Johnson, 2014). En nuestro estudio no se detectó ni *Staphylococcus aureus*, ni *E. coli* en ninguno de los AQF durante el almacenamiento a 4 °C.

En las Figuras 6.1 a 6.4 se muestran los recuentos y la evolución de los grupos microbianos mesófilos, psicrótrofos, *Pseudomonas*, levaduras y enterobacterias durante la conservación de los AQF control y con AEs. Además, en la Tabla 6. 7 se muestran los parámetros de la cinética de crecimiento de estos grupos microbianos, obtenidos utilizando la herramienta DMFIT.

Los AQF control y con AEs presentaron un nivel inicial de mesófilos de ~3 log UFC/g y de ~2 log UFC/g de psicrótrofos, no evidenciándose diferencias entre los AQF control y con AEs, ni en función de si la adición de AES fuera emulsionado o libre.

Durante su conservación, la evolución de mesófilos y psicrótrofos de los AQF con AEs fue similar a la obtenida en el AQF control (Figura 6. 1 y Tabla 6. 7), aunque las muestras de AQF Tom 1 (en emulsión) mostraron un recuento inferior a partir del día 7, presentando una velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) de aproximadamente 0,27 (log UFC/g) /día, mientras que en los AQF control y el resto de AQF con AEs, incluido el Tom2 (adición libre), fue igual o superior a 0,50 (log UFC/g) /día.

Las bacterias Gram negativas predominantes como *Pseudomonas* spp. pueden causar el deterioro de los productos lácteos (Arslan *et al.*, 2011). Las bajas temperaturas pueden inducir la producción de proteasas que pueden alterar la textura del queso y generar sabores desagradables, que incluyen amargor y rancidez. La degradación proteolítica de la caseína también puede dar como resultado quesos con una humedad superior a la normal. Las lipasas catalizan la hidrólisis de los triglicéridos en ácidos grasos libres y glicerol, que producen defectos de sabor. Al requerir oxígeno para el crecimiento, este

microorganismo a menudo predomina en la superficie del queso, produciendo numerosos compuestos volátiles (Arslan *et al.*, 2011; D'Amico, 2014). Por estos motivos, este grupo microbiano fue uno de los considerados para hacer el seguimiento de su evolución durante el almacenamiento de los AQF.

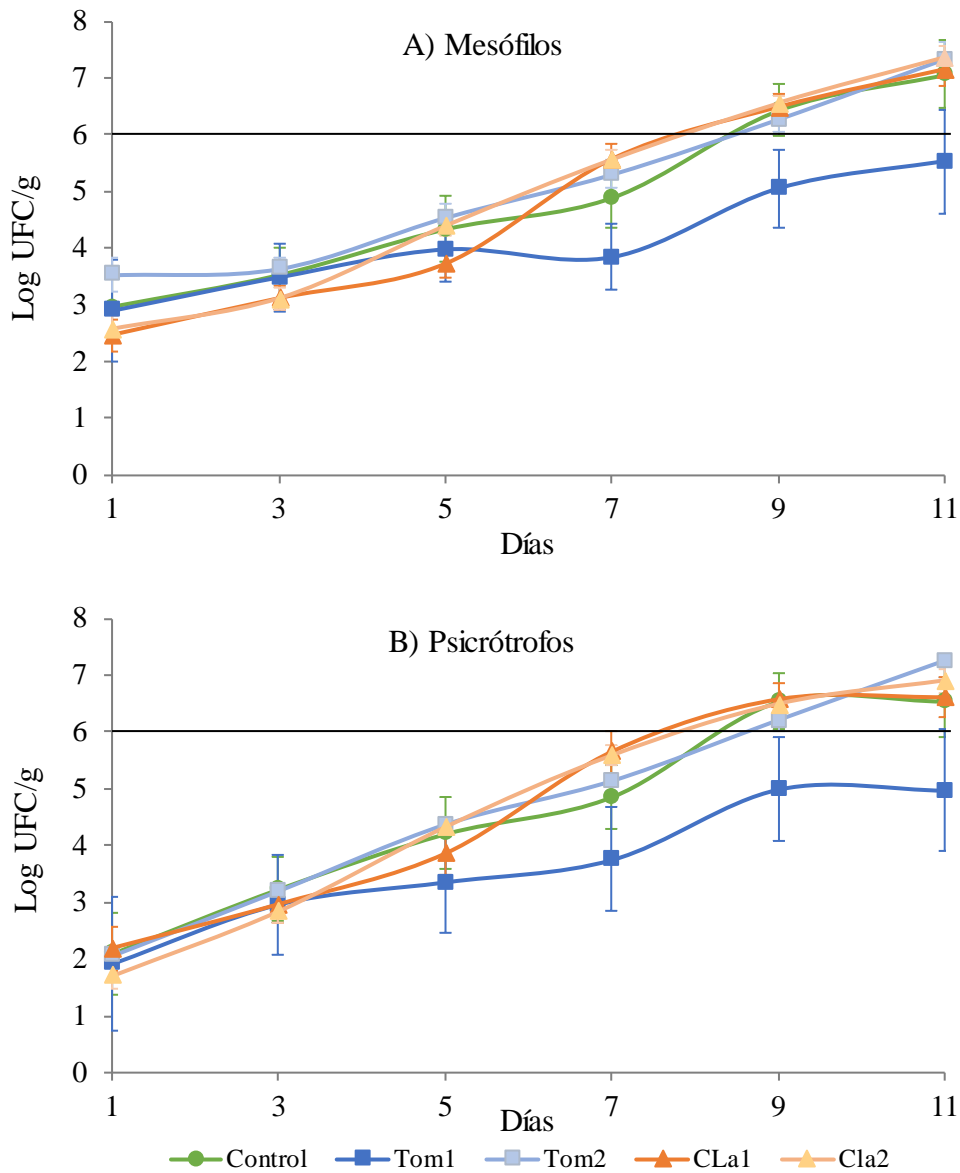


Figura 6. 1. Evolución de microorganismos aerobios mesófilos (A) y psicrótrofos (B) durante el almacenamiento a 4 °C en los análogos de queso fresco elaborados con emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva control y con aceite esencial de clavo y tomillo, adicionados en forma de emulsión (Tom1 y Cla1) o libre (Tom2 y Cla2).

Inicialmente el recuento de *Pseudomonas* fue muy bajo (inferior a 0,5 log UFC/g), sin embargo, a medida que transcurrió el tiempo su recuento incrementó durante el almacenamiento en refrigeración. No se presentaron diferencias en los recuentos de este microorganismo entre los AQF (añadidos de AEs y control) durante los primeros 5 días de almacenamiento, no obstante, al final de la vida útil de los AQF (8 días) en los que se añadió AE de tomillo, especialmente el de TOM1, presentaron recuentos de *Pseudomonas* significativamente menores que en los AQF control y en los que se añadió AE de clavo. En los AQF de Tom1 la inhibición se apreció en su mayor fase lag y velocidad de crecimiento que las muestras AQF control (

Figura 6. 2). En los otros AQF con AEs también se evidenció una cierta inhibición manifestada por una mayor fase lag, sin embargo, hacia el final de la conservación de los AQF proliferaron de forma rápida, presentando una velocidad de crecimiento elevada (Tabla 6. 7).

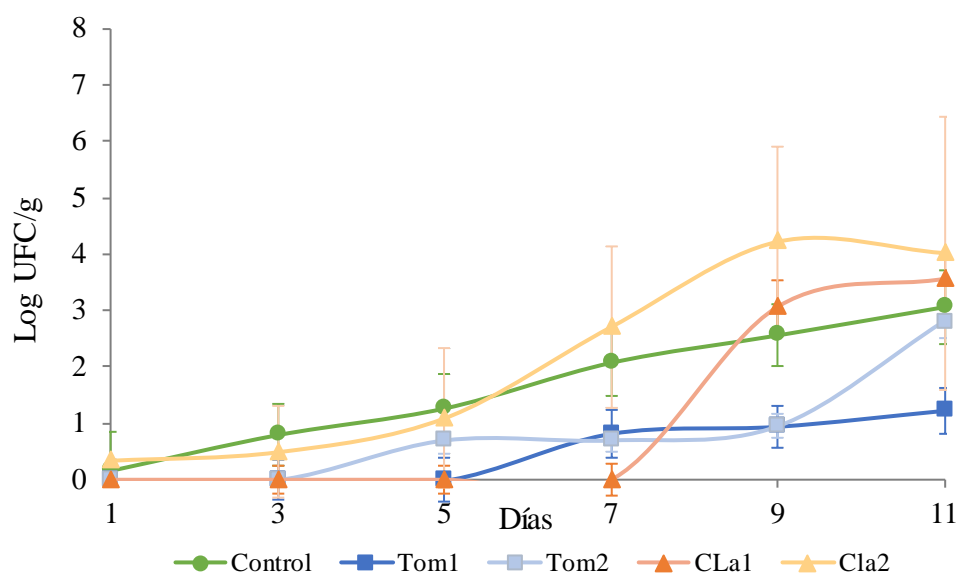


Figura 6. 2. Evolución de *Pseudomonas* spp. durante el almacenamiento a 4 °C en los análogos de queso fresco elaborados con emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva control y con aceite esencial de clavo y tomillo, adicionados en forma de emulsión (Tom1 y Cla1) o libre (Tom2 y Cla2).

En la

Figura 6. 3 se presenta la evolución de las levaduras en los AQF durante el almacenamiento a 4 °C. En este periodo no se detectó la presencia de mohos. En los primeros 5 días los recuentos fueron muy similares para los diferentes AQF. En el día 7 de almacenamiento, en los AQF con AE de clavo, el recuento de levaduras incrementó, alcanzando recuentos por encima de 4 log UFC/g, especialmente en el AQF con Cla2. Sin embargo, posteriormente no se apreciaron diferencias significativas entre los AQF, aunque los AQF Cla2 fueron los que alcanzaron un mayor recuento (Tabla 6. 7).

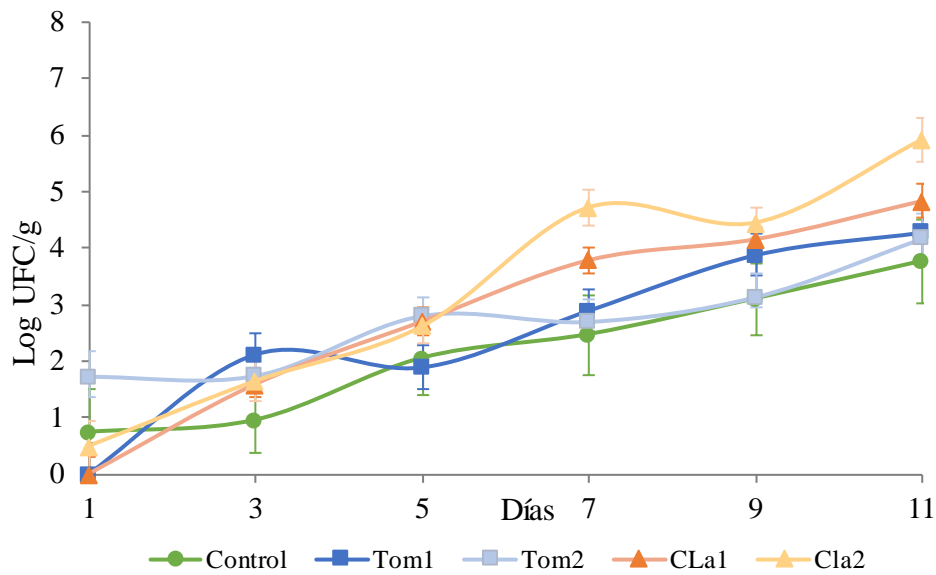


Figura 6. 3. Evolución de levaduras durante el almacenamiento a 4 °C en los análogos de queso fresco elaborados con emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva control y con aceite esencial de clavo y tomillo, adicionados en forma de emulsión (Tom1 y Cla1) o libre (Tom2 y Cla2).

La Figura 6. 4. muestra los recuentos de enterobacterias en los AQF durante su conservación a 4 °C, observándose que hubo presencia de este grupo bacteriano en los AQF desde el día 1 de producción. Los recuentos fueron oscilantes al inicio del almacenamiento en refrigeración. Sin embargo, a partir del día 5 se observó una ligera tendencia a disminuir en los AQF con AE de tomillo y clavo, determinándose velocidades de crecimiento muy bajas e incluso negativas (Tabla 6. 7). En el AQF control, el recuento de enterobacterias aumentó, lo que demuestra un cierto efecto inhibitor de los AEs utilizados, como ya se evidenció en los estudios *in vitro*.

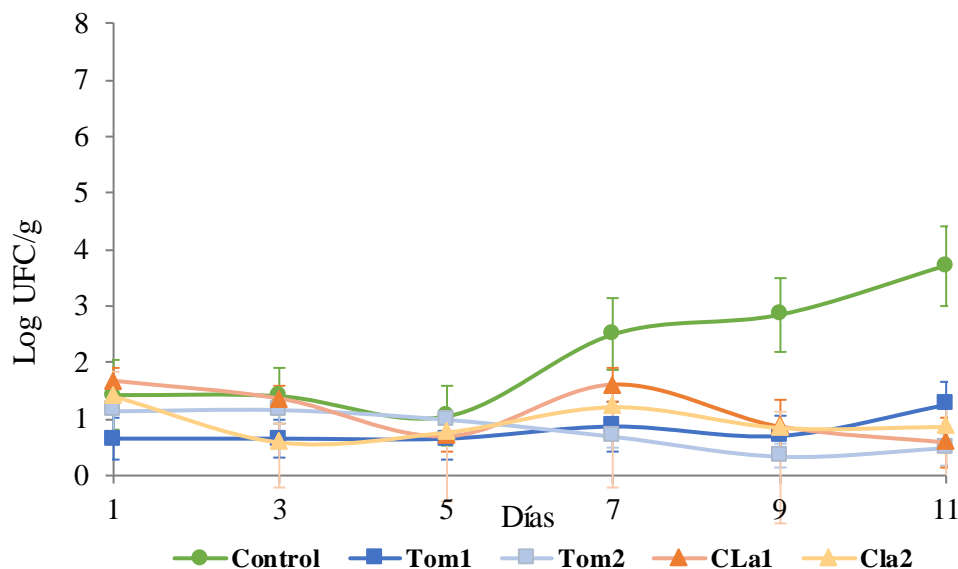


Figura 6. 4. Evolución de enterobacteria durante el almacenamiento a 4 °C en los análogos de queso fresco elaborados con emulsiones O/W a base de caseinato de sodio, aceite de chía y oliva control y con aceite esencial de clavo y tomillo, adicionados en forma de emulsión (Tom1 y Cla1) o libre (Tom2 y Cla2).

Los resultados microbiológicos de los AQF elaborados, fueron bastante similares a los obtenidos por Evert-Arriagada *et al.* (2012) en queso fresco elaborado con leche pasteurizada, adicionada con 1% de sal, envasados al vacío y almacenados a 4 °C. Los recuentos iniciales fueron de 3,6 y 0,99 log UFC/g para mesófilos y psicrótrofos respectivamente, llegando en el día 7 a 6,3 log UFC/g en mesófilos, 6,7 log UFC/g en psicrótrofos, 1,5 log UFC/g en enterobacterias, y en el grupo de mohos y levaduras a 5 log UFC/g. Sin embargo, fueron superiores a los obtenidos por Zamora *et al.* (2012), también en queso fresco, que en el día 1 de almacenamiento a 4 °C los recuentos fueron de 2,56; 2,38 y 0,43 log UFC/g de mesófilos, psicrótrofos y mohos y levaduras, respectivamente, que aumentaron durante su almacenamiento hasta alcanzar en el día 13 recuentos de 6,76; 6,58 y 2,22 log UFC/g, respectivamente, en los grupos microbianos anteriormente mencionados. Por otro lado, Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas (2011) elaboraron un queso enriquecido con aceite de linaza y otro con aceite encapsulado de pescado, obteniendo recuentos iniciales de mesófilos totales más bajos en la muestra control (1,4 log UFC/g) en comparación a los quesos enriquecidos (~4 log UFC/g). Sin embargo, durante el almacenamiento a 4 °C, el crecimiento bacteriano aumentó en todas las muestras, llegando a 6 log UFC/g en el día 6, presentado el crecimiento de

microorganismos psicrótrofos y enterobacterias un comportamiento similar, pero con recuentos superiores a los obtenidos en nuestro estudio.

Tabla 6. 7. Recuento inicial y final, fase de latencia (λ) y velocidad máxima (μ_{\max}), de microorganismos mesófilos, psicrótrofos, *Pseudomonas*, levaduras y enterobacterias en AQF control y con AEs de tomillo y clavo durante el almacenamiento a 4 °C.

Parámetro	AQF ¹	Parámetros cinéticos crecimiento			
		Valor Inicial (log UFC/g)	Valor Final (log UFC/g)	λ (días)	μ_{\max} (log UFC/g/d)
Mesófilos	Control	2,96 ± 0,19	7,77 ± 2,12	2,45 ± 0,88	0,50 ± 0,08
	Tom1	2,89 ± 0,25	5,53 ± 0,92	1,58 ± 1,77	0,27 ± 0,05
	Tom2	3,51 ± 0,06	7,33 ± 0,31	3,20 ± 0,28	0,49 ± 0,02
	Cla1	2,42 ± 0,24	7,15 ± 0,30	2,06 ± 0,86	0,56 ± 0,06
	Cla2	2,51 ± 0,08	7,53 ± 0,20	2,12 ± 0,31	0,61 ± 0,03
Psicrótrofos	Control	2,05 ± 0,29	6,73 ± 0,45	1,21 ± 1,09	0,56 ± 0,10
	Tom1	1,87 ± 0,29	5,16 ± 0,54	0,61 ± 1,70	0,35 ± 0,08
	Tom2	1,96 ± 0,17	7,26 ± 0,30	0,70 ± 0,70	0,52 ± 0,05
	Cla1	2,21 ± 0,14	6,67 ± 0,17	2,48 ± 0,46	0,75 ± 0,08
	Cla2	1,64 ± 0,11	6,87 ± 0,13	1,33 ± 0,35	0,71 ± 0,05
<i>Pseudomonas spp</i>	Control	0,13 ± 0,08	3,25 ± 0,27	1,26 ± 0,55	0,33 ± 0,03
	Tom1	0,02 ± 0,11	1,23 ± 0,41	3,91 ± 1,36	0,19 ± 0,04
	Tom2	0,28 ± 0,17	2,81 ± 0,24	8,30 ± 0,68	0,93 ± 0,29
	Cla1	0,01 ± 0,28	3,56 ± 0,45	6,46 ± 0,91	0,88 ± 0,22
	Cla2	0,40 ± 0,08	4,15 ± 0,12	4,38 ± 0,29	0,92 ± 0,11
Levaduras	Control	0,68 ± 0,16	4,12 ± 0,98	1,89 ± 0,99	0,35 ± 0,06
	Tom1	0,01 ± 0,34	4,47 ± 0,88	0,42 ± 0,90	0,44 ± 0,08
	Tom2	1,69 ± 0,24	4,18 ± 0,45	2,45 ± 1,86	0,27 ± 0,06
	Cla1	0,00 ± 0,30	4,64 ± 0,29	0,46 ± 1,01	0,61 ± 0,10
	Cla2	0,37 ± 0,53	6,11 ± 1,41	0,88 ± 1,89	0,59 ± 0,16
Enterobacterias	Control	1,34 ± 0,18	3,71 ± 0,70	5,15 ± 1,15	0,41 ± 0,10
	Tom1	0,70 ± 0,04	1,1 ± 0,25	-	0,04 ± 0,07
	Tom2	1,17 ± 0,10	0,50 ± 0,20	-	-0,10 ± 0,03
	Cla1	1,75 ± 0,34	0,96 ± 0,22	-	-0,17 ± 0,18
	Cla2	1,50 ± 0,24	0,87 ± 0,11	-	-0,24 ± 0,31

¹ Control: control; Tom1: con aceite esencial de tomillo emulsionado; Tom2: con aceite esencial de tomillo sin emulsionar; Cla1: con aceite esencial de clavo emulsionado; Cla2: con aceite esencial de clavo sin emulsionar.

Considerando la velocidad de crecimiento y la fase de la latencia de los grupos microbianos de mesófilos y psicrótrofos, la vida útil calculada de los AQF elaborados se puede situar en unos 12 días en el AQF Tom1, mientras que en los otros AQF la vida útil sería de entre 7 y 8 días en condiciones de refrigeración a 4 °C. Por lo tanto, la inclusión de los AEs de tomillo a 0,05% en forma de emulsión (encapsulada por homogeneización) podría ser una alternativa para incrementar la vida útil de los AQF.

En relación al efecto de los AEs, hay resultados diversos en relación a su eficacia. Tsiraki y Savvaidis (2013) determinaron la vida útil de queso de suero griego con AE de albahaca al 0,4% sobre la superficie. El recuento inicial en el queso fue 4,7; 3,5; < 1; < 2 y 2,2 log UFC/g para los recuentos de mesófilos viables totales, bacterias ácido lácticas, enterobacterias, *Pseudomonas*, y mohos y levaduras, respectivamente. La población de mohos y levaduras llegó a 3,8 log UFC/g a los 7 días, y en el resto de microorganismos llegaron a 7 log UFC/g, estableciendo 7 días como el tiempo de vida útil microbiológica para el queso con 0,4% de AE de albahaca. Los resultados son muy similares a los de nuestro estudio, aunque la concentración utilizada de albahaca fue muy alta, posiblemente porque como se determinó en los estudios realizados *in vitro* su actividad antimicrobiana no es muy elevada.

Por otro lado, Khorshidian *et al.* (2018) observaron en queso de cabra a los que añadieron AEs de tomillo y orégano (0,05 y 0,1%), que las muestras con AE de orégano al 0,1% presentaron recuentos de coliformes por debajo del límite de detección desde el primer día de almacenamiento y desde el día 1 en el caso de tomillo, resultado muy similar al de nuestro estudio en el que se apreciaron, en el recuento de enterobacterias velocidades de crecimiento negativas en los AQF con AEs. Además, al analizar el crecimiento de mohos y levaduras, encontraron que los AEs prolongaron la vida útil de los quesos, siendo el AE de orégano el más eficiente. Este efecto inhibitorio no se observó en nuestro estudio.

En la comparación de la adición de AEs encapsulados, Fernandes *et al.* (2017) en un queso fresco con un 0,5% de AE de romero en forma libre y microencapsulado, agregado después del drenado de suero, el tiempo de vida útil a 6 °C con una limitación de 8 log UFC/g para microorganismos mesófilos, fue sólo de 3 días para el queso control, de 8 días para el queso adicionado del AE en su forma libre y de 12 días para el AE microencapsulado, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el AQF con tomillo encapsulado (Tom1) de nuestro estudio.

Un factor a considerar en la eficacia de los AES es la composición de los alimentos, que pudiera ser una de las causas de la reducida eficacia obtenida en los AQF con AEs de nuestro estudio. En general, los altos niveles de grasa y/o proteína en los alimentos protegen a los microorganismos de la acción del AE (Si *et al.*, 2006). Así por ejemplo Smith-Palmer *et al.* (2001) estudiaron el efecto de los AEs de *Pimenta racemosa*, clavo, canela y tomillo a concentraciones de 0,1, 0,5 y 1% en queso blando bajo en grasa en comparación a su homólogo con toda la grasa, inoculados con ~ 6 log UFC/mL de *L. monocytogenes* y *Salmonella* Enteritidis a temperaturas de almacenamiento de 4 y 10 °C, durante un período de 14 días. En el queso bajo en grasa, los cuatro AEs al 1% redujeron *L. monocytogenes* a 1 log UFC/g, mientras que en el queso con toda su grasa el AE de clavo fue el único que logró alcanzar esta reducción.

Otro factor que influye en la eficacia de los AES, es la forma de aplicación. Así, Gurdian *et al.* (2017a) elaboraron un queso blanco fortificado con aceite de linaza e incorporaron una película o film de recubrimiento comestible superficial preparada con un aislado de proteína de suero y 3% de AE de orégano. De inicio los recuentos de levaduras y mohos fueron inferiores a 1 log UFC/g, después de 60 días de almacenamiento en refrigeración, los recuentos fueron de 1,82 y 4,53 log UFC/g para el queso con película comestible y control respectivamente, demostrando que la película comestible superficial conteniendo AE es capaz de incrementar el tiempo de vida del queso.

6.2.6. Análisis sensorial

Un aspecto importante a considerar cuando se utilizan AEs en los alimentos son las características sensoriales que conferirán al producto final. En este estudio, para las evaluaciones sensoriales de los AQF, se contó con la participación de personal del Departamento de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Como se indicó en la sección 6.1, para determinar la concentración de AE a incorporar en el AQF, previamente se realizaron producciones de AQF, considerando como punto de partida la CMI de los AEs de clavo, tomillo, orégano y romero en las emulsiones, que fue de 4 mg/mL (0,4%). También se tuvo en consideración que, en los sistemas alimentarios, en general, se requieren mayores concentraciones de AE para lograr el mismo efecto que en el estudio *in vitro*, además se tomó en cuenta el efecto a nivel

sensorial de los AEs. Se elaboraron AQF con concentraciones de AEs 0,5 y 0,05% en la mezcla leche desnatada/emulsión. Estos AQF se evaluaron por 4 catadores para determinar la concentración más aceptable organolépticamente. Como resultado de esta evaluación se decidió utilizar 0,05% de AE de tomillo y clavo. Debido a que incluso la concentración elegida presentó un sabor intenso. Para realizar la evaluación sensorial se decidió acompañar al producto con tomate y lechuga con el objetivo de atenuar el sabor intenso de los AE en el AQF.

Se realizó la evaluación sensorial descriptiva de los AQF con adición de AEs, al día 3 de almacenamiento, con la participación de 10 catadores. Se evaluaron los atributos de color, sabor y textura. El AQF elaborado tuvo un formato cilíndrico/troncocónico de ~400 g, de color blanco, de aspecto firme y textura gelificada similar al queso fresco, de sabor y aroma lácteos, con notas herbales poco intensas, provenientes del aceite de chía que se percibía en el caso del AQF control. En los atributos de color y textura en los AQF con AE de tomillo y clavo las valoraciones fueron similares al control. Sin embargo, los catadores describieron en los AQF con AEs un olor moderado al aceite esencial añadido, pero percibían un fuerte sabor con una elevada persistencia en el paladar. Entre los AQF con AEs añadidos de manera directa o a través de la emulsión, no apreciaron diferencias.

En otros estudios realizados en diferentes variedades de queso, también se percibieron los efectos predominantes en el olor y sabor por la adición de AEs. Olmedo *et al.* (2013) evaluaron el efecto de los AEs de orégano y romero (0,2 g/100 g) en queso crema, apreciando intensidades similares en la mayoría de los atributos sensoriales de los quesos crema, excepto en el aroma de los quesos con AE de orégano o romero que se consideraron de intensidad elevada, sobre todo en el de romero. Govaris *et al.* (2011) evaluaron sensorialmente muestras de queso feta al que aplicaron AE de tomillo (0,1 mL/100 g) y orégano (0,1 y 0,2 mL/100 g), y evaluaron los atributos de sabor, olor y aceptabilidad utilizando una escala hedónica de 1 a 9 puntos. En el queso control obtuvieron una puntuación de 8 en promedio en todos los atributos, de ~7,5 para el queso con AE de tomillo, y de ~6 para el adicionado de AE de orégano (0,1 y 0,2 mL /100 g). Sadeghi *et al.* (2012) en su estudio utilizaron AE de comino (0, 7,5, 15 y 30 μ L/100 mL de leche), obteniendo una valoración aceptable en la muestra de queso con 15 μ L/100 mL de AE, y un efecto sensorial adverso cuando la concentración del AE aumentó de 15 a 30 μ L/100 mL. Ehsani y Mahmoudi, (2013) aplicaron AE de *Mentha longifolia* L. (0, 50, 150 y 300 ppm en la leche) en queso iraní y valoraron sus características sensoriales de

aceptación en una escala hedónica de 9 puntos. El queso control sin AE añadido gustó moderadamente y conforme la concentración de AE se incrementó la aceptación del producto disminuyó, de forma que a la concentración de 300 ppm la valoración fue de 4 puntos. Estos autores afirmaron que la aceptación organoléptica fue el principal factor limitante en la aplicación de las dosis más altas del AE en su estudio. Otros investigadores como Asensio *et al.* (2015) aplicaron AEs de orégano y tomillo (0,05 g/100 g) a un requesón orgánico comercial, y aunque en su estudio no se realizó el análisis organoléptico, señalaron que hubo un cierto impacto sensorial debido a los AE y que sería esencial determinar su aceptación por parte del consumidor. Finalmente, Sadeghi *et al.* (2012) afirmaron que a pesar de los fuertes efectos inhibitorios de los AEs contra diferentes patógenos transmitidos por los alimentos y microorganismos de alteración, su aplicación práctica está condicionada por los sabores intensos que causan en los productos alimenticios en los que son añadidos.

6.3. Referencias

- Almena-Aliste, M. y Mietton, B. 2014. Cheese Classification, Characterization, and Categorization: A Global Perspective. *En Cheese and microbes*. C.W. Donnelly, editor. ASM Press, Washington, DC. 39-71.
- Arslan, S., Eyi, A., y Özdemir, F. 2011. Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses. *Journal of Dairy Science*, 94: 5851-5856.
- Asensio, C. M., Grosso, N. R., y Juliani, H. R. 2015. Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential oils. *LWT - Food Science and Technology*, 60: 664-671.
- Bermúdez-Aguirre, D. y Barbosa-Cánovas, G. V. 2011. Quality of selected cheeses fortified with vegetable and animal sources of omega-3. *LWT - Food Science and Technology*, 44: 1577-1584.
- Bermúdez-Aguirre, D. y Barbosa-Cánovas, G. V. 2012. Fortification of queso fresco, cheddar and mozzarella cheese using selected sources of omega-3 and some nonthermal approaches. *Food Chemistry*, 133: 787-797.
- Bodoira, R. M., Penci, M. C., Ribotta, P. D., y Martínez, M. L. 2017. Chia (*Salvia hispanica* L.) oil stability: Study of the effect of natural antioxidants. *LWT - Food Science and Technology*, 75: 107-113.
- Calligaris, S., Gulotta, A., Ignat, A., Bermúdez-Aguirre, D., Barbosa-Cánovas, G. V., y Nicoli, M. C. 2013. Milk pre-treatment by high pressure homogenization in the manufacturing of «queso fresco» fortified with omega-3 fatty acids. *LWT - Food Science and Technology*, 50: 629-633.
- Calligaris, S., Ignat, A., Biasutti, M., Innocente, N., y Nicoli, M. C. 2015. Cheese fortification using saturated monoglyceride self-assembly structures as carrier of omega-3 fatty acids. *International Journal of Food Science and Technology*, 50: 2129-2134.
- Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., De Marchi, M., y Bittante, G. 2013. Factors affecting variation of different measures of cheese yield and milk nutrient recovery from an individual model cheese-manufacturing process. *Journal of Dairy Science*, 96: 7952-7965.
- D'Amico, D. J. 2014. Microbiological Quality and Safety Issues in Cheesemaking. *En Cheese and Microbes*. C. Donnelly, editor. ASM Press, Washington, DC. 251-309.
- Delgado, T., Marinero, P., Asensio-S.-Manzanera, M. C., Asensio, C., Herrero, B., Pereira, J. A., y Ramalhosa, E. 2014. Antioxidant activity of twenty wild Spanish *Thymus mastichina* L. populations and its relation with their chemical composition. *LWT - Food Science and Technology*, 57: 412-418.

- Ehsani, A. y Mahmoudi, R. 2013. Effects of *Mentha longifolia* L. essential oil and *Lactobacillus casei* on the organoleptic properties and on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during manufacturing, ripening and storage of Iranian white-brined cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 66: 70-76.
- Evert-Arriagada, K., Hernández-Herrero, M. M., Guamis, B., y Trujillo, A. J. 2014. Commercial application of high-pressure processing for increasing starter-free fresh cheese shelf-life. *LWT - Food Science and Technology*, 55: 498-505.
- Evert-Arriagada, K., Hernández-Herrero, M. M., Juan, B., Guamis, B., y Trujillo, A. J. 2012. Effect of high pressure on fresh cheese shelf-life. *Journal of Food Engineering*, 110: 248-253.
- Fernandes, R. V. de B., Guimarães, I. C., Ferreira, C. L. R., Botrel, D. A., Borges, S. V., y de Souza, A. U. 2017. Microencapsulated rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil as a biopreservative in Minas frescal cheese. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41: 1-9.
- Fox, P. F. y Cogan, T. M. 2004. Factors that affect the quality of cheese. *En Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. P. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, y T.P. Guinee, editores. Elsevier Ltd., London . 583-608.
- Francis, F. J. y Clydesdale, F. M. 1975. Food colorimetry: theory and applications. AVI Publishing Co. Inc., Connecticut. 477 pp.
- Gaygadzhiev, Z., Alexander, M., y Corredig, M. 2009. Sodium caseinate-stabilized fat globules inhibition of the rennet-induced gelation of casein micelles studied by Diffusing Wave Spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 23: 1134-1138.
- Gaygadzhiev, Z., Corredig, M., Alexander, M., Gaygadzhiev, Z., Corredig, M., y Alexander, : M. 2011a. Rennet coagulation properties of milk in the presence of oil droplets stabilised by a combination of sodium caseinate and whey protein isolate. *Dairy Science and Technology*, 91: 719-737.
- Gaygadzhiev, Z., Massel, V., Alexander, M., y Corredig, M. 2011b. Addition of sodium caseinate to skim milk inhibits rennet-induced aggregation of casein micelles. *Food Hydrocolloids*, 26: 405-411.
- Giroux, H. J., Constantineau, S., Fustier, P., Champagne, C. P., St-Gelais, D., Lacroix, M., y Britten, M. 2013. Cheese fortification using water-in-oil-in-water double emulsions as carrier for water soluble nutrients. *International Dairy Journal*, 29: 107-114.
- Givens, D. I. 2017. Saturated fats, dairy foods and health: A curious paradox?. *Nutrition Bulletin*, 42: 274-282.

- Goñi, M. G., Roura, S. I., Ponce, A. G., y Moreira, M. R. 2015. Clove (*Syzygium aromaticum*) oils. *En Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. V.R. Preedy, editor. Elsevier Inc., London. 349-357.
- Govaris, A., Botsoglou, E., Sergelidis, D., y Chatzopoulou, P. S. 2011. Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere. *LWT - Food Science and Technology*, 44: 1240-1244.
- Gurdian, C., Chouljenko, A., Solval, K. M., Boeneke, C., King, J. M., y Sathivel, S. 2017a. Application of edible films containing oregano (*Origanum vulgare*) essential oil on queso blanco cheese prepared with flaxseed (*Linum usitatissimum*) oil. *Journal of Food Science*, 82: 1395-1401.
- Gurdian, C., Reyes, V., Kyereh, E., Bonilla, F., Galindo, C., Chouljenko, A., Solval, K. M., Boeneke, C., King, J. M., y Sathivel, S. 2017b. Incorporating flaxseed (*Linum usitatissimum*) oil into queso blanco at different stages of the cheese manufacturing process. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41: 1-7.
- Hall III, C. y Tulbek, M. C. 2008. Omega-3-enriched bread. *En Technology of functional cereal products*. B.R. Hamaker, editor. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 362-387.
- Hernandez, E. M. 2016. Specialty Oils: Functional and Nutraceutical Properties. *En Functional Dietary Lipids: Food Formulation, Consumer Issues and Innovation for Health*. T.A.B. Sanders, editor. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. 69-101.
- Hernandez, E. M. y de Jong, L. 2011. Applications of Omega-3 Fats in Foods. *En Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease*. E.M. Hernandez y M. Hosokawa, editores. AOCS Press, Illinois. 151-176.
- Hughes, B. H., Brian Perkins, L., Calder, B. L., y Skonberg, D. I. 2012. Fish Oil Fortification of Soft Goat Cheese. *Journal of Food Science*, 77: 128-133.
- Jalilzadeh, A., Tunçtürk, Y., y Hesari, J. 2015. Extension shelf life of cheese: A review. *International Journal of Dairy Science*, 10: 44-60.
- Jiménez-Colmenero, F. 2013. Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Research International*, 52: 64-74.
- Johnson, M. E. 2014. Mesophilic and Thermophilic Cultures Used in Traditional Cheesemaking. *En Cheese and microbes*. C.W. Donnelly, editor. ASM Press, Washington, DC. 73-94.
- Khorshidian, N., Yousefi, M., Khanniri, E., y Mortazavian, A. M. 2018. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies journal*, 45: 62-72.

- Kindstedt, P. S. 2014. The basics of cheesemaking. *En Cheese and microbes*. C.W. Donnelly, editor. ASM Press, Washington, DC. 17-38.
- Litopoulou-Tzanetaki, E. 2007. Soft-ripened and fresh cheeses: Feta, Quark, Halloumi and related varieties. *En Improving the Flavour of Cheese*. B.C. Weimer, editor. Woodhead Publishing, Cambridge. 474-493.
- Liu, A. G., Ford, N. A., Hu, F. B., Zelman, K. M., Mozaffarian, D., y Kris-Etherton, P. M. 2017. A healthy approach to dietary fats: Understanding the science and taking action to reduce consumer confusion. *Nutrition Journal*, 16: 1-15.
- Lobato-Calleros, C., Reyes-Hernández, J., Beristain, C. I., Hornelas-Uribe, Y., Sánchez-García, J. E., y Vernon-Carter, E. J. 2007. Microstructure and texture of white fresh cheese made with canola oil and whey protein concentrate in partial or total replacement of milk fat. *Food Research International*, 40: 529-537.
- MAGRAMA. 2015. Informe del consumo de alimentación en España 2014. 139 pp.
- MAGRAMA. 2016. Informe del consumo de alimentación en España 2015. 230 pp.
- MAPAMA. 2017. Informe del consumo de alimentación en España 2016. 242 pp.
- MAPAMA. 2018. Informe del consumo de alimentación en España 2017. 230 pp.
- Morales, J., Valenzuela, R., González, D., González, M., Tapia, G., Sanhueza, J., y Valenzuela, A. 2012. Nuevas fuentes dietarias de ácido alfa-linolénico: una visión crítica. *Revista Chilena de Nutrición*, 39: 79-87.
- O'Callaghan, D. J. y Guinee, T. P. 2004. Rheology and Texture of Cheese. *En Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, y P. Guinee, editores. Elsevier Ltd., London. 511-540.
- Olmedo, R. H., Nepote, V., y Grosso, N. R. 2013. Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. *LWT - Food Science and Technology*, 53: 409-417.
- Papastergiadis, A., Fatouh, A., Jacxsens, L., Lachat, C., Shrestha, K., Daelman, J., Kolsteren, P., Langenhove, H. Van, y De Meulenaer, B. 2014. Exposure assessment of malondialdehyde, 4-hydroxy-2-(e)-nonenal and 4-hydroxy-2-(e)-hexenal through specific foods available in Belgium. *Food and Chemical Toxicology journal*, 73: 51-58.
- Papastergiadis, A., Mubiru, E., Van Langenhove, H., y De Meulenaer, B. 2012. Malondialdehyde measurement in oxidized foods: Evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test in various foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 9589-9594.
- Pinho, O., Mendes, E., Alves, M. M., y Ferreira, I. M. P. L. V. O. 2004. Chemical, physical, and sensorial characteristics of «Terrincho» ewe cheese: Changes during ripening and intravarietal comparison. *Journal of Dairy Science*, 87: 249-257.

- Ratnayake, W. M. N. y Galli, C. 2009. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: A background review paper. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 55: 8-43.
- Sadeghi, E., Akhondzadeh Basti, A., Noori, N., Khanjari, A., y Partovi, R. 2012. Effect of *Cuminum cyminum* L. essential oil and *Lactobacillus acidophilus* (a probiotic) on *Staphylococcus aureus* during the manufacture, ripening and storage of white brined cheese. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37: 449-455.
- Segura-Campos, M. R., Ciau-Solís, N., Rosado-Rubio, G., Chel-Guerrero, L., y Betancur-Ancona, D. 2014. Physicochemical characterization of chia (*Salvia hispanica*) seed oil from Yucatán, México. *Agricultural Sciences*, 5: 220-226.
- Si, W., Gong, J., Chanas, C., Cui, S., Yu, H., Caballero, C., y Friendship, R. M. 2006. In vitro assessment of antimicrobial activity of carvacrol, thymol and cinnamaldehyde towards *Salmonella* serotype Typhimurium DT104: effects of pig diets and emulsification in hydrocolloids. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 1282-1291.
- da Silva Dannenberg, G., Funck, G. D., Mattei, F. J., Padilha da Silva, W., y Fiorentini, Â. M. 2016. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in vitro and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 36: 120-127.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., y Lugasi, A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*, 51: 456-467.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., y Fyfe, L. 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18: 463-470.
- Stratulat, I., Britten, M., Salmieri, S., Fustier, P., St-Gelais, D., Champagne, C. P., y Lacroix, M. 2014. Enrichment of cheese with bioactive lipophilic compounds. *Journal of Functional Foods*, 6: 48-59.
- Stratulat, I., Britten, M., Salmieri, S., Fustier, P., St-Gelais, D., Champagne, C. P., y Lacroix, M. 2015. Enrichment of cheese with vitamin D₃ and vegetable omega-3. *Journal of Functional Foods*, 13: 300-307.
- Tsiraki, M. I. y Savvaidis, I. N. 2013. Effect of packaging and basil essential oil on the quality characteristics of whey cheese «Anthotyros». *Food and Bioprocess Technology*, 6: 124-132.
- Wang, D. D. y Hu, F. B. 2017. Dietary fat and risk of cardiovascular disease: Recent controversies and advances. *Annual Review of Nutrition*, 37: 423-446.

- Wang, Y. Z., Fu, S. G., Wang, S. Y., Yang, D. J., Wu, Y. H. S., y Chen, Y. C. 2018. Effects of a natural antioxidant, polyphenol-rich rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, on lipid stability of plant-derived omega-3 fatty-acid rich oil. *LWT - Food Science and Technology*, 89: 210-216.
- Yang, D., Gan, L.-J., Shin, J.-A., Kim, S., Hong, S.-T., Park, S.-H., Lee, J. H., y Lee, K.-T. 2013. Antioxidative activities of *Ginkgo biloba* extract on oil/water emulsion system prepared from an enzymatically modified lipid containing alpha-linolenic acid. *Journal of Food Science*, 78: C43-C49.
- Ye, A., Cui, J., Taneja, A., Zhu, X., y Singh, H. 2009. Evaluation of processed cheese fortified with fish oil emulsion. *Food Research International*, 42: 1093-1098.
- Zamora, A., Ferragut, V., Juan, B., Guamis, B., y Trujillo, A. J. 2011. Effect of ultra-high pressure homogenisation of milk on the texture and water-typology of a starter-free fresh cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12: 484-490.
- Zamora, A., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., y Trujillo, A.-J. 2012. Ultra-high pressure homogenisation of milk: technological aspects of cheese-making and microbial shelf life of a starter-free fresh cheese. *Journal of Dairy Research*, 79: 168-175.
- Zamora, A., Juan, B., y Trujillo, A. J. 2015. Compositional and biochemical changes during cold storage of starter-free fresh cheeses made from ultra-high-pressure homogenised milk. *Food Chemistry*, 176: 433-440.

Capítulo VII

Conclusiones

1. De los 11 aceites esenciales comerciales testados (albahaca, canela, clavo, laurel, limón, mandarina, orégano, romero, salvia, tomillo y valeriana), los de canela, clavo, orégano y tomillo destacaron por su capacidad antimicrobiana y antioxidante *in vitro*.
2. Los aceites esenciales de orégano y tomillo fueron los que presentaron mayor capacidad antimicrobiana seguidos del clavo y canela, estableciéndose el siguiente orden de acuerdo a la sensibilidad de los microorganismos seleccionados: levaduras > bacterias lácticas > mohos > bacterias patógenas > *P. aeruginosa*.
3. Los AEs de clavo y canela fueron los más eficaces como antioxidantes para atrapar radicales libres (método del radical DPPH), sin embargo, cuando se trata de evitar la oxidación de lípidos (método de decoloración del β -caroteno) los cuatro aceites esenciales se comportaron de manera similar.
4. La capacidad antimicrobiana, de los aceites esenciales de orégano, tomillo, clavo y canela incluidos en emulsiones O/W con 20% de aceites vegetales (chía y oliva) con caseinato de sodio (3%) como emulgente y obtenidas por homogeneización convencional (15 MPa), se ve disminuida, siendo la concentración mínima inhibitoria entre 4 y 32 veces superior a la determinada para estos aceites esenciales en el estudio *in vitro*, mostrando una mayor resistencia *P. aeruginosa*.

5. La inclusión de los aceites esenciales de tomillo y clavo en las emulsiones O/W no tuvo efecto en su estabilidad física. La emulsión presentó un comportamiento reológico pseudoplástico y fue inestable desde el primer día de almacenamiento a 4 °C, con presencia de fenómenos de clarificación y cremado. Se determinó cierto efecto antimicrobiano en la emulsión con clavo, en la que se determinó una vida útil de 9 días, mientras que en la emulsión control y de tomillo fue de 4-5 días.
6. La adición de los aceites esenciales de tomillo y clavo a las emulsiones no produjo un efecto apreciable ni en el pH, ni en la oxidación lipídica durante su almacenamiento a temperatura de refrigeración, observándose una formación mínima de productos de oxidación primaria y secundaria en todas las emulsiones, lo que se podría atribuir al efecto antioxidante combinado del caseinato de sodio, los aceites esenciales y algunos compuestos del aceite de chía.
7. Al sustituir la grasa de la leche por una emulsión O/W que contiene 20% de aceites vegetales (5% chía y 15% oliva) elaborado bajo condiciones de coagulación optimizadas permitió obtener un análogo de queso fresco con alto contenido de ácidos grasos insaturados, en especial omega-3, que permite realizar declaraciones nutricionales y de propiedades saludables relacionadas con los ácidos grasos omega-3 en la etiqueta del producto.
8. La incorporación de los aceites esenciales de clavo y tomillo en la elaboración del análogo de queso fresco y en comparación a su homólogo sin aceites esenciales añadidos, en general, no tuvieron efecto en la composición y textura, pero sí en el desarrollo microbiano especialmente del AQF con tomillo añadido en la emulsión, que tuvo una vida útil de unos 12 días, mientras que en los otros AQF la vida útil fue 7 y 8 días. Además, la oxidación lipídica disminuyó con la incorporación de los aceites esenciales en los AQF. Esta actividad de los aceites esenciales permitiría mantener el contenido de ácidos grasos insaturados, y en especial a los omega-3, en el producto durante el almacenamiento. Posiblemente para extender la vida útil microbiológica del análogo de queso fresco mediante el uso de estos aceites esenciales se tendría que incrementar su concentración, hecho que haría sensorialmente inaceptable el producto.
9. Los análogos de queso fresco con aceites esenciales se describieron como de sabor intenso y persistente característicos a los aceites esenciales utilizados, mientras que el AQF control presentó un sabor herbal conferido por el aceite de chía.