

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**DESARROLLO DE MICRO Y NANOEMULSIONES ESTABILIZADAS CON UN  
COMPLEJO PROTEÍNA-POLISACÁRIDO DE *Linum usitatissimum***

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias  
Agropecuarias y Forestales de la Universidad de  
La Frontera como parte de los requisitos para  
Optar al título de Biotecnólogo.

**JAVIERA SOLEDAD PARADA CARCAMO**

**PROFESORA GUIA: DRA. MÓNICA RUBILAR DÍAZ**

**TEMUCO-CHILE**

**2014**

“DESARROLLO DE MICRO Y NANOEMULSIONES ESTABILIZADAS CON UN  
COMPLEJO PROTEÍNA-POLISACÁRIDO DE *Linum usitatissimum*”

**PROFESORA GUIA**

: \_\_\_\_\_

Dra. Mónica Rubilar Díaz  
Departamento de Ingeniería Química  
Universidad de La Frontera

**PROFESOR CONSEJERO**

: \_\_\_\_\_

Dr. César Burgos Díaz  
Departamento de Ingeniería Química  
Universidad de La Frontera

CALIFICACIÓN PROMEDIO TESIS: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mis tutores, la Dra. Mónica Rubilar y el Dr. César Burgos, por haber sido parte fundamental durante mi formación profesional, por la dedicación y por aconsejarme cada vez que fue necesario. A Eduardo Morales por brindarme su ayuda constantemente, y a la Dra. Francisca Acevedo por su preocupación y buena disposición. A todos ellos, muchas gracias por su grata compañía y por los buenos momentos vividos en la Unidad de Tecnología y Procesos.

Agradezco especialmente a quienes estuvieron conmigo durante la realización de mi trabajo de tesis, a mi familia, quienes me han dado su apoyo incondicional a lo largo de toda mi carrera. A mi pololo y compañero Joaquín, por estar siempre a mi lado en las buenas y malas.

Se agradece también al Proyecto FONDECYT Regular 1130639 por el respaldo entregado a este trabajo de título.

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>3</b>
2.1	Emulsiones	3
2.1.1.	Microemulsiones	4
2.1.2.	Nanoemulsiones	4
2.1.2.1.	Desarrollo de nanoemulsiones mediante homogeneización de alta presión	5
2.2.	Emulsionante	5
<b>2.2.1.</b>	<b>Biopolímeros como emulsionante</b>	<b>6</b>
2.2.1.1.	Emulsiones estabilizadas con proteína	6
2.2.1.2.	Emulsiones estabilizadas con polisacáridos	7
2.2.1.3.	Emulsiones estabilizadas con complejo proteína-polisacárido	7
<b>2.3.</b>	<b>Linaza como fuente potencial de bioemulsionante</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO</b>	<b>10</b>
3.1.	Hipótesis	10
3.1.	Objetivo general	10
3.2.	Objetivos específicos	10
<b>4.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>11</b>
4.1.	Extracción de biopolímeros a partir de linaza	11
<b>4.1.1.</b>	<b>Extracción de mucilago</b>	<b>11</b>
<b>4.1.2.</b>	<b>Extracción de proteína</b>	<b>12</b>
<b>4.1.3.</b>	<b>Extracción de complejo proteína-mucilago</b>	<b>12</b>
<b>4.2.</b>	<b>Caracterización química de biopolímeros</b>	<b>13</b>
<b>4.2.1.</b>	<b>Análisis proximal</b>	<b>13</b>
<b>4.2.1.1.</b>	<b>Humedad</b>	<b>14</b>
<b>4.2.1.2.</b>	<b>Ceniza</b>	<b>14</b>
<b>4.2.1.3.</b>	<b>Extracto etéreo</b>	<b>14</b>
<b>4.2.1.4.</b>	<b>Fibra bruta</b>	<b>15</b>
<b>4.2.1.5.</b>	<b>Proteína</b>	<b>15</b>

4.2.1.6.	Extracto no nitrogenado	16
4.2.2.	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	16
4.2.3.	Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	16
4.3.	<b>Caracterización fisicoquímica de los biopolímeros</b>	17
4.3.1.	Potencial Zeta	17
4.3.1.1.	Preparación de muestras	17
4.4.	<b>Caracterización de emulsiones</b>	18
4.4.1.	Emulsiones con distintos tipos de aceite	18
4.4.2.	Emulsiones con distinta fracción de biopolímero	19
4.4.3.	Capacidad y estabilidad emulsionante de las emulsiones	19
4.4.4.	Diagrama de fases ternario	20
4.4.4.1.	Replica de puntos estables de diagrama de fases ternario	21
4.4.4.2.	Análisis microscópico de emulsiones	21
4.5.	Desarrollo de nanoemulsiones	22
4.5.1.	Estabilidad de nanoemulsiones	23
4.5.1.1.	Potencial Zeta y tamaño de partícula de nanoemulsiones	23
4.5.1.2.	Estabilidad oxidativa de nanoemulsiones	23
4.5.1.3.	Análisis de microscopía óptica de nanoemulsiones	24
5.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	25
5.1.	<b>Caracterización química preliminar de biopolímeros de linaza</b>	25
5.1.1.	Composición química de los biopolímeros	25
5.1.2.	Identificación de los grupos funcionales del complejo proteína-mucilago mediante FTIR	26
5.1.3.	Perfil de aminoácidos de la proteína de linaza mediante HPLC	27
5.2.	<b>Caracterización fisicoquímica de biopolímeros</b>	28
5.2.1.	Potencial Zeta de las fracciones en función a variaciones de pH	29
5.2.2.	Potencial Zeta de las fracciones en función a variaciones de concentración p/v.	30
5.2.3.	Potencial Zeta de las fracciones en función a variaciones de fuerza iónica (NaCl)	31

5.2.4.	Potencial Zeta de las fracciones en función a variaciones de temperatura	32
<b>5.3.</b>	<b>Caracterización de emulsiones</b>	<b>33</b>
5.3.1.	Capacidad emulsionante de proteína de linaza usando distintos aceites (%C.E <sub>24</sub> )	33
5.3.2.	Capacidad y estabilidad emulsionante de fracciones de linaza (%C.E <sub>24</sub> y %E.E <sub>24</sub> )	34
5.3.3.	Diagrama de fases ternario	36
5.4.	Desarrollo de nanoemulsiones mediante homogeneización de alta presión	38
5.4.1.	Tamaño de partícula de nanoemulsiones	38
5.4.2.	Potencial Zeta de nanoemulsiones	40
5.4.3.	Estabilidad oxidativa de nanoemulsiones mediante test de Rancimat	41
5.5.	Análisis microscópico de emulsiones y nanoemulsiones	42
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>43</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>44</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>49</b>

**INDICE DE FIGURAS**

- Figura 1. Representación esquemática de biopolímeros usados como emulsionante
- Figura 2. Extracción de polisacárido de linaza (mucílago) a 70 °C.
- Figura 3. Esquema para la extracción de fracciones de biopolímero
- Figura 4. Zetasizer Nano Zs (Malvern Instruments)
- Figura 5. A: Homogeneizador de alta velocidad 400DS Benchtop homogenizer, (PRO Scientific); B, Homogeneizador de Alta presión Panda plus 2000, (Gea Niro soavi)
- Figura 6. Espectro FT-IR producido por complejo Proteína-Mucilago
- Figura 7. Potencial Zeta de las fracciones de linaza en función a variaciones de pH
- Figura 8. Potencial Zeta de las fracciones de linaza en función a variaciones de concentración p/v
- Figura 9. Potencial Zeta de las fracciones de linaza en función al aumento de fuerza iónica
- Figura 10. Potencial Zeta de fracciones de linaza en función a variaciones de temperatura
- Figura 11. Emulsiones desarrolladas con concentraciones crecientes de biopolímeros extraídos desde semilla de linaza
- Figura 12. Diagrama de fases ternario representando las zonas de estabilidad emulsionante utilizando complejo proteína polisacárido
- Figura 13. Replica de emulsiones estables del diagrama ternario, frente a variaciones de pH donde A, B y C corresponden al punto 1, 2 y 3 respectivamente
- Figura 14. Tamaño de partícula de nanoemulsiones en función a la concentración de emulsionante (complejo proteína-mucílago)
- Figura 15. Potencial Zeta de nanoemulsiones en función al aumento de concentración de emulsionante
- Figura 16. Microscopía óptica de emulsiones 5-5-90% (complejo proteína-mucílago, aceite de linaza, agua). A: Objetivo 10x; B: Objetivo 40x
- Figura 17. Microscopía óptica de nanoemulsiones 5-5-90% (complejo proteína-mucílago, aceite de linaza, agua). Objetivo 40x

**INDICE DE TABLAS**

- Tabla 1. Porcentajes iniciales de los componentes de la emulsión para rastrear zonas de estabilidad emulsionante: Aceite, complejo proteína-polisacárido y agua
- Tabla 2. Concentraciones usadas para la elaboración de nanoemulsiones
- Tabla 3. Composición química de las diferentes fracciones de semilla linaza (de acuerdo a metodología oficial de la AOAC, 1990)
- Tabla 4. Perfil de aminoácidos para la fracción de proteica de linaza (g/100g de proteína)
- Tabla 5. Valores de capacidad emulsionante (%C.E<sub>24</sub>) de distintos tipos de aceites vegetales. La letra A corresponde a: aceite de Canola; B: aceite de Maravilla; C: Mezcla de aceite de soya 64% y maravilla 28%; D: aceite de Soya; E: aceite de Linaza; F: aceite de Oliva
- Tabla 6. Estabilidad emulsionante (%E.E<sub>24</sub>) a concentraciones crecientes de proteína, mucílago y complejo proteína-mucílago
- Tabla 7. Puntos extraídos desde la zona de estabilidad del diagrama de fases ternario
- Tabla 8. Estabilidad oxidativa de nanoemulsiones a distintas concentraciones de complejo proteína-mucílago



## RESUMEN

Actualmente, existen muchos compuestos bioactivos de interés en la industria agroalimentaria caracterizados por su naturaleza lipofílica o baja solubilidad en agua. Una estrategia para mejorar la estabilidad de estos compuestos, es incorporarlos en emulsiones aceite en agua (O/W), específicamente en emulsiones de gotas muy pequeñas denominadas nanoemulsiones. El uso de ellas ha despertado gran interés en la actualidad, ya que permiten encapsular y proteger compuestos bioactivos. Biopolímeros tales como proteínas y/o polisacáridos presentan la capacidad de estabilizar emulsiones, es por ello que el objetivo principal del presente trabajo de investigación, fue estudiar la formación de micro/nanoemulsiones (O/W) estabilizadas con un complejo proteína-polisacárido extraído a partir de semilla de *Linum usitatissimum*.

Por lo anterior, primero se realizó una caracterización química de tres fracciones de linaza (proteína, mucílago y complejo proteína-mucílago) mediante Análisis Proximal, Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), y Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) y una caracterización físicoquímica mediante la determinación del potencial Z en función a variaciones de pH (2-10), concentración de emulsionante (0,0625-1%), fuerza iónica (0-500 mM NaCl) y temperatura (4-75 °C). Luego se estudiaron los factores que influyen en la estabilidad de emulsiones, tales como tipo y concentración de emulsionante y tipo de aceite, alcanzando un 99% de capacidad emulsionante utilizando aceite de linaza y complejo proteína-mucílago (4-5% p/v). También, se determinó la composición que formó emulsiones más estables a través de un diagrama de fases ternario diseñado en base a distinto rango de concentración de agua (0-96%), aceite de linaza (1-97%) y complejo proteína-mucílago (1-5%), encontrando mayor estabilidad en la composición de 90% de agua, 5% aceite de linaza y 5 % de complejo proteína-mucílago.

Finalmente, se formularon nanoemulsiones (O/W) por homogenización de alta presión utilizando distintas concentraciones de complejo proteína-mucílago (0,2-5%) obteniendo nanoemulsiones de 362,8 nm de tamaño a concentraciones bajas de complejo proteína-mucílago, las cuales además fueron oxidativamente estables, según test de Rancimat. Estos resultados mostraron que el complejo proteína-mucílago puede ser utilizado para la elaboración de nanoemulsiones O/W, siendo una alternativa al uso de emulsionantes sintéticos.

## SUMMARY

Nowadays, there are many bioactive components of interest in food industry, characterized for his lipophilic nature or low aqueous solubility. An approach that may improve the stability of this components, it is the incorporation of them in oil in water emulsions (O/W), specifically in very fine droplets of emulsions called nanoemulsions. Currently, the use of nanoemulsions has raised great interest based on their capacity to protect and encapsulate several bioactive components. Biopolymers such as protein and/or polysaccharide can be used to stabilize emulsions. For that, the principal objective of this investigation work, it was study the formation of micro/nanoemulsion (O/W) stabilized for a protein-polysaccharide complex extracted from linseed.

First, was performed a chemical characterization of three fractions obtained from linseed (protein, mucilage, protein-mucilage complex). For this, a Proximate Analysis, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and liquid chromatography (HPLC) were realized. On the other hand, a physicochemical characterization was realized through zeta potential determination as a response of pH changes (2-10), type and concentration of emulsifier (0,0625-1%) ionic strength (0-500 mM NaCl) and heat changes (4-75 °C). Then, the factors that influence the stability in emulsions were studied, such as emulsifier type and his concentration, and oil type, reaching 99% of emulsifying capacity using linseed oil and protein-mucilage complex (4-5% w/v). Moreover, the composition that formed stable emulsions was determined, by means of ternary phase diagram designed in base of different range of water concentration (0-96%), linseed oil (1-97%) and protein-mucilage complex (1-5%), finding increased stability in the composition of 90% water, 5% linseed oil, and 5% protein-mucilage complex.

Finally, nanoemulsions (O/W) were formulated trough high pressure homogenization using different concentrations of protein-mucilage complex (0,2-5% w/v), obtaining nanoemulsion of 362,8 nm at low concentrations of complex. These results showed that protein-mucilage complex could be used for nanoemulsions O/W elaboration, being an alternative in use of synthetic emulsifier.

## 1. INTRODUCCION

El surgimiento de la nanotecnología para el encapsulamiento de compuestos bioactivos y nutracéuticos ha revolucionado la industria farmacéutica y alimentaria, y actualmente constituye uno de los campos de investigación más promisorios. Esto debido al incremento en la demanda por nuevos productos fortificados con ingredientes saludables y de origen natural.

Una de las aplicaciones más importantes de la nanotecnología en el campo nutricional, consiste en el mejoramiento de las propiedades físico-químicas de compuestos bioactivos, tales como la solubilidad acuosa, estabilidad térmica y la biodisponibilidad.

Una de las herramientas que mejoraría la estabilidad química de los compuestos bioactivos es encapsularlos en un material o sistema comestible mediante el desarrollo de nanoemulsiones, las cuales son formuladas mediante el uso de emulsionantes. Las propiedades físico químicas de las nanoemulsiones, están determinadas principalmente por el tipo y concentración del emulsionante utilizados. Entre los materiales que cumplen esta función, se encuentran biopolímeros tales como polisacáridos y/o proteínas de origen vegetal, los cuales son capaces de estabilizar cinéticamente las emulsiones y contribuir en sus propiedades estructurales. Ambos son buenos ejemplos de emulsionante comúnmente encontrados en la industria alimenticia y farmacéutica (Dickinson, 2003; Bouyer *et al.*, 2012).

Estudios demuestran que complejos de proteína-polisacárido producidos por atracción electrostática pueden mejorar considerablemente la estabilidad de las emulsiones frente a variaciones de temperatura, pH y fuerza iónica (Yin *et al.*, 2012).

Dentro de las proteínas de origen vegetal utilizadas como emulsionante, se ha descrito la actividad y estabilidad emulsionante a partir de complejos proteína-polisacárido (conjugado de proteína con mucílago) obtenidos desde semilla de linaza, logrando resultados favorables para la formulación de emulsiones aceite en agua (O/W) (Wang *et al.*, 2010). Además, se han demostrado los efectos beneficiosos para la salud humana que posee la proteína de linaza gracias a su alto contenido de ingredientes funcionales, como por ejemplo en la prevención de enfermedades coronarias y cáncer (Wang *et al.*, 2011).

Estudios señalan que se puede reemplazar completamente el uso de emulsionantes sintéticos potencialmente tóxicos e irritantes por biopolímeros como las proteínas, logrando además mayor estabilidad emulsionante que ellos (Bouyer *et al.*, 2012). Es por ello que de acuerdo a los antecedentes previamente descritos, se propone utilizar biopolímeros extraídos desde la semilla de linaza (proteína y/o polisacárido), para la formulación de nanoemulsiones O/W mediante homogeneización de alta presión.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Emulsiones.

Una emulsión es un sistema conformado por dos fases líquidas inmiscibles, una de las cuales está dispersa en la otra: fase dispersa y fase continua respectivamente, formando gotas entre 100 nm a 100  $\mu\text{m}$  de tamaño (McClements, 2011). De acuerdo a su naturaleza, las emulsiones pueden ser definidas como emulsiones aceite en agua (oil-in-water, O/W) o emulsiones agua en aceite (water-in-oil, W/O). Las primeras consisten en emulsiones con el aceite como fase dispersa en una fase continua acuosa, mientras que las segundas utilizan agua como fase dispersa en una fase continua oleosa (Aranberri *et al.*, 2006; Bouyer *et al.*, 2012). Actualmente, muchos productos alimenticios se encuentran en forma de emulsiones aceite en agua (O/W) tales como cremas, bebidas y postres (Wang *et al.*, 2011).

Debido a la diferente naturaleza de las fases oleosas y acuosas de la emulsión, son esperables diferencias significativas de densidad, que conduzcan tarde o temprano a una separación de fases, y que en la práctica supone la rotura de la emulsión (Muñoz y Alfaro, 2007). Entre los mecanismos fisicoquímicos responsables de romper las emulsiones a lo largo del tiempo se encuentran: separación gravitacional (cremado o sedimentación), agregación de gotas (floculación y coalescencia) y crecimiento de gotas o maduración de Ostwald (Piorkowski y McClements, 2013).

Para que dos fases inmiscibles puedan formar una emulsión, es necesario agregar un tercer componente llamado emulsionante. Éste facilita la formación de la emulsión mediante la disminución de la tensión interfacial entre la fase apolar (oleosa) y la fase polar (acuosa). Además, permite la formulación de emulsiones estables gracias a la formación de películas interfaciales estructuradas (Muñoz y Alfaro, 2007; Bouyer *et al.*, 2011). La composición de la fase oleosa también tiene una gran influencia sobre la estabilidad y las propiedades físicoquímicas de la emulsión (Piorkowski y McClements, 2013) y puede estar constituida por un producto químico orgánico de síntesis como los hidrocarburos o grasas y aceites procedentes de materias primas vegetales (Muñoz y Alfaro, 2007).

Las emulsiones poseen diversas aplicaciones en distintos campos, siendo las emulsiones alimentarias las más difíciles de estudiar debido a sus microestructuras y a los factores que afectan su estabilización (Garti, 1999).

Existen dos tipos de emulsiones comúnmente desarrolladas para encapsular compuestos lipofílicos y que difieren principalmente de acuerdo al método de elaboración usado para elaborarlas: microemulsiones y nanoemulsiones (McClements, 2012).

### **2.1.1. Microemulsiones.**

Una microemulsión aceite en agua (O/W) es definida como una dispersión coloidal termodinámicamente estable de pequeñas partículas esféricas (McClements, 2012). Se caracterizan por la baja tensión interfacial existente entre las fases inmiscibles, pudiendo formarse espontáneamente mediante auto ensamblaje termodinámico (Mason *et al.*, 2006), sin embargo en la práctica puede ser necesario aplicar temperatura o agitación (McClements, 2012). Una microemulsión es termodinámicamente estable bajo condiciones particulares de composición y temperatura. Si estas condiciones son alteradas, la microemulsión pierde estabilidad (McClements, 2011). Morfológicamente, las microemulsiones pueden estar constituidas por fases laminares, hexagonales o esféricas (Mason *et al.*, 2006).

### **2.1.2. Nanoemulsiones.**

Una nanoemulsión aceite en agua (O/W) es definida como una dispersión coloidal consistente de dos líquidos inmiscibles con uno de ellos dispersado como pequeñas gotas esféricas ( $r < 100$  nm) en el otro (McClements, 2012). Mason *et al.* (2006) señalan que a diferencia de las microemulsiones, las nanoemulsiones requieren una fuerza mecánica de alto cizallamiento para generar disrupción de gotas grandes en gotas más pequeñas.

Debido al pequeño tamaño de partícula de las nanoemulsiones, estas tienen un número de ventajas sobre los otros tipos de emulsiones: (a) mejor estabilidad gravitacional (Mason *et al.*,

2006), (b) apariencia transparente o transluciente según el tamaño (McClements y Li, 2010) y (c) incremento en la biodisponibilidad de compuestos lipofílicos debido a la composición y microestructura de los sistemas de liberación (Golding *et al.*, 2011).

Las nanoemulsiones son sistemas atractivos para uso farmacéutico, ya que debido al tamaño de gota extremadamente pequeño, se pueden utilizar en sistemas de transferencia rápida de principios activos (Huang *et al.*, 2010). Además, se ha incrementado el uso de ellas en la industria de alimentos y bebidas debido a sus propiedades físicoquímicas y funcionales, tales como la alta eficiencia de encapsulación y biodisponibilidad, baja turbidez, y la alta estabilidad física (Qian y McClements, 2011).

#### **2.1.2.1. Desarrollo de nanoemulsiones mediante homogeneización de alta presión.**

La elaboración de nanoemulsiones puede ser realizada ya sea por métodos de alta o baja energía. Entre los métodos de alta energía se encuentra la homogeneización de alta presión, la cual es capaz de generar partículas de muy pequeño tamaño mediante intensas fuerzas mecánicas disruptivas (Qian y McClements, 2011). Para tal efecto, la homogeneización de alta presión es más efectiva en la reducción de tamaño en emulsiones creadas previamente, por lo tanto las emulsiones son producidas en un homogeneizador de alto cizallamiento y luego son sometidas a homogeneización de alta presión (McClements, 2011).

#### **2.2. Emulsionante.**

Un emulsionante es una molécula de alto o bajo peso molecular de carácter anfifílico, que tiende a migrar y adsorberse rápidamente en la interfase aceite-agua, favoreciendo la formación de gotas con un menor consumo de energía, y por lo tanto la formación de la emulsión (Muñoz y Alfaro, 2007; Huang *et al.*, 2010). Pequeñas moléculas surfactantes iónicas y no iónicas son comúnmente usadas para estabilizar emulsiones (Rao y McClements, 2012), sin embargo, también es posible mejorar la estabilidad de emulsiones mediante la incorporación de

biopolímeros (McClements *et al.*, 2009). Para que un polímero sea un agente emulsionante, este debe tener propiedades superficiales o tensioactivas, es decir, debe tener la capacidad de reducir la tensión interfacial aceite-agua sustancialmente y de manera rápida cuando esté presente a las concentraciones típicamente usadas durante la emulsificación (Dickinson, 2003). Según McClements (1999) las dos funciones más importantes del emulsionante durante el proceso de homogenización son: (1) Disminuir la tensión interfacial entre el aceite y la fase acuosa, por lo tanto reducir la cantidad de energía necesaria para la disrupción de las gotas y (2) Formar una capa protectora alrededor de las gotas lo cual previene la coalescencia entre ellas.

Biopolímeros como proteínas y polisacáridos contribuyen en las propiedades de estructura y textura de emulsiones, ya que ambos son buenos ejemplos de emulsionantes/estabilizadores comúnmente encontrados en la industria alimenticia y farmacéutica (Dickinson, 2003; Bouyer *et al.*, 2012).

### **2.2.1. Biopolímeros como emulsionantes.**

#### **2.2.1.1. Emulsiones estabilizadas con proteína.**

Muchas proteínas son moléculas de superficie que pueden ser usadas como emulsionante, debido a la capacidad de adsorberse en la interfase aceite-agua e incrementar la estabilidad de la emulsión, y producir propiedades fisicoquímicas deseables en emulsiones aceite en agua (O/W) (Bouyer *et al.*, 2012; Evans *et al.*, 2013). En una fase acuosa, una proteína está rodeada primariamente por moléculas de agua, pero en la interfase aceite-agua de la emulsión, la proteína se encuentra rodeada por moléculas de agua en un lado y por moléculas de aceite por el otro, lo que provoca cambios sustanciales en su conformación para maximizar el número de interacciones favorables y minimizar las condiciones desfavorables producidas por los cambios moleculares de su entorno (Freer *et al.*, 2004; McClements, 2004). Se ha demostrado que biopolímeros como las proteínas, puede reemplazar el uso de surfactantes sintéticos potencialmente tóxicos e irritantes para la piel, ya que logran mayor estabilidad en las emulsiones (Bouyer *et al.*, 2012).



Las proteínas son capaces de estabilizar emulsiones ya que previenen la agregación y coalescencia de las gotas a través de fuerzas repulsivas electrostáticas y/o estéricas. Sin embargo, tienen limitaciones ya que en el punto isoeléctrico de las proteínas, estas tendrán una carga neta cero, produciendo inestabilidad debido a la agregación de partículas (Yin *et al.*, 2012; Evans *et al.*, 2013).

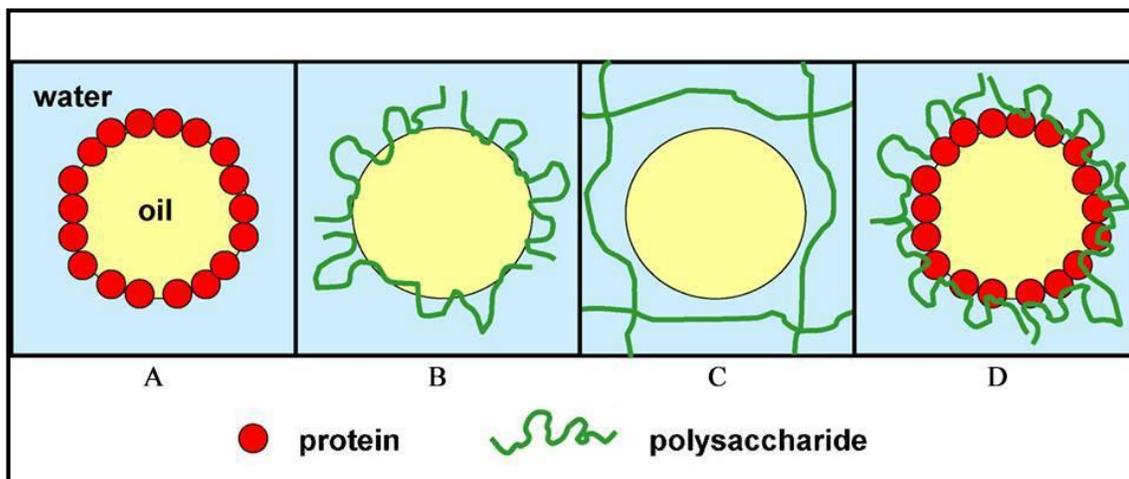
### **2.2.1.2. Emulsiones estabilizadas con Polisacáridos.**

Los polisacáridos son ampliamente usados en la industria alimenticia para estabilizar emulsiones O/W y controlar sus propiedades reológicas. Son conocidos por su capacidad de retención de agua y por sus propiedades espesantes, debido a su carácter hidrofílico y su alto peso molecular (Bouyer *et al.*, 2012). La mayoría de ellos no se adsorben en la interfase aceite-agua, sino que se incorporan en emulsiones O/W mediante el aumento de la viscosidad de la fase continua retardando el movimiento de las gotas, con el objetivo de preservar sus propiedades estructurales (Paraskevopoulou *et al.*, 2005).

### **2.2.1.3. Emulsiones estabilizadas con Complejo Proteína-Polisacárido.**

Muchos biopolímeros o macromoléculas anfifílicas naturales están basados principalmente en proteínas y polisacáridos. La atracción y repulsión son los dos mayores tipos de interacción que ocurren entre las proteínas y polisacáridos en solución y puede resultar en la formación de complejos o inmiscibilidad de los dos biopolímeros (Benichou *et al.*, 2010). Las proteínas son conocidas por sus propiedades emulsionantes y espumantes, y los polisacáridos por su capacidad de retener agua y por sus propiedades espesantes (Dickinson, 2003). La mayoría de las emulsiones están constituidas por combinaciones de polisacárido y proteína. Estos son ingredientes esenciales en la formulación de coloides alimenticios, principalmente debido a la capacidad de variar la textura de los alimentos permitiendo cambiar su vida útil (Ghosh y Bandyopadhyay, 2012). Un ejemplo de ello es la goma arábica, emulsionante ampliamente usado en la estabilización de emulsiones O/W, constituido por un complejo de polisacárido que

contiene ciertas fracciones ricas en proteínas, las cuales han mostrado estar covalentemente enlazadas (Mahendran *et al.*, 2008). La formación y deformación de complejos proteína-polisacárido y su solubilidad dependen de varios factores como la carga, naturaleza de los biopolímeros, pH, fuerza iónica y temperatura del medio (Gosh y Bandyopadhyay, 2011). La interacción electrostática entre el polisacárido y la proteína ocurre bajo condiciones de pH donde ambos tengan cargas opuestas y los complejos formados puedan estar en forma de coacervados/precipitados o solubles dependiendo de la relación de polisacárido-proteína (Vinayahan *et al.*, 2010). El polisacárido puede cambiar las cargas como también aumentar el grosor de la capa interfacial, mejorando la hidrofiliidad y la repulsión estérica de las gotas (Yin *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Representación esquemática de biopolímeros usados como emulsionante. (A) Proteína, (B) y (C) Polisacárido, (D) Complejo Proteína-Polisacárido. Imagen tomada de Bouyer *et al.*, 2012.

### 2.3. Linaza como fuente potencial de bioemulsionante.

La linaza o semilla de lino (*Linum usitatissimum* L.) es rica en compuestos que son benéficos para la salud humana, tales como ácido  $\alpha$ -linolénico, lignanos y polisacáridos, ayudando a reducir el riesgo de desarrollar diversos tipos de enfermedades (Figuerola *et al.*, 2008; Rubilar *et al.*,

2010). Se caracteriza por ser una semilla oleaginosa que contiene aproximadamente 38-45% de aceite dependiendo de la ubicación del cultivo y las condiciones ambientales (Hall *et al.*, 2006).

El aceite de linaza es una excelente ingrediente funcional debido a su alto contenido de ácido  $\alpha$  - linolenico (ALA; C<sub>18:3<sub>n-3</sub></sub>) constituyendo generalmente sobre un 50% del total de ácidos grasos (Rubilar *et al.*, 2012; Gallardo *et al.*, 2013). El ácido  $\alpha$ -linolenico es un importante ácidos graso poliinsaturado (PUFA). Entre los PUFA, la familia más importante son los conocidos omega 3 y omega 6 (n-3 y n-6 respectivamente). Estas dos familias son similares en que ambas incluyen el precursor llamado ALA para n-3 y ácido linoleico (LA; C<sub>18:2<sub>n-6</sub></sub>) para la familia n-6 (Dubois *et al.*, 2007). Se ha demostrado que el consumo regular de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) reduce el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer, enfermedades inflamatorias entre otras (Garg *et al.*, 2006; Astrup *et al.*, 2011).

Las propiedades tecnológicas del mucilago de linaza se relacionan a su capacidad espesante, de hinchamiento y emulsionante, las cuales se asemejan mucho a las de la goma arábiga (Figuerola *et al.*, 2008)

Se ha reportado que el contenido de proteína de la linaza fluctúa entre 20-30% (Coskuner y Karababa, 2007; Figuerola *et al.*, 2008; Rubilar *et al.*, 2010). Sin embargo, este contenido puede variar considerablemente dependiendo del cultivar, del procesamiento de las semillas y principalmente si la semilla es desgrasada, (Oomah y Mazza, 1997), pudiendo alcanzar un porcentaje superior al 80% luego de la extracción de aceite (Wang *et al.*, 2011).

Estudios han demostrado que concentrados de proteína con mucilago (polisacárido) de linaza poseen mejor absorción de agua y aceite, actividad y estabilidad emulsionante comparada a la proteína de soya (Dev y Quensel, 1989). Martínez-Flores *et al.* (2006) reportó un 88,37% de actividad emulsionante utilizando mezclas de proteína y mucilago.

### **3. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO**

#### **3.1. Hipótesis.**

Las proteínas y/o polisacáridos obtenidos desde la semilla de linaza proporcionan estabilidad a nanoemulsiones (O/W) producidas a través de homogeneización de alta presión.

La cubierta de las gotas lipídicas con una capa de bioemulsionante de linaza, específicamente complejo de proteína-polisacárido, mejora la estabilidad del aceite nanoencapsulado, por lo tanto, lo protege contra la oxidación.

#### **3.2. Objetivo general.**

Estudiar la formación y estabilidad de micro/nanoemulsiones (O/W) estabilizadas con biopolímeros extraídos desde la semilla de linaza.

#### **3.3. Objetivos específicos.**

Caracterizar químicamente las fracciones de biopolímeros extraídos de linaza y determinar sus propiedades emulsionantes.

Determinar a través de un diagrama de fases ternario (agua, aceite y biopolímero seleccionado) las composiciones que forman emulsiones estables y estudiar el comportamiento de estas frente a diferentes factores ambientales.

Estudiar el efecto de la concentración de emulsionante y de la homogeneización de alta presión sobre la estabilidad estructural y oxidativa de nanoemulsiones.

## 4. METODOLOGÍA

Los experimentos se realizaron en la Unidad de Tecnología y Procesos del departamento de ingeniería química, de la Universidad de La Frontera. La materia prima utilizada fue semilla de linaza variedad café obtenida en el comercio local (Casa de Campo, Temuco). A partir de la semilla de linaza, se extrajo la goma o mucílago (polisacárido) que se encuentra asociado a la cáscara del grano, obteniendo de este modo las fracciones de proteína y mucílago por separado. Por otro lado, se extrajo proteína y mucílago en forma simultánea desde la semilla molida, para obtener directamente una fracción de complejo proteína-mucilago. Posteriormente, se evaluaron las propiedades emulsionantes de estos biopolímeros y su estabilidad respecto a factores ambientales: tiempo, pH, fuerza iónica y temperatura.

### 4.1. Extracción de biopolímeros a partir de linaza.

El procedimiento para la extracción y purificación parcial de biopolímeros desde la semilla de linaza fue llevado a cabo según el protocolo descrito por Hall *et al.* (2006) con algunas modificaciones.

#### 4.1.1. Extracción de Mucílago.

La separación de mucilago desde la semilla de linaza fue realizada por extracción acuosa en agua destilada en una relación 1:13, ajustando el pH entre 6,0 y 7 bajo agitación constante. Luego se elevó la temperatura de la mezcla hasta 70 °C y posteriormente se dejó en agitación a 300 rpm durante 3 horas a temperatura ambiente. Finalmente se extrajo el mucilago, el cual fue filtrado a través de una gasa. La extracción de mucilago se repitió dos veces. Luego el mucílago filtrado fue secado en bandeja a una temperatura de 45°C por 12 horas.

#### 4.1.2. Extracción de Proteína.

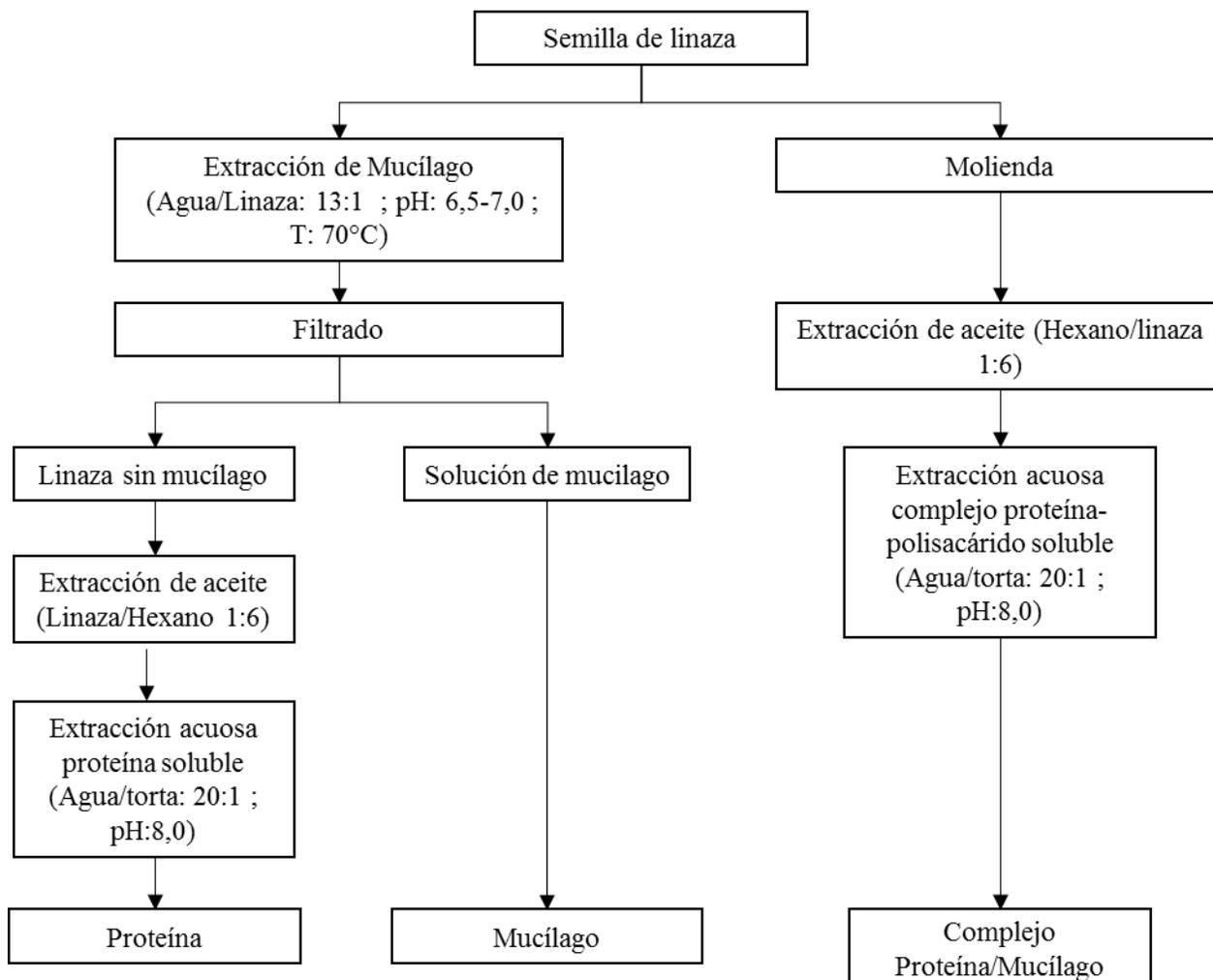
En una segunda etapa se aisló la proteína obtenida desde la semilla seca (sin mucílago), para lo cual se molió la semilla seca y se desgrasó dos veces con hexano en una relación 1:6 (Wang *et al.*, 2011). La solubilización de la proteína se realizó usando el método de Adebowale con algunas modificaciones (Adebowale *et al.*, 2007). La semilla desgrasada o torta de linaza obtenida, fue solubilizada en agua destilada en una relación 1:20, ajustando a pH 8. La solución fue centrifugada a 6000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante obtenido con la proteína solubilizada fue secado en bandeja a 45°C durante 12 horas.



**Figura 2.** Extracción de polisacárido de linaza (mucílago) a 70 °C.

#### 4.1.3. Extracción de complejo proteína-mucílago.

Las condiciones para la extracción y desgrasado de complejo proteína-mucílago fueron las mismas que para la extracción de proteína, con la diferencia que no se realizó la extracción de mucílago desde la semilla.



**Figura 3.** Esquema para la extracción de fracciones de biopolímero.

## 4.2. Caracterización química de biopolímeros.

### 4.2.1. Análisis Proximal.

Se realizó una determinación de la composición química de los biopolímeros extraídos: proteína, mucílago y complejo proteína-mucílago según los métodos oficiales de la AOAC (1990). Los parámetros estudiados fueron: porcentaje de humedad, extracto etéreo, fibra bruta, cenizas, proteína y extracto no nitrogenado de las muestras. Cada parámetro de análisis se realizó por duplicado.

#### 4.2.1.1. Humedad.

La humedad de las muestras se determinó por el método de gravimetría, por diferencia entre la masa inicial a temperatura ambiente y la masa resultante de la muestra llevada a desecación en estufa a 105 °C hasta peso constante por un lapso de 3 horas, mediante la ecuación 4.1.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Masa inicial} - \text{Muestra seca}}{\text{Masa inicial}} \times 100 \quad (4.1)$$

#### 4.2.1.2. Ceniza.

El contenido de cenizas totales se determinó mediante el método de incineración de las muestras a temperaturas de 525-550° C. Para ello, se pesaron con precisión 0,5g de muestra seca en capsulas de incineración. Las muestras fueron incineradas en mechero Bunsen y luego en una mufla a 550° C durante 5 horas hasta peso constante. El contenido de cenizas se calculó por diferencia de masa en una balanza analítica, mediante la ecuación 4.2.

$$\% \text{ Cenizas totales} = \frac{\text{g de cenizas}}{\text{g de muestra seca}} \times 100 \quad (4.2)$$

#### 4.2.1.3. Extracto etéreo.

Se determinó el contenido de extracto etéreo (lípidos) de muestras previamente deshidratadas mediante diferencia de masa en balanza analítica. La extracción de lípidos se realizó con éter de petróleo (40-60° C) mediante un equipo Soxhlet durante 5 a 6 horas. Luego se eliminó el solvente del balón evaporándolo con un rotavapor y desecando el residuo en estufa a 105° C por una hora. Transcurrido ese tiempo, se dejó enfriar el balón con la muestra en un desecador y se pesó. El contenido de extracto etéreo se calculó según la ecuación 4.3.

$$\% \text{ Extracto etéreo} = \frac{(\text{Peso del balón} + \text{grasa}) - (\text{Peso del balón})}{\text{Peso muestra inicial}} \times 100 \quad (4.3)$$



#### 4.2.1.4. Fibra Bruta.

Para el contenido de fibra bruta se pesaron 2g de muestra seca y desgrasada, que se vaciaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL donde se agregaron 250mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,255 N hirviendo más gotas de alcohol amílico como medio antiespumante. Se adaptó al matraz una varilla de vidrio con tapón de goma y se colocó sobre placa calefactora por 30 min agitando constantemente para mantener una ebullición controlada. El contenido del matraz fue filtrado al vacío con un trozo de gasa. El residuo seco se arrastró con 250 mL de NaOH 0,313 N hirviendo y la mezcla obtenida se hirvió nuevamente en un matraz de 500 mL, repitiendo lo anterior y filtrando al vacío con papel filtro previamente tarado. El papel filtro con el residuo se secó en la estufa por 30 min a 105 ° C y posteriormente se pesó en la balanza. El porcentaje de fibra se obtuvo según la ecuación 4.4

$$\% \text{ Fibra Bruta} = \frac{(\text{peso papel} + \text{extracto}) - (\text{peso papel})}{\text{peso muestra inicial}} \times 100 \quad (4.4)$$

#### 4.2.1.5. Proteína.

El contenido de proteína se determinó mediante método Kjeldhal, cuantificando el nitrógeno orgánico presente en las muestras. Se pesó 0,5 g de muestra seca, los cuales fueron digeridos en tubos Kjeldhal en unidad digestora (BÜCHI K-424) con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en presencia de CuSO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:10) como catalizador. La digestión se realizó durante aproximadamente 2 h hasta que la solución se observó clara. Una vez retirados los tubos de la unidad digestora, se enfriaron a temperatura ambiente y se adicionaron 50 mL de agua destilada a cada tubo con muestra digerida. Luego los tubos Kjeldhal se ubicaron en la unidad de destilación (BÜCHI 323) donde las muestras fueron alcalinizadas con 50 mL de NaOH 40% p/v y el condensado se recibió en 50mL de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 4% p/v en presencia de 0,5 mL de indicador mix (rojo + verde bromocresol). Finalmente se procedió a titular la solución obtenida con HCl 0,1 N con la ayuda de una bureta. El porcentaje de proteína se calculó según la ecuación 4.5.

$$\% \text{ Proteína} = \frac{(V_{\text{HCl}} - V_{\text{Blanco}}) \times N_{\text{HCl}} \times PM_{\text{N}}}{M} \times 100 \times 6,25 \quad (4.5)$$

Donde:

$V_{\text{HCl}}$ : Volumen de ácido clorhídrico gastado en la titulación de la muestra (mL)

$V_{\text{Blanco}}$ : Volumen de ácido clorhídrico gastado en la titulación del blanco (mL)

$N_{\text{HCl}}$ : Normalidad del ácido clorhídrico

$PM_{\text{N}}$ : Peso molecular del nitrógeno

M: Masa de la muestra (mg)

#### **4.2.1.6. Extracto no nitrogenado.**

El extracto no nitrogenado se estableció por diferencia luego de sumar los porcentajes de fibra bruta, extracto etéreo, proteína y cenizas. La cantidad resultante se restó de 100.

#### **4.2.2. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).**

La espectroscopia infrarroja fue usada para determinar los grupos funcionales y enlaces químicos presentes en las tres fracciones de biopolímero de linaza. El análisis fue realizado según la metodología descrita por Rubilar *et al.* (2011) usando 0,1 mg de muestra liofilizada de cada fracción que fueron mezclados con 100mg de KBr. El espectro FTIR fue obtenido usando espectrofotómetro de infrarrojo Bruker tensor 27 FT-IR.

#### **4.2.3. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).**

Se realizó una cuantificación del perfil de aminoácidos de la fracción de proteína de linaza mediante HPLC. La presencia de altas concentraciones de carbohidratos, lípidos, vitaminas o sales inorgánicas presentes en las muestras puede interferir con el método de análisis. Fue necesario por lo tanto hidrolizar las muestras para obtener un análisis representativo. El perfil de aminoácidos se determinó por HPLC acoplada a detector UV (626 LC System, Columna AccQ – Tag). Para el análisis se utilizaron muestras liofilizadas de proteína de linaza. Se hidrolizaron y

diluyeron las muestras de acuerdo al método AccQ-Tag con modificaciones (Waters AccQ-Tag Solutions): Se pesó 0,1g de cada muestra por duplicado en tubos de ensayo y se mezclaron con 5ml de HCl 6N + Fenol 0.1%. Posteriormente se agregó nitrógeno gaseoso a los tubos y se dejaron reposar por 18 horas a 115°C en una placa en oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo, se enfriaron y filtraron las muestras, y la solución se agregó a un matraz aforado con agua desionizada a 250mL. Se calcularon las concentraciones de aminoácidos, con respecto al estándar interno (2,5 mM de ácido  $\alpha$ -aminobutírico). Finalmente los aminoácidos de la muestra se evaluaron con respecto al tiempo de retención (min) del estándar anteriormente mencionado.

### **4.3. Caracterización físico química de los Biopolímeros.**

#### **4.3.1. Potencial Zeta.**

Se determinó la carga eléctrica (Potencial Zeta) de las tres fracciones de biopolímero mediante dispersión de luz dinámica y movilidad electroforética (Mediante ecuación de Henry), utilizando para ello el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Estos valores fueron determinados en función a variaciones de pH, concentración p/v, fuerza iónica y temperatura de las fracciones para evaluar su estabilidad.

##### **4.3.1.1. Preparación de muestras.**

Se prepararon soluciones acuosas de las tres fracciones de biopolímero en tubos de ensayo a una concentración de 2% p/v para evaluar el comportamiento de frente a variaciones de pH, fuerza iónica y temperatura. Para ello se ajustó el pH de las tres fracciones en un rango de pH de 2-10 utilizando soluciones de NaOH 1M y HCl 1M.

Por otra parte, se evaluó el comportamiento de las fracciones de biopolímero frente a variaciones de fuerza iónica, en un rango de 0-500 mM de NaCl. Para ello, se preparó una solución madre de NaCl 5M de la cual se hicieron las diluciones necesarias para obtener cada concentración evaluada. Las soluciones obtenidas se ajustaron a pH 7.

Respecto al comportamiento frente a la variación de temperatura, se evaluó un rango de

temperatura de 4-75 °C. Las soluciones fueron sometidas a las distintas temperaturas durante 1 hora. Finalmente se evaluaron distintas concentraciones (0,0625-1% p/v) para cada fracción de biopolímero. Las soluciones obtenidas se ajustaron a pH 7.

Una vez preparadas las soluciones, se realizó la medición de Potencial Zeta, para lo cual las muestras evaluadas fueron diluidas en agua destilada previamente al análisis (1:100) para evitar efectos de dispersión múltiple. La muestra diluida fue depositada en cubetas DTS-1060 (Malvern). Se realizaron tres lecturas por muestra.



**Figura 4.** Zetasizer Nano Zs (Malvern Instruments).

#### **4.4. Caracterización de emulsiones.**

##### **4.4.1. Emulsiones con distintos tipos de Aceite.**

Se preparó una solución de proteína de linaza 2% p/v ajustada a pH 7 como emulsionante, y la fase oleosa correspondiente a distintos tipos de aceites vegetales: Aceite de Canola, Aceite de Maravilla, Aceite de Soya, Aceite de Linaza, Aceite de Oliva y una Mezcla de aceites 64% aceite de soya y 28% aceite de maravilla. De este modo se evaluó cuál de ellos presentó mejor desempeño para formular emulsiones. Se mezclaron el emulsionante y la fase oleosa según la metodología de Portilla-Rivera *et al.* (2008) con modificaciones, utilizando ambos componentes en la misma proporción (1:1). Estos componentes fueron homogenizados en tubos de ensayo en vórtex (2850 rpm) durante 3 min. Se dejaron reposar las emulsiones por una hora, y luego se

midió la capacidad emulsionante del tiempo inicial o tiempo cero ( $T_0$ ) y posteriormente a las 24 horas ( $T_{24}$ ) según la ecuación 4.6.

#### **4.4.2. Emulsiones con distinta fracción de biopolímero.**

Se realizaron emulsiones evaluando las tres fracciones de biopolímero de linaza (proteína, mucílago y complejo proteína/mucílago) a distintas concentraciones (2-5% p/v), las cuales fueron formuladas con el aceite seleccionado según el paso anterior. La metodología para la preparación de emulsiones fue la misma indicada en el punto 4.4.1.

#### **4.4.3. Capacidad y estabilidad emulsionante de las emulsiones.**

La capacidad emulsionante (C.E) y la estabilidad emulsionante (E.E) son dos características funcionales importantes de las proteínas que afectan el comportamiento de varios productos industriales, incluyendo adhesivos, cosméticos y alimentos (Cano-Medina *et al.*, 2011). Un criterio citado para identificar un bioemulsionante es su capacidad de mantener al menos el 50% del volumen original de la emulsión luego de su formación (Portilla-Rivera *et al.*, 2008).

Se midió el porcentaje de capacidad emulsionante de las emulsiones luego de 24 horas de su formación (%C.E<sub>24</sub>) según Wang y Kinsella, (1976) y el porcentaje de estabilidad emulsionante (%E.E<sub>24</sub>) según Portilla-Rivera *et al.* (2008). Se utilizaron las ecuaciones 4.6 y 4.7 respectivamente. Para calcular el %E.E<sub>24</sub> se consideraron valores de %C.E a  $T_0$  y  $T_{24}$  de las emulsiones.

Una vez completo el análisis, se determinó cuál es el aceite y la fracción de linaza indicada para ser usados como fase oleosa y emulsionante respectivamente.

$$CE (\%) = \frac{\text{Altura de la fase emulsionada (cm)}}{\text{Altura total (cm)}} \times 100$$

**(4.6)**

$$ES (\%) = \frac{CE T_{24}}{CE T_0} \times 100 \quad (4.7)$$

#### 4.4.4. Diagrama de fases ternario.

Se determinaron las cantidades efectivas de los componentes requeridos para desarrollar emulsiones estables a través del diseño de un diagrama de fases ternario, el cual fue construido con emulsiones preparadas usando diferentes proporciones de los tres componentes requeridos: agua (0-96%), aceite de Linaza (1-97%) y emulsionante seleccionado (Complejo proteína-mucilago) (1-5%). El diagrama fue representado como un triángulo equilátero. Cada lado del triángulo fue dividido en 100 partes correspondiente al porcentaje de cada componente y cada esquina representó el 100% de ellos.

Se establecieron 8 puntos de rastreo con distintos porcentajes para cada componente. Las emulsiones fueron preparadas según Marqués *et al.* (2009) con modificaciones, pesando cada componente en el siguiente orden: la cantidad requerida de complejo proteína/mucílago se pesó en tubos de ensayo, mezclado con la cantidad necesaria de agua desionizada hasta su disolución. En seguida, se agregó aceite de linaza hasta completar 1g de peso en cada tubo. Se taparon los tubos y se agitaron vigorosamente en vórtex durante 2 minutos. Las emulsiones obtenidas se dejaron reposar a temperatura constante (25° C) en baño María. El experimento se llevó a cabo durante 18 días agregando agua desionizada (5% del peso de la emulsión) y agitando cada tubo por 2 minutos en vórtex cada 24 horas, evaluando diariamente su capacidad emulsionante. Los diferentes puntos rastreados inicialmente se muestran en la Tabla 1. Cada punto de rastreo se analizó por duplicado.

**Tabla 1.** Porcentajes iniciales de los componentes de la emulsión para rastrear zonas de estabilidad emulsionante: Aceite, complejo proteína-polisacárido y agua.

Aceite de linaza	Complejo Proteína-Mucilago	Agua
97,50	2,50	0,00
90,00	5,00	5,00
60,00	5,00	35,00
39,37	5,00	55,00
20,00	5,00	75,00
10,00	5,00	85,00
5,00	5,00	90,00
2,50	5,00	92,50

#### **4.4.4.1. Replica de puntos estables de diagrama de fases ternario.**

Se replicaron 3 puntos extraídos desde de la zona de estabilidad obtenida luego de realizar el diagrama de fases ternario, con el objetivo de validar el comportamiento de la capacidad emulsionante de ellos frente a variaciones de temperatura, pH y fuerza iónica y escoger un punto para los análisis posteriores.

#### **4.4.4.2. Análisis microscópico de emulsiones.**

Se analizó la estructura microscópica de la emulsión escogida según el punto anterior, utilizando microscopía óptica (Olympus BX43). La emulsión fue agitada suavemente en vórtex previamente al análisis. Una gota de emulsión fue depositada sobre un portaobjeto, donde se mezcló con una gota de solución de rojo nilo, para la tinción de gotas de aceite.

#### 4.5. Desarrollo de nanoemulsiones.

Se elaboraron nanoemulsiones estabilizadas con la fracción de complejo proteína-mucílago como emulsionante, utilizando la concentración previamente seleccionada a partir de los resultados obtenidos del diagrama de fases ternario versus concentraciones comúnmente usadas para emulsionantes comerciales (0,2-1%). La Tabla 2 muestra el detalle de las concentraciones evaluadas. El primer paso fue realizar las emulsiones según la concentración mencionadas anteriormente: Los tres componentes fueron mezclados mediante agitación constante y la mezcla obtenida fue ajustada a pH 7. El segundo paso fue obtener microemulsiones mediante un equipo de homogeneización de alta velocidad 400DS Benchtop homogenizer, (PRO Scientific) donde las mezclas fueron sometidas a 5000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las microemulsiones obtenidas fueron sometidas a un equipo de homogeneización de alta presión Panda plus 2000, (Gea Niro Soavi) donde se realizaron dos pasos de homogeneización (1000 bar). La Figura 5 muestra los equipos utilizados en la elaboración de nanoemulsiones.

**Tabla 2.** Concentraciones usadas para la elaboración de nanoemulsiones.

Complejo Proteína- Mucílago (% p/p)	Aceite de Linaza (% p/p)	Agua (% p/p)
5%	5%	90%
1%	5%	94%
0,5%	5%	94,5%
0,2%	5%	94,8%





**Figura 5.** A, Homogeneizador de alta velocidad 400DS Benchtop homogenizer, (PRO Scientific); B, Homogeneizador de Alta presión Panda plus 2000, (Gea Niro Soavi)

#### **4.5.1. Estabilidad de nanoemulsiones.**

##### **4.5.1.1. Potencial Zeta y tamaño de partícula de nanoemulsiones.**

Luego de realizadas las nanoemulsiones bajo las distintas variaciones antes mencionadas, se evaluó la estabilidad de ellas mediante la determinación de valores de Potencial Zeta y el tamaño de partícula en el equipo Zetasizer Nano Zs (Malvern Instruments). La metodología llevada a cabo fue la descrita en el punto 4.3.1.1.

##### **4.5.1.2. Estabilidad Oxidativa de las nanoemulsiones.**

Para determinar la estabilidad oxidativa de las nanoemulsiones se llevó a cabo un Test de Rancimat (Modelo 743, Metrohm). Para ello se fijó la temperatura del equipo a 100 °C y se midieron muestras de nanoemulsiones a distintas concentraciones por duplicado. Las muestras fueron sometidas a un flujo de aire de 20 L/h. El flujo de aire producido arrastra los productos de oxidación volátiles (principalmente ácidos fórmicos) hasta la solución de medición (agua destilada). Mediante el registro continuo de conductividad se construyeron curvas de oxidación

cuyo punto de inflexión se designa como tiempo de inducción y representa la magnitud para la estabilidad de la oxidación.

#### **4.5.1.3. Análisis de Microscopia óptica de nanoemulsiones.**

Se analizó la microestructura de las nanoemulsiones obtenidas de acuerdo a la metodología descrita en el punto 4.4.4.2.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Caracterización química preliminar de biopolímeros de linaza.

#### 5.1.1. Composición química de los biopolímeros.

Mediante el análisis de composición química de la Tabla 3, se demostró que las tres fracciones en estudio están principalmente compuestas por proteína y carbohidratos (Extracto No Nitrogenado). La fracción proteína de linaza está compuesta por un 70,6% (p/p) de proteína, la fracción mucílago contiene aproximadamente un 70,3% (p/p) de polisacárido y el complejo proteína-mucílago, posee un 47,2 y un 37,9% (p/p) de proteína y polisacárido, respectivamente. Los porcentajes obtenidos demuestran la efectividad del método utilizado para la separación parcial de las tres fracciones estudiadas.

**Tabla 3.** Composición química de las diferentes fracciones de semilla linaza (de acuerdo a metodología oficial de la AOAC, 1990).

Parámetros (%)	Fracción proteína	Fracción mucílago	Fracción proteína-mucílago
Humedad	7,46 ± 0,07	7,71 ± 0,18	7,40 ± 0,23
Materia grasa	2,99 ± 0,06	0,79 ± 0,12	5,76 ± 1,35
Proteína (N*6,25)	70,60 ± 0,03	11,30 ± 0,15	47,20 ± 0,23
Fibra cruda	0,00 ± 0,00	3,35 ± 0,42	1,07 ± 0,08
Cenizas	5,81 ± 0,42	14,27 ± 1,51	8,09 ± 0,11
Extracto no nitrogenado	20,60	70,29	37,88

Los datos son presentados como promedios ± desviación estándar.

Según Figuerola *et al.* (2008) el contenido de proteína en la mayoría de los cultivares de linaza fluctúa entre 22,5 y 31,6% (p/p). La fracción concentrada alcanzó un 70,6% de proteína como se aprecia en la Tabla 3. De acuerdo a Omaah y Mazza (1997) esta diferencia de valores se puede atribuir a las condiciones de procesamiento realizadas a la semilla de linaza, tales como el descascarado y/o desgrasado. Por otra parte, se ha reportado que el contenido de proteína de linaza se puede ver afectado por el contenido de mucílago. Dev y Quensel (1988) determinaron

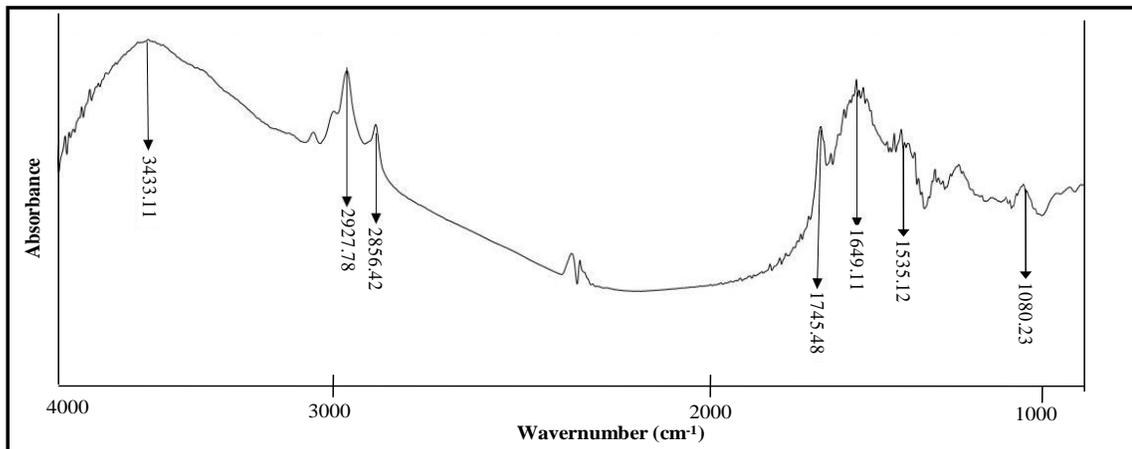
que un concentrado proteico con alta cantidad de mucilago (HMPC) obtuvo un contenido de proteína mucho menor a un aislado proteico con baja cantidad de mucilago (LMPI) alcanzando porcentajes de 65,5 y 86,6% (p/p), respectivamente. Igualmente, Wang *et al.* (2011) observó un 87,25% (p/p) de contenido de proteína para un concentrado proteico de linaza sin mucilago. Estos resultados fueron consistentes a los observados en la Tabla 3, donde se observa una diferencia en el porcentaje de proteína entre la fracción de proteína-mucilago respecto a la fracción parcialmente purificada (fracción proteína).

El 2,99% (p/p) de materia grasa obtenido para la fracción proteína, se acerca al 2,43% de materia grasa para el concentrado proteico reportado por Wang *et al.* (2011) bajo las mismas condiciones de desgrasado de la semilla para ambos casos.

### **5.1.2. Identificación de los grupos funcionales del complejo proteína-mucilago mediante FTIR.**

La composición molecular de las tres fracciones (proteína, mucilago y complejo proteína-mucilago), fueron evaluados mediante Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR). Todos los espectros obtenidos mostraron esencialmente las mismas bandas de absorción, sin embargo el complejo proteína-mucilago demostró ser la fracción más abundante, cuyo espectro se representa en la Figura 4. El espectro infrarrojo de las fracciones mostró un *peak* de absorción a  $3433\text{ cm}^{-1}$  y  $1649\text{ cm}^{-1}$  que sugieren la presencia de grupos aminos en las proteínas ( $\text{NH}_3$ ). La absorción cercana a  $2927\text{ cm}^{-1}$  se asoció a valores característicos de grupos  $-\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  correspondiente a cadenas alifáticas. Las bandas de absorción a  $1745\text{ cm}^{-1}$  y  $1463\text{ cm}^{-1}$  indican la presencia de grupos ester carbonilo (C-O en COOH). Similares bandas de absorción fueron observadas por Jiang *et al.* (2013) en semilla de Raps.

De acuerdo a Rodrigues *et al.* (2006) bandas de absorción observadas a  $1535\text{ cm}^{-1}$  corresponden a grupos N-H en proteínas, y bandas observadas a  $1080\text{ cm}^{-1}$  a bandas características de polisacáridos. Bandas de absorción similares se observaron para la fracción de complejo proteína-mucilago.



**Figura 6.** Espectro FT-IR producido por complejo Proteína-Mucilago.

### 5.1.3. Perfil de aminoácidos de las fracciones de proteína mediante HPLC.

La Tabla 4 muestra el perfil de aminoácidos obtenido mediante HPLC. Se encontraron básicamente los mismos aminoácidos entre las fracción de proteína y el perfil de aminoácido descrito por Wanasundrara y Shahidi (1994). Los aminoácidos más abundantes en la fracción de proteína fueron el ácido glutámico, seguida por el ácido aspártico y la arginina, lo cual concuerda con el perfil de aminoácidos descrito por Hall *et al.* (2006) quienes señalan que la proteína de linaza es relativamente rica en arginina, ácido aspártico y ácido glutámico, mientras los aminoácidos limitantes son metionina y cisteína. La abundancia de estos aminoácidos concuerda con los resultados obtenidos por Wanasundrara y Shahidi (1994).

Ciertos aminoácidos esenciales para el consumo humano, tales como lisina, isoleucina y fenilalanina, alcanzaron valores para la fracción de proteína similares a los valores de la Harina de soya (Morris, 2007), cuya proteína es considerada una de las más nutritivas.

**Tabla 4.** Perfil de aminoácidos para la fracción proteica de linaza (g/100g de proteína)

Aminoácidos	Proteína	Wanasundara y Shahidi (1994)
Ácido Aspártico	7,06 ± 0,32	9,18
Serina	2,55 ± 0,22	4,94
Acido glutámico	44,50 ± 1,74	16,70
Glicina	5,93 ± 0,69	6,44
Histidina	NR	2,69
NH3	1,18 ± 0,22	NR
Arginina	5,22 ± 0,61	11,50
Treonina	0,90 ± 0,14	3,40
Alanina	3,22 ± 0,22	4,81
Prolina	1,51 ± 0,17	3,64
Cisteína	NR	3,29
Tirosina	2,33 ± 0,17	2,21
Valina	2,51 ± 0,27	5,75
Metionina	0,98 ± 1,39	1,45
Lisina	3,24 ± 0,21	4,38
Isoleucina	2,34 ± 0,27	4,78
Leucina	4,35 ± 0,37	6,70
Fenilalanina	3,55 ± 0,25	5,13

NR: No reportado

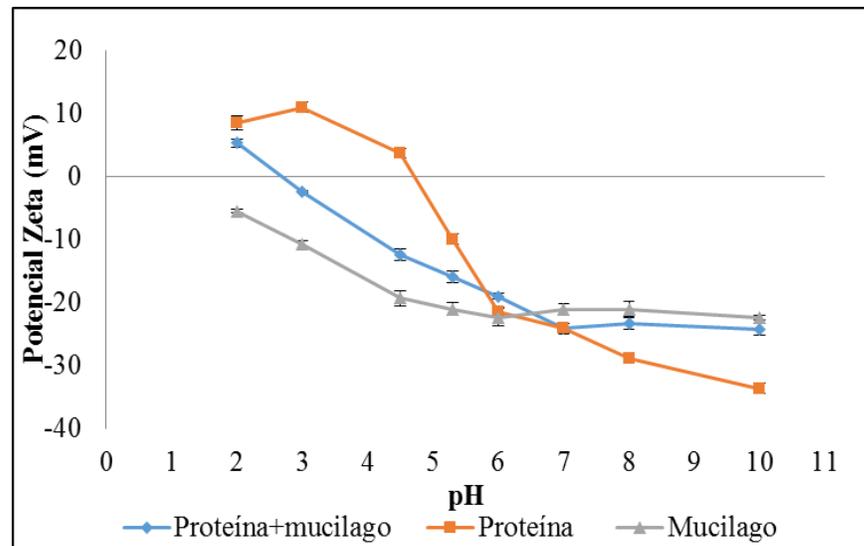
## 5.2. Caracterización fisicoquímica de biopolímeros.

Las fracciones de mucílago, proteína y linaza, fueron caracterizadas por la determinación de sus cargas eléctricas, en función a variaciones de pH, fuerza iónica, y concentración.

Los valores de Potencial Zeta están relacionados a la estabilidad de las emulsiones, la cual puede ser influenciada por las cargas eléctricas interfaciales de las partículas. Valores bajos de Potencial Zeta (cerca de cero) indican una rápida floculación de la emulsión (Kim *et al.*, 2012), por el contrario, valores altos de Potencial Zeta previenen la agregación de gotas (Bouyer *et al.*, 2011).

### 5.2.1. Potencial Zeta de las fracciones en función a variaciones de pH.

Los valores de Potencial Zeta de las distintas fracciones en función a variaciones de pH (2-10) se muestran en la Figura 7. En ella se muestra que el punto en el cual la carga de la proteína se acercó a cero (pH entre 4 y 4,5) coincide con el punto isoeléctrico (pI) determinado por Wang *et al.* (2011) para proteína de linaza. Además, la proteína de linaza obtuvo un Potencial Zeta positivo por debajo del punto isoeléctrico de pH y negativo a pH superior. Esto es consistente con lo señalado por Piorkowski y McClements, (2013) quienes afirman que las proteínas llevan Potencial Zeta positivo o negativo según el pH del medio en que ellas se encuentren: positivo a valores de pH bajo el punto isoeléctrico y negativo a valores de pH sobre el punto isoeléctrico. Según Lee *et al.* (2011) estos cambios de Potencial Zeta se deben a cambios producidos en los grupos amino y carboxilo de las proteínas, señalando que a pH inferior al punto isoeléctrico, la carga es positiva debido a que grupos amino están cargados positivamente ( $\text{NH}_3^+$ ) y grupos carboxilo se encuentran en estado neutro ( $-\text{COOH}$ ), y que a pH superior al punto isoeléctrico, la carga es negativa ya que los grupos carboxilo están negativamente cargados ( $-\text{COO}^-$ ) y los grupos amino se encuentran en estado neutro ( $-\text{NH}_2$ ).



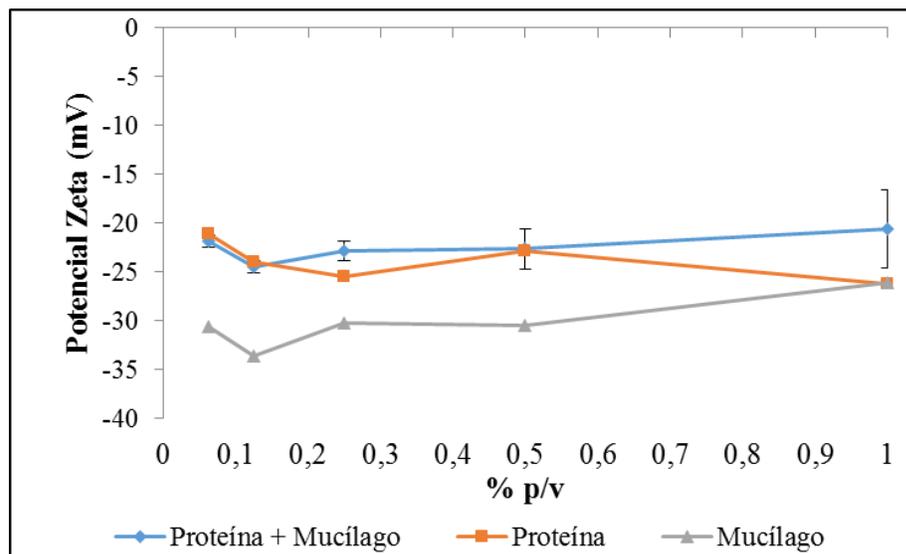
**Figura 7.** Potencial Zeta de las fracciones de linaza en función a variaciones de pH

En cuanto al mucílago, este tuvo carga negativa de Potencial Zeta en todo el rango de pH evaluado, por lo tanto tiene un carácter aniónico. Khalloufi *et al.* (2009) observó el mismo

comportamiento de Potencial Zeta para el mucílago de linaza. Bajo el punto isoeléctrico de pH, el Potencial Zeta del complejo proteína-mucílago fue menos negativo que el mucílago (polisacárido) por sí solo, y más negativo que la proteína por sí sola. Según Yin *et al.* (2012) esto indica la formación de complejos electrostáticos, producidos por las cargas eléctricas opuestas de la proteína y el mucílago. Jones *et al.* (2010) observaron el mismo comportamiento de Potencial Zeta en un complejo de  $\beta$ -lactoglobulina-pectina en función del pH.

### 5.2.2. Potencial Zeta de las fracciones en función a variaciones de concentración p/v.

La Figura 8 muestra el efecto de la concentración (% p/v) sobre el Potencial Zeta de las tres fracciones. Mediante análisis de varianza se demostró que no hubo diferencia estadísticamente significativa de Potencial Zeta respecto al uso de distintas concentraciones de las fracciones ( $p > 0,05$ ). (Anexo 1)



**Figura 8.** Potencial Zeta de las fracciones de linaza en función a variaciones de concentración p/v

Estos resultados concuerdan con el trabajo realizado por Wang *et al.* (2010), quienes no encontraron diferencias de Potencial Zeta para distintas concentraciones de una fracción de proteína y mucílago de linaza (0,5-1,5% p/v).

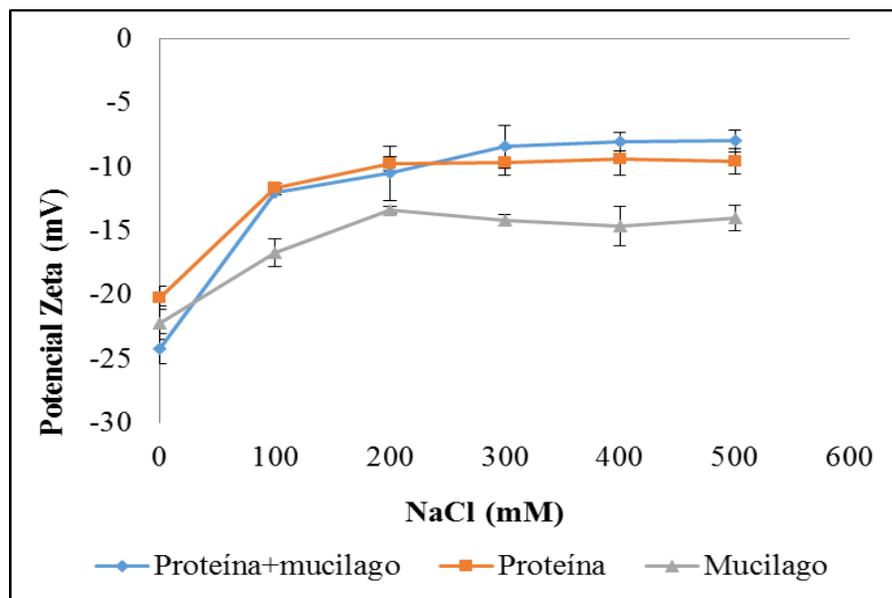


### 5.2.3. Potencial Zeta de las fracciones en función a variaciones de fuerza iónica (NaCl).

La fuerza iónica es de gran importancia en la estabilidad de las emulsiones. Según Laplante *et al.* (2006) altos valores de fuerza iónica pueden inducir la floculación de las gotas si la concentración de electrolitos es alta. En la Figura 9 se muestran los efectos de la variación de fuerza iónica sobre el Potencial Zeta de las fracciones a pH 7.

Mediante análisis de varianza se determinó que existe un efecto de la fuerza iónica sobre el Potencial Zeta de las fracciones, ya que este difiere significativamente respecto al Potencial Zeta en ausencia de NaCl para las tres fracciones estudiadas ( $p \leq 0,05$ ) (Anexo 2).

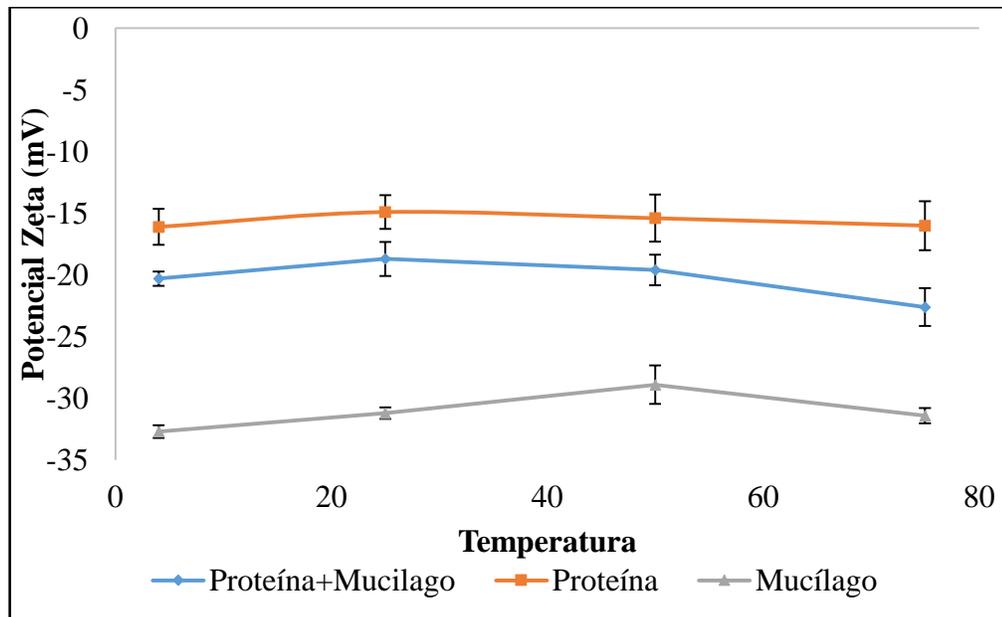
Se observó una importante disminución de Potencial Zeta bajo la presencia de 100 mM de NaCl, producto de la disminución de fuerzas repulsivas entre partículas con carga similar en cada fracción. Estos efectos son similares a los resultados obtenidos por Wang *et al.* (2011) quienes detectaron una disminución de Potencial Zeta entre 0 y 200 mM de NaCl para un aislado proteico de linaza. Lee *et al.* (2011) observaron el mismo efecto sobre un aislado proteico de suero de leche, relacionando esta disminución de Potencial Zeta al incremento en la concentración de sal, puesto que iones  $\text{Na}^+$  en fase acuosa tiende a asociarse a grupos negativamente cargados ( $-\text{COO}^-$ ) debido a atracciones electrostáticas, reduciendo por lo tanto la carga neta de los biopolímeros.



**Figura 9.** Potencial Zeta de las fracciones de linaza en función al aumento de fuerza iónica

#### 5.2.4. Potencial Zeta de las fracciones en función a variaciones de temperatura.

La Figura 10 muestra el Potencial Zeta de las fracciones en función a variaciones de temperatura. En ella se observa que no hubo dependencia de la temperatura sobre el Potencial Zeta de las tres fracciones, lo cual es consistente a lo observado por Wang *et al.* (2011) quienes no observaron diferencias significativas de Potencial Zeta en un aislado proteico de linaza cuando la temperatura fue incrementada desde 25 a 95 °C. Gu *et al.* (2005) observaron el mismo efecto en  $\beta$ -lactoglobulina y  $\beta$ -lactoglobulina-carragenina bajo una variación de 30 a 90 °C.



**Figura 10.** Potencial Zeta de fracciones de linaza en función a variaciones de temperatura.

### 5.3. Caracterización de emulsiones.

#### 5.3.1. Capacidad emulsionante de proteína de linaza usando distintos aceites (%C.E<sub>24</sub>).

Se midió preliminarmente la capacidad emulsionante de emulsiones estabilizadas con proteína de linaza, realizadas según la metodología de Portilla-Rivera *et al*, (2008) descrita anteriormente en el punto 4.4.1 Se evaluó el comportamiento de distintos tipos de aceites vegetales. La capacidad emulsionante se midió a las 24 horas de formuladas las emulsiones. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Valores de capacidad emulsionante (%C.E<sub>24</sub>) de distintos tipos de aceites vegetales. La letra A corresponde a: aceite de Canola; B: aceite de Maravilla; C: Mezcla de aceite de soya 64% y maravilla 28%; D: aceite de Soya; E: aceite de Linaza; F: aceite de Oliva.

Fracción	Capacidad Emulsionante (%C.E <sub>24</sub> )					
	A	B	C	D	E	F
Proteína de linaza	41,15 ±0,7 b	47,1 ±0,28 b	49,25 ±1,06 b	51,05 ±0,7 b	53,6 ±0,7 b	69,25 ±0,4 a

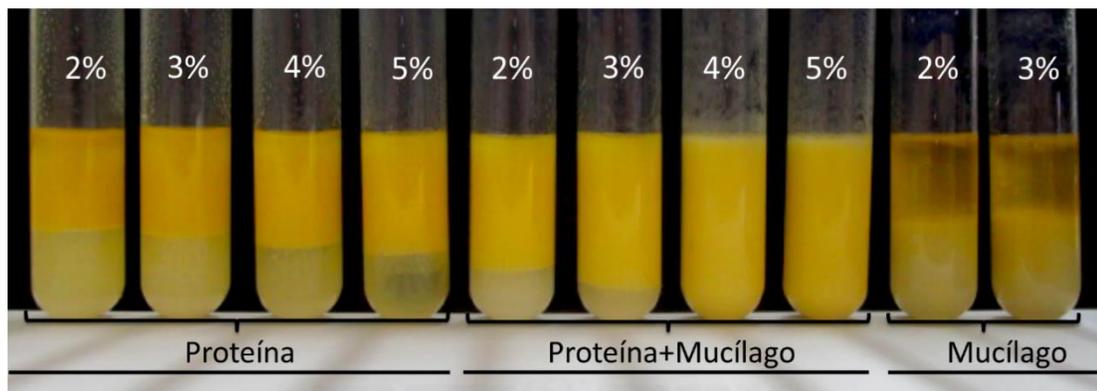
\* Letras diferentes en filas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Luego de realizar un análisis de varianza (Anexo 3), se estableció que existe diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) de %C.E<sub>24</sub> entre los distintos aceites vegetales ensayados para la formulación de emulsiones. Las emulsiones elaboradas con aceite de oliva, linaza y soya presentaron %C.E<sub>24</sub> superiores a 50% tras 24 horas de su formación, sin embargo, el aceite seleccionado fue el aceite de linaza, puesto que es una valiosa fuente de Omega-3.

Los resultados obtenidos sugieren que el tipo y composición de los aceites ejercen un efecto importante sobre las propiedades emulsionantes. De acuerdo a Ushikubo y Cunha, (2014) la densidad, viscosidad, polaridad y estructura química de los ácidos grasos, pueden tener un efecto en la tensión interfacial con la fase acuosa y en la estabilidad de la emulsión.

### 5.3.2. Capacidad y estabilidad emulsionante de fracciones de linaza (%C.E<sub>24</sub> y %E.E<sub>24</sub>).

Se determinó el porcentaje de capacidad emulsionante %C.E<sub>24</sub> luego de 24 horas de emulsiones desarrolladas con aceite de linaza y concentraciones crecientes de fracciones de proteína, mucílago y complejo proteína-mucílago (2-5% p/v) y contrastados a un emulsionante comercial (goma arábica). Cabe destacar que no fue posible elaborar emulsiones sobre el 3% de mucílago debido a su alta viscosidad. La Figura 11 muestra las emulsiones elaboradas con las tres fracciones de linaza luego de 24 horas.



**Figura 11.** Emulsiones desarrolladas con concentraciones crecientes de biopolímeros extraídos desde semilla de linaza.

El análisis de varianza (Anexo 5) mostró que existe diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) de %C.E<sub>24</sub> entre las diferentes concentraciones de biopolímeros para la formulación de emulsiones. Emulsiones elaboradas con concentraciones crecientes de complejo proteína-mucílago (2-5%) y proteína (4-5%) presentaron mayor %C.E<sub>24</sub>, exceptuando la fracción de mucílago y la goma arábica, con los cuales no se observó formación de emulsión (Anexo 4). Además, los resultados de %C.E<sub>24</sub> utilizando complejo de proteína-mucílago presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) respecto a la proteína de linaza en la formulación de emulsiones (Anexo 5.1), alcanzando un 100% de capacidad emulsionante. Estos resultados sugieren que el %C.E depende de la concentración utilizada de emulsionante.

Por otra parte, se determinó la estabilidad emulsionante de las fracciones proteína y complejo proteína-mucílago de acuerdo a Portilla-Rivera *et al.* (2008). Los resultados se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Estabilidad emulsionante (%E.E<sub>24</sub>) a concentraciones crecientes de proteína, y complejo proteína-mucílago.

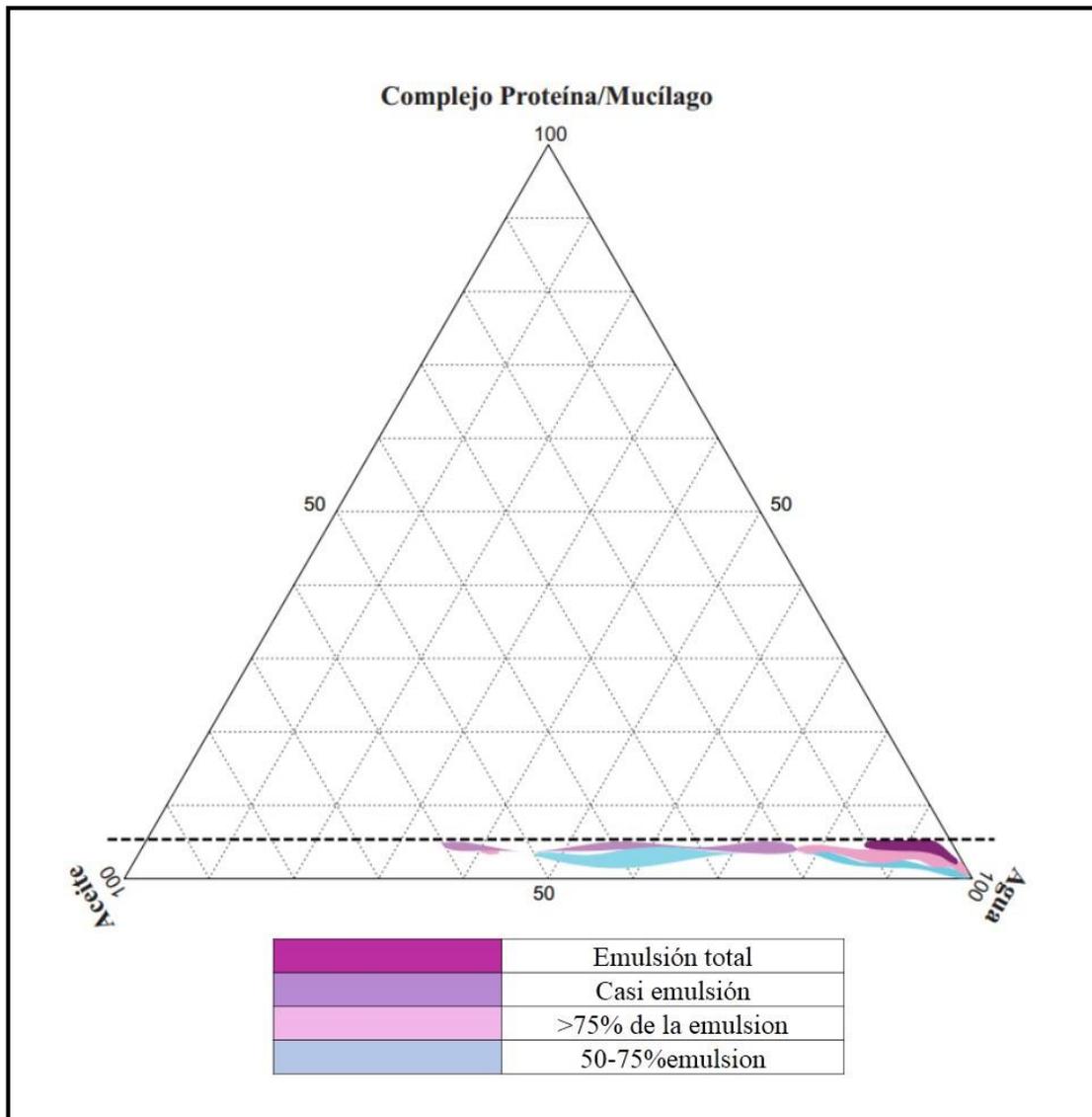
Fracción	Estabilidad Emulsionante (%E.E <sub>24</sub> )			
	2%	3%	4%	5%
Proteína	9,19 ± 0,19	74,89 ± 0,13	84,48 ± 2,65	82,38 ± 2,29
Complejo Proteína-Mucílago	76,6 ± 0,08	83,05 ± 2,54	99,79 ± 0,14	99,89 ± 0,07

Según la Tabla 6, el complejo proteína-mucílago es considerablemente más estable que la proteína luego de 24 horas (99,79%). De acuerdo a Yin *et al.* (2012) esto se debe a que la presencia de polisacárido en el complejo (mucílago) puede mejorar la estabilidad de la proteína debido a enlaces covalentes o por complejos formados por atracción electrostática entre la proteína y el polisacárido. Emulsionantes típicamente usados en la industria, estabilizan las gotas de la emulsión contra la agregación mediante la generación de interacciones repulsivas de tipo estéricas y/o electrostáticas (Piorkowski y McClements, 2013).

Un criterio citado para identificar un bioemulsionante es su capacidad de mantener al menos el 50% del volumen original de la emulsión luego de 24 horas de su formación (Portilla-Rivera *et al.* 2008). Es por ello que la fracción de complejo proteína-polisacárido fue la seleccionada para los análisis posteriormente realizados debido a sus propiedades emulsionantes.

### 5.3.3. Diagrama de fases ternario.

Se determinaron las cantidades efectivas de los tres componentes necesarios para formular emulsiones estables mediante el diseño de un diagrama de fases ternario, el cual consideró el complejo proteína-mucílago previamente seleccionado por sus características emulsionantes, el aceite de linaza y agua. Se evaluaron los puntos de rastreo mencionados anteriormente hasta obtener la zona de estabilidad emulsionante que se muestra en la Figura 12.



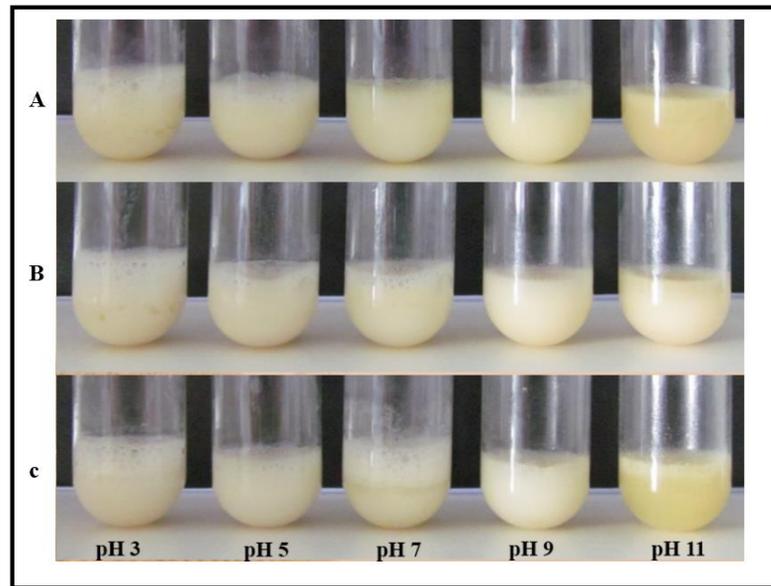
**Figura 12.** Diagrama de fases ternario representando las zonas de estabilidad emulsionante utilizando complejo proteína polisacárido.

Se encontraron distintas zonas de estabilidad que fueron determinadas de acuerdo a la medida de capacidad emulsionante de los puntos de rastreo establecidos (Anexo 6). A partir de la zona de emulsión total obtenida (color morado de la Figura 11), se seleccionaron 3 puntos de la zona más estable para evaluar su comportamiento frente a variación de factores ambientales de acuerdo a la metodología anteriormente descrita. La Tabla 7 muestra los tres puntos evaluados.

**Tabla 7.** Puntos extraídos desde la zona de estabilidad del diagrama de fases ternario

Punto	Concentración (% p/p)		
	Aceite	Complejo Proteína- Mucílago	Agua
1	5,00	5,00	90,00
2	2,50	5,00	92,50
3	1,99	3,97	94,04

Se desarrollaron emulsiones de acuerdo a los puntos descritos en la Tabla 7. Estos fueron sometidos a variaciones de fuerza iónica (0-500mM), pH (3-11) y temperatura (4-100 °C). Se evaluó la capacidad emulsionante de ellos luego de 24 y 48 horas. De acuerdo a los resultados obtenidos (Anexo 7), se observaron diferencias de %C.E respecto a la variación de temperatura y pH. No se observaron diferencias considerables respecto a la variación de fuerza iónica entre los 3 puntos, sin embargo se seleccionó el punto 1 para los análisis posteriores debido a su mayor estabilidad respecto a los puntos 2 y 3 frente a la variación de temperatura (4-70 °C) y pH (5-11). Figura 13 muestra las réplicas de los puntos evaluados frente a variaciones de pH.



**Figura 13.** Replica de emulsiones estables del diagrama ternario, frente a variaciones de pH donde A, B y C corresponden al punto 1, 2 y 3 respectivamente.

En la Figura 13 se observan diferencias de capacidad emulsionante para los tres puntos analizados, siendo el punto 1 el que mantuvo constante su capacidad emulsionante luego de 24 y 48 horas de formación (100%) entre pH 5 y 11. En el caso del punto 2, se observó estabilidad a cambios de pH entre 7-11. Contrariamente, el punto 3 demostró ser el más inestable a las variaciones de pH, observándose separación de fase de las emulsiones a 24 horas de su formación en todo el rango de pH analizado, excepto a pH 7 donde mantuvo un 100% de capacidad emulsionante.

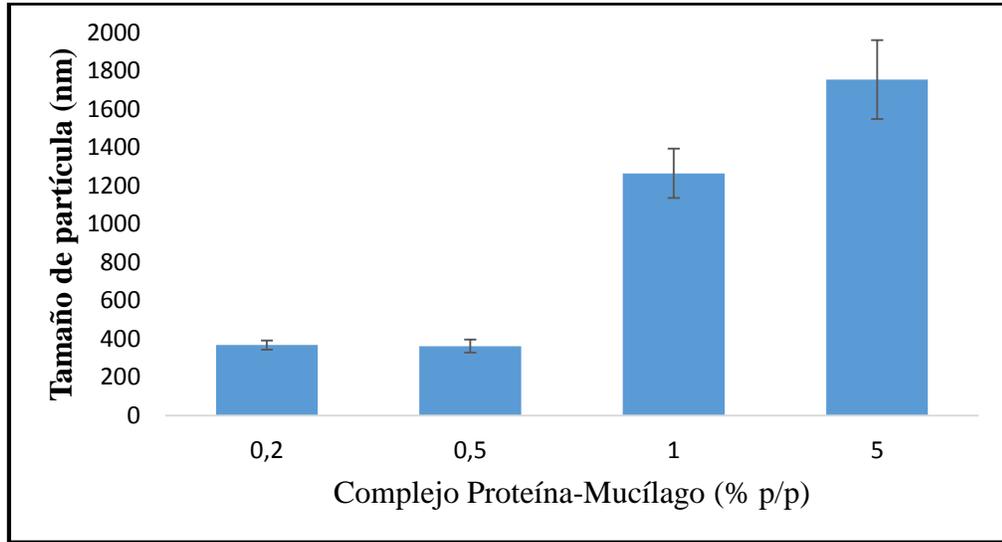
#### **5.4. Desarrollo de nanoemulsiones mediante homogeneización de alta presión.**

##### **5.4.1. Tamaño de partícula de nanoemulsiones.**

Se observó un efecto de la homogeneización de alta presión sobre el tamaño de partícula de las nanoemulsiones, las cuales fueron obtenidas a 1000 bar de presión. Un efecto similar se obtuvo en el trabajo realizado por Kim *et al.* (2012) y Troncoso *et al.* (2012) quienes lograron obtener nanoemulsiones con tamaños de partícula menor a 100 nm de radio utilizando 1000 bar de



presión. Por otra parte, se observó una influencia de la concentración de emulsionante sobre el tamaño de partícula. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14.



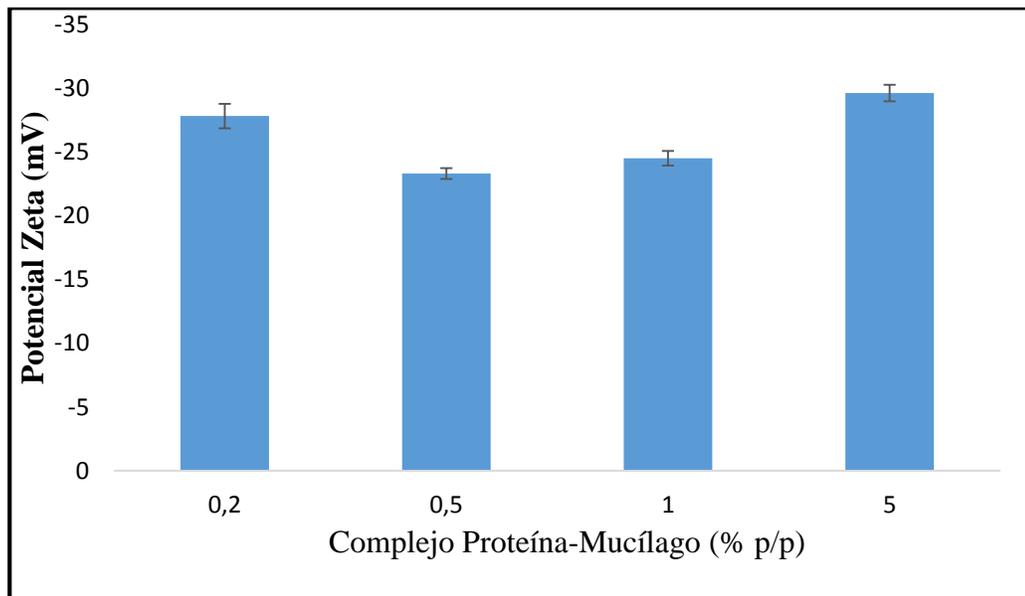
**Figura 14.** Tamaño de partícula de nanoemulsiones en función a la concentración de emulsionante (complejo proteína-mucílago)

La Figura 14 muestra una tendencia de aumento en el tamaño de partículas respecto al aumento en la concentración de complejo proteína-mucílago, logrando tamaños menores mediante el uso de concentraciones bajas o comúnmente usadas para emulsionantes comerciales (0,2-1%). Qian y McClements (2011) observaron el mismo efecto para nanoemulsiones fabricadas con  $\beta$ -lactoglobulina como emulsionante, obteniendo partículas de mayor tamaño de acuerdo al aumento de concentración. Ellos atribuyeron este fenómeno a algunas proteínas globulares que pudieron ser denaturadas durante el proceso de homogeneización de alta presión. Se lograron tamaños de partícula de 368,2 y 362,8 nm a concentraciones de 0,2 y 0,5% de complejo proteína-mucílago. Estos resultados fueron favorables respecto a los reportados por Wang *et al.* (2010), quienes determinaron un diámetro de partícula de 1294 nm utilizando un 0,5% de concentrado de proteína y mucílago de linaza. La tendencia observada en la Figura 14, es atribuible a los resultados obtenidos por Khalloufi *et al.* (2009) quienes determinaron que existe una dependencia entre el diámetro de partícula de las emulsiones y la concentración de mucílago de linaza. El

análisis de varianza (Anexo 8) reveló que existe diferencia estadísticamente significativa entre las distintas concentraciones evaluadas de complejo proteína-mucílago ( $p \leq 0,05$ ) para el desarrollo de nanoemulsiones. Mediante Test de Duncan (Anexo 8.1) se identificaron diferencias entre los promedios obtenidos de cada concentración usada, exceptuando las concentraciones 0,2 y 0,5% donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

#### 5.4.2. Potencial Zeta de nanoemulsiones.

No se observaron diferencias respecto al Potencial Zeta de las partículas al utilizar distintas concentraciones de complejo proteína-mucílago. Como se observa en la Figura 15, el Potencial Zeta de las nanoemulsiones fue variable entre -23,3 a -29,6 mV. De acuerdo a Piorkowski y McClements (2013), estos resultados de Potencial Zeta demuestran la estabilidad electrostática de las nanoemulsiones, puesto que valores sobre  $\pm 20$  mV producen sistemas que son estables en el tiempo. Los valores de Potencial Zeta obtenidos en nanoemulsiones, confirman los resultados observados previamente en el punto 5.2.2. donde no se observó un efecto de la concentración sobre el Potencial Zeta de las fracciones de linaza.



**Figura 15.** Potencial Zeta de nanoemulsiones en función al aumento de concentración de emulsionante.

### 5.4.3. Estabilidad oxidativa de nanoemulsiones mediante test de Rancimat.

Los resultados obtenidos de estabilidad oxidativa para nanoemulsiones desarrolladas con distintas concentraciones de complejo proteína-mucílago y aceite de linaza se muestran en la Tabla 8. El tiempo de inducción señalado indica el tiempo que tarda la muestra en producir compuestos volátiles producto de la oxidación. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos de inducción ( $p \leq 0,05$ ) para las distintas concentraciones de complejo proteína-mucílago (Anexo 9), siendo la muestra con mayor concentración la que obtuvo un menor tiempo de inducción y por la tanto, la más inestable a la oxidación. Por el contrario, la muestra con mayor tiempo de inducción fue la nanoemulsion preparada con 1% de complejo proteína-mucílago (7,37 h). No se observaron diferencias de estabilidad oxidativa para las concentraciones de 0,2 y 0,5%.

**Tabla 8.** Estabilidad oxidativa de nanoemulsiones a distintas concentraciones de complejo proteína-mucílago.

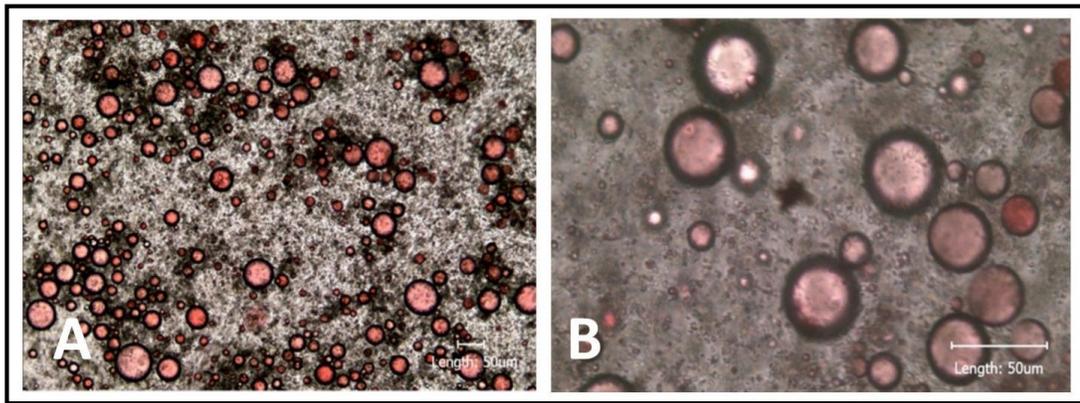
Concentración	T°	Tiempo de Inducción (h)
5%	100 °C	0,38 ± 0,1 (c)
1%	100 °C	7,37 ± 0,32 (a)
0,5%	100 °C	5,91 ± 0,23 (b)
0,2%	100 °C	6,09 ± 0,11 (b)

Letras diferentes en filas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

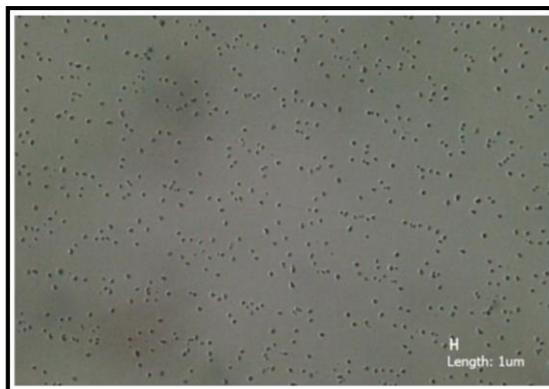
De acuerdo a Rubilar *et al.* (2012), los ácidos grasos poliinsaturados del aceite de linaza son altamente inestables a la oxidación debido a su alto grado de insaturación, proponiendo la microencapsulación del aceite de linaza como herramienta para mejorar su estabilidad oxidativa. Gallardo *et al.* (2013) lograron desarrollar aceite de linaza microencapsulado altamente estable a la oxidación utilizando un aislado de proteína y polisacáridos como material de pared, cuyo tiempo de inducción según test de Rancimat fue de 9,5 horas. Estos resultados se acercan al tiempo de inducción alcanzado por nanoemulsiones desarrolladas con un 1% de complejo proteína-mucílago (7,37 h), sugiriendo una mayor estabilidad oxidativa de las nanoemulsiones a esa concentración.

### 5.5. Análisis microscópico de emulsiones y nanoemulsiones.

La Figura 16 A y B, muestran los análisis microscópicos de la emulsión elaborada con la composición más estable del diagrama de fases ternario (5-5-90% de complejo proteína-mucílago, aceite de linaza y agua, respectivamente). Mientras que la Figura 17 muestra nanoemulsiones elaboradas con la misma composición mediante homogeneización de alta presión. En ambas, se logró una tinción efectiva de las gotas esféricas de aceite con el colorante rojo nilo, lo cual indica la obtención de emulsiones aceite en agua (O/W) de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro aproximadamente (Figura 16) y de nanoemulsiones de diámetro inferior a 1  $\mu\text{m}$  (Figura 17).



**Figura 16.** Microscopía óptica de emulsiones 5-5-90% (complejo proteína-mucílago, aceite de linaza, agua). A: Objetivo 10x; B: Objetivo 40x



**Figura 17.** Microscopía óptica de nanoemulsiones 5-5-90% (complejo proteína-mucílago, aceite de linaza, agua). Objetivo 40x

## 6. CONCLUSIONES

Entre las tres fracciones de linaza evaluadas y caracterizadas preliminarmente (proteína, mucílago y complejo proteína mucílago) el complejo proteína-mucílago fue considerablemente más eficaz que las otras fracciones en la elaboración de emulsiones, debido a su mayor capacidad y estabilidad emulsionante en todas las concentraciones evaluadas.

Mediante el diseño de un diagrama de fases ternario, se determinó una zona o rango de concentraciones para la elaboración de emulsiones estables, determinando que la concentración de 5% complejo proteína-mucílago, 5% aceite de linaza y 90% de agua, es la más estable frente a variaciones de pH y temperatura, manteniendo su capacidad emulsionante.

La homogeneización de alta presión para el desarrollo de nanoemulsiones, demostró mayor eficiencia en la disminución del tamaño de partícula para concentraciones bajo el 1% de complejo proteína-mucílago, respecto al 5% seleccionado desde el diagrama ternario, alcanzando un tamaño promedio de 362,8 nm al utilizar un 0,5% de complejo. Mediante test de Rancimat se demostró además que estas nanoemulsiones fueron estables a la oxidación.

De acuerdo a los resultados obtenidos, quedó demostrado que gracias a las propiedades emulsionantes y físico-químicas del complejo proteína-mucílago de linaza, éste puede ser utilizado como emulsionante para la elaboración de nanoemulsiones aceite en agua (O/W) mediante la homogeneización de alta presión.

## 7. LITERATURA CITADA

- A.O.A.C.** 1990. Official methods of analysis of association of official analytical chemists. 15<sup>th</sup> Ed. Washington DC.
- Adebowale, Y., Adeyemi, I., Oshodi, A., Niranjana, K.** 2007. Isolation, fractionation and characterisation of proteins from Mucuna bean. *Food Chemistry* 104, 287–299.
- Aranberri, I., Binks, B. P., Clint, J. H., Group, C.** 2006. Elaboración y caracterización de emulsiones. *Revista iberoamericana de Polímeros* 7, 211–231.
- Astrup, A., Dyerberg, J., Elwood, P., Hermansen, K., Hu, F. B., Jakobsen, M. U., Kok, F. J., et al.** 2011. The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease : where does the evidence stand in 2010? <sup>1-4</sup>. *The American Journal of Clinical Nutrition* 93, 684–688.
- Benichou, A., Aserin, A., Garti, N.** 2010. Protein-Polysaccharide Interactions for Stabilization of Food Emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology* 23, 93-123.
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J.-L., Agnely, F.** 2012. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field?. *International journal of pharmaceutics* 436, 359–78.
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Le Potier, I., De Kerdaniel, T. D. F., Grossiord, J.-L., Rosilio, V., Agnely, F.** 2011. Stabilization mechanism of oil-in-water emulsions by  $\beta$ -lactoglobulin and gum Arabic. *Journal of colloid and interface science* 354, 467–77.
- Cano-Medina, A., Jiménez-Islas, H., Dendooven, L., Herrera, R. P., González-Alatorre, G., Escamilla-Silva, E. M.** (2011). Emulsifying and foaming capacity and emulsion and foam stability of sesame protein concentrates. *Food Research International* 44, 684–692.
- Coşkuner, Y., Karababa, E.** 2007. Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Food Engineering* 78, 1067–1073.
- Dev, D. K., Quensel, E.** 1989. Functional Containing Properties of Linseed Protein Products Different Levels of Mucilage in Selected Food Systems. *Journal of Food Science* 54, 1–4.
- Dev, D. K., Quensel, E.** 1988. Preparation and Functional Properties of Linseed Protein Products Containing Differing Levels of Mucilage, *Journal of Food Science* 53, 0–3.
- Dickinson, E.** 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids* 17, 25–39.

- Dubois, V., Breton, S., Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M.** 2007. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 710–732.
- Evans, M., Ratcliffe, I., Williams, P. A.** 2013. Emulsion stabilisation using polysaccharide–protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 18, 272–282.
- Figuerola, F., Muñoz, O., Estévez, A.M.** 2008. La linaza como fuente de compuestos bioactivos 36, 49–58.
- Freer, E. M., Yim, K. S., Fuller, G. G., Radke, C. J.** 2004. Interfacial Rheology of Globular and Flexible Proteins at the Hexadecane / Water Interface : Comparison of Shear and Dilatation Deformation. *The Journal of Physical Chemistry B* 108, 3835–3844.
- Gallardo, G., Guida, L., Martínez, V., López, M. C., Bernhardt, D., Blasco, R., Pedroza-Islas, R., et al.** 2013. Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. *Food Research International* 52, 473–482.
- Garg, M. L., Wood, L. G., Singh, H., Moughan, P. J.** 2006. Means of Delivering Recommended Levels of Long Chain n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Human Diets. *Journal of Food Science* 71, R66–R71
- Garti, N.** 1999. What can nature offer from an emulsifier point of view: trends and progress? *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 152, 125–146.
- Ghosh, A. K., & Bandyopadhyay, P.** 2012. Polysaccharide-Protein Interactions and Their Relevance in Food Colloids. *The Complex World of Polysaccharides*, Dr. Desiree Nedra Karunaratne (Ed.).
- Ghosh, A. K., Bandyopadhyay, P.** 2011. A simple strategy for charge selective biopolymer sensing. *Chemical communications* 47, 8937–8939.
- Golding, M., Wooster, T. J., Day, L., Xu, M., Lundin, L., Keogh, J., Clifton, P.** 2011. Impact of gastric structuring on the lipolysis of emulsified lipids. *Soft Matter* 7, 3513–3523.
- Gupta, S., Moulik, S.P.** 2008. Biocompatible Microemulsions and Their Prospective Uses in Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97, 22–45.
- Gu, Y. S., Regnier, L., McClements, D. J.** 2005. Influence of environmental stresses on stability of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by beta-lactoglobulin-*iota*-carrageenan membranes. *Journal of colloid and interface science* 286, 551–558.
- Hall, C., Tulbek, M. C., Xu, Y.** 2006. Flaxseed. *Advances in food and nutrition research* 51, 1–97.
- Huang, Q., Yu, H., Ru, Q.** 2010. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *Journal of food science* 75, R50–7.

- Jiang, J., Shao, Y., Li, A., Zhang, Y., Wei, C., Wang, Y.** 2013. FT-IR and NMR study of seed coat dissected from different colored progenies of *Brassica napus*-*Sinapis alba* hybrids. *Journal of the science of food and agriculture* 93, 1898–1902.
- Jones, O. G., Lesmes, U., Dubin, P., McClements, D. J.** 2010. Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles created by heat treatment of  $\beta$ -lactoglobulin–pectin complexes. *Food Hydrocolloids* 24, 374–383.
- Kim, D. M., Hyun, S. S., Yun, P., Lee, C. H., Byun, S. Y.** 2012. Identification of an emulsifier and conditions for preparing stable nanoemulsions containing the antioxidant astaxanthin. *International Journal of Cosmetic Science* 34, 64–73.
- Khalloufi, S., Corredig, M., Goff, H. D., Alexander, M.** 2009. Flaxseed gums and their adsorption on whey protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids* 23, 611–618.
- Laplante, S., Turgeon, S. L., Paquin, P.** 2006. Emulsion-stabilizing properties of chitosan in the presence of whey protein isolate: Effect of the mixture ratio, ionic strength and pH. *Carbohydrate Polymers* 65, 479–487.
- Lee, S. J., Choi, S. J., Li, Y., Decker, E. A., McClements, D. J.** 2011. Protein-stabilized nanoemulsions and emulsions: comparison of physicochemical stability, lipid oxidation, and lipase digestibility. *Journal of agricultural and food chemistry* 59, 415–427.
- Mahendran, T., Williams, P. A., Phillips, G. O., Al-Assaf, S.** 2008. New insights into the structural characteristics of gum Arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 9296–9297.
- Marqués, A.M., Pinazo, A., Farfan, M., Aranda, F. J., Teruel, J.A, Ortiz, A., Manresa, A., Espuny, M.J.** 2009. The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. *Chemistry and physics of lipids* 158, 110–117.
- Martínez-Flores, H. E., Barrera, E. S., Garnica-Romo, M. G., Penagos, C. J. C., Saavedra, J. P., Macazaga-Alvarez, R.** 2006. Functional Characteristics of Protein Flaxseed Concentrate Obtained Applying a Response Surface Methodology. *Journal of Food Science* 71, C495–C498.
- Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B., Graves, S. M.** 2006. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter* 18, R635–R666.
- Morris, D. H.** 2007. *Linaza – Un Producto Premier de Salud y Nutrición*. Winnipeg, MB: Consejo Canadiense de Linaza.



- Muñoz, J., Alfaro, C.** 2007. Avances en la formulación de emulsiones, *Grasas y aceites* 3495, 64–73.
- McClements, D. J.** 2012. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* 8, 1719-1729.
- McClements.** 2011. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter* 7, 2297-2316.
- McClements, D. J., Li, Y.** 2010. Structured emulsion-based delivery systems : Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science* 159, 213–228.
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., Weiss, J.** 2009. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical reviews in food science and nutrition* 49, 577–606.
- McClements, D. J.** 2004. Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 9, 305–313.
- McClements, D.J.** 1999. *Food Emulsions: Principles, Practices and Techniques*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 235–266.
- Oomah, B. D., Mazza, G.** 1997. Effect of Dehulling on Chemical Composition and Physical Properties of Flaxseed. *LWT - Food Science and Technology* 30, 135–140.
- Paraskevopoulou, A., Boskou, D., Kiosseoglou, V.** 2005. Stabilization of olive oil ? lemon juice emulsion with polysaccharides. *Food Chemistry* 90, 627–634.
- Piorkowski, D. T., McClements, D. J.** 2013. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, 1-37.
- Portilla-Rivera, O., Torrado, a, Domínguez, J. M., Moldes, A.B.** 2008. Stability and emulsifying capacity of biosurfactants obtained from lignocellulosic sources using *Lactobacillus pentosus*. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 8074–8080.
- Qian, C., McClements, D. J.** 2011. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids* 25, 1000–1008.
- Rao, J., McClements, D. J.** 2012. Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. *Food Hydrocolloids* 29, 326–334.
- Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A., Van der Mei, H.C., Oliveira, R.** 2006. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 49, 79–86.

- Rubilar, M., Morales, E., Contreras, K., Ceballos, C., Acevedo, F., Villarroel, M., Shene, C.** 2012. Development of a soup powder enriched with microencapsulated linseed oil as a source of omega-3 fatty acids. *European Journal of Lipid Science and Technology* 114, 423–433.
- Rubilar, O., Tortella, G. R., Cuevas, R., Cea, M., Rodríguez-Couto, S., Diez, M. C.** 2011. Adsorptive Removal of Pentachlorophenol by *Anthracophyllum discolor* in a Fixed-Bed Column Reactor. *Water, Air, & Soil Pollution* 223, 2463–2472.
- Rubilar, M., Gutiérrez, C., Verdugo, M., Shene, C., Sineiro, J.** 2010. Flaxseed as a Source of Functional Ingredients. *Journal of soil science and plant nutrition* 10, 373–377.
- Troncoso, E., Aguilera, J. M., McClements, D. J.** 2012. Fabrication, characterization and lipase digestibility of food-grade nanoemulsions. *Food Hydrocolloids* 27, 355–363.
- Ushikubo, F. Y., Cunha, R. L.** 2014. Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions. *Food Hydrocolloids* 34, 145–153.
- Vinayahan, T., Williams, P. A, Phillips, G. O.** 2010. Electrostatic interaction and complex formation between gum arabic and bovine serum albumin. *Biomacromolecules*, 11, 3367–3374.
- Wanasundara, J. P. D., Shahidi, F.** 1994. Functional properties and aminoacid composition of solvent-extracted flaxseed meals. *Food Chemistry* 49, 45–51.
- Wang, B., Wang, L., Li, D., Adhikari, B., Shi, J.** 2011. Effect of gum Arabic on stability of oil-in-water emulsion stabilized by flaxseed and soybean protein. *Carbohydrate Polymers* 86, 343–351.
- Wang, B., Li, D., Wang, L.-J., Özkan, N.** 2010. Effect of concentrated flaxseed protein on the stability and rheological properties of soybean oil-in-water emulsions. *Journal of Food Engineering* 96, 555–561.
- Wang, J. C., & Kinsella, J. E.** 1976. Functional properties of novel proteins : alfalfa leaf protein. *Journal of Food Science* 41, 286-292.
- Yin, B., Deng, W., Xu, K., Huang, L., Yao, P.** 2012. Stable nano-sized emulsions produced from soy protein and soy polysaccharide complexes. *Journal of colloid and interface science* 380, 51–9.

## 8. ANEXOS

**Anexo 1.** Análisis de varianza de Potencial Zeta en fracciones de linaza en función a concentración (%p/v).

Variaciones	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los cuadrados	Valor calculado F	Probabilidad	Valor crítico para F
% p/v	18,8	4	4,71	1,08	0,42	3,83
Fracciones	168,4	2	84,24	19,4	0,0008	4,45
Error	34,7	8	4,34			
Total	222	14				

**Anexo 2.** Análisis de varianza para valores de Potencial Zeta en fracciones de linaza en función a fuerza iónica (NaCl mM)

Variaciones	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los cuadrados	Valor calculado F	Probabilidad	Valor crítico para F
NaCl (Mm)	313,4	5	62,6	23,3	3,00E-05	3,32
Fracciones	66,1	2	33	12,3	0,002	4,1
Error	26,7	10	2,67			
Total	406,3	17				

**Anexo 2.1.** Test de Duncan para valores de Potencial Zeta en fracciones de linaza en función a fuerza iónica (NaCl mM)

NaCl (mM)	P+M	Proteína	Mucílago
0	-24,2 a	-20,2 a	-22,2 a
100	-12,0 b	-11,7 b	-16,7 b
200	-10,5 b	-9,75 b	-13,4 b
300	-8,45 b	-9,64 b	-14,2 b
400	-8,05 b	-9,38 b	-14,6 b
500	-8,00 b	-9,56 b	-14,0 b

\*Letras diferentes en filas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

**Anexo 3.** Análisis de varianza para valores de %C.E<sub>24</sub> de emulsiones utilizando distintos aceites vegetales

Variaciones	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los cuadrados	Valor calculado F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	900,52	5	180,104	341,969	2,79496E-07	4,3872
Dentro de los grupos	3,16	6	0,526			
Total	903,68	11				

**Anexo 4.** Capacidad emulsionante (%C.E<sub>24</sub>) de emulsiones preparadas con concentraciones crecientes de fracciones de linaza

Fracción	Capacidad emulsionante (%C.E <sub>24</sub> )			
	2% (p/v)	3% (p/v)	4% (p/v)	5% (p/v)
Proteína de linaza	10,0 ± 0,42 b	43,5 ± 0,89 a	55,1 ± 1,13 a	60,9 ± 1,24 a
Proteína-mucílago	66,7 ± 1,36 b	78,2 ± 2,49 a	99,7 ± 0,42 a	99,5 ± 0,77 a
Mucílago	S.E	S.E	S.E	S.E
Goma arábica	S.E	S.E	S.E	S.E

\*Letras diferentes en filas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). S.E: sin emulsión.

**Anexo 5.** Análisis de varianza para valores de %C.E<sub>24</sub> de emulsiones utilizando concentraciones crecientes de proteína y complejo proteína-mucílago.

Variaciones	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los cuadrados	Valor calculado F	Probabilidad	Valor crítico para F
fracciones	3811,081	1	3811,081	83,006	0,002	10,127
concentraciones	2218,087	3	739,362	16,103	0,023	9,276
Error	137,738	3	45,912			
Total	6166,907	7				

**Anexo 5.1.** Test de Duncan para Capacidad emulsionante (%C.E<sub>24</sub>) a concentraciones crecientes de proteína, y complejo proteína-mucílago.

Concentración (%p/v)	Fracción	
	Proteína	Proteína-Mucilago
2%	10 ± 0,42 (b)	66,7 ± 1,36 (b)
3%	43,5 ± 0,89 (a)	78,2 ± 2,49 (a)
4%	55,1 ± 1,13 (a)	99,7 ± 0,42 (a)
5%	60,9 ± 1,24 (a)	99,5 ± 0,77 (a)

\*Letras diferentes en filas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

**Anexo 6.** Zonas rastreadas de estabilidad emulsionante del diagrama de fases ternario

Día	PUNTO 1			PUNTO 2			PUNTO 3			PUNTO 4		
	Aceite (%)	P+M (%)	Agua (%)	Aceite (%)	P+M (%)	Agua (%)	Aceite (%)	P+M (%)	Agua (%)	Aceite (%)	P+M (%)	Agua (%)
1	97,50	2,50	0,00	90,00	5,00	5,00	60,00	5,00	35,00	39,37	5,00	55,00
2	92,86	2,38	4,76	85,71	4,76	9,52	57,14	4,76	38,10	38,10	4,76	57,14
3	88,64	2,27	9,09	81,82	4,55	13,64	54,55	4,55	40,91	36,36	4,55	59,09
4	84,53	2,17	13,31	78,09	4,34	17,57	52,15	4,35	43,50	34,75	4,34	60,90
5	80,90	2,07	17,03	74,64	4,15	21,21	49,81	4,15	46,04	33,15	4,14	62,71
6	77,52	1,99	20,49	71,45	3,97	24,58	47,57	3,96	48,46	31,75	3,97	64,28
7	74,34	1,91	23,75	68,67	3,82	27,51	45,67	3,81	50,52	30,43	3,80	65,77
8	71,56	1,83	26,61	65,66	3,65	30,70	43,88	3,66	52,46	29,27	3,66	67,07
9	68,96	1,77	29,27	63,20	3,51	33,29	42,24	3,52	54,24	28,17	3,52	68,31
10	66,44	1,70	31,85	60,94	3,39	35,68	40,65	3,39	55,96	27,14	3,39	69,47
11	63,67	1,63	34,70	58,69	3,28	38,09	38,88	3,24	57,88	25,94	3,24	70,81
12	60,76	1,56	37,68	55,60	3,09	41,31	37,14	3,09	59,77	24,75	3,09	72,16
13	57,80	1,48	40,72	53,06	2,95	44,00	35,42	2,95	61,62	23,63	2,95	73,42
14	55,04	1,41	43,55	50,55	2,81	46,64	33,74	2,81	63,45	22,53	2,82	74,65
15	52,27	1,34	46,39	48,05	2,67	49,28	32,09	2,67	65,24	21,43	2,68	75,89
16	49,73	1,28	48,99	45,74	2,54	51,72	30,55	2,55	66,91	21,43	2,68	75,89
17	47,26	1,21	51,53	43,54	2,42	54,04	29,09	2,42	68,49	19,38	2,42	78,20

Día	PUNTO 5			PUNTO 6			PUNTO 7			PUNTO 8		
	Aceite (%)	P+M (%)	Agua (%)	Aceite (%)	P+M (%)	Agua (%)	Aceite (%)	P+M (%)	Agua (%)	Aceite (%)	P+M (%)	Agua (%)
1	20,00	5,00	75,00	10,00	5,00	85,00	5,00	5,00	90,00	2,50	5,00	92,50
2	19,05	4,76	76,19	9,52	4,76	85,71	4,76	4,76	90,48	2,38	4,76	92,86
3	18,18	4,55	77,27	9,09	4,55	86,36	4,55	4,55	90,91	2,27	4,55	93,18
4	17,37	4,34	78,29	8,67	4,34	86,99	4,32	4,32	91,36	2,17	4,35	93,48
5	16,54	4,14	79,32	8,27	4,14	87,59	4,13	4,13	91,75	2,07	4,15	93,78
6	15,85	3,96	80,18	7,91	3,95	88,14	3,95	3,95	92,09	1,99	3,97	94,04
7	15,21	3,80	80,98	7,59	3,79	88,62	3,79	3,79	92,41	1,91	3,81	94,28
8	14,63	3,66	81,71	7,29	3,64	89,07	3,65	3,65	92,70	1,83	3,67	94,50
9	14,09	3,52	82,39	7,03	3,51	89,46	3,51	3,51	92,98	1,76	3,53	94,71
10	13,57	3,39	83,04	6,79	3,39	89,82	3,39	3,39	93,22	1,70	3,40	94,90
11	13,02	3,26	83,72	6,50	3,25	90,26	3,25	3,25	93,50	1,63	3,26	95,11
12	12,44	3,11	84,45	6,20	3,10	90,70	3,11	3,11	93,79	1,56	3,11	95,33
13	11,84	2,96	85,21	5,91	2,95	91,14	2,96	2,96	94,07	1,48	2,97	95,55
14	11,27	2,82	85,91	5,63	2,82	91,55	2,83	2,83	94,34	1,41	2,83	95,76
15	10,72	2,68	86,61	5,35	2,68	91,97	2,69	2,69	94,63	1,34	2,69	95,97
16	10,19	2,55	87,26	5,09	2,55	92,36	2,56	2,56	94,88	1,28	2,55	96,17
17	9,69	2,42	87,88	4,84	2,42	92,74	2,43	2,43	95,13	1,22	2,43	96,35

**Anexo 7.** Capacidad emulsionante de puntos seleccionados desde el diagrama de fases ternario frente a variaciones de temperatura, pH y Fuerza iónica

Punto	4°		25°		40°		70°		100°	
	C.E <sub>24</sub>	C.E <sub>48</sub>	C.E <sub>24</sub>	C.E <sub>48</sub>	C.E <sub>24</sub>	C.E <sub>48</sub>	C.E <sub>24</sub>	C.E <sub>48</sub>	C.E <sub>24</sub>	C.E <sub>48</sub>
1	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0
2	100	100	100	75	75	75	75	75	0	0
3	100	75	100	75	100	75	100	75	0	0

Punto	pH 3		pH 5		pH 7		pH 9		pH 11	
	C.E <sub>24</sub>	C.E <sub>48</sub>	C.E <sub>24</sub>	C.E <sub>48</sub>	C.E <sub>24</sub>	C.E <sub>48</sub>	C.E <sub>24</sub>	C.E <sub>48</sub>	C.E <sub>24</sub>	C.E <sub>48</sub>
1	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100
2	0	0	75	75	100	100	100	100	100	100
3	0	0	75	75	100	100	75	75	75	0

Punto	0 mM		100 mM		200 mM		300 mM		400 mM		500 mM	
	C.E <sub>24</sub>	C.E <sub>48</sub>	C.E <sub>24</sub>	C.E <sub>48</sub>	C.E <sub>24</sub>	C.E <sub>48</sub>	C.E <sub>24</sub>	C.E <sub>48</sub>	C.E <sub>24</sub>	C.E <sub>48</sub>	C.E <sub>24</sub>	C.E <sub>48</sub>
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75
3	100	100	100	100	100	100	100	75	100	75	100	75

**Anexo 8.** Análisis de varianza para valores de tamaño de partícula de nanoemulsiones en función a la concentración.

Variaciones	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los cuadrados	Valor calculado F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4157535,6	3	1385845,2	319,057	1,16E-08	4,066
Dentro de los grupos	34748,426	8	4343,553			
Total	4192284,03	11				

**Anexo 8.1.** Test de Duncan para las distintas concentraciones usadas para nanoemulsiones

0,2% (p/p)	0,5% (p/p)	1 % (p/p)	5 % (p/p)
368,2 ± 22,7 (c)	362,8 ± 19,6 (c)	1267,4 ± 65,8 (b)	1726,6 ± 110,1 (a)

**Anexo 9.** Análisis de varianza para valores de tiempo de inducción (Test de Rancimat) para nanoemulsiones en función a la concentración.

Variaciones	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los cuadrados	Valor calculado F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	86,752	3	28,917	630,122	7,75E-10	4,066
Dentro de los grupos	0,367	8	0,045			
Total	87,119	11				