



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERIA QUÍMICA
INSTITUTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la
obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**DISEÑO DE UN INGREDIENTE FUNCIONAL EN POLVO CON PROBIÓTICOS Y ACEITE DE
LANGOSTINO COMO ADYUVANTE PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
INTESTINALES INFLAMATORIAS**

Ing. Carolina Acosta

Directora: Dra. Silvana A. Fioramonti

Co-director: Dr. Gustavo J. Hein

*Somos, en gran medida, los profesores que
nos van formando a lo largo de la vida.*

*A mi familia,
porque su amor me alcanza siempre, sin importar el cuándo ni el dónde.
Todo lo que soy tiene raíces en ustedes.*

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de Tesis, Silvana, por acompañarme con generosidad y compromiso a lo largo de estos años, tanto en el plano académico como en lo personal. Gracias por compartir todos tus conocimientos sin reservas, por el esfuerzo, el tiempo y la paciencia que dedicaste para poder hacer posible este trabajo. Y por ultimo pero no menos importante, gracias por tu calidez humana en todos estos años.

A mi codirector, Gustavo, por compartir su conocimiento y visión, por la predisposición y la confianza depositada. Te agradezco por tu paciencia y comprensión. Y gracias por tus aportes que enriquecieron profundamente este trabajo.

A la EDUCACIÓN PÚBLICA, única herramienta igualadora de oportunidades, y a la Universidad Nacional del Litoral, que desde siempre me acoge y me brinda la oportunidad de formarme en lo que elijo ser cada día.

Al Instituto de Tecnología de Alimentos y a mi casa de estudios, la Facultad de Ingeniería Química, por permitirme iniciarme en el mundo de la investigación y comenzar mis estudios de posgrado en la carrera del Doctorado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el apoyo económico, técnico y académico brindado durante esta etapa de formación. Este trabajo no hubiera sido posible sin el respaldo sostenido del sistema científico público, al que espero seguir aportando con compromiso y gratitud.

A todas mis compañeras del área de Estudios Fisicoquímicos de Alimentos, por su apoyo constante durante el desarrollo de esta Tesis. Agradezco profundamente su calidez, su disposición y el espíritu de trabajo compartido, mucho de esto es gracias a ellas. Gracias por todos los almuerzos compartidos. En especial, a Caro y Lau, por los mates, las risas, el trabajo en equipo y, sobre todo, por haber sido un soporte emocional fundamental. Todo fue más fácil gracias a ustedes.

También a Eugenia, Flavia y Paula, por estar siempre dispuestas a colaborar con generosidad, aportando sus conocimientos y experiencias en una parte fundamental de este trabajo y cuya ayuda que fue esencial para poder llegar a este punto.

A mis amigas, mis amores eternos, que siempre estan a mi lado, acompañandome en cada paso del camino, son un gran apoyo incondicional siempre que necesito.

A mi familia, por ser mi motivación, mi pilar y el hogar al que siempre vuelvo. Marce, que siempre va a ser mi hermanito aunque crezca, gracias por ser una fuente de felicidad en mi vida. A mis padres les agradezco todo el esfuerzo que hicieron para que pueda tener una carrera universitaria. Siempre confiaron y creyeron que iba a lograrlo, siempre alentándome a estudiar y desde siempre trabajaron duro para que pueda hacerlo y nunca me falte nada. Gracias por todo lo que siguen haciendo por nosotros.

A mis abuelos que tengo conmigo, y los que ya no están, todos son parte de lo que soy hoy como persona.

RESUMEN

En las últimas décadas, el continuo crecimiento de la población mundial trajo aparejado una mayor demanda de alimentos, promoviendo un incremento de la producción y con ello el aumento en los descartes generados. Estos desechos, que generalmente no se reutilizan, generan problemas medio ambientales y económicos. Es por ello que es necesaria la búsqueda de estrategias capaces de aprovechar estos descartes, generando valor agregado con bajo impacto ambiental, contribuyendo al desarrollo de la economía circular. Una de las alternativas surge de la extracción de compuestos bioactivos a partir de estos descartes de la industria.

Sumado a esto, la creciente demanda de alimentos funcionales con propiedades saludables ha impulsado el desarrollo de ingredientes capaces de vehicular compuestos bioactivos en matrices alimentarias. Entre ellos, los ácidos grasos omega-3 y la astaxantina, un potente antioxidante, han demostrado efectos antiinflamatorios en diversos modelos experimentales. La combinación de ambos compuestos junto con un probiótico podría potenciar su actividad bioactiva en la prevención y/o tratamiento de trastornos asociados a procesos de inflamación crónica de bajo grado. Sin embargo, su alta susceptibilidad a factores ambientales plantea un desafío para desarrollar matrices protectoras que mantengan su estabilidad durante el almacenamiento.

El objetivo de este trabajo fue diseñar sistemas bicomponentes de aceite de langostinos (fuente de omega-3 y astaxantina) y una cepa potencialmente probiótica autóctona, aislada en el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, CONICET/UNL), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, utilizando emulsiones multicapa, para obtener encapsulados sólidos mediante diferentes métodos de deshidratación y evaluar sus potenciales efectos bioactivos sobre líneas celulares tumorales.

Se formularon emulsiones O/W de aceite de langostinos, con estructuras interfaciales bicapa, empleando proteína de soja, quitosano y maltodextrina como materiales de pared. Las emulsiones se secaron por aspersion y se liofilizaron. Se evaluó cómo el método de secado afectaba la estabilidad oxidativa del aceite. Se caracterizaron las emulsiones (tamaño de gota,

potencial zeta, estabilidad física, microscopía óptica) y los encapsulados (microscopía SEM, eficiencia de encapsulación, humedad, actividad de agua, dispersabilidad, solubilidad), junto con la evolución de compuestos primarios y secundarios de oxidación.

Además, se formuló una suspensión con la cepa *B. lactis* INL1 y maltodextrina que fue deshidratada mediante secado por aspersión. El sistema fue caracterizado en cuanto a morfología mediante microscopía SEM, viabilidad celular a lo largo del proceso de síntesis y durante el almacenamiento.

A partir de estos estudios, se eligieron dos formulaciones para el sistema bicomponente: polvos obtenidos mediante liofilización de las emulsiones y polvos obtenidos mediante secado por aspersión de la cepa probiótica. Se caracterizaron y evaluaron durante el almacenamiento a -18, 4 y 25 °C. Además, se sometió al sistema bicomponente al análisis de su resistencia frente a la digestión gastrointestinal simulada *in vitro*.

Los hallazgos sobre la actividad antitumoral demostraron la capacidad citotóxica y antiproliferativa de los extractos sobre tres líneas tumorales HepG2, HT-29 y Caco-2 de cáncer de hígado y de colon, respectivamente.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis aportan mayor conocimiento acerca de los compuestos bioactivos extraídos de los descartes del langostino, como se ve afectada su estabilidad por los distintos procesos tecnológicos y sus efectos citotóxicos.

Palabras claves: sistema bicomponente, aceite de langostinos, ácidos grasos omega-3, astaxantina, probióticos, estabilidad oxidativa, bioactividad.

ABSTRACT

In recent decades, continuous global population growth has led to increased demand for food, promoting increased production and, with it, an increase in waste generated. This waste, which is generally not reused, causes environmental and economic problems. It is therefore necessary to seek strategies capable of making use of this waste, generating added value with low environmental impact, and contributing to the development of the circular economy. One alternative is the extraction of bioactive compounds from this industrial waste.

In addition to this, the growing demand for functional foods with healthy properties has driven the development of ingredients capable of conveying bioactive compounds in food matrices. Among them, omega-3 fatty acids and astaxanthin, a powerful antioxidant, have demonstrated anti-inflammatory effects in various experimental models. The combination of both compounds together with a probiotic could enhance their bioactive activity in the prevention and/or treatment of disorders associated with low-grade chronic inflammation processes. However, their high susceptibility to environmental factors poses a challenge for the development of protective matrices that maintain their stability during storage.

The objective of this study was to design bicomponent systems for shrimp oil (a source of omega-3 and astaxanthin) and a potentially probiotic native strain, isolated at the Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, CONICET/UNL), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, using multilayer emulsions, to obtain solid encapsulates using different dehydration methods and evaluate their potential bioactive effects on tumor cell lines.

The O/W emulsions of shrimp oil were formulated with bilayer interfacial structures, using soy protein, chitosan, and maltodextrin as wall materials. The emulsions were spray-dried and freeze-dried. The effect of the drying method on the oxidative stability of the oil was evaluated. The emulsions (droplet size, zeta potential, physical stability, optical microscopy) and the encapsulates (SEM microscopy, encapsulation efficiency, moisture, water activity,

dispersibility, solubility) were characterized, together with the evolution of primary and secondary oxidation compounds.

In addition, a suspension was formulated with the *B. lactis* INL1 strain and maltodextrin, which was dehydrated by spray drying. The system was characterized in terms of morphology by SEM microscopy and cell viability throughout the synthesis process and during storage.

Based on these studies, two formulations were selected for the bicomponent system: powders obtained by freeze-drying the emulsions and powders obtained by spray drying the probiotic strain. They were characterized and evaluated during storage at -18, 4, and 25 °C. In addition, the bicomponent system was subjected to analysis of its resistance to simulated *in vitro* gastrointestinal digestion.

The findings on antitumor activity demonstrated the cytotoxic and antiproliferative capacity of the extracts on three tumor lines, HepG2, HT-29, and Caco-2, of liver and colon cancer, respectively.

The results obtained in this thesis provide greater knowledge about the bioactive compounds extracted from shrimp waste, how their stability is affected by different technological processes, and their cytotoxic effects.

Keywords: bicomponent system, shrimp oil, omega-3 fatty acids, astaxanthin, probiotics, oxidative stability, bioactivity.

ÍNDICE

1.	CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	1
1.1.	INTRODUCCIÓN GENERAL	2
1.1.1.	<i>Alimentos e ingredientes funcionales.....</i>	<i>3</i>
1.1.2.	<i>Compuestos bioactivos.....</i>	<i>4</i>
1.1.2.1.	Aceites de origen animal	5
1.1.2.1.1.	Ácidos grasos en la alimentación	7
1.1.2.1.2.	Compuestos antioxidantes	10
1.1.2.1.3.	Oxidación lipídica	13
1.1.2.2.	Microorganismos probióticos.....	14
1.1.2.2.1.	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis INL1</i>	<i>15</i>
1.1.3.	<i>Encapsulación.....</i>	<i>17</i>
1.1.3.1.	Materiales de pared.....	18
1.1.3.1.1.	Proteína de soja.....	20
1.1.3.1.2.	Quitosano	21
1.1.3.1.3.	Maltodextrina	22
1.1.4.	<i>Emulsiones como tecnología de encapsulación de compuestos bioactivos..</i>	<i>22</i>
1.1.5.	<i>Tecnologías de deshidratación de emulsiones</i>	<i>26</i>
1.1.5.1.	Secado por aspersión.....	26
1.1.5.2.	Liofilización.....	27
1.1.6.	<i>Aportes de este trabajo de investigación.....</i>	<i>28</i>
1.2.	HIPÓTESIS	30
1.3.	OBJETIVOS.....	30
1.3.1.	<i>Objetivo general.....</i>	<i>30</i>
1.3.2.	<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>30</i>
2.	CAPÍTULO 2: VALIDACIÓN DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PERÓXIDOS EN ACEITES MUY PIGMENTADOS	31
2.1.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
2.1.1.	<i>Materiales</i>	<i>32</i>
2.1.2.	<i>Métodos.....</i>	<i>33</i>

2.1.2.1.	Método Iodométrico AOAC por titulación	33
2.1.2.2.	Método original IDF.....	33
2.1.2.3.	Método espectrofotométrico IDF modificado	34
2.1.2.4.	Validación del método espectrofotométrico modificado	35
2.1.2.5.	Análisis estadístico de los datos	36
2.2.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
2.2.1.	<i>Modificación del método espectrofotométrico IDF para medir IP</i>	<i>37</i>
2.2.2.	<i>Modificaciones planteadas al método IDF existente.....</i>	<i>38</i>
2.2.3.	<i>Validación del método IDF modificado.....</i>	<i>41</i>
2.3.	CONCLUSIONES PARCIALES.....	46
3.	CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE LANGOSTINOS.....	47
3.1.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
3.1.1.	<i>Materiales</i>	<i>48</i>
3.1.2.	<i>Métodos.....</i>	<i>48</i>
3.1.2.1.	Composición de ácidos grasos	48
3.1.2.2.	Ensayos de estabilidad del AL.....	49
3.1.2.2.1.	Índice de peróxidos	49
3.1.2.2.2.	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	50
3.1.2.2.3.	Determinación de la concentración de ASX	51
3.1.2.2.4.	Cinética de la tasa de degradación de ASX en el AL almacenado a	
	distintas temperaturas.....	53
3.1.2.3.	Análisis estadístico de los datos	53
3.2.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
3.2.1.	<i>Perfil de ácidos grasos.....</i>	<i>54</i>
3.2.2.	<i>Estabilidad del AL.....</i>	<i>56</i>
3.2.3.	<i>Cinética de degradación de ASX en el AL.....</i>	<i>60</i>
3.3.	CONCLUSIONES PARCIALES.....	63
4.	CAPÍTULO 4: FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EMULSIONES PARA	
	ENCAPSULAR ACEITE DE LANGOSTINOS.....	64
4.1.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
4.1.1.	<i>Materiales</i>	<i>65</i>

4.1.2. Métodos.....	65
4.1.2.1. Preparación de las emulsiones.....	66
4.1.2.2. Caracterización de emulsiones.....	67
4.1.2.2.1. Microscopía óptica.....	67
4.1.2.2.2. Determinación del potencial zeta.....	67
4.1.2.2.3. Evaluación macroscópica de cremado	68
4.1.2.2.4. Determinación de coalescencia.....	68
4.1.2.2.5. Distribución de tamaños de gota.....	68
4.1.2.3. Análisis estadístico de los datos	69
4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
4.2.1. Estudio de las variables que afectan la formación y estabilidad de emulsiones	69
4.2.1.1. Efecto de las condiciones de homogeneización	69
4.2.1.2. Efecto del pH.....	71
4.2.1.2.1. Potencial Zeta	72
4.2.1.2.2. Estabilidad frente al cremado	74
4.2.1.2.3. Tamaños de gota	75
4.2.2. Estudio de homogeneización de emulsiones mediante tecnología de altas presiones	78
4.2.2.1. Estabilidad de las emulsiones frente a la liberación de aceite	80
4.3. CONCLUSIONES PARCIALES.....	80
5. CAPÍTULO 5: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ENCAPSULADOS DE ACEITE DE LANGOSTINOS EN POLVO	82
5.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	83
5.1.1. Materiales	83
5.1.2. Métodos.....	83
5.1.2.1. Obtención de microcápsulas de AL en polvo.....	83
5.1.2.2. Caracterización de microcápsulas de AL.....	84
5.1.2.2.1. Eficiencia de encapsulación.....	84
5.1.2.2.2. Microscopía electrónica de barrido.....	84
5.1.2.2.3. Determinación de actividad de agua.....	85

5.1.2.2.4.	Determinación de humedad	85
5.1.2.2.5.	Dispersabilidad	85
5.1.2.2.6.	Solubilidad.....	85
5.1.2.2.7.	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	86
5.1.2.3.	Estabilidad de microcápsulas durante el almacenamiento	86
5.1.2.3.1.	Determinación de parámetros de oxidación	86
5.1.2.3.2.	Determinación del porcentaje de retención de ASX.....	87
5.1.2.4.	Análisis estadístico de los datos	87
5.2.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	88
5.2.1.	<i>Obtención de microcápsulas en polvo mediante secado por aspersión</i>	<i>88</i>
5.2.2.	<i>Caracterización de las microcápsulas de AL.....</i>	<i>91</i>
5.2.3.	<i>Estabilidad de microcápsulas durante el almacenamiento.....</i>	<i>99</i>
5.3.	CONCLUSIONES PARCIALES	104
6.	CAPÍTULO 6: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS BICOMPONENTES DE ACEITE DE LANGOSTINOS Y BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SUBSP. LACTIS INL1	105
6.1.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	106
6.1.1.	<i>Materiales</i>	<i>106</i>
6.1.2.	<i>Métodos.....</i>	<i>106</i>
6.1.2.1.	Obtención de microcápsulas con AL	107
6.1.2.2.	Eficiencia de encapsulación	107
6.1.2.3.	Obtención de microcápsulas de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1 en polvo	107
6.1.2.4.	Viabilidad de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1	108
6.1.2.5.	Obtención de sistemas bicomponentes	108
6.1.2.6.	Caracterización de los sistemas bicomponentes	108
6.1.2.7.	Estabilidad de los sistemas bicomponentes en el almacenamiento	109
6.1.2.8.	Análisis estadístico de los datos	109
6.2.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	109
6.2.1.	<i>Obtención de microcápsulas con AL mediante liofilización</i>	<i>109</i>
6.2.2.	<i>Obtención y caracterización de sistemas bicomponentes de AL y Bifidobacterium animalis subsp. lactis INL1</i>	<i>111</i>
6.2.2.1.	Caracterización de los sistemas bicomponentes	111

6.2.3.	<i>Estabilidad de los sistemas bicomponentes durante el almacenamiento..</i>	116
6.2.3.1.	Estabilidad oxidativa.....	117
6.2.3.2.	Estabilidad de la ASX.....	120
6.2.3.3.	Estabilidad de la cepa <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1.....	121
6.3.	CONCLUSIONES PARCIALES.....	124
7.	CAPÍTULO 7: ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES BIOACTIVAS DEL SISTEMA BICOMPONENTE	125
7.1.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	126
7.1.1.	<i>Digestión gastrointestinal in vitro</i>	126
7.1.1.1.	Estabilidad y bioaccesibilidad de AL	127
7.1.1.2.	Retención de ASX.....	128
7.1.1.3.	Viabilidad de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1	128
7.1.2.	<i>Estudio de citotoxicidad de los sistemas bicomponentes sobre líneas celulares tumorales</i>	128
7.1.2.1.	Evaluación de viabilidad celular de líneas tumorales y normales	129
7.1.3.	<i>Análisis estadístico de los datos</i>	130
7.2.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	131
7.2.1.	<i>Digestión gastrointestinal in vitro</i>	131
7.2.1.1.	Estabilidad y bioaccesibilidad de AL y ASX.....	131
7.2.1.2.	Viabilidad de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1	134
7.2.2.	<i>Estudio de citotoxicidad de los sistemas bicomponentes sobre líneas celulares tumorales</i>	136
7.2.2.1.	Evaluación de la viabilidad celular	137
7.3.	CONCLUSIONES PARCIALES.....	142
8.	CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES	143
	BIBLIOGRAFÍA	146

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AG	Ácidos grasos
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AL	Aceite de langostinos
ANOVA	Análisis de la Varianza
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
ASX	Astaxantina
a_w	Actividad de agua
CHP	Hidroperóxido de cumeno
CHT	Quitosano
DE	Desviación estándar
DHA	Ácido docosaheptaenoico
DLS	Dispersión de luz dinámica
Ea	Energía de activación
ECNT	Enfermedades crónicas no transmisibles
EE	Eficiencia de encapsulación
EII	Enfermedad inflamatoria Intestinal
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAME	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FGS	Fluido gástrico simulado
FIS	Fluido intestinal simulado
FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
GRAS	Generalmente reconocidos como seguros
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IDF	International Dairy Federation
IDFm	Método IDF modificado
IP	Índice de peróxidos
IS	Índice de selectividad
LD	Límite de detección
MDA	Malondialdehído
MDX	Maltodextrina
meq	Miliequivalentes
MTT	3-(4,5 dimethylthiazol 2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide
ND	No detectable

O/W	Oil/water
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer fosfato salino
pI	Punto isoeléctrico
%RSD	Coeficiente de variación relativo
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SPC	Concentrado de proteína de soja
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TE	Temperatura de entrada
TS	Temperatura de salida
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
US	Procesador ultrasónico
UT	Ultraturrax
UV	Ultravioleta

1. CAPÍTULO 1: *Introducción general, hipótesis y objetivos*

1.1. Introducción general

Las consecuencias de la industrialización y la globalización en la actualidad abarcan una serie de cambios en el medioambiente, el comportamiento humano y el estilo de vida, lo cual ha llevado a un incremento significativo de las tasas de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) vinculadas a la dieta en numerosos países (Britos et al., 2010). Entre estas condiciones de salud se encuentran la diabetes, obesidad, enfermedades cardíacas, hipertensión, cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Paudel et al., 2019). En nuestro país, más del 50 % de las defunciones se atribuyen a las ECNT, padecimientos que se ven agravados por el consumo de tabaco, la falta de actividad física, la alimentación inadecuada, la obesidad y el abuso del alcohol (Mangialavori et al., 2022).

Incluidas en las ECNT se encuentra un trastorno inflamatorio del sistema digestivo conocido como Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), la cual abarca dos formas crónicas: la Colitis Ulcerosa y la Enfermedad de Crohn (Larussa et al., 2017). Aunque la etiología de la EII es desconocida, se atribuye a una combinación de factores que incluyen predisposición genética, influencias ambientales, la dieta, el equilibrio de la flora intestinal y posibles respuestas inmunitarias anómalas (Abegunde et al., 2016). Los síntomas de esta afección abarcan un espectro variado que incluye diarrea severa, dolor abdominal, cólicos, fiebre y fatiga, lo que lleva consigo una pérdida de peso, impactando de manera significativa el bienestar general del individuo. Un aspecto preocupante es que, tras un lapso de 8 a 10 años de manifestarse, la EII se convierte en un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer colorrectal (M'Koma, 2013). La terapia requerida para mitigar los efectos de la EII conlleva efectos secundarios y, además, implica un elevado costo para el sistema de salud (Larussa et al., 2017).

El avance de la edad se asocia a un aumento en la incidencia de ECNT, en parte debido al incremento del estrés oxidativo y de las respuestas inflamatorias. El estrés oxidativo, caracterizado por un exceso de radicales libres, daña los tejidos y activa mecanismos inflamatorios. A su vez, la inflamación - una respuesta inmediata del organismo ante patógenos,

lesiones o radicales libres - puede intensificar el estrés oxidativo, generando un círculo vicioso que contribuye a la progresión de estas patologías (Seyedsadjadi & Grant, 2020). Se ha demostrado la existencia de varios compuestos bioactivos que pueden prevenir o reducir eficazmente la inflamación crónica, al mismo tiempo proporcionan importantes beneficios antioxidantes (Lu & Yen, 2015). Por ejemplo, la astaxantina (ASX), es un potente carotenoide que puede encontrarse en los langostinos y sus notables propiedades han sido bien documentadas (Martínez-Delgado et al., 2017; Mota et al., 2022).

Llevar una dieta sana a lo largo de la vida ayuda a prevenir la malnutrición en todas sus formas, así como distintas ECNT y diferentes afecciones, según lo afirma la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2003). El aumento de estas patologías y la difusión de los factores desencadenantes de las mismas, han llevado a que los consumidores, cada vez más, consideren que la alimentación contribuye directamente a su salud.

En consecuencia, la industria alimentaria ha centrado sus investigaciones en el desarrollo de productos que ofrezcan una ventaja fisiológica para la salud más allá de la nutrición, surgiendo así los denominados “alimentos funcionales” (Carneiro et al., 2013). El campo de desarrollo de estos alimentos es muy amplio actualmente, encontrándose distintas categorías de estos, entre los que podemos citar: alimentos probióticos, alimentos prebióticos o con fibra soluble, alimentos simbióticos, alimentos con proteínas lácteas o de soja, alimentos con péptidos bioactivos de efectos saludables, alimentos con antioxidantes, alimentos con lípidos funcionales (Bruzos et al., 2011).

1.1.1. Alimentos e ingredientes funcionales

Los avances tecnológicos en el área de los alimentos han impulsado el desarrollo de diversas técnicas de encapsulación y entrapamiento de compuestos bioactivos de interés con el fin de preservar estos compuestos, sensibles a factores externos, para producir ingredientes y alimentos funcionales. Estos últimos, son considerados alimentos que contienen ingredientes con funciones específicas para la salud y cuyo mensaje o alegación saludable ha sido aprobada acerca de sus efectos fisiológicos en el cuerpo humano (Durán & Valenzuela, 2010).

La continua aparición de evidencias científicas acerca del rol de la dieta y/o sus componentes sobre la salud y el bienestar humano, ha impulsado la idea de no solo considerar el valor nutricional de los alimentos, sino también su capacidad de prevenir diversos tipos de enfermedades (Granato et al., 2020). Esta tendencia asociada al consumo de una dieta más adecuada ha favorecido la aparición de nuevos productos impulsando el desarrollo tanto de nuevos alimentos como ingredientes funcionales. Estas novedosas formulaciones se han convertido en un nicho de mercado para las compañías de alimentos, las cuales deben responder a las crecientes demandas. Algunos ejemplos de ingredientes funcionales contienen aceites con alto contenido en omega-3 (ω -3), compuestos antioxidantes, prebióticos, probióticos, vitaminas, entre otros, y con los cuales pueden formularse distintos alimentos (Cámpora, 2016; Eratte et al., 2015; Granato et al., 2020; Reque & Brandelli, 2021).

Si bien este tipo de ingredientes podría tener un efecto positivo en la salud, no son considerados medicamentos, sino más bien nutraceuticos. Son productos atractivos por su origen natural, que pueden consumirse como parte de una dieta normal y ayudan a prevenir o retardar el riesgo de enfermedades crónicas a través de una alimentación más sana y equilibrada. Generalmente, pueden ser administrados a largo plazo, sin riesgos de efectos colaterales (Leonard, 2006).

Dado que los ingredientes funcionales pueden ser considerados *carriers* de agentes bioactivos, en la presente tesis se propone estudiar la encapsulación de aceite de langostinos (AL) y una cepa de bacterias potencialmente probiótica como compuestos de interés para lograr distintas presentaciones de ingredientes funcionales.

1.1.2. Compuestos bioactivos

El crecimiento progresivo de la población mundial ha llevado al aumento en la demanda de alimentos y, en consecuencia, la producción de alimentos se ha incrementado. Simultáneamente, esto genera un incremento similar en los volúmenes de desechos como resultado de los procesos físicos, químicos y biológicos causados por la industria y que no se utilizan como material para la cadena productiva. A su vez, una gestión inadecuada de los

residuos puede generar problemas medioambientales y económicos, para lo cual, uno de los propósitos de la industria es la reducción de sus impactos por medio del desarrollo de alternativas para el manejo de sus descartes. Una alternativa sustentable para eliminar estos residuos y generar valor agregado, es la recuperación de fitoquímicos o compuestos bioactivos desde estas matrices (Alam et al., 2016).

Una de las matrices que ha despertado nuestro interés es el langostino, y más precisamente su exoesqueleto (cabeza y caparazón), ya que es un desecho de la industrialización que contiene una valiosa cantidad de compuestos bioactivos (entre ellos aceite, ASX, quitosano). Es por ello, que resulta importante desarrollar técnicas que permitan revalorizar estos residuos, y así intentar reducir los impactos ambientales, convirtiendo a los descartes en valiosas fuentes de compuestos químicos con bioactividades asociadas que logren disminuir los volúmenes de desechos y generen oportunidades de crecimiento económico sostenible.

1.1.2.1. Aceites de origen animal

Los alimentos de origen marino, conocidos como pescados y mariscos, son organismos ampliamente utilizados para consumo humano (Hosomi et al., 2012). Estos engloban diversas especies, incluyendo crustáceos, moluscos, equinodermos, peces y algas marinas o macroalgas y se destacan por ser excelentes fuentes de proteínas, grasas, vitaminas y minerales (Olatunde & Benjakul, 2022). Los aceites de crustáceos, como los de langostinos, camarones y krill, son ricos en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) ω -3, especialmente el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) y ASX, un potente antioxidante.

Estos compuestos bioactivos se asocian con una amplia gama de beneficios para la salud, incluyendo fuertes propiedades antiinflamatorias y antiartríticas, ofreciendo así posibles efectos terapéuticos para trastornos metabólicos caracterizados por inflamación crónica (Vitetta, 2022).

El langostino, *Pleoticus muelleri*, es un crustáceo decápodo que se encuentra en aguas templado-frías, que habita en el fondo del mar, en un rango de profundidad que abarca desde

los 3 hasta los 110 metros. Esta especie ha sido capturada en una extensa área, desde las costas de Santa Cruz-Argentina, hasta Río de Janeiro-Brasil, siendo más abundante en el litoral patagónico argentino, específicamente desde las costas de Rawson hasta el sur del Golfo San Jorge. En relación con sus características físicas, el langostino exhibe dimorfismo sexual y presenta un crecimiento diferencial entre machos y hembras. La coloración del langostino varía desde tonos rosados hasta rojizos, mostrando una amplia gama de matices. Aunque el ciclo de vida del langostino es breve, se destaca por su rápida y variable tasa de crecimiento a lo largo del tiempo y en diferentes áreas. A través de métodos indirectos, se ha estimado que su esperanza de vida promedio es de aproximadamente dos años, presentando además un gran potencial reproductivo. Actualmente, la pesca del langostino es una de las actividades más importantes que se realiza en el Mar Argentino, siendo la pesca más rentable de la Zona Económica Exclusiva Argentina (de la Garza et al., 2017).

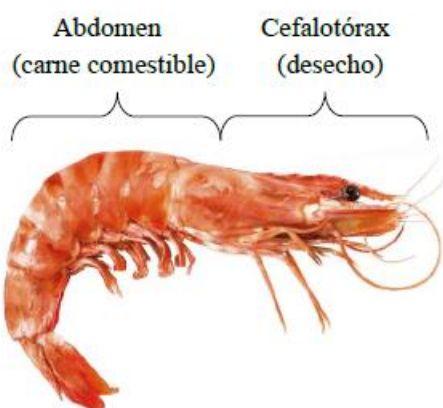


Figura 1.1. Langostino (*Pleoticus muelleri*).

El procesamiento doméstico e industrial del langostino implica la separación de los residuos de cefalotórax (desechos) y abdomen (carne comestible), Fig. 1.1. Los estudios muestran que dicho procesamiento genera entre el 40 y el 60 % del desperdicio de alimentos (Saini et al., 2020).

El cefalotórax, un subproducto no comestible del langostino, puede representar hasta un 56 % del peso total del crustáceo (Pascual-Silva et al., 2022). A pesar de ser elemento de descarte, el cefalotórax alberga una cantidad significativa del aceite, el cual ha atraído la

atención en los últimos años debido a su alto contenido de AGPI, especialmente AGPI ω -3 de cadena larga, como el EPA y el DHA, que son reconocidos por sus beneficios para la salud. Además, el cefalotórax contiene otros componentes bioactivos como ASX, que es un carotenoide antioxidante responsable de la coloración característica de este crustáceo (Cretton et al., 2021; Gómez-Estaca et al., 2017, 2019).

El aprovechamiento de los desechos de procesamiento de langostinos resulta una vía valiosa para recuperar componentes bioactivos, los cuales pueden ser utilizados como suplementos para promover la salud (Williamson et al., 2020). Esta iniciativa no solo tiene un impacto positivo en términos de sostenibilidad, sino que también puede generar ingresos excedentes que contribuyan significativamente a mejorar la economía asociada con la producción y el procesamiento de alimentos.

1.1.2.1.1. Ácidos grasos en la alimentación

Para mantener una alimentación equilibrada es necesario incluir distintos tipos de nutrientes que cumplen diversas funciones en el organismo. Dentro de ellos, podemos destacar a los ácidos grasos (AG), que se definen como biomoléculas de origen lipídico que consisten en cadenas lineales hidrocarbonadas y contienen en su extremo un grupo carboxilo. La longitud de la cadena de carbonos y el número y localización de dobles enlaces confieren a los AG propiedades fisiológicas diferentes y permite agruparlos en AG saturados, aquellos que no presentan ningún doble enlace; monoinsaturados, los que tienen un solo doble enlace; y poliinsaturados, con dos o más dobles enlaces. A su vez, los AGPI se agrupan según el carbono en el que se sitúa el primer doble enlace, contando a partir del grupo metilo terminal. Cuando se encuentra en el carbono 3 (C3), se denominan AGPI omega-3 (ω -3), mientras que si el primer doble enlace aparece en carbono 6 (C6), se llaman AGPI omega-6 (ω -6) (Piñeiro-Corrales et al., 2013; Wang et al., 2021).

El compuesto predominante de la familia de los AGPI ω -6 es el ácido linoleico (C18:2) y de la familia de los AGPI ω -3 son el EPA (C20:5), el DHA (C22:6) y el ácido α -linolénico (ALA,

C18:3) (Walker et al., 2015), Fig. 1.2. El EPA y el DHA se encuentran tanto en animales como vegetales de origen marino (Alfonso Valenzuela et al., 2012).

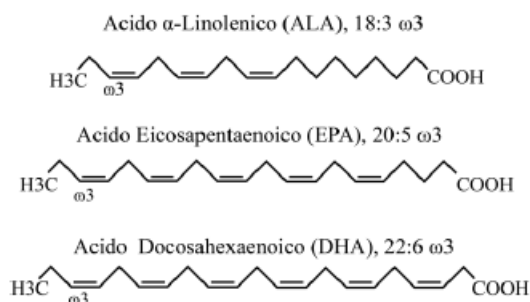


Figura 1.2. Estructura química de los principales AGPI de la serie ω -3.

Tanto los AGPI ω -3 como los ω -6 son esenciales, es decir que deben ser incorporados con la dieta, debido a la incapacidad del organismo humano para sintetizarlos a partir de otros AG consumidos habitualmente (Taneja & Singh, 2012). Una ingesta adecuada es fundamental para el funcionamiento normal de las membranas celulares, el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central, así como para el correcto desempeño de múltiples procesos metabólicos y bioquímicos del organismo (Barsky & Blesson, 2020; Geranpour et al., 2020).

Se ha establecido una proporción dietética recomendada de AGPI ω -6 y ω -3 en el rango de 1:1 a 5:1. Sin embargo, la predominancia de alimentos ricos en ω -6 y la ingesta insuficiente de ω -3 en la dieta contemporánea dificultan el logro de este equilibrio (Patel et al., 2022; Saini & Keum, 2018). Marion-Letellier et al. (2013) informaron un aumento preocupante de EII en países donde antes eran poco frecuentes, y explicaron este fenómeno como una consecuencia directa del mayor consumo de AGPI ω -6 debido a la occidentalización de las dietas en esas poblaciones. Por otro lado, diversos estudios llevados a cabo tanto en animales como en seres humanos han proporcionado evidencias sobre los efectos beneficiosos de incorporar AGPI ω -3 en la dieta.

Los beneficios de salud y nutricionales derivados del consumo de AGPI ω -3 de origen marino están sólidamente demostrados en la literatura científica y su consumo es fuertemente recomendado por las autoridades de salud y nutrición en todo el mundo tales como la OMS (OMS, 2003).

Estos compuestos han demostrado atenuar reacciones inflamatorias del sistema inmune, lo que los convierte en posibles agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas (Calder, 2017; Zhao et al., 2017). Numerosas investigaciones han demostrado las diversas aplicaciones clínicas de los AGPI ω -3, principalmente el EPA y DHA, destacando sus beneficios en la salud cardiovascular, la reducción de procesos inflamatorios intestinales, la prevención de ciertas enfermedades crónicas y hasta con efectos anticancerígenos, siendo cada día más recomendado su consumo tanto para la prevención como el tratamiento de estas enfermedades (Calder, 2018; Nodari et al., 2011; Piñeiro-Corrales et al., 2013; Rodrigo Valenzuela et al., 2011).

Ante esta información, surge el interés en enriquecer los alimentos con AGPI ω -3 como una estrategia para contrarrestar los posibles desequilibrios en la dieta y, potencialmente, contribuir a la prevención y el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas.

Sin embargo, es conocido el bajo consumo de productos del mar en muchos países occidentales, debido al alto costo y/o a la existencia en la población de sectores que los descartan de su alimentación, ya sea por falta de hábitos, porque le desagrada su sabor o deciden seguir una dieta vegana (Walker et al., 2015). Además, el consumo directo de los aceites de langostinos no constituye una alternativa viable debido a problemas organolépticos (sabor y olor) y a la alta inestabilidad de estos productos, ya que, por efecto de la temperatura, luz, y presencia de metales, entre otros factores, se deterioran con mucha facilidad desarrollando procesos de oxidación irreversibles (Valenzuela & Videla, 2011). Una alternativa nutricional para enfrentar este importante déficit de AGPI ω -3, son los suplementos nutricionales, especialmente a base de aceites de origen marino.

Los desechos de langostinos muestran una composición de AG que incluye una alta proporción de AG saturados, junto con cantidades significativas de AGPI que representan aproximadamente el 34 % del total de AG presentes (Kandra et al., 2012).

A pesar de sus beneficios para la salud, su alto contenido en AGPI los hace altamente susceptibles a la oxidación durante la extracción, el procesamiento, el transporte y el

almacenamiento (Li et al., 2019), lo que conlleva una menor vida útil, sabores desagradables y pérdida de valor nutricional (Maqsood et al., 2014; Sultana et al., 2021). Estos factores limitan su uso en ingredientes funcionales, ya que podrían afectar negativamente las características sensoriales y nutricionales del producto final. Esto implica varios desafíos a la hora de producir, transportar y almacenar alimentos con altos contenidos de AGPI ω -3, lo que hace necesario el desarrollo de metodologías que permitan proteger eficazmente estos componentes (Drusch & Berg, 2008; Zimet & Livney, 2009). El control de la oxidación, especialmente en sus etapas iniciales, es esencial para el diseño de ingredientes nutraceuticos y alimentos estables que contengan estos aceites.

Para superar estas limitaciones, es esencial desarrollar tecnologías que permitan un adecuado manejo de los AG presentes en los desechos de langostinos. De esta manera, se podría optimizar su aprovechamiento y asegurar la estabilidad de EPA y DHA, con el objetivo de obtener el máximo beneficio nutricional y funcional de estos valiosos componentes.

1.1.2.1.2. Compuestos antioxidantes

Los compuestos antioxidantes son sustancias capaces de prevenir o retardar la oxidación, un proceso que puede provocar el deterioro de los alimentos (rancidez, pardeamiento) y generar daño celular en organismos vivos, como la oxidación del ADN, lípidos o proteínas. En términos bioquímicos, se define como antioxidante a toda sustancia que, en bajas concentraciones respecto al sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente su oxidación (Atta et al., 2017; Griffiths et al., 2016).

Los antioxidantes pueden clasificarse, según su origen, en naturales y sintéticos (Seyedsadjadi & Grant, 2020). Los antioxidantes sintéticos son obtenidos por síntesis química, utilizados principalmente como aditivos en alimentos para prevenir la oxidación lipídica y prolongar la vida útil de los productos. Por su parte, los antioxidantes naturales comprenden una amplia variedad de compuestos producidos por plantas, animales y microorganismos. Entre ellos, destaca la ASX, cuyo perfil antioxidante superior se debe a su estructura molecular,

que le permite insertarse en las membranas celulares y ejercer una protección integral, tanto en la superficie como en el núcleo (Ambati et al., 2014).

La ASX, conocida químicamente como 3,3'-dihidroxi- β , β' -caroteno-4,4'-diona, es un carotenoide xantofílico perteneciente al grupo de los tetraterpenoides, y su fórmula molecular es $C_{40}H_{52}O_4$. Posee una estructura que consiste en una cadena de polieno lineal y dos anillos β terminales, Fig. 1.3. La molécula posee grupos hidroxilo (-OH) y grupos cetona (C=O) en cada uno de los anillos terminales, mientras que su cadena central de polieno presenta enlaces dobles conjugados, los cuales son responsables de su coloración rojiza (Martínez-Delgado et al., 2017; Mota et al., 2022; Mularczyk et al., 2020).

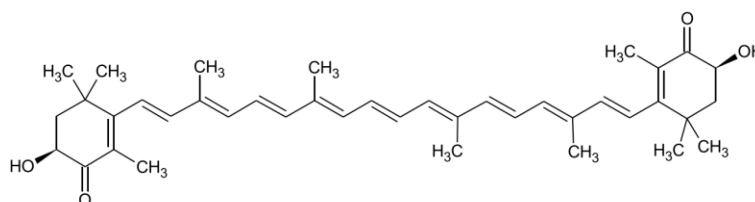


Figura 1.3. Estructura química de ASX.

En particular, los aceites de camarón, krill y langostino contienen pigmentos liposolubles, principalmente ASX. En estos aceites también se han detectado otros carotenoides, como el β -caroteno, la equinenona, la cantaxantina, el astaceno, la zeaxantina y otros compuestos no identificados (Su et al., 2018). La ASX y sus ésteres son los carotenoides predominantes en estas especies, representando aproximadamente entre el 67 % y el 95 % del contenido total de carotenoides y siendo los principales responsables de la característica coloración rojo-anaranjada de los crustáceos y sus aceites (Gulzar et al., 2020; Nirmal et al., 2020).

Debido a sus propiedades excepcionales, la ASX ha captado la atención de numerosos investigadores en los últimos años. Su bioactividad ha sido objeto de extensos estudios, tanto en entornos controlados de laboratorio (*in vitro*) como en organismos vivos (*in vivo*), incluyendo ensayos en animales y humanos (Donoso et al., 2021). Actualmente, existe evidencia sustancial que respalda las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y

antitumorales de ASX en la salud humana (McCall et al., 2018; Park et al., 2010; Singh et al., 2020).

Particularmente, la ASX se destaca por su alta actividad antioxidante, siendo diez veces más potente que el β -caroteno y hasta cien veces más eficaz que la vitamina E (Naguib, 2000). Gracias a sus dobles enlaces conjugados, posee la capacidad de neutralizar el oxígeno singlete y eliminar los radicales libres (Kumar et al., 2022). Además, se ha observado que ASX puede inhibir la peroxidación lipídica en muestras biológicas, brindando así un escudo protector frente a posibles daños oxidativos (Ranga Rao et al., 2013). Estudios recientes respaldan las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de la ASX. Un metaanálisis de Ma et al. (2022) mostró reducciones significativas en biomarcadores de estrés oxidativo e inflamación como el malondialdehído (MDA), los isoprostanos y la interleucina-6.

Por último, la ASX es un antioxidante con notable potencial antitumoral, demostrado tanto en estudios *in vitro* como en modelos animales. Su acción se basa en la reducción del estrés oxidativo, la protección del ADN, la modulación de la inflamación y el fortalecimiento de la respuesta inmune. Su capacidad para integrarse en las membranas celulares la hace especialmente eficaz en la neutralización de radicales libres (Galarza et al., 2023). En estudios *in vitro*, ha inhibido la proliferación y migración de células tumorales en cáncer de mama, promoviendo la apoptosis y deteniendo el ciclo celular (McCall et al., 2018). En modelos animales, se ha observado que la ASX previene la carcinogénesis en colon, vejiga, cavidad oral y mama (Galarza et al., 2023).

Sin embargo, debido a su estructura altamente conjugada, la ASX es propensa a degradarse fácilmente, lo que le impone ciertas limitaciones en su uso (Martínez-Delgado et al., 2017). Estas limitaciones son especialmente notables cuando es aislada de su matriz original y expuesta directamente a condiciones industriales, tales como ambientes ácidos, calor, luz, iones de metales de transición, oxígeno singlete y radicales libres. Estos factores ambientales pueden afectar negativamente el color, los valores funcionales y nutricionales, como la estabilidad en el almacenamiento (Armenta & Isabbl, 2009).

1.1.2.1.3. Oxidación lipídica

Una de las principales causas del deterioro de los alimentos es la oxidación lipídica, también conocida como autooxidación.

El proceso de oxidación lipídica comprende un conjunto de reacciones químicas complejas, y puede ser iniciado por diferentes mecanismos, entre los que destacan la acción de radicales libres, la presencia de metales de transición – que actúan como catalizadores – y la exposición a la luz UV. La presencia de varios dobles enlaces en la estructura de los AGPI es lo que los hace especialmente vulnerables a este tipo de reacciones (Fereidoon & Ying, 2010). Los radicales libres generan la remoción de iones hidrógeno de los AGPI, iniciando una reacción catalítica en cadena, definida como autooxidación lipídica, que puede generar más de 60 productos finales, muchos de los cuales son citotóxicos (Chaiyasit et al., 2007). Cabe señalar que, durante la primera etapa de oxidación de los lípidos, se forman “compuestos primarios de oxidación” llamados hidroperóxidos, cuya concentración va aumentando gradualmente a medida que transcurre el tiempo hasta alcanzar un máximo, Fig. 1.4.

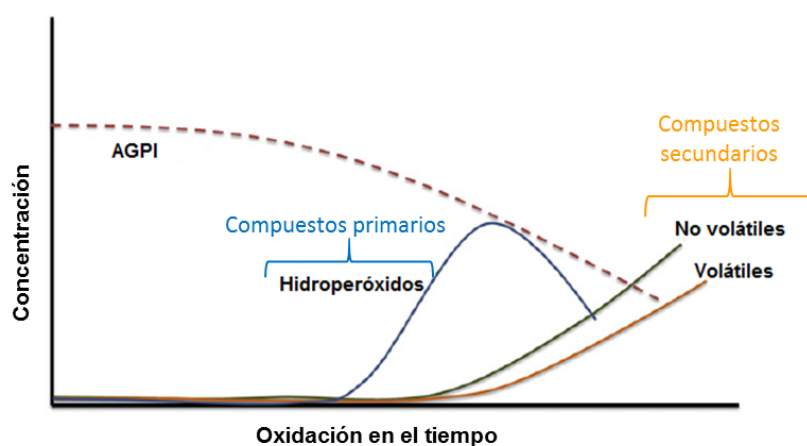


Figura 1.4. Curva cinética de autooxidación de AGPI. Adaptado de Pingret et al. (2013).

Luego la concentración de hidroperóxidos comienza a disminuir, ya que éstos se degradan para dar lugar a los llamados “compuestos secundarios” de la reacción oxidativa (aldehídos, cetonas, hidrocarburos), que además de tener acción citotóxica, son los

responsables de los aromas y sabores desagradables desarrollados en los alimentos rancios y representan una pérdida significativa de calidad (Bodoira et al., 2017; Mansouri, 2020).

La oxidación lipídica representa un desafío en la producción, transporte y almacenaje de alimentos enriquecidos con AGPI (Espinaco et al., 2023). Teniendo en cuenta las dificultades para incorporar estos AGPI directamente en los alimentos, la industria alimentaria debe proponer nuevas estrategias tecnológicas para proteger a estos compuestos de los agresores medioambientales y desarrollar ingredientes funcionales que mejoren la estabilidad de los alimentos que los contienen (Drusch & Berg, 2008; Zimet & Livney, 2009). En particular, una alternativa que ha sido implementada en los últimos tiempos y, la cual utilizamos en el presente trabajo, es la microencapsulación de estos compuestos.

1.1.2.2. Microorganismos probióticos

Se ha comprobado que las bacterias probióticas puedan conferir efectos benéficos sobre la salud humana al ser consumidas en dosis adecuadas y con cierta regularidad (FAO/WHO, 2002).

Entre los microorganismos probióticos, ya estudiados y ampliamente utilizados en la industria de los alimentos, se encuentran principalmente cepas específicas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, algunas cepas de especies de *Bacillus*, y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* o *S. boulardii*, entre otros (Rodríguez et al., 2016). Comercialmente y a nivel mundial, se las puede encontrar bajo distintas presentaciones como, por ejemplo, cápsulas, perlas de liberación controlada, bebidas fermentadas lista para consumo, *smoothies*, también pueden encontrarse probióticos en productos tales como yogures o quesos o polvos listos para su consumo. En este último caso las preparaciones pueden obtenerse a través de distintos procedimientos, los dos más utilizados consisten en la liofilización o, en gran medida a escala industrial, el secado por aspersión.

Los microorganismos probióticos en general han sido propuestos para modular la actividad de la microbiota del intestino y la inmunidad local o sistémica, para prevenir infecciones entéricas o ejercer efectos antiinflamatorios; lo cual contribuye al buen

funcionamiento y protección del tracto gastrointestinal en animales y humanos. Sin embargo, se ha observado que la influencia de diversos factores de estrés tales como la acidez gástrica y las sales biliares; las enzimas digestivas, niveles de oxígeno y el pH; la presencia de inhibidores; la temperatura de almacenamiento y la composición de matrices de alimentos, pueden traducirse en pérdidas de la viabilidad y capacidad de supervivencia de estos o alteran su funcionalidad sin necesariamente modificar el número de células viables (Anal & Singh, 2007). Dados estos factores condicionantes, diversos trabajos se han enfocado en desarrollar y mejorar estrategias para estabilizar probióticos, siendo una de ellas la encapsulación. Dicha técnica podría mejorar la supervivencia de los probióticos durante su permanencia en alimentos y/o su paso por el sistema digestivo.

1.1.2.2.1. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1

La leche materna se ha convertido en una fuente interesante de microorganismos potencialmente probióticos. Es una fuente de bacterias viables, procedentes del intestino materno, las cuales son llevadas por las células dendríticas y macrófagos, vía el sistema linfático, hasta las glándulas mamarias (Jeurink et al., 2013). En el año 2008, en el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, CONICET/UNL), comenzaron los intentos por aislar bacterias potencialmente probióticas a partir de leche materna humana. Es en este contexto que se logró aislar y caracterizar la cepa *B. lactis* INL1.

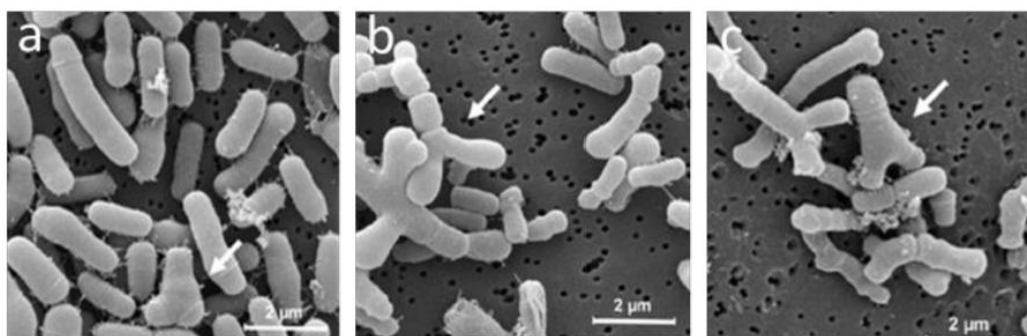


Figura 1.5. Micrograffías electrónicas de barrido de *B. lactis* INL1. Las flechas blancas indican la morfología típica de las bacterias. Material obtenido de Vinderola et al. (2012).

La cepa probiótica *B. lactis* INL1 pertenece al género de bacterias Gram-positivas, presenta morfología de bastón de largo variable y sección relativamente constante. Se

consideran bacterias no móviles y suelen presentar una estructura característica de “horqueta” o “Y” que permite reconocerla fácilmente al microscopio, Fig. 1.5.

Si se pretende desarrollar un ingrediente funcional, los ensayos sobre la funcionalidad y la seguridad de los nuevos aislados bacterianos cuyo consumo se destinaría a seres humanos es un prerrequisito (FAO/WHO, 2002). El hecho de que la cepa se haya aislado de leche materna, la cual es administrada por las madres hacia los recién nacidos durante los primeros días de vida, sugiere que la misma sería segura y potencialmente reguladora de la función inmune (Vinderola et al., 2004). Además, la especie *B. lactis* es una de las especies comúnmente incorporadas en ingredientes funcionales por sus diversos efectos benéficos tales como la reducción del riesgo de contraer diarrea por parte de los niños y aliviar trastornos alérgicos.

Por otro lado, cepas potencialmente probióticas con poca tolerancia a los parámetros tecnológicos son de limitado interés para la industria alimentaria si no pueden superar los obstáculos del procesamiento de alimentos (Ross et al., 2005). Para tener en cuenta, el secado por aspersión es una herramienta ampliamente utilizada en la industria para la deshidratación por lo cual es una potencial alternativa más económica y versátil de escalar a planta industrial, que la liofilización o *freeze-drying* para la producción de cultivos probióticos.

En el año 2017, Burns et al. (2017) publicaron los resultados de un estudio llevado a cabo con la cepa *B. lactis* INL1 secada por aspersión y sus efectos sobre la colitis crónica y aguda en ratones. En cuanto al secado por aspersión, y al igual que Loyeau et al. (2018), se evidenció una satisfactoria capacidad de resistencia al proceso, con una tasa de supervivencia cercana al 97 %. La cepa *B. lactis* INL1, tanto como cultivo fresco o secado por aspersión en leche reconstituida al 20 %, mantuvieron la capacidad antiinflamatoria en el modelo de colitis.

Por lo tanto, la cepa *B. lactis* INL1 se considera un agente bioactivo de interés para formular un ingrediente funcional mediante la técnica de encapsulación y sus variantes, convirtiéndose en uno de los objetivos de la presente tesis.

1.1.3. Encapsulación

Como se señaló previamente, tanto los AGPI ω -3 como la ASX son compuestos sensibles a la degradación cuando se exponen a factores ambientales como el oxígeno, la luz, la humedad y el calor. Durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos, estos compuestos suelen estar expuestos a condiciones adversas que comprometen su estabilidad y pueden dar lugar a la formación de alteraciones organolépticas desfavorables. Además, al atravesar el tracto gastrointestinal, pueden sufrir transformaciones estructurales que afecten tanto su estabilidad como su bioactividad. A esto se suma su escasa solubilidad en agua, lo cual dificulta su incorporación en productos alimenticios de base acuosa (Alu'datt et al., 2022; Đorđević et al., 2014).

Ante este panorama, en el área de investigación y desarrollo de nuevos alimentos, el propósito de la encapsulación radica en la contención de compuestos bioactivos y su protección contra factores ambientales durante el almacenamiento. Funciona como una barrera que controla la liberación, solubilidad y biodisponibilidad de los compuestos estabilizándolo durante el pasaje por el tracto gastrointestinal; al mismo tiempo, simplifica la manipulación y transporte, además de enmascarar sabores y aromas indeseados (Calderón-Oliver & Ponce-Alquicira, 2022; Shishir et al., 2018).

La microencapsulación es un proceso en el cual se genera una barrera funcional entre el núcleo y el material de pared para evitar reacciones químicas y físicas que puedan deteriorar o modificar las propiedades biológicas y fisicoquímicas de los materiales de interés que se ubican en el núcleo (Zabot et al., 2022). El resultado son pequeñas cápsulas con diversas morfologías y diámetros que oscilan entre 1 y 1000 μm (Chang & Nickerson, 2018; Dias et al., 2015).

En el caso de aplicaciones alimentarias, el núcleo suele estar constituido por el compuesto bioactivo, mientras que los materiales de pared están formados, en general, por polímeros de grado alimentario, principalmente proteínas y/o polisacáridos (Alu'datt et al., 2022).

Las numerosas ventajas que presenta la microencapsulación han llevado a aumentar la utilización de esta técnica en la industria alimentaria en los últimos años. En la actualidad, existen numerosas técnicas de microencapsulación y se espera que este número continúe creciendo debido a la identificación de nuevos materiales para encapsular y a la aparición de nuevos principios bioactivos que requieren procesos de microencapsulación específicos (Fioramonti et al., 2015).

La elección del método adecuado de microencapsulación y del material de pared depende de la aplicación que tendrá la microcápsula, el tamaño de partículas requerido, las propiedades físicas y químicas tanto del núcleo como del material de pared, el mecanismo de liberación, la escala de producción y el costo (Alu'datt et al., 2022; da Silva et al., 2014).

El desarrollo de un sistema de microencapsulación eficaz se basa en el conocimiento del componente activo que se quiere encapsular, así como su estabilidad y los factores que intervienen en su proceso degenerativo. Se deben conocer las propiedades del material de pared que se ha elegido como matriz encapsulante y el adecuado proceso para la aplicación final (Nazzaro et al., 2012).

1.1.3.1. Materiales de pared

Existe una amplia variedad de materiales sintéticos y naturales, capaces de combinarse con el fin de obtener propiedades de barrera. Dentro de los materiales de pared utilizados para la encapsulación se pueden encontrar activos hidrofílicos como ciertos polisacáridos, gomas, proteínas de origen vegetal o animal y activos hidrofóbicos como lípidos, grasas y polímeros (Sobel et al., 2014).

La elección adecuada del material de pared es muy importante dado que influye sobre la eficiencia de encapsulación y la estabilidad de la microcápsula (da Silva et al., 2014).

Los criterios para seleccionar un material de pared ideal se basan principalmente en alta solubilidad en agua, poseer sabor y aroma neutros, baja viscosidad a altas concentraciones, baja capacidad de absorción de agua atmosférica, bajo costo, no reaccionar ni solubilizarse con el material encapsulado y proporcionarle la máxima protección. Además, en el caso de

encapsular aceites, el material de pared debe tener suficiente capacidad emulsionante para producir emulsiones estables antes del secado por aspersión (Augustin & Hemar, 2009).

Los biopolímeros, como proteínas y polisacáridos, han sido usados como materiales de pared para la producción de microcápsulas más allá de sus propiedades emulsionantes y estabilizantes (Bae & Lee, 2008). Su amplio uso se justifica por ser biodegradables y biocompatibles. Esta particularidad les ha otorgado el estatus de sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS, *Generally Recognized As Safe*, por sus siglas en inglés). Esta designación implica que estos compuestos pueden ser incorporados en alimentos sin comprometer la seguridad del consumidor (McClements, 2006; Neiryck et al., 2007).

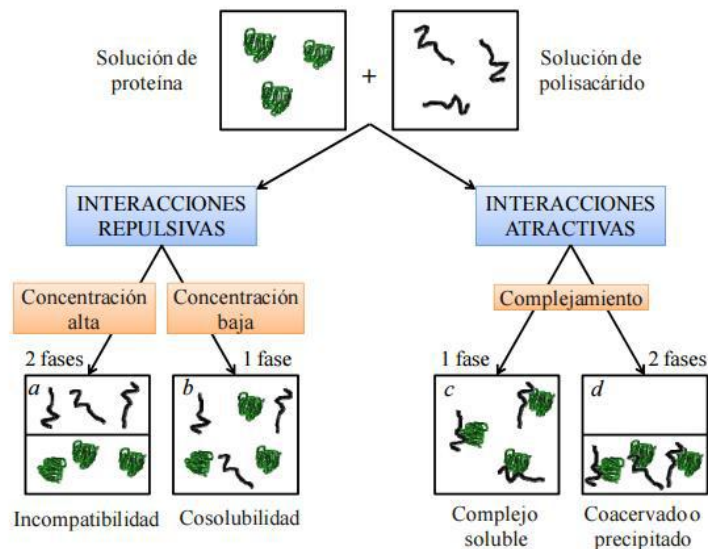


Figura 1.6. Representación esquemática de los cuatro posibles sistemas obtenidos por mezclar soluciones de una proteína y un polisacárido. Adaptado de Guzey & McClements (2006).

Cuando se tiene una mezcla de biopolímeros en solución, pueden existir entre ellos interacciones sinérgicas o antagónicas, que podrían promover la modificación de sus propiedades funcionales. El conocimiento del origen y la naturaleza de estas interacciones podrían ser utilizados para el diseño de nuevas estructuras en matrices alimentarias. Cuando dos biopolímeros se mezclan en solución, por ejemplo, una solución de proteínas y otra de

polisacáridos, pueden tener lugar algunos de los fenómenos representados esquemáticamente en la Fig. 1.6

Las interacciones entre ambos pueden ser de carácter atractivo - cuando los biopolímeros se atraen entre sí y forman complejos -, o repulsivo - cuando los biopolímeros se repelen mutuamente dando lugar a una incompatibilidad termodinámica. Si las proteínas y los polisacáridos muestran atracción neta, dependiendo de la concentración de los biopolímeros en solución y del pH, podría ocurrir la formación de complejos proteína-polisacárido solubles, Fig. 1.6 c; este es el tipo de interacciones con los que se desea trabajar en esta tesis.

1.1.3.1.1. Proteína de soja

Las proteínas de soja son el representante más importante de las proteínas de leguminosas debido a su alto contenido proteico y su equilibrada composición de aminoácidos, mostrando un gran potencial como sustitutos de las proteínas de la carne y los lácteos (Yuan et al., 2014).

El concentrado de proteína de soja (SPC) es un producto que se obtiene a partir de los porotos de soja, compuesto principalmente glicina y β -conglucina. El SPC es rico en compuestos bioactivos (como vitamina E y nueve aminoácidos esenciales), posee un excelente equilibrio hidrofílico e hidrofóbico, así como propiedades de agregación térmica/gelificación que podrían estabilizar las emulsiones. El SPC se ha utilizado ampliamente en la industria alimentaria debido a sus beneficios nutricionales y propiedades funcionales, tales como la solubilidad, gelificación, emulsificación y capacidad espumante. Presenta una naturaleza anfótera con carga negativa por encima de su punto isoelectrico (pI) de 4.5. Sin embargo, la solubilidad de la mayoría del SPC disminuye drásticamente en el rango de pH de 3 a 5, lo que limita su aplicación en condiciones ácidas. Para resolver este problema, la homogeneización por mezcla, el tratamiento ultrasónico o la microfluidización podrían disolver el SPC (Gao et al., 2022; Tavares et al., 2021).

1.1.3.1.2. Quitosano

El quitosano (CHT) representa un biopolímero de gran interés por sus funcionalidades complementarias en formulaciones alimentarias y farmacéuticas. Este polímero natural ha cobrado relevancia gracias a sus destacadas propiedades fisicoquímicas y biológicas (Jiménez-Gómez & Cecilia, 2020). Es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa, se obtiene mediante un proceso de deacetilación alcalina de la quitina (Fig. 1.7), la cual proviene principalmente del exoesqueleto de crustáceos (como el langostino) y de ciertos hongos (Khutoryanskiy, 2014). El grado de deacetilación, idealmente superior al 85 %, junto con su peso molecular, determina muchas de sus funcionalidades (Zhang et al., 2021).

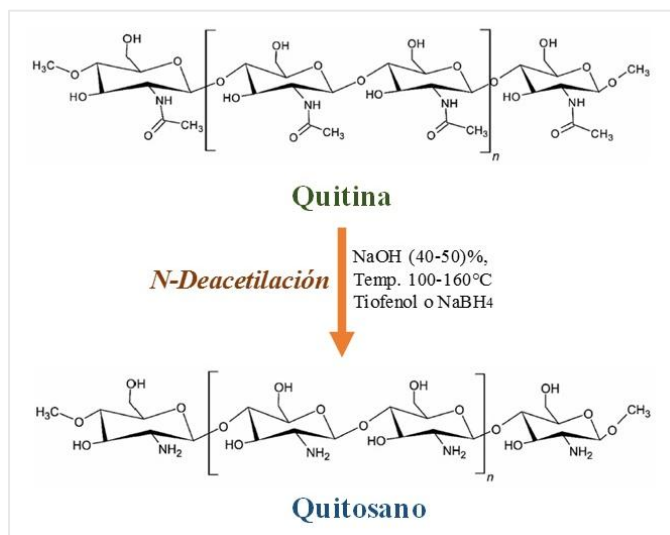


Figura 1.7. Estructura química de la quitina y el CHT luego del proceso de deacetilación.

Desde el punto de vista fisicoquímico, el CHT es una base débil con un pK_a entre 6.3 – 6.5. Es soluble en medios ácidos ($\text{pH} < 6$), donde los grupos amino se protonan, volviéndose un polielectrolito catiónico; por encima de ese pH , se desprotona y precipita (Klinkesorn & McClements, 2009). Posee alta viscosidad, capacidad para formar enlaces de hidrógeno y para adsorberse en interfaces, reduciendo la tensión interfacial. Además, puede formar complejos con iones metálicos, actuar como floculante y procesarse en diversas formas físicas (películas, geles, nanopartículas, entre otros), lo que amplía su versatilidad (Jiménez-Gómez & Cecilia, 2020).

1.1.3.1.3. Maltodextrina

La maltodextrina (MDX), fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n \cdot H_2O$, es un producto obtenido por la hidrólisis ácida o enzimática del almidón, o la combinación de ambas, que consiste en oligómeros y/o polímeros de D-glucosa unidos principalmente por enlaces glucosídicos α -1,4 (Klinkesorn et al., 2004).

En la actualidad se cuenta con un amplio respaldo regulatorio por parte de la FDA (*Food and Drug Administration*): está catalogada como sustancia GRAS en la industria alimentaria e incluida en la Base de Datos de Ingredientes Inactivos para su aplicación en el sector farmacéutico.

En la industria alimentaria son muy utilizadas como agentes estabilizantes, espesantes, sustitutos de grasas y aceites en aderezos para ensaladas, margarinas y postres congelados. También ayudan a controlar la textura, la higroscopicidad y la densidad en algunos alimentos.

Además, presenta buena relación costo/beneficio, ya que se ha utilizado junto con otros polímeros actuando como coadyuvante de secado, aumentando la concentración de sólidos totales en solución y reduciendo los gastos de producción, como los relacionados con la energía y materia prima, al reemplazar de manera parcial a polímeros de mayor valor (Mahdavi et al., 2014). Sin embargo, es importante destacar que su capacidad de emulsionar es limitada, por este motivo, las emulsiones que contienen MDX requieren, además, un agente emulsificante adicional para formular una emulsión estable (Klinkesorn et al., 2004).

En el secado por aspersión, a menudo se recurre a la mezcla con MDX con el propósito de disminuir los costos y mejorar la eficiencia de encapsulación (Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015).

1.1.4. Emulsiones como tecnología de encapsulación de compuestos bioactivos

La emulsificación es una técnica que es ampliamente utilizada para producir productos farmacológicos o ingredientes funcionales con la intención de proteger compuestos de interés.

Básicamente, una emulsión consiste en al menos dos líquidos inmiscibles, generalmente una fase oleosa y una fase acuosa, dispersándose una de las fases como pequeñas

gotas esféricas en la otra. Un sistema que consiste en gotas de aceite dispersas en una fase acuosa se denomina emulsión de aceite en agua (*O/W, oil/water*), mientras que un sistema que consiste en gotas de agua dispersas en una fase oleosa se conoce como emulsión agua en aceite (*W/O, water/oil*) (Chung & McClements, 2015).

Debido a la inmiscibilidad de los líquidos, una emulsión es un sistema termodinámicamente inestable, que tiende a desestabilizarse a lo largo del tiempo debido a una variedad de mecanismos fisicoquímicos: separación gravitacional (cremado), sedimentación, floculación, coalescencia y maduración de Ostwald, los cuales se encuentran representado en la Fig. 1.8 (McClements & Jafari, 2018; Rayees et al., 2024). De todas maneras, es posible formular emulsiones que sean cinéticamente estables por un periodo de tiempo razonable utilizando fuerzas mecánicas intensas y/o incluyendo emulsionantes (Kuhn & Cunha, 2012).

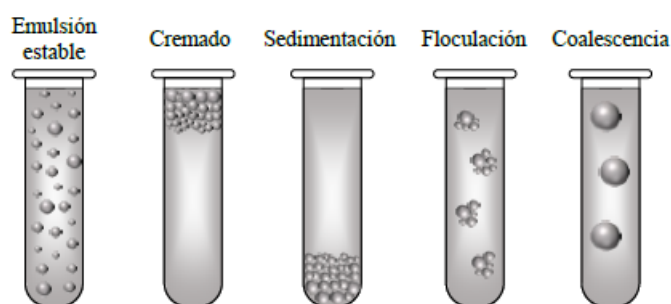


Figura 1.8. Mecanismos de desestabilización de emulsiones. Adaptado de McClements & Jafari (2018).

Las proteínas son los agentes emulsionantes más comúnmente utilizados en la actualidad (proteínas lácteas, de soja, de huevo, etc.), ya que son ingredientes naturales, económicos y están ampliamente disponibles (Berton-Carabin & Schroën, 2015; Cai et al., 2023). Las mismas, por su carácter anfifílico, actúan como tensoactivos macromoleculares y tienen la particularidad de adsorberse en la interfase formando una cubierta viscoelástica cuyas propiedades mecánicas influyen en la estabilidad del sistema coloidal (Ozturk & McClements, 2016).

Tradicionalmente las emulsiones son preparadas mediante la homogeneización de la fase acuosa junto con la oleosa en presencia de un emulsificante soluble en alguna de las dos fases. Este proceso requiere del aporte de energía para deformar la interfase aceite-agua de manera tal que se generen gotas, aumentando el área superficial. Durante la homogeneización se facilita la adherencia del emulsificante a la superficie interfacial, reduciendo la tensión superficial y formando una capa protectora que previene la agregación de las gotas (Kuhn & Cunha, 2012).

La formación de gotas de emulsión durante la homogeneización de las fases inmiscibles se encuentra influenciada principalmente por dos factores claves: la cantidad de agente emulsionante presente en la mezcla y la energía total suministrada al sistema, esta última determinada por la tecnología utilizada en la preparación de la emulsión (McClements, 2015).

En muchas operaciones industriales y estudios científicos la formación de una emulsión se realiza en dos pasos: (i) las fases separadas de aceite y agua se convierten en una emulsión gruesa que contiene gotas grandes mediante el empleo de un tipo de homogeneizador (mezclador de alta velocidad), (ii) luego el tamaño de las gotas se reduce mediante el uso de otro tipo de homogeneizador. Para este último paso, existe una gran variedad de homogeneizadores disponibles incluyendo los homogeneizadores de alta presión, ultrasónicos y de membrana, entre otros (McClements, 2010). Los homogeneizadores de alta presión son los más frecuentemente utilizados en la industria para producir emulsiones alimentarias, permitiendo obtener sistemas con buenas propiedades de textura y gran estabilidad. En este proceso, las gotas que en su mayoría son demasiado grandes son subsecuentemente rotas hasta obtener partículas de menor tamaño. La disminución del tamaño promedio de gotas reduce los procesos de desestabilización de las emulsiones (Kuhn & Cunha, 2012).

Las emulsiones O/W, son propensas a la inestabilidad física y química cuando son expuestas a tensiones ambientales (calentamiento, refrigeración, congelación, secado, cambios de pH y fuerza iónica), debido a que contienen gotas de aceite recubiertas con una sola capa de biopolímeros, lo que limita su capacidad de resistencia frente a estos factores (Guzey &

McClements, 2006). Se han reportado muchos trabajos en los cuales se usan distintas estrategias para encapsular aceite, mediante formulación de emulsiones. Entre las estrategias utilizadas se encontraron, emulsiones multicapa (Copado et al., 2021), emulsiones bicapa (Acosta et al., 2024), coacervados (Bordón et al., 2022), con adición de antioxidantes y mezclas de antioxidantes (Acosta et al., 2024; Ixtaina et al., 2023). En todos estos trabajos se combinaron diferentes técnicas para preparar la emulsión.

Una de las estrategias para mejorar la estabilidad de las emulsiones O/W, se basa en la técnica de deposición electrostática capa por capa (*layer-by-layer*, por sus siglas en inglés) (McClements, 2015). Esta técnica consiste en la adsorción secuencial de polielectrolitos con cargas opuestas sobre la superficie de las partículas lipídicas, aprovechando la atracción electrostática para formar capas estables que mejoran la protección y estabilidad de la emulsión, Fig. 1.9 (Copado et al., 2021; Guzey & McClements, 2006).

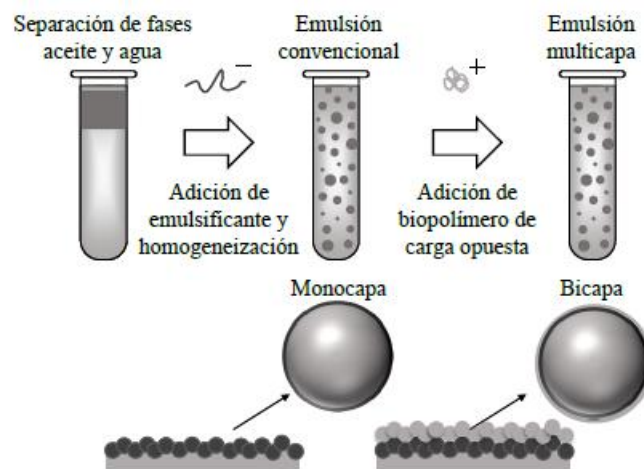


Figura 1.9. Representación esquemática de la formación de emulsiones convencionales y multicapa. Adaptado de McClements (2010).

Estas películas protectoras proporcionan al sistema una repulsión tanto estérica como electrostática que estabiliza la emulsión en un amplio rango de condiciones variables de pH, temperatura, entre otros (Fioramonti et al., 2015). El pH afecta la ionización de los polímeros, influyendo directamente en la formación de capas y en el potencial zeta de las emulsiones. Por

ello, es fundamental seleccionar un pH óptimo que prevenga la aglomeración de las gotas y garantice la estabilidad del sistema (Fioramonti et al., 2019).

Una de las ventajas que poseen este tipo de sistemas es que permiten diseñar películas interfaciales con distintas propiedades. Esto promovería un aumento en la estabilidad de las emulsiones frente a condiciones de estrés, mejorando la protección de los componentes encapsulados (Burgos-Díaz et al., 2016). Además, prolongan el tiempo de residencia del compuesto bioactivo en el tracto gastrointestinal y aumentan la interacción con los tejidos (Chen et al., 2006). Mediante esta tecnología, se podría regular la liberación de los agentes funcionales en respuesta a cambios específicos en el entorno, como dilución, pH, fuerza iónica, temperatura, entre otros (McClements, 2012).

1.1.5. Tecnologías de deshidratación de emulsiones

Los métodos de deshidratación que se emplean comúnmente en la industria son la liofilización y el secado por aspersión (Gómez-Cruz & Jiménez-Munguía, 2014).

1.1.5.1. Secado por aspersión

El secado por aspersión de una suspensión de componente bioactivo es el método más utilizado para producir microcápsulas, donde el componente de interés queda recubierto por el material de pared (Bae & Lee, 2008; Partanen et al., 2008). Esto resulta en la producción de partículas con dimensiones que oscilan entre 10 y 100 μm (Bakry et al., 2016). Los polvos generados suelen tener baja actividad de agua (a_w), ser de fácil manejo y disposición para el almacenamiento y también protegen el agente bioactivo contra reacciones indeseables (oxidación, degradación) (Geranpour et al., 2020; Gómez-Cruz & Jiménez-Munguía, 2014). Por otro lado, de los métodos de encapsulación existentes, el secado por aspersión se encuentra desarrollado tecnológicamente desde escala laboratorio, pasando por la escala piloto y hasta el nivel industrial, lo que aumenta la factibilidad del escalado de algún desarrollo y su transferencia al sector productivo (Gharsallaoui et al., 2007).

El principio del secado por aspersión consiste en la atomización de un líquido (solución, suspensión o emulsión) en una corriente de aire caliente, dentro de una cámara de secado. El agua se evapora instantáneamente permitiendo que el compuesto bioactivo quede atrapado dentro de una película de material encapsulante. Una esquematización del proceso se presenta en la Fig. 1.10.

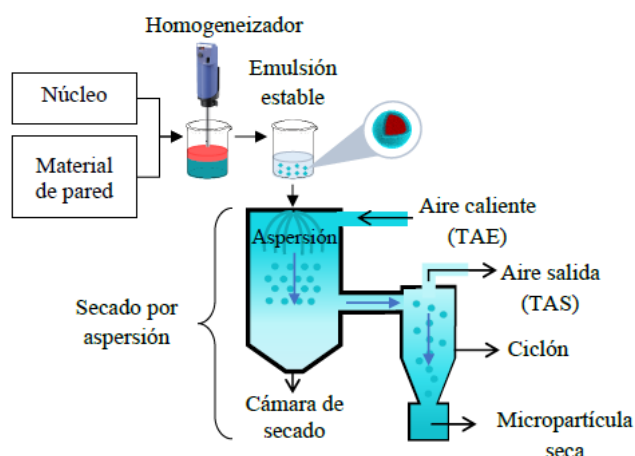


Figura 1.10. Esquema del proceso de encapsulación mediante secado por aspersión.

El secado por aspersión se recomienda ampliamente como método de secado para compuestos muy volátiles y sensibles al calor debido a su corto tiempo de contacto con el aire a alta temperatura y velocidad de evaporación; obteniendo productos finales de buena calidad, estabilidad y funcionalidad lo que amplía el rango de aplicación de este tipo de ingredientes en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética (Mohammed et al., 2020; Özbek & Ergönül, 2017; Zhang et al., 2022). La calidad de las microcápsulas obtenidas a través del secado por aspersión se ve afectada por diversas variables como el contenido de sólidos, viscosidad, material de la pared y temperaturas del aire de entrada y salida, entre otros.

1.1.5.2. Liofilización

La liofilización es una técnica ampliamente utilizada para encapsular compuestos sensibles, basada en la deshidratación por sublimación de muestras previamente congeladas (Fioramonti et al., 2017). Al eliminar el agua directamente del estado sólido al gaseoso, preserva la integridad de sustancias termosensibles. A diferencia de otros métodos, evita la

exposición a altas temperaturas, lo que la hace especialmente adecuada para la microencapsulación de compuestos bioactivos. Los productos obtenidos son fácilmente reconstituibles y, al requerir pocas etapas, el proceso se considera relativamente simple. Sin embargo, su principal desventaja es el alto costo (Pudziuelyte et al., 2020).

1.1.6. Aportes de este trabajo de investigación

La mayoría de los tratamientos antitumorales actualmente disponibles buscan inducir la muerte selectiva de las células tumorales, minimizando al mismo tiempo efectos adversos sobre las células normales del organismo. Sin embargo, muchos de los agentes quimioterápicos utilizados presentan limitada selectividad y generan importantes efectos secundarios, lo que ha impulsado la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas y compuestos bioactivos de origen natural (Kim & Kim, 2018).

El cáncer constituye una enfermedad multifactorial caracterizada por el crecimiento descontrolado de las células, con capacidad de invadir otros tejidos y generar metástasis por vía linfática o hematogénica (Maiuolo et al., 2021). Entre los factores asociados a su desarrollo se encuentran mutaciones genéticas, infecciones, inflamación crónica, exposición a radiaciones, estrés oxidativo y distintos factores ambientales y nutricionales (Wang et al., 2018).

En este contexto, diversos estudios han demostrado que determinados compuestos presentes en alimentos y subproductos marinos podrían ejercer efectos biológicos beneficiosos, incluyendo actividad antioxidante, antiproliferativa y citotóxica frente a líneas celulares tumorales (Gulzar et al., 2020; Jayathilake et al., 2016; Kannan et al., 2011; Kim et al., 2022; Nirmal et al., 2020; Xie et al., 2019).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo se propone el diseño de un ingrediente funcional innovador en polvo y de grado alimenticio, a partir de la encapsulación de AL (fuente animal rica en AGPI ω -3 y ASX) y la cepa potencialmente probiótica *B. lactis* INL1.

Si bien ambos componentes han sido estudiados previamente por separado, existen escasos antecedentes relacionados con su incorporación conjunta en un mismo sistema

encapsulado. Actualmente pueden encontrarse en el mercado suplementos comerciales de AL o de probióticos (en polvo o en cápsulas), pero no se han desarrollado hasta la fecha productos que combinen estos compuestos en una misma formulación para potenciar sus efectos beneficiosos, a partir de fuentes 100 % naturales y sostenibles.

En este contexto, este trabajo propone obtener un ingrediente nutracéutico versátil y fácilmente manipulable, que pueda incorporarse en polvo a una amplia variedad de alimentos, facilitando su adopción cotidiana.

Para ello, se desarrollará una tecnología de emulsiones multicapa - mediante la técnica de deposición electrostática capa sobre capa - empleando proteína de soja, CHT y MDX como materiales de pared. A partir de la deshidratación de estas emulsiones y la adición de una cepa potencialmente probiótica se obtendrán sistemas bicomponentes.

Por un lado, se estudiará la estabilidad oxidativa y la viabilidad celular en los sistemas bicomponentes almacenados a distintas temperaturas, para evaluar sus propiedades fisicoquímicas durante la vida útil. Por otro lado, se analizará la estabilidad de los sistemas bicomponentes frente a un proceso de digestión gastrointestinal simulada *in vitro*, así también como la actividad citotóxica y antiproliferativa del ingrediente funcional digerido frente a líneas celulares de cáncer hepático (HepG2) y cáncer colorrectal (HT-29 y Caco-2).

Desde el punto de vista económico y medioambiental se busca aprovechar un subproducto de la industria alimentaria - como lo es el exoesqueleto del langostino - que en la actualidad se desecha generando grandes inconvenientes desde el punto de vista medioambiental, del cual se puede obtener tanto el aceite (bioactivo) como el CHT (material de pared).

Por todo lo expuesto, esta propuesta constituye un enfoque novedoso para el diseño de ingredientes funcionales basados en fuentes naturales, y contribuir al desarrollo de nuevas formulaciones más seguras y estables, con potencial aplicación en la industria alimentaria y nutracéutica.

1.2. Hipótesis

En base a lo anteriormente expuesto, se propone la siguiente hipótesis:

“El desarrollo de una tecnología para encapsular ácidos grasos ω -3 (junto al potente antioxidante ASX) y probióticos, posibilitará el diseño de un ingrediente capaz de conservar sus propiedades durante el almacenamiento y con efectos benéficos sobre líneas celulares, atribuidos a los bioactivos”.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Diseñar un ingrediente funcional bicomponente en polvo constituido por encapsulados de aceite de langostino y probióticos deshidratados, empleando la tecnología de emulsiones y evaluar su estabilidad durante el almacenamiento y sus propiedades bioactivas *in vitro* en líneas celulares.

1.3.2. Objetivos específicos

- Validar un método espectrofotométrico para determinar índice de peróxidos en aceites altamente pigmentados.
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas y oxidativas del aceite de langostinos.
- Diseñar y caracterizar emulsiones estabilizadas con concentrado de proteínas de soja y quitosano para la encapsulación del aceite de langostinos.
- Obtener y caracterizar encapsulados de aceite de langostinos, obtenidos por deshidratación de las emulsiones, mediante la evaluación de sus propiedades fisicoquímicas y morfológicas.
- Obtener un ingrediente funcional bicomponente en polvo mediante la combinación de encapsulados de aceite de langostinos y probióticos deshidratados, y evaluar su estabilidad durante el almacenamiento a distintas temperaturas.
- Analizar las propiedades bioactivas *in vitro* del ingrediente funcional en líneas celulares.

**2. CAPÍTULO 2: *Validación de
método espectrofotométrico
para la determinación del
índice de peróxidos en aceites
muy pigmentados***

En este capítulo, se presentan los ensayos realizados para validar una técnica espectrofotométrica destinada a la determinación del Índice de Peróxidos (IP) en el AL, ya que la presencia de ASX y otros carotenoides pigmentados en esta matriz, dificultó la aplicación de las metodologías de determinación de IP en aceites más comúnmente reportadas en bibliografía.

Por un lado, el método estándar recomendado por la AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*), basado en una titulación iodométrica, resulta poco preciso en estos aceites debido a la fuerte coloración rojiza que dificulta la detección del punto final.

Por otro lado, el método espectrofotométrico de la IDF (*International Dairy Federation*), basado en la formación del complejo Fe(III)-tiocianato con máxima absorbancia a 500 nm, tampoco puede aplicarse directamente porque los pigmentos del aceite absorben en la misma región espectral, interfiriendo con la lectura.

Para superar esta limitación, se evaluaron dos modificaciones del método IDF orientadas a permitir la separación del complejo coloreado Fe(III)-tiocianato de los carotenoides. Finalmente, el método seleccionado fue validado usando otros aceites, analizando su linealidad, veracidad, precisión y repetibilidad.

2.1. Materiales y Métodos

2.1.1. Materiales

El hidroperóxido de cumeno (CHP), el sulfato de hierro (II) heptahidratado y el tiocianato de amonio se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, EE. UU.). El cloruro de bario dihidratado y el indicador de almidón se obtuvieron de Mallinckrodt (EE. UU.). Todos los solventes (grado analítico), el yoduro de potasio y el tiosulfato de sodio fueron proporcionados por Laboratorios Cicarelli (Argentina). Se utilizó agua desionizada ultrapura (GT Laboratories, Argentina) para preparar las soluciones acuosas. El AL fue donado gentilmente por Harinas Patagónicas SRL (Puerto Madryn, Argentina). El aceite de chía prensado en frío fue proporcionado por SDA SA (Buenos Aires, Argentina). Los aceites comerciales de girasol y soja

(Molinos Río de la Plata S.A., Argentina) se adquirieron en un supermercado local. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

2.1.2. Métodos

2.1.2.1. Método Iodométrico AOAC por titulación

El método oficial de la AOAC se tomó como referencia para cuantificar los productos de oxidación a través de la determinación del IP en los aceites (AOAC International, 2000). Brevemente, se añadieron 0.5 g de aceite a 5 mL de una mezcla ácido acético/cloroformo (3:2 v/v) contenida en un Erlenmeyer de 25 mL, seguido de la adición de 1 mL de solución saturada de KI. La mezcla se mantuvo en oscuridad durante 5 min y, posteriormente, se añadieron 10 mL de agua destilada y 1 mL de solución de almidón al 0.5 % p/v (indicador). Las muestras se titularon utilizando una solución 0.01 N de tiosulfato de sodio previamente valorada, agitando vigorosamente hasta la desaparición del color azul. El IP se calculó según la siguiente ecuación:

$$IP \left(\frac{meq O_2}{kg \text{ aceite}} \right) = \frac{(S-B) \times N \times 1000}{W} \quad \text{Ec. 2.1}$$

donde S es el volumen de titulación de la muestra (en mL), B es el volumen utilizado en la titulación del blanco (en mL), N es la normalidad de la solución de $Na_2S_2O_3$ y W representa la masa de aceite en gramos. Cada medición se realizó por quintuplicado y los resultados se expresaron como la media de cinco mediciones.

2.1.2.2. Método original IDF

El método espectrofotométrico propuesto por la IDF (International Dairy Federation, 1991) para determinar el IP comprende la medida del complejo coloreado Fe(III)-tiocianato, donde los peróxidos del aceite oxidan los iones de Fe(II) a Fe(III), que luego reaccionan con el tiocianato para formar un complejo de color rosa-violeta, cuya máxima absorbancia es a 500 nm. En primer lugar, se mezclaron 200 μ L de muestra con 2.8 mL de cloroformo/metanol (7:3, v/v). A continuación, se añadieron 15 μ L de solución saturada de tiocianato de amonio (3.94 M) y 15 μ L de solución de Fe(II) (preparada mediante la mezcla de $BaCl_2$ 0.132 M y $FeSO_4$ 0.144

M en solución ácida, seguida de filtración a través de un papel de filtro con una retención de partículas de 11 μm). La mezcla se agitó en vórtex durante 15 s, se incubó durante 10 min en oscuridad a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) y se registró la absorbancia a 500 nm. La concentración de peróxidos se determinó mediante una curva estándar de CHP, donde se prepararon y analizaron seis concentraciones diferentes (0.00–0.43 mM), cada una por cuadruplicado ($n=4$), lo que resultó en un total de 24 puntos de datos. El IP se calculó de la siguiente manera:

$$IP \left(\frac{\text{meq } O_2}{\text{kg aceite}} \right) = \frac{(A_s - A_b)}{m \times W} \times 2 \quad \text{Ec. 2.2}$$

donde A_s es la absorbancia de la muestra; A_b es la absorbancia del blanco, m es la pendiente de la curva de calibración de CHP; W es el peso de la muestra en gramos; y 2 es el factor de corrección para convertir mmol a meq de oxígeno activo (valencia=2 para O_2) (International Organization for Standardization, 2017). Para obtener resultados confiables, la solución de Fe(II) debe prepararse en el momento de la medición. Su calidad se verifica añadiendo unas gotas de solución de tiocianato; si la solución se vuelve rosa pálido, debe desecharse.

2.1.2.3. Método espectrofotométrico IDF modificado

Las modificaciones se centraron en separar los carotenoides de la solución que contenía el complejo Fe(III)-tiocianato antes de medir la absorbancia.

La primera modificación consistió en intentar eliminar la interferencia de los carotenoides mediante la solubilización del complejo Fe(III)-tiocianato en agua. Para ello, se añadieron 2 mL de agua destilada a la mezcla tras la incubación, seguido de agitación en vórtex y centrifugación (1000 g, 1 min), con el fin de obtener dos fases. La absorbancia de la fase acuosa superior se midió a 500 nm.

En la segunda modificación, el complejo Fe(III)-tiocianato formado tras la incubación se extrajo mediante la adición de 2 mL de una mezcla metanol/agua (1:1 v/v), seguida de agitación en vórtex y centrifugación (1000 g, 1 min). La absorbancia de la fase superior se midió a 490 nm. Esta longitud de onda se seleccionó debido a que el espectro de absorción del

complejo formado en este medio de extracción presentó un máximo a 490 nm, en lugar de 500 nm, como en el método original de la IDF.

2.1.2.4. Validación del método espectrofotométrico modificado

Para validar la modificación introducida en el método espectrofotométrico IDF, distintos tipos de aceites no pigmentados (soja, girasol, chía), conteniendo distintas mezclas de AG con diferentes grados de insaturación, se colocaron en viales de 10 mL y se sometieron a oxidación en estufa a 40 °C durante 35 días para generar muestras con distintos niveles de peróxidos (Abuzaytoun et al., 2020). Las muestras se retiraron de forma periódica: diariamente durante los primeros 10 días, y luego cada 5 días, retirando dos viales de cada tipo de aceite y almacenándolos a -20 °C hasta su análisis.

El IP de estas muestras se determinó luego mediante dos métodos: (i) IDF modificado (IDFm) aplicando el paso de extracción con la mezcla agua-metanol (1:1) y empleando la curva de calibrado correspondiente con CHP extraído de la misma manera, y (ii) con titulación por el método oficial de la AOAC.

Posteriormente, se construyó una curva de validación para correlacionar el IP determinado por el IDFm y el método AOAC (se analizaron en total 21 muestras, cada una con 5 réplicas de medición). Para evaluar la veracidad, se realizaron mediciones de IP sobre muestras oxidadas que no se utilizaron para construir la curva de validación (5 muestras, cada una con 4 réplicas de medición), empleando el método IDFm. Luego, para obtener un IP equivalente al determinado por el método oficial de la AOAC – denominado IP derivado – se utilizó la ecuación de la curva de validación. El valor obtenido se comparó con el valor determinado por el método AOAC en la misma muestra (denominado IP verdadero y considerado como valor de referencia). Así, la veracidad del método se evaluó comparando el IP verdadero y el IP derivado mediante la aplicación de un t-test para muestras pareadas ($p > 0.05$).

La precisión se evaluó calculando el coeficiente de variación relativo (%RSD), tanto para el IP verdadero como para el IP derivado, según:

$$\%RSD = \frac{DE}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{Ec. 2.3}$$

donde DE es la desviación estándar y $\bar{X}$ es el promedio. También se calculó el RSD aceptable de Horwitz, a partir de la ecuación:

$$\text{Horwitz RSD} = 2^{(1 - 0.5 \times \log C)} \quad \text{Ec. 2.4}$$

donde C representa la concentración de hidroperóxidos expresada como fracción másica (ppm), concretamente hidroperóxidos de (i) ácido α -linolénico para aceite de chía, (ii) ácido linoleico para aceites de girasol y soja. Se consideró aceptable la precisión cuando el RSD combinado obtenido por ambos métodos fue inferior al límite establecido por el RSD de Horwitz (Boyer et al., 1985).

La precisión se evaluó, además, examinando la repetibilidad del método aplicado al aceite pigmentado de langostino. Sin embargo, como este aceite presentó valores de IP cercanos a cero tras una exposición prolongada a 40 °C - posiblemente debido a su elevado contenido de ASX, un potente antioxidante natural - se prepararon mezclas de AL con aceites no pigmentados previamente oxidados para obtener un IP cuantificable. Se generó una serie de muestras con concentraciones de AL entre 0 % y 30 % (en masa) en los aceites oxidados no pigmentados. La repetibilidad del método se evaluó comparando los %RSD (Abuzaytoun et al., 2020).

2.1.2.5. Análisis estadístico de los datos

Los resultados se presentaron como valores promedio con sus respectivas desviaciones estándar (DE). Para evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores de IP obtenidos, se aplicó una prueba t de Student para dos muestras independientes, utilizando un nivel de significancia $\alpha=0.05$. Todas las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el software R con la interfaz R-Studio (R Foundation for Statistical Computing, 2023).

2.2. Resultados y Discusión

2.2.1. Modificación del método espectrofotométrico IDF para medir IP

La medición del IP en el AL mediante el método oficial de la AOAC a través de titulación iodométrica se vio limitada debido a su intenso color rojo oscuro natural, atribuida principalmente a su contenido de ASX. A pesar de realizar varios intentos y de reducir significativamente la cantidad de muestra (0.5 g) respecto de la recomendada por la técnica (5 g), no fue posible identificar con claridad el punto final de la titulación. Por consiguiente, se optó por probar el método espectrofotométrico IDF para la determinación del IP, aplicando algunas modificaciones para su adaptación a este tipo de aceite.

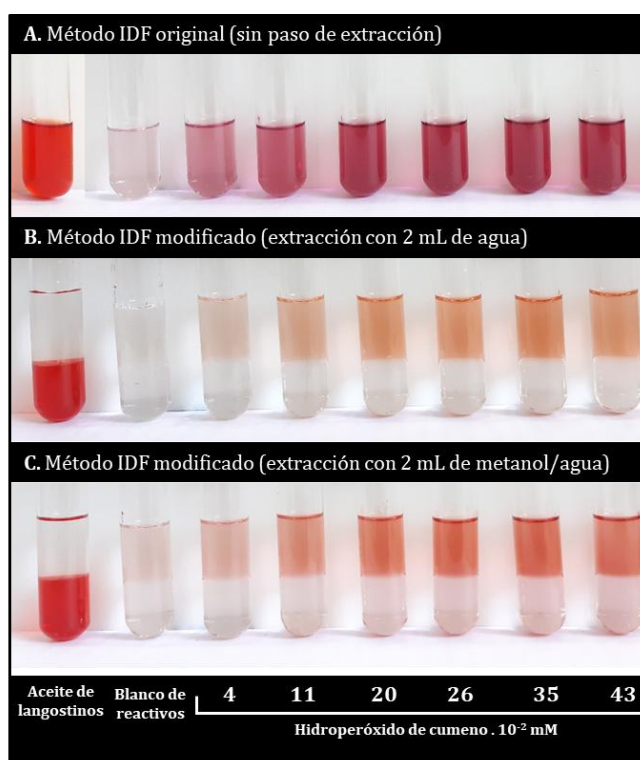


Figura 2.1. Tubos de ensayo preparados para la curva de calibración de CHP utilizando el método IDF (A) original (sin pasos de extracción), con el complejo Fe(III)-tiocianato rosado disuelto en cloroformo/metanol (7:3 v/v), (B) con extracción del complejo Fe(III)-tiocianato en 2 mL de agua o (C) con extracción en 2 mL de metanol/agua (1:1 v/v). El primer tubo de cada serie contiene AL en lugar de CHP. Adaptado de Acosta-Müller et al. (2025).

La Fig. 2.1 A muestra la serie de tubos de ensayo preparados para la curva de calibración del método IDF, que contienen diferentes concentraciones de CHP disuelto en

cloroformo/metanol (7:3 v/v), junto con los demás reactivos. En cada tubo se observa la formación del complejo rosáceo Fe(III)-tiocianato, promovido por la oxidación del Fe^{2+} al Fe^{3+} por los hidroperóxidos. El primer tubo, a la izquierda, contiene todos los reactivos y AL en lugar de CHP. Allí se puede observar cómo el intenso color rojo del aceite puede interferir en la determinación del IP, enmascarando la presencia del complejo Fe(III)-tiocianato.

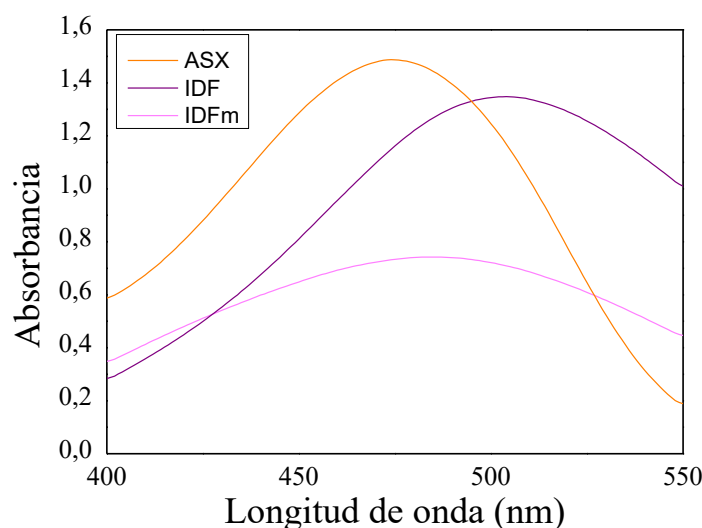


Figura 2.2. Espectros UV-visible de patrón de ASX; complejo Fe(III)-tiocianato en cloroformo/metanol (7:3 v/v) (IDF); complejo Fe(III)-tiocianato en la fase metanólica después de la eliminación de los carotenoides (IDFm). Adaptado de Acosta-Müller et al. (2025).

Para mayor claridad, la Fig. 2.2 presenta los espectros de un patrón de ASX - presente de forma natural en el AL - y del complejo Fe(III)-tiocianato formado en el método IDF. Tal y como puede observarse, los espectros de ambos componentes se superponen, por lo que sería necesario separarlos de alguna manera con algún paso de extracción para que queden en fases separadas, y así poder realizar la cuantificación del IP. Este problema hizo necesario modificar el método existente.

2.2.2. Modificaciones planteadas al método IDF existente

La estrategia más sencilla para aislar el complejo Fe(III)-tiocianato formado en el medio cloroformo/metanol consistió en realizar una extracción acuosa del complejo con 2 mL de agua

(Abuzaytoun et al., 2020), con el fin de separarlo de los pigmentos lipofílicos del aceite, que permanecerían en la fase orgánica inferior (Fig. 2.1 B).

Sin embargo, se observó que la adición de agua afectó la coloración del complejo rosa Fe(III)-tiocianato, que se tornó naranja después de la extracción (Fig. 2.1 B). Además, en esta fase acuosa el complejo no presentó su pico de absorción a 500 nm, y la concentración de hidroperóxidos no mantuvo una relación lineal con la absorbancia medida por el espectrofotómetro. Por lo tanto, esta modificación fue descartada.

La segunda estrategia consistió en realizar una extracción metanólica del complejo Fe(III)-tiocianato agregando 2 mL de agua/metanol (1:1 v/v) al medio de reacción (Fig. 2.1 C).

La proporción metanol-cloroformo-agua se seleccionó en base al triángulo de Bligh y Dyer (Fig. 2.3) (Bligh & Dyer, 1959).

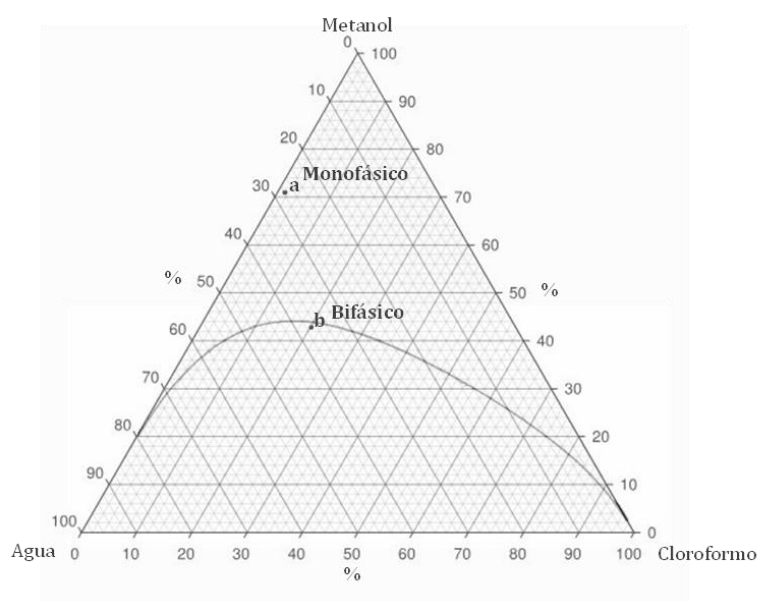


Figura 2.3. Triángulo de solventes de Bligh y Dyer. (a) Sistema monofásico del método IDF original, (b) Sistema bifásico del método IDF modificado. Adaptado de Acosta-Müller et al. (2025).

Este método es muy utilizado para la separación de lípidos de matrices biológicas y proporciona un enfoque práctico para calcular las proporciones adecuadas de agua, metanol y cloroformo necesarias para el desarrollo de sistemas monofásicos y bifásicos (Gabriels et al., 2000). En la Tabla 2.1 se muestran las proporciones relativas de agua, metanol y cloroformo,

así como los volúmenes correspondientes, de las condiciones de los sistemas monofásico del método IDF original (punto a) y bifásico del método IDF modificado (punto b).

El punto de partida (composición de la mezcla de reacción del método IDF original) corresponde al punto 'a', un sistema monofásico en el que se forma el complejo Fe(III)-tiocianato en las proporciones indicadas en la Tabla 2.1 (Fig. 2.1 A). Al añadir 2 mL de metanol/agua (1:1 v/v) a esta mezcla de reacción, se generó un sistema bifásico compuesto por dos fases claramente diferenciadas: la fase acuosa superior, que contiene el complejo Fe(III)-tiocianato, y la fase orgánica inferior, que contiene los carotenoides del aceite (Fig. 2.1 C).

Tabla 2.1. Volúmenes y proporciones relativas de agua, metanol y cloroformo, correspondientes a los sistemas mono- y bifásicos marcados den el triángulo de Bligh y Dyer.

Solvente	Monofásico = punto a	Bifásico = punto b
Cloroformo	2.16 mL (71 % v/v)	2.16 mL (43 % v/v)
Metanol	0.84 mL (28 % v/v)	1.84 mL (37 % v/v)
Agua	0.03 mL (1 % v/v)	1.03 mL (20 % v/v)

Con esta extracción metanólica, se logró separar el complejo Fe(III)-tiocianato, que migró a la fase acuosa superior, mientras que los carotenoides del AL permanecieron en la fase orgánica (Fig. 2.1 C). Además, la concentración de hidroperóxidos mantuvo una relación lineal con la absorbancia medida por espectrofotometría, aunque la medición se realizó a 490 nm, ya que el espectro de absorción del complejo Fe(III)-tiocianato en la fase metanólica presentó un máximo a esa longitud de onda (Fig. 2.2). Por lo tanto, esta etapa de extracción metanólica se adoptó para el método IDF modificado (IDFm).

La Fig. 2.4 muestra la curva de calibración con el estándar de CHP para la cuantificación del IP mediante el método IDFm, junto con su ecuación de regresión, evidenciando una buena linealidad en el rango de concentraciones evaluado ($R^2=0.99$). El límite de detección (LD) se determinó a partir de la medición de la absorbancia de 10 réplicas del blanco de reactivos (sin CHP), calculando con la curva de calibrado la concentración de correspondiente al valor

promedio de la absorbancia del blanco más 3.3 DE, de acuerdo con la definición de la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) (Thompson et al., 2002). El LD para el IP del aceite por esta técnica fue de 0.10 meq O₂/kg de aceite.

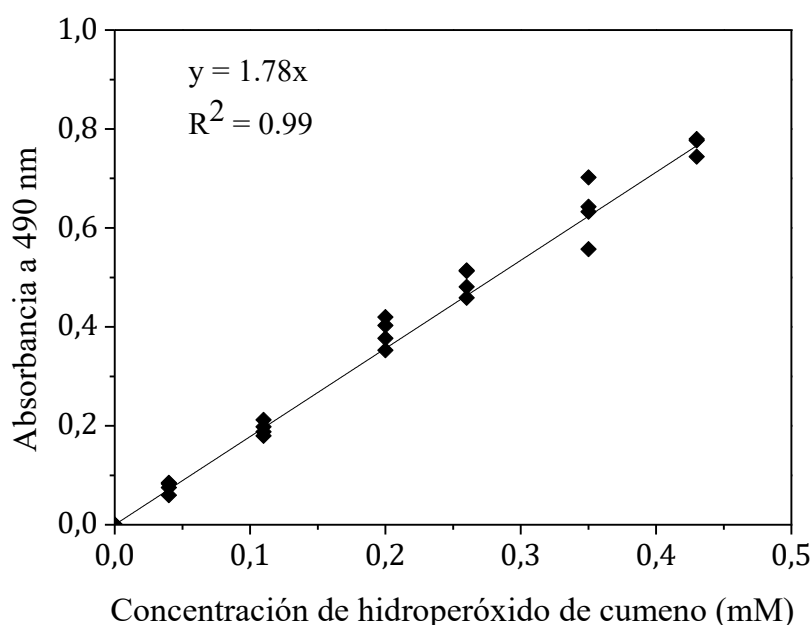


Figura 2.4. Curva de calibración para la cuantificación de IP mediante el método IDFm (con extracción metanólica). La regresión se realizó con 24 datos experimentales. Adaptado de Acosta-Müller et al. (2025).

2.2.3. Validación del método IDF modificado

El método IDFm fue validado frente al método oficial de la AOAC utilizando 21 muestras oxidadas obtenidas a partir de diferentes de aceites no pigmentados (chía, soja, girasol). El bajo contenido de carotenoides de estos aceites permite la aplicación del método iodométrico y facilita la identificación del punto final de la titulación. Las muestras se almacenaron durante distintos periodos de tiempo con el fin de obtener un amplio rango de valores de IP, y cada una fue analizada en 5 réplicas.

Se utilizó la prueba de regresión de Passing y Bablok para comparar los métodos (Passing & Bablok, 1983). En la Fig. 2.5 se muestra la curva de validación, con los valores promedio de IP para cada muestra analizada, obtenidos con ambos métodos. Los residuos de

la curva de validación presentaron una distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk), y se obtuvo la siguiente ecuación de regresión, con un coeficiente de determinación de 0.94:

$$IP_{IDFm} = 1.14 \times IP_{AOCS} - 0.46 \quad \text{Ec. 2.5}$$

Al analizar los intervalos de confianza del 95 % para la ordenada al origen [-2.294 a 1.383] y la pendiente [0.999 a 1.278], se observó que incluían los valores cero y uno, respectivamente. Por lo tanto, según Passing y Bablok, se puede concluir que no existe una diferencia significativa entre los métodos, por lo que ambos pueden utilizarse indistintamente (Bilić-Zulle, 2011).

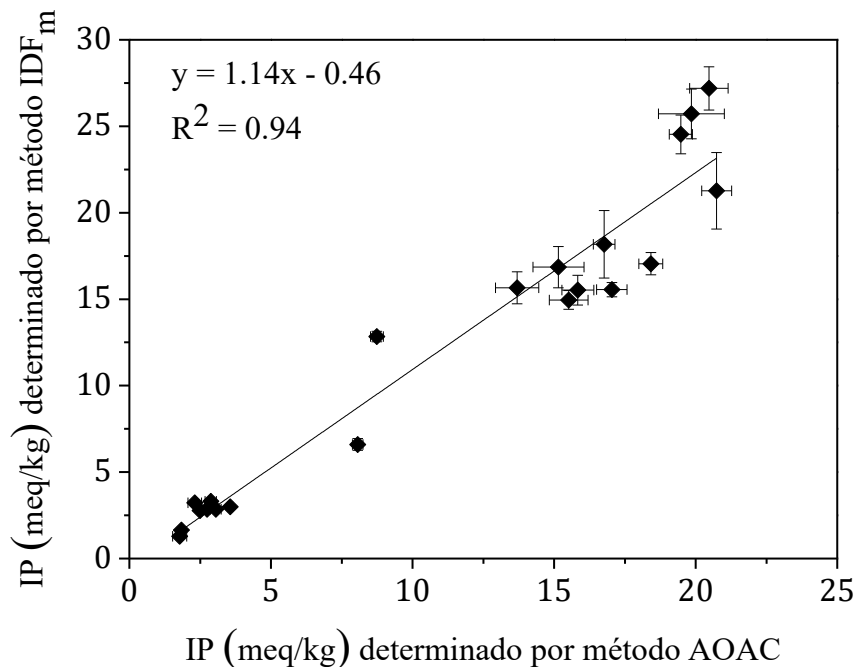


Figura 2.5. Curva de validación que relaciona el IP determinado por el método AOAC con el IP determinado por el método IDFm para tres tipos de aceite no pigmentados oxidados (media $\pm$ DE; se representaron 21 muestras en cada eje, con $n=5$ para cada muestra).

Adaptado de Acosta-Müller et al. (2025).

Para evaluar la veracidad del IDFm, se realizaron mediciones de IP en muestras de aceites no pigmentados oxidados que no fueron utilizadas para construir la curva de validación (cinco muestras, medidas por cuatriplicado). Los IP se determinaron mediante el método IDFm y, para obtener un IP equivalente al determinado por el método oficial de AOAC (denominado «IP derivado»), se utilizó la ecuación de la curva de validación. El valor resultante se comparó

con el valor determinado por el método de AOAC en la misma muestra (denominado «IP verdadero» y considerado como el valor verdadero). La veracidad del método se evaluó comparando el «IP verdadero» y el «IP derivado», aplicando una prueba t de dos muestras ($p > 0.05$). La Tabla 2.2 muestra los resultados obtenidos para todas las muestras analizadas. No se observaron diferencias significativas entre el «IP verdadero» y el «IP derivado» en ninguna de las muestras, lo que confirma la veracidad del método modificado.

Tabla 2.2. Veracidad y precisión del método IDFm (media $\pm$ DE, $n=4$) en aceites no pigmentados (chía, girasol y soja), evaluadas mediante la prueba t de dos muestras y el RSD aceptable de Horwitz, respectivamente.

Tipo de aceite	Método AOAC (verdadero)		Método IDFm (derivado)		Valor p de prueba t de dos muestras	%RSD combinado	Aceptable RSD de Horwitz
	IP (meq/kg)	%RSD	IP (meq/kg)	%RSD			
Soja	3.06 $\pm$ 0.11	3.75	3.03 $\pm$ 0.06	2.03	0.94	2.79	5.79
Soja	3.21 $\pm$ 0.09	2.87	3.13 $\pm$ 0.07	2.20	0.24	2.69	5.75
Chía	10.71 $\pm$ 0.14	1.31	10.95 $\pm$ 0.14	1.32	0.08	1.60	4.80
Chía	15.25 $\pm$ 0.13	0.85	15.83 $\pm$ 0.46	2.94	0.06	2.82	4.55
Girasol	19.34 $\pm$ 0.60	3.12	19.79 $\pm$ 0.13	0.44	0.27	2.28	4.39

La precisión se evaluó mediante el cálculo del %RSD para el IP verdadero y el IP derivado, y comparándola con el RSD de Horwitz. En la Tabla 2.2, para cada muestra se puede observar que el %RSD combinado obtenido con ambos métodos fue inferior al límite permisible establecido por el RSD de Horwitz (Boyer et al., 1985), lo que confirma la precisión del IDFm.

Asimismo, la validación se complementó mediante la evaluación de soluciones estándar de CHP con valores de IP conocidos para confirmar la exactitud y la fiabilidad del método. En la Tabla 2.3 se presentan los resultados, y se observa que, tanto los valores de recuperación como de precisión se encuentran dentro de los rangos de aceptabilidad establecidos en el Reglamento UE 2021/808 (80-120 % para recuperación y $RSD \leq 16$ %) (European Commission, 2021). Además, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los valores de IP

determinados por los métodos AOAC e IDFm, lo que confirma la exactitud y la fiabilidad del método propuesto.

Tabla 2.3. Pruebas de precisión del método IDFm (media $\pm$ DE, n=5 para cada muestra) aplicadas a soluciones estándar de CHP evaluadas por el porcentaje de recuperación y la prueba t de dos muestras.

Estándar de CHP		Método AOAC			Método IDFm			Valor p de prueba t de dos muestras
Conc. (mM)	IP (meq/kg)	IP (meq/kg)	%RSD	% Recup.	IP (meq/kg)	%RSD	% Recup.	
5.41	7.27	7.38 $\pm$ 0.72	9.7	102	7.41 $\pm$ 0.65	8.8	102	0.96
8.12	10.90	10.69 $\pm$ 0.72	6.7	98	11.28 $\pm$ 0.85	7.5	104	0.27
13.54	18.17	16.75 $\pm$ 0.86	5.1	92	17.32 $\pm$ 1.50	8.7	95	0.48

Una vez confirmada la exactitud y la precisión del IDFm, se procedió a determinar el IP en muestras de AL (pigmentado), exponiéndolas a 40 °C durante 35 días y tomando alícuotas a diferentes tiempos para evaluar la estabilidad oxidativa. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos por oxidar el AL puro, no se observó un aumento del IP en las muestras tratadas térmicamente. De hecho, se obtuvieron IP inferiores a 1 meq O₂/kg de aceite. Esto podría estar relacionado con el alto contenido de ASX del aceite (2.3 mg/g de aceite), ya que actúa como antioxidante, previniendo así el deterioro oxidativo. Abuzaytoun et al. (2020) obtuvieron resultados similares al intentar oxidar lípidos de vísceras de pepino de mar muy pigmentados que contenían carotenoides, como ASX, durante 15 días a 40 °C (IP < 1 meq O₂/kg de aceite). En la misma línea, Li et al. (2023) también reportaron un IP muy bajo al someter muestras de aceite de krill a un almacenamiento acelerado a 60 °C durante 12 días.

Ante esta dificultad, se siguió un procedimiento similar al descrito por Abuzaytoun et al. (2020) para medir un IP cuantificable en un aceite pigmentado, y se mezcló AL con distintas proporciones de aceites no pigmentados oxidados con el fin de obtener muestras pigmentadas con diferentes concentraciones de hidroperóxidos. Esto dio como resultado una serie de muestras con una concentración de AL que variaba del 0 al 30 % en masa en las mezclas con aceites no pigmentados oxidados. Estas mezclas se analizaron mediante el método IDFm, en el

que los carotenoides liposolubles rojizos se separaron eficazmente del complejo Fe(III)-tiocianato, y permanecieron en la capa inferior de cloroformo.

Los valores de IP obtenidos para estas mezclas pigmentadas se muestran en la Tabla 2.4, donde puede observarse que el IP se fue incrementando a medida que aumentó la proporción de aceite no pigmentado oxidado en las mezclas. En este análisis, el %RSD osciló entre 1.21 y 3.35, lo que verifica la buena precisión del método IDFm. Dado que los valores de %RSD no variaron sistemáticamente con el IP, puede considerarse que la concentración de pigmento no influyó en la repetibilidad del método.

Tabla 2.4. IP derivado (media $\pm$ DE, n=3) determinado en mezclas de AL y aceite oxidado no pigmentado en diferentes proporciones, utilizadas para evaluar la repetibilidad del método (expresada como %RSD).

Muestra	IP derivado (meq/kg)	%RSD
1	11.24 $\pm$ 0.38	3.35
2	15.70 $\pm$ 0.19	1.21
3	20.52 $\pm$ 0.33	1.61
4	24.43 $\pm$ 0.70	2.87

Las mezclas contenían 30 (1), 20 (2), 10 (3) y 0 % (4) m/m de AL en aceites no pigmentados.

En resumen, la modificación introducida con la extracción metanólica en el método IDFm permitió separar eficazmente del complejo Fe(III)-tiocianato de los pigmentos carotenoides lipídicos del AL en una sola etapa de extracción. En comparación con el método estándar de titulación iodométrica, el método propuesto es más sencillo, rápido y sensible (detecta valores de peróxido tan bajos como 0.1 meq O₂/kg). En general, el método IDFm ofrece una precisión comparable a la del método estándar AOAC, pero con un tiempo de análisis más corto y una mayor simplicidad operativa, lo que justifica su idoneidad para la determinación rutinaria de valores de peróxido en aceites comestibles pigmentados.

Además de demostrar un desempeño analítico adecuado, el método IDFm presenta ventajas desde el punto de vista de la Química Analítica Verde. La reducción del volumen de muestra y del consumo de solventes respecto del método oficial de la AOAC, junto con la

simplificación del procedimiento analítico aplicando un solo paso de extracción, permiten disminuir la generación de residuos y la exposición del operador a sustancias químicas, contribuyendo así a un enfoque analítico más sostenible (Gałaszka et al., 2013, Pena-Pereira et al., 2020; Płotka-Wasyłka, 2018).

2.3. Conclusiones parciales

En este capítulo se logró modificar el método espectrofotométrico IDF mediante la incorporación de una etapa de extracción metanólica (IDFm), lo que permitió su aplicación en aceites muy pigmentados, como el AL. La validación frente al método iodométrico oficial de la AOAC mostró una buena correlación entre ambos métodos, así como parámetros analíticos adecuados de linealidad, exactitud, sensibilidad y repetibilidad. Asimismo, el método requiere una cantidad mínima de muestra, presenta tiempos de análisis cortos y reduce el consumo de solventes. Estos resultados demuestran que el método IDFm constituye una herramienta analítica confiable para la determinación del IP en matrices con alto contenido de carotenoides pigmentados, lo que permitirá su aplicación en los capítulos siguientes para evaluar la estabilidad oxidativa del AL y de los sistemas desarrollados en esta tesis.

3. CAPÍTULO 3: *Caracterización del aceite de langostinos*

En este capítulo se presentan los resultados de la caracterización del AL, así como también la influencia de ciertos factores (como la luz y la temperatura) sobre su estabilidad.

3.1. Materiales y Métodos

3.1.1. Materiales

AL crudo sin refinar, gentilmente donado por la empresa Harinas Patagónicas S.R.L. (Puerto Madryn, Argentina), cuya composición centesimal informada en base seca fue: 97.2 % de grasas, 1.2 % de proteína, 1.6 % de cenizas y 4.9 % de humedad. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

3.1.2. Métodos

3.1.2.1. Composición de ácidos grasos

La composición de AG del AL se determinó mediante cromatografía gaseosa, siguiendo el método descrito por Acosta et al. (2026). Una alícuota de la muestra de aceite (70 mg) fue disuelta en 3 mL de hexano. La derivatización de los AG a ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se realizó usando una solución de hidróxido de potasio en metanol (2N) (Sain et al., 2023). Los FAME se cuantificaron utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2014 (Shimadzu Corporation, Japón) equipado con una columna capilar CP-Sil 88 (100 m, 0.25 mm de diámetro interior, Varian, EE. UU.) y un detector de ionización de llama (GC-FID). El volumen de inyección fue de 1 μ L con una relación de *split* de 1:100. Se utilizó H₂ como gas *carrier* a una velocidad de flujo en la columna de 1 mL/min, además fue empleado N₂ como gas suplementario de arrastre (*make up*) a 25 mL/min.

La temperatura de la columna se mantuvo a 100 °C durante 3 min tras la inyección. Posteriormente, se incrementó a una velocidad de 3 °C/min hasta alcanzar los 140 °C, luego a 0.5 °C/min hasta 170 °C, y finalmente a 5 °C/min hasta llegar a 220 °C. Esta última temperatura se mantuvo durante 40 min.

Los FAME se identificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención relativos con los de estándares comerciales, utilizando el software GC Solution Postrun (Versión 2.30 00 SU6) de Shimadzu. Se empleó el GLC-463 Reference Standard, que contiene una mezcla de 52 FAME con una pureza superior al 99 %, adquirido a Nu-Chek Prep, Inc. Todos los disolventes y reactivos utilizados para la cuantificación de ácidos grasos fueron de grado cromatográfico, y los demás productos químicos empleados fueron al menos de grado de la *American Chemical Society*.

Los resultados finales se expresaron en gramos de ácido graso por 100 gramos de ácidos grasos (g AG/100 g AGs).

3.1.2.2. Ensayos de estabilidad del AL

Se realizaron ensayos preliminares para evaluar la estabilidad oxidativa del AL y la sensibilidad de la ASX frente a distintas condiciones de almacenamiento: (i) 25 °C con exposición a la luz (10, 20 y 30 días), (ii) 60 °C en oscuridad (10, 20 y 30 días), (iii) 100 °C en oscuridad (1, 2, 5 y 48 h) y 150 °C en oscuridad (0.5 y 1 h). Luego de estos tratamientos, se determinó la estabilidad oxidativa midiendo los compuestos de oxidación primaria y secundaria - mediante la cuantificación del IP y de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), respectivamente - y también, la sensibilidad de ASX determinando el contenido de ASX y estudiando su cinética de degradación.

3.1.2.2.1. Índice de peróxidos

Se utilizó la técnica espectrofotométrica validada en el capítulo anterior. El procedimiento se basó en la metodología descrita por Acosta-Müller et al. (2025). Inicialmente, una alícuota de AL se diluyó en cloroformo de acuerdo con el nivel de oxidación estimado. Se añadieron 0.2 mL de muestra a tubos de ensayo tapados y cubiertos con papel aluminio, conteniendo 2.8 mL de una solución cloroformo-metanol (7:3 v/v) y 15 µL de NH_4SCN 3.94 M. La reacción se inició añadiendo 15 µL de solución de Fe (II), preparada mezclando

volúmenes iguales de BaCl_2 0.131 M y FeSO_4 0.144 M en solución ácida, y filtrando el sobrenadante.

Luego de un tiempo de incubación de 10 min, se añadieron 2 mL de agua-metanol (1:1), seguidamente se homogeneizó con vortex por unos segundos y se centrifugó ($1.000 \times g$, 1 min), con el fin de separar el complejo coloreado Fe(III)-tiocianato de los carotenoides que causan interferencia en la medición. Luego de la extracción, se registró la absorbancia de la fase metanólica a 490 nm mediante un espectrofotómetro Peet Lab, modelo PLC-7000 UV (China).

La concentración de peróxidos se determinó a partir de una curva de calibración de CHP (0.00 - 0.43 mM). El valor de IP se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$IP_{IDFm} \left(\frac{\text{meq } O_2}{\text{kg de aceite}} \right) = \frac{Abs_M - Abs_B}{m \times A} \times 2 \quad \text{Ec. 3.1}$$

donde Abs_M es la absorbancia de la muestra, Abs_B es la absorbancia del blanco de reactivo, m es la pendiente de la curva de calibración de CHP, A es la masa de aceite en gramos contenida en la muestra y 2 es el factor de corrección para convertir mmol a meq de oxígeno activo (valencia=2 para O_2).

Una vez obtenido el IP_{IDFm} se utilizó la ecuación de regresión obtenida en el capítulo anterior para obtener el IP_{AOCs} equivalente (Ec. 2.5).

3.1.2.2.2. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Los productos de oxidación secundaria se determinaron según Acosta et al. (2024), con modificaciones. Se realizaron diluciones $\frac{1}{4}$ del AL en cloroformo y una alícuota de 0.1 mL se mezcló con 2 mL de solución de reactivo TBA (15 % p/v ácido tricloroacético, 0.375 % p/v ácido tiobarbitúrico, 0.25 M ácido clorhídrico, 0.06 % hidroxitolueno butilado-BHT). Las mezclas se incubaron (90°C , 15 min), se centrifugaron ($6000 \times g$, 10 min) y se midió la absorbancia de la fase acuosa a 532 nm. Para determinar la concentración de TBARS, se preparó una curva de calibrado utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (0 – 0.024 mM). El índice de TBARS se expresó como mmoles de malondialdehído (MDA)/kg aceite, y calculó según la siguiente ecuación:

$$TBARS \left(\frac{mmol\ MDA}{kg\ aceite} \right) = \frac{(Abs_M - Abs_B) \times 2 \times 1000}{m \times A} \quad \text{Ec. 3.2}$$

donde Abs_M y Abs_B corresponden a las absorbancias a 532nm de la muestra y del blanco de reactivos, respectivamente, m es la pendiente de la curva de calibrado, el valor numérico 2 tiene en cuenta los mL del volumen de reacción, A es la masa de aceite en gramos contenida en la muestra y el factor 1000 es para expresar el resultado en kg de aceite. En la Ec. 3.2 se tuvo en cuenta el factor de dilución del aceite en cloroformo.

3.1.2.2.3. Determinación de la concentración de ASX

Se aplicó una técnica espectrofotométrica basada en el método de la primera derivada descrito por Liu et al. (2011), con algunas modificaciones. Brevemente, se tomó una alícuota de AL la cual se resuspendió primeramente en 5 mL de una solución de etilacetato-etanol (1:1). Y a partir de ello se realizaron las diluciones necesarias para la medición. Finalmente, se realizó un barrido espectrofotométrico entre 400 y 550 nm utilizando el espectrofotómetro Peet Lab, modelo PL.C-7000 UV (China). La concentración de ASX se determinó a partir del valor de la primera derivada a 432 nm, utilizando una curva de calibración construida con un patrón de ASX.

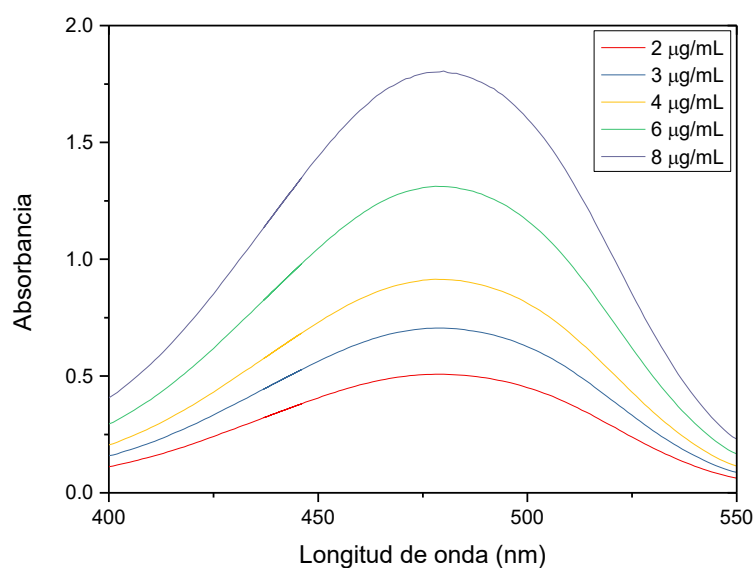


Figura 3.1. Curvas de absorción del patrón ASX a distintas concentraciones.

Para construir esta curva, en primer lugar, se diluyó el patrón en una solución de etiloacetato-etanol (1:1 v/v) en distintas concentraciones, se agitó en vortex 30 s para homogeneizar la muestra y, posteriormente, se realizó un barrido espectrofotométrico entre las longitudes de onda 400-550 nm (Fig. 3.1).

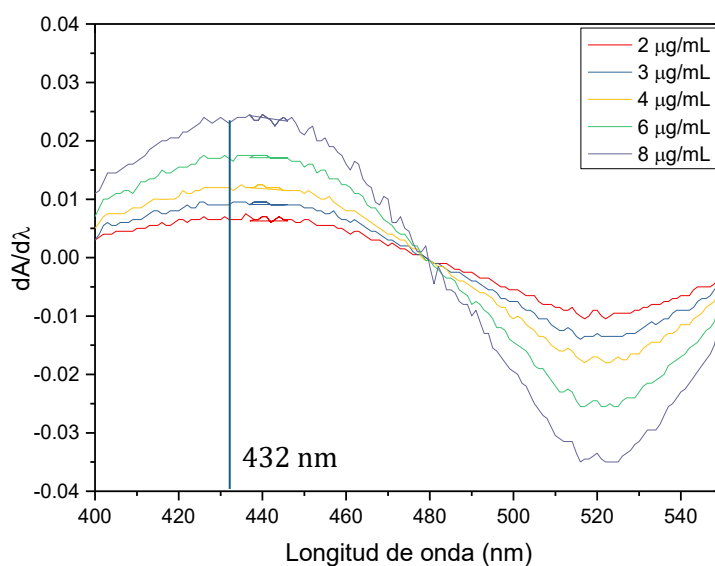


Figura 3.2. Gráfica luego de aplicar la primer derivada a las curvas de absorbancia.

Luego, se realizó la primer derivada de estas curvas y se seleccionaron los valores hallados para todas las concentraciones a 432 nm, tal y como se muestra en la Fig. 3.2

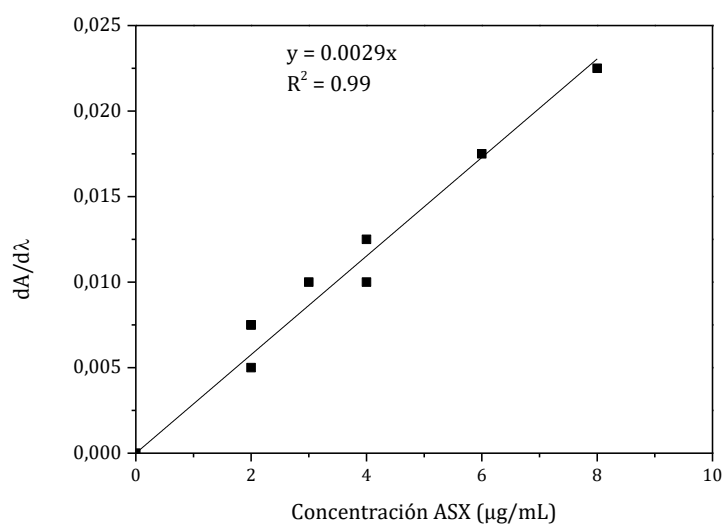


Figura 3.3. Curva de calibrado para determinar concentraciones de ASX.

Por último, con estos valores seleccionados se graficó $\delta A/\delta \lambda$ en función de la concentración de ASX, para obtener la ecuación de la recta de la curva de calibrado (Fig. 3.3).

3.1.2.2.4. Cinética de la tasa de degradación de ASX en el AL almacenado a distintas temperaturas

El modelo de primer orden se utilizó para describir la cinética de degradación de la ASX (Takeungwongtrakul & Benjakul, 2016), como se describe en la siguiente ecuación:

$$\ln\left(\frac{C}{C'}\right) = -k \cdot t \quad \text{Ec. 3.3}$$

donde C' es la concentración inicial de ASX (mg/g de aceite); C es la concentración de ASX (mg/g de aceite) en el tiempo t ; k es la constante de velocidad de degradación (h^{-1}); t es el tiempo de exposición (h). Se construyó un gráfico de $\ln(C/C')$ versus t , a diferentes temperaturas (25, 60 y 100 °C) y por regresión lineal se obtuvieron los valores de k (pendiente de la recta) y los coeficientes de correlación.

Además, para cada temperatura se calculó el tiempo de vida media ($t_{1/2}$):

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Ec. 3.4}$$

Utilizando la ecuación de Arrhenius (Takeungwongtrakul & Benjakul, 2016) que relaciona la constante k con la temperatura (T), se puede calcular también la energía de activación (E_a) para la degradación de ASX, según:

$$\ln k = \frac{-E_a}{RT} + \ln k_{\infty} \quad \text{Ec. 3.5}$$

donde k es la constante de velocidad de reacción; k_{∞} es el factor de frecuencia; R es la constante universal de los gases (8.3145 J/mol K); T es la temperatura absoluta (K); E_a es la energía de activación (J/mol).

Para ello, se graficaron los valores k resultantes del modelo de primer orden ($\ln k$) en función de $1/T$ y se obtuvo la E_a para la degradación de la ASX utilizando la Ec. 3.5.

3.1.2.3. Análisis estadístico de los datos

Cada experimento se realizó con su correspondiente réplica (dos repeticiones). Todos los ensayos se realizaron al menos por duplicado. A partir de estas mediciones se calcularon

los valores promedio y sus desviaciones estándar (DE). Para determinar diferencias significativas entre las distintas condiciones de ensayos se aplicó el test de Análisis de la Varianza (ANOVA) con un nivel de significancia $\alpha=0.05$, mediante la prueba de Tukey HSD. En los casos donde no se pudo aplicar ANOVA, se aplicaron pruebas no paramétricas (Kruskal Wallis) y gráficos de caja y bigotes para determinar diferencias entre las muestras.

3.2. Resultados y Discusión

3.2.1. Perfil de ácidos grasos

El estudio del AL, derivado del procesamiento de los restos de este crustáceo, es de gran interés debido a las propiedades nutricionales y biológicas que posee, y su caracterización química proporciona información valiosa sobre sus propiedades y posibles aplicaciones (Gulzar et al., 2020). En la Tabla 3.1 se muestra el perfil de AG del AL analizado por GC-FID, donde se observa un alto contenido de AG insaturados ($\cong 72\%$). Dentro de esta fracción, los AGPI representan el 40.5 % de la composición total, destacándose particularmente los AGPI ω -3, que constituyen el 35 %.

Desde el punto de vista nutricional, este perfil resulta relevante, dado que los AGPI ω -3 (como EPA y DHA) se han relacionado en muchos estudios con efectos antiinflamatorios, al modular la producción de mediadores lipídicos (eicosanoides) y citoquinas, en contraste con los AGPI ω -6 - especialmente el ácido araquidónico -, que actúan como precursores de compuestos proinflamatorios. En este sentido, algunos autores (DiNicolantonio & O'Keefe, 2021; Simopoulos, 2016) señalan que la dieta occidental actual presenta una relación $\omega 6/\omega 3$ marcadamente desequilibrada, a favor de los ω -6, lo que podría favorecer estados de inflamación crónica de bajo grado. Este cambio en las dietas occidentales se atribuyó, en gran medida, a la agroindustria y la agricultura moderna que promovieron un consumo excesivo de ácido linoleico (ω -6), principalmente proveniente de aceites vegetales (maíz, soja, girasol). Mientras que las proporciones $\omega 6/\omega 3$ entre 1:1 y 5:1 se consideran adecuadas, la dieta occidental alcanza valores cercanos a 20:1 (Simopoulos, 2016).

Tabla 3.1. Composición de AG del AL.

Ácido graso	AG ± DE %
Ácido láurico (12:0)	0.08 ± 0.02
Ácido mirístico (14:0)	3.02 ± 0.16
Ácido pentadecanoico (15:0)	0.80 ± 0.09
Ácido palmítico (16:0)	15.04 ± 0.43
Ácido heptadecanoico (17:0)	1.92 ± 0.21
Ácido esteárico (18:0)	2.93 ± 0.39
Ácido behénico (22:0)	0.21 ± 0.04
Ácido miristoleico (9c-14:1)	0.04 ± 0.02
Ácido palmitoleico (9c-16:1) (ω7)	7.00 ± 0.31
Ácido oleico (9c-18:1) (ω9)	12.79 ± 0.45
Ácido cis-vaccénico (11c-18:1) (ω7)	6.42 ± 0.60
Ácido gondoico (11c-20:1) (ω9)	4.91 ± 0.40
Ácido nervónico (15c-24:1) (ω9)	0.68 ± 0.16
Ácido linoleico (18:2) (ω6)	1.71 ± 0.46
Ácido γ-linolénico (18:3) (ω6), GLA	0.23 ± 0.06
Ácido α-linolénico (18:3) (ω3), ALA	1.71 ± 0.57
Ácido eicosadienoico (20:2) (ω6)	0.69 ± 0.23
Ácido dihomo-γ-linolénico (20:3) (ω6)	0.07 ± 0.02
Ácido eicosatrienoico (20:3) (ω3)	6.88 ± 0.82
Ácido araquidónico (20:4) (ω6)	1.30 ± 0.77
Ácido eicosapentaenoico (20:5) (ω3), EPA	11.31 ± 0.59
Ácido docosadienoico (22:2) (ω6)	0.19 ± 0.08
Ácido adrenico (22:4) (ω6)	0.79 ± 0.19
Ácido docosapentaenoico (22:5) (ω6), DPA	0.42 ± 0.02
Ácido docosapentaenoico (22:5) (ω3), DPA	2.05 ± 0.02
Ácido docosahexaenoico 22:6 (ω3), DHA	13.13 ± 0.47
Total saturados	26.72 ± 1.25
Total monoinsaturados	31.85 ± 1.52
Total poliinsaturados	40.47 ± 0.23
Total de ω6	5.40 ± 1.45
Total de ω3	35.07 ± 1.27
Relación ω6/ω3	0.15 ± 0.05

Los valores representan el promedio ± DE de las réplicas.

En este contexto, el AL se convertiría en una fuente prometedora para el desarrollo de ingredientes funcionales o formulaciones nutracéuticas orientadas a restablecer ese equilibrio, debido a que presenta una relación ω6/ω3 de 0.15 (Tabla 3.1), equivalente a proporciones entre 1:6 y 1:7.

3.2.2. Estabilidad del AL

Se realizaron ensayos preliminares de carácter exploratorio para evaluar la estabilidad oxidativa del AL y la sensibilidad de la ASX frente a distintas condiciones de almacenamiento: (i) 25 °C con exposición a la luz, y (ii) 60 °C en oscuridad, con tiempos de evaluación de 10, 20 y 30 días.

La selección de estas condiciones se basó en observaciones experimentales previas. Durante ensayos de extracción del aceite y posterior evaporación del solvente, se observó una despigmentación progresiva en la muestra almacenada en el balón de extracción a temperatura ambiente, lo que sugirió una posible influencia de la luz sobre la estabilidad de los carotenoides. Asimismo, se había registrado que muestras mantenidas a 60 °C en ausencia de luz no presentaban incrementos significativos en el IP.

En este contexto, se evaluó la incidencia relativa de la exposición a la luz y de la temperatura sobre la degradación oxidativa del aceite y la estabilidad de la ASX bajo condiciones basadas en estas observaciones.

La Fig. 3.4 muestra los valores de IP (compuestos primarios de oxidación) y TBARS (compuestos secundarios de oxidación) en las distintas condiciones ensayadas. En ambas, el aceite presentó valores bajos tanto de IP como de TBARS, evidenciando una elevada resistencia a la degradación oxidativa, particularmente destacable considerando su alto contenido de AGPI, que suelen ser altamente susceptibles a la oxidación. Los valores de IP se mantuvieron muy por debajo del límite máximo sugerido por el *Codex Alimentarius* para aceites prensados en frío (<15 meq/kg aceite) (Codex Alimentarius, 1981), con un leve incremento en el aceite expuesto a la luz (Fig. 3.4 B). Por su parte, los valores de TBARS permanecieron prácticamente constantes, por debajo de <1 mmol MDA/kg aceite (Fig. 3.4), lo que sería consistente con el bajo grado de oxidación observado en los valores de IP. Estos resultados preliminares fueron muy prometedores ya que mostraron una alta estabilidad oxidativa del aceite, que podría atribuirse al contenido de ASX, un potente antioxidante presente de forma natural en este tipo de crustáceos.

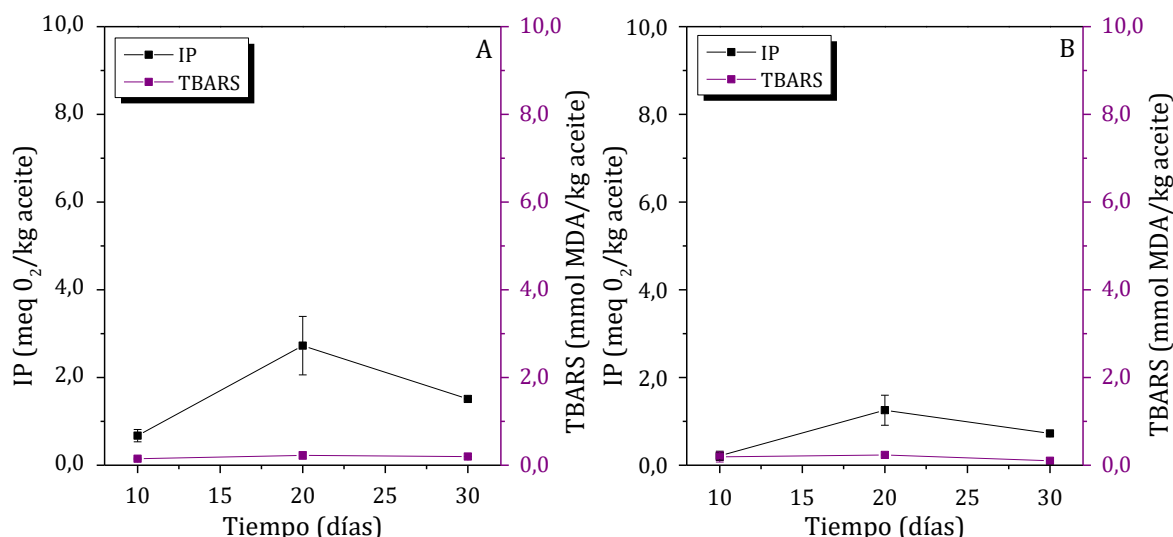


Figura 3.4. Estabilidad oxidativa del AL durante el almacenamiento en distintas condiciones (A) 25 °C expuesto a la luz y (B) 60 °C en oscuridad.

En contraste con la estabilidad observada para los indicadores de oxidación lipídica (IP y TBARS), la concentración de ASX evidenció una mayor sensibilidad a las condiciones de almacenamiento, tal y como se muestra en la Fig. 3.5. En particular, la degradación de ASX estuvo más influenciada por la temperatura que por la exposición a la luz. Luego de 30 días, las muestras almacenadas a 25 °C en presencia de luz presentaron una disminución del 23 % en el contenido de ASX, mientras que a 60 °C en oscuridad, la degradación alcanzó aproximadamente el 60 %.

Estos resultados sugieren que, bajo condiciones de mayor temperatura, la ASX estaría actuando como principal agente antioxidante para ralentizar la oxidación de los AG, lo que sería consistente con los bajos valores de IP y TBARS observados. Tal y como se reporta en la bibliografía, además de la fotodegradación, factores como la temperatura y la disponibilidad de oxígeno desempeñan un rol determinante en la estabilidad de la ASX (Christophersen et al., 1991; Niamnuy et al., 2008).

No obstante, aún bajo estas condiciones de almacenamiento acelerado a 60 °C, el contenido de ASX remanente se mantuvo dentro de los rangos reportados para aceites de crustáceos con capacidad antioxidante (Fuller et al., 2020; Olatunde & Benjakul, 2022; Sun et

al., 2019; Xie et al., 2019), lo que resulta particularmente destacable considerando la elevada susceptibilidad a la oxidación de matrices ricas en AGPI.

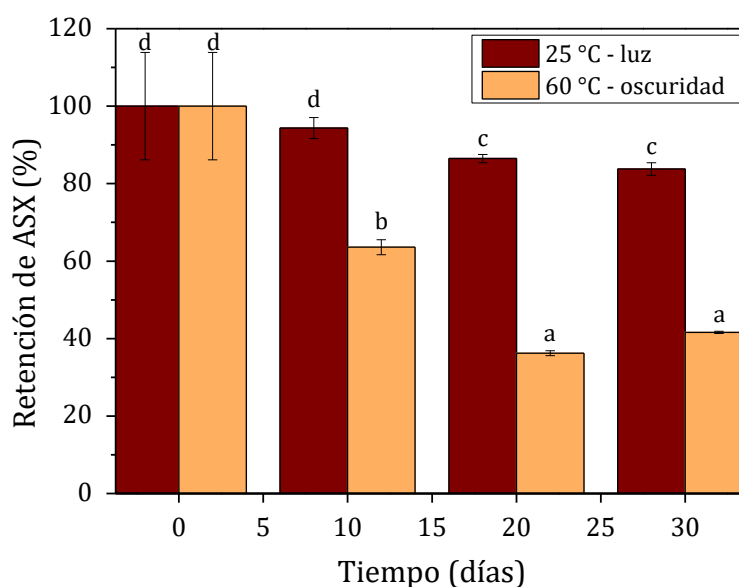


Figura 3.5. Retención de ASX en el AL durante el almacenamiento a 25 °C expuesto a la luz, y a 60 °C en oscuridad. Las diferencias entre tratamientos se evaluaron mediante la prueba de Kruskal–Wallis ($p < 0.05$).

En este sentido, el AL evidenció una estabilidad poco frecuente, manteniendo simultáneamente niveles bajos de IP y una fracción apreciable de ASX disponible, incluso tras su almacenamiento a alta temperatura.

Debido a que el AL mostró bajos valores de IP y TBARS cuando se almacenó a 60 °C durante 30 días, se decidió profundizar el análisis sometiénolo a condiciones térmicas más exigentes (100 °C y 150 °C), cercanas a las que se utilizan durante los procesos de secado por aspersión.

Como se observa en la Tabla 3.2, el incremento de la temperatura produjo una marcada disminución en la retención del contenido de ASX, mientras que los indicadores de oxidación lipídica (IP y TBARS) mostraron un ligero aumento, pero aun así permanecieron en valores muy bajos ($IP < 1 \text{ meq O}_2/\text{kg aceite}$, $TBARS < 1 \text{ mmol MDA/kg aceite}$).

Durante el tratamiento a 100 °C, el contenido de ASX disminuyó un 25 % en la primera hora y se degradó casi completamente (94 %) a las 48 h. Cuando se aumentó la temperatura a

150 °C, la degradación de ASX se aceleró significativamente, reduciéndose a la mitad a los 30 min, y degradándose completamente al cabo de 1 h (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Retención de ASX, IP y TBARS del AL almacenado a 100 °C y 150 °C a distintos tiempos.

Tratamiento térmico	Retención de ASX (%)	IP (meq O ₂ /kg aceite)	TBARS (mmol MDA/kg aceite)
Sin tratamiento	100.0 ± 13.9 ^a	ND	0.13 ± 0.01 ^a
100 °C – 1 h	74.4 ± 1.9 ^b	0.47 ± 0.13 ^a	0.20 ± 0.06 ^b
100 °C – 2 h	65.1 ± 4.6 ^c	0.58 ± 0.01 ^a	0.44 ± 0.11 ^d
100 °C – 5 h	52.8 ± 0.2 ^d	0.57 ± 0.02 ^a	0.29 ± 0.04 ^c
100 °C – 48 h	6.4 ± 0.5 ^f	0.87 ± 0.01 ^b	0.44 ± 0.08 ^d
150 °C – 0.5 h	47.4 ± 1.0 ^e	ND	0.21 ± 0.04 ^b
150 °C – 1 h	ND	ND	0.29 ± 0.04 ^c

Los datos se expresan como los promedios ± DE. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (p<0.05). ND = No detectable.

Estos resultados indican que la baja formación de productos primarios y secundarios de oxidación no necesariamente refleja una mayor estabilidad oxidativa intrínseca del aceite, sino que estaría asociada al consumo progresivo de la ASX, que actuaría como la principal barrera antioxidante durante el tratamiento térmico.

La ASX probablemente ejerció su efecto antioxidante mediante la interrupción de las reacciones de propagación de la peroxidación lipídica, actuando como captador de radicales peroxilo y otros radicales lipídicos. Además, su capacidad para extinguir oxígeno singlete habría contribuido a reducir la formación de hidroperóxidos y, en consecuencia, de productos secundarios de oxidación.

En conjunto, estos resultados sugieren que la estabilidad oxidativa observada se mantendría a expensas de la degradación de la ASX, lo que pone de manifiesto el papel fundamental de este carotenoide en la protección del AL frente al estrés térmico.

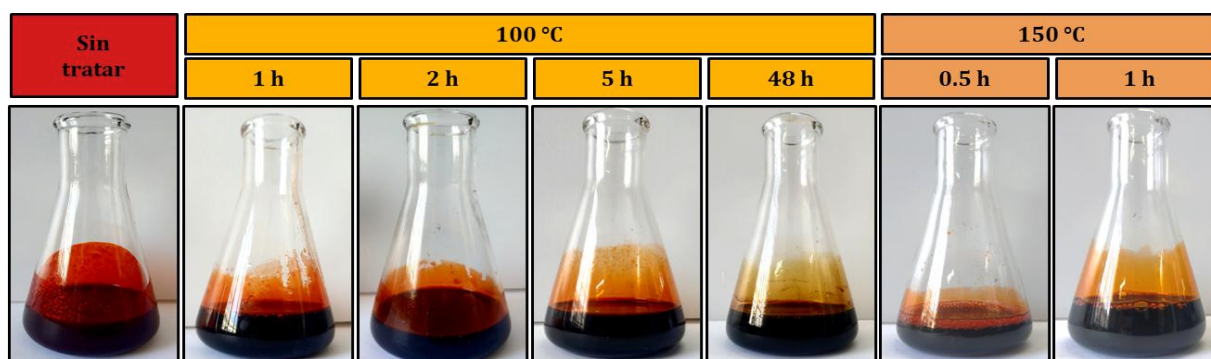


Figura 3.6. Apariencia del AL sometido a tratamientos térmicos a 100 y 150 °C.

Este comportamiento se vio acompañado por los cambios de coloración del aceite (Fig. 3.6), donde la aparición de tonalidades marrón-pardas ocurrió más rápidamente a 150 °C, lo que es consistente con la degradación acelerada de la ASX.

3.2.3. Cinética de degradación de ASX en el AL

Tal y como se observó anteriormente, la ASX es un compuesto muy sensible a la oxidación debido a su estructura con múltiples insaturaciones, lo que promueve su degradación durante el almacenamiento y el procesamiento térmico (Ribeiro et al, 2005).

El contenido inicial de ASX en el AL fue de 2.73 ± 0.01 mg/g de aceite.

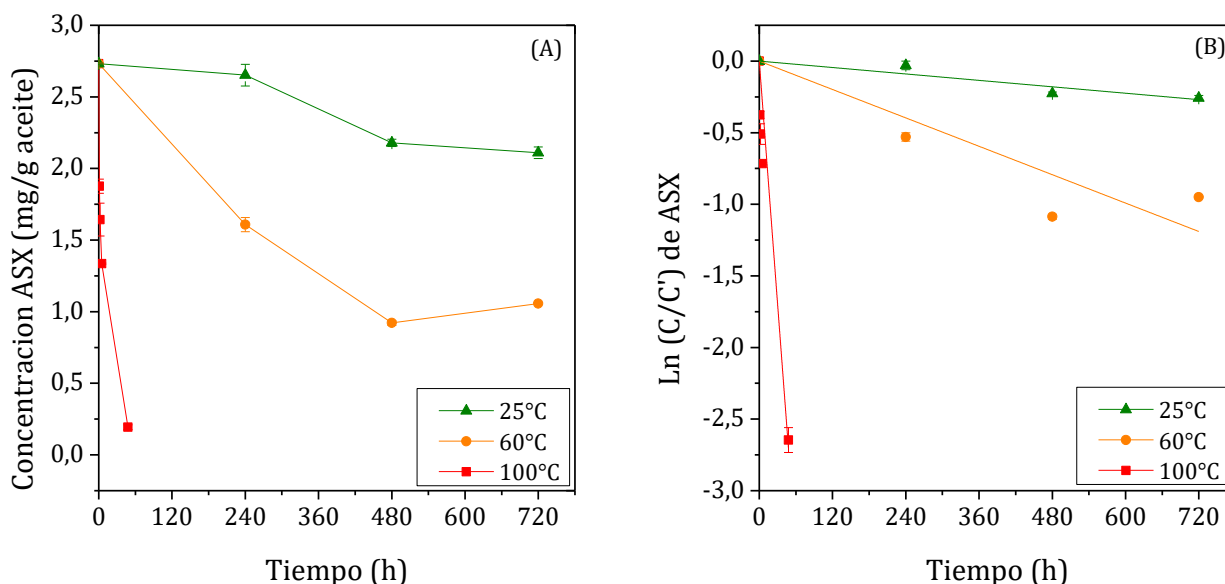


Figura 3.7. AL almacenado a distintas temperaturas (25, 60 y 100 °C). (A) Concentración de ASX en función del tiempo y (B) linealización de la concentración de ASX en función del tiempo según la ecuación $\ln(C/C') = k.t$, donde C' es la concentración inicial.

En la Fig. 3.7 A se presentan las curvas de degradación de ASX en función del tiempo en el AL incubado 25 °C, 60 °C y 100 °C.

Las mayores temperaturas provocaron un mayor grado de degradación del antioxidante. Con el objetivo de describir cuantitativamente este comportamiento, los datos experimentales se ajustaron a un modelo cinético de primer orden, ya que se ha reportado previamente en bibliografía este tipo de cinética para la degradación térmica de ASX (Pu et al., 2010; Pu & Sathivel, 2011).

La linealización de estos datos a partir de la Ec. 3.3 (Fig. 3.7 B) permitió obtener los parámetros cinéticos correspondientes (k y $t_{1/2}$) para la degradación de ASX, que se presentan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Parámetros cinéticos de la degradación de ASX en el AL.

Temperatura (°C)	$k \times 10^{-2} (h^{-1})$	R^2	$t_{1/2} (h)$	$E_a (kJ/mol)$
25	0.04 ± 0.01	0.95	1732.9 ± 0.1	
60	0.17 ± 0.01	0.93	420.5 ± 18.0	60.63 ± 0.36
100	5.66 ± 0.18	0.94	12.3 ± 0.4	

Los datos se expresan como los promedios $\pm$ DE.

Como era esperable, la constante de degradación de ASX (k) aumentó con la temperatura. De manera complementaria, el $t_{1/2}$ también disminuyó significativamente: se redujo aproximadamente 4 veces al pasar de 25 °C a 60 °C, y cerca de 35 veces al pasar de 60 °C a 100 °C, alcanzándose en estas últimas condiciones una reducción del 50 % del contenido de ASX en 12 h de incubación.

Estos parámetros cinéticos constituyen una herramienta útil para evaluar el impacto que podrían tener las condiciones de secado por aspersión sobre la estabilidad de la ASX en los procesos de obtención de microcápsulas de AL en polvo.

Pu et al. (2010) y Pu & Sathivel (2011) también estudiaron la cinética de degradación de ASX proveniente de distintas fuentes (camarón y cangrejo de río), pero añadida a aceite de lino - un aceite vegetal. En ambos estudios, sometieron las mezclas a 60 °C y obtuvieron valores de $k \cdot 10^2$ de 4.14 y $6.49 h^{-1}$ para la ASX de camarón y de cangrejo, respectivamente. Estos valores de k fueron mucho mayores que los obtenidos para el AL a 60 °C ($0.17 h^{-1}$) (Tabla 3.3). Esta

diferencia estaría indicando una mayor tasa de degradación de la ASX en el aceite de lino, en comparación con el AL, lo que podría estar relacionado con la mayor proporción de AGPI presentes en el aceite de lino ($\approx 73\%$) que en el AL ($\approx 40.5\%$). Un mayor contenido de AGPI favorecería la formación de especies altamente reactivas durante la oxidación lipídica - como radicales alquilo y peroxilo - que podrían acelerar la degradación de compuestos con muchas insaturaciones como la ASX (Lavecchia & Zuorro, 2008).

Por otro lado, Takeungwongtrakul & Benjakul (2016) también estudiaron la degradación de ASX, pero en aceite de camarón - una matriz natural para este tipo de carotenoide - y reportaron valores de $k \cdot 10^2$ de 1.19 a 60°C . Si bien este valor es inferior al observado en aceite de lino, continúa siendo 7 veces mayor que el obtenido para AL (0.17 h^{-1}). Esto evidenciaría un efecto protector de la matriz lipídica del AL sobre la ASX, reduciendo su velocidad de degradación, incluso frente a sistemas lipídicos de origen similar como el aceite de camarón.

Además del efecto antioxidante de la propia ASX, es posible que otros componentes minoritarios presentes en la matriz lipídica también contribuyan a su protección frente a la oxidación. Entre ellos se encuentran otros carotenoides, como β -caroteno, equinenona, cantaxantina, astaceno y zeaxantina, que han sido reportados en este tipo de aceites (Su et al., 2018). Asimismo, las posibles interacciones entre estos compuestos y los demás constituyentes de la matriz lipídica podrían potenciar la capacidad antioxidante del sistema y contribuir a disminuir la degradación oxidativa.

A partir de los valores de k obtenidos a las distintas temperaturas, se calculó la energía de activación (E_a) del proceso de degradación de la ASX mediante la ecuación de Arrhenius (Ec. 3.5), aplicando la regresión lineal de la gráfica de $\ln(k)$ en función de $1/T$ (Fig. 3.8). Este parámetro está relacionado con la mínima cantidad de energía que se debe superar para que ocurra la reacción de degradación de la ASX (Farhoosh & Hoseini-Yazdi, 2014).

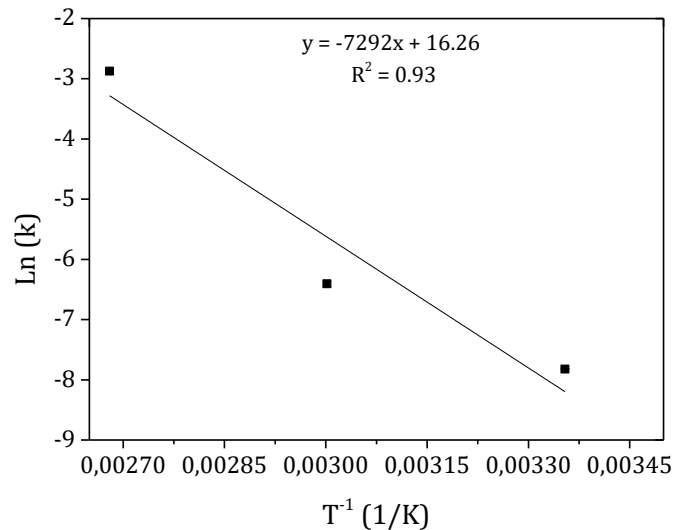


Figura 3.8. Diagrama de Arrhenius para la degradación de ASX en el AL.

El valor de E_a obtenido fue de 60.63 kJ/mol (Tabla 3.3), que es comparable con el reportado para aceite de camarón (52.01 kJ/mol), lo que sugiere mecanismos de degradación similares en ambas matrices, aun cuando difieran en la velocidad del proceso.

3.3. Conclusiones parciales

El AL presentó un elevado contenido de AGPI, especialmente ω -3, junto con una alta estabilidad oxidativa, atribuida al efecto antioxidante de la ASX. No obstante, este carotenoide evidenció una marcada sensibilidad térmica, por lo que la estabilidad oxidativa del aceite se mantendría a expensas de su degradación. En este contexto, resulta necesario desarrollar estrategias de encapsulación que permitan preservar el aceite y sus compuestos bioactivos frente a condiciones térmicas intensivas, como las involucradas en los procesos de secado por aspersión.

**4. CAPÍTULO 4: *Formulación y
caracterización de emulsiones
para encapsular aceite de
langostinos***

Con el objetivo de reducir la degradación de ASX durante etapas posteriores de procesamiento del AL para la obtención de un ingrediente en polvo (secado por aspersión), en este capítulo se diseñaron emulsiones O/W con una doble capa interfacial biopolimérica, como etapa inicial del proceso de encapsulación. Para ello, se empleó un concentrado de proteínas de soja como emulsionante y quitosano (CHT) como componente de la capa más exterior que rodea a las gotas de aceite, junto con maltodextrina (MDX) como material de relleno, para aumentar el contenido de sólidos.

Se estudió la influencia del pH en la formación de estas emulsiones, que se caracterizaron con el fin de evaluar su estabilidad y verificar la formación de la doble capa interfacial. El análisis de la estructura de estas emulsiones es fundamental, ya que constituyen el paso previo a la etapa de deshidratación, necesaria para obtener las microcápsulas de aceite en estado sólido.

4.1. Materiales y Métodos

4.1.1. Materiales

Se utilizaron los mismos materiales descriptos previamente (Sección 3.1.1.).

En particular, se empleó un concentrado de proteína de soja (SPC) provisto por Archer Daniels Midland Company – ADM (EE. UU.). La composición centesimal informada del SPC en base seca fue: 70 % de proteína, 20 % de fibra dietética total, 3 % de grasas, 5 % de cenizas y, además, contenía un 6 % de humedad. La muestra comercial de quitosano (CHT) fue provista por Eastar Holding Group Dong Chen Co. Ltd. (China) (PM: 63.97 ± 2.31 kDa; grado de acetilación: 93 %). La muestra de maltodextrina (MDX) fue provista por Gelfix (Buenos Aires, Argentina). Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

4.1.2. Métodos

Se prepararon emulsiones monocapa (SPC) y multicapa (SPC-CHT), incorporando MDX como polisacárido neutro en la fase continua, y se realizaron estudios preliminares para seleccionar las condiciones de pH y de homogeneización que favorecieran la formación de

emulsiones estables. Para ello, se evaluó el comportamiento interfacial de los biopolímeros bajo diferentes condiciones de pH, mediante mediciones de potencial zeta, tamaño de partícula, índice de cremado, coalescencia y observaciones por microscopía óptica. Estos ensayos permitieron identificar las condiciones para generar las emulsiones más estables, para su posterior deshidratación.

4.1.2.1. Preparación de las emulsiones

En primer lugar, se prepararon por separado dispersiones concentradas de SPC, CHT y MDX. El CHT fue dispersado en una solución de ácido acético al 0.5 % p/p, con agitación durante 30 min. El SPC y la MDX fueron dispersadas en agua, con agitación a temperatura ambiente, hasta disolución completa. La preparación de las dispersiones acuosas se realizó utilizando agua ultrapura Milli-Q a la cual se le agregó azida sódica al 0.02 % p/v para evitar el desarrollo microbiano. Una vez preparadas, se conservaron a 4 °C overnight para promover la hidratación completa de los biopolímeros.

Las emulsiones secundarias se prepararon mezclando, simultáneamente, 10 % de fase oleosa y 90 % de fase acuosa conteniendo SPC, CHT y MDX, de manera que la composición final de las emulsiones (en % p/p) fue: 10 % de aceite, 1 % de SPC, 0.3 % CHT y 25 % de MDX. La concentración de SPC se seleccionó para establecer una relación 1:10 respecto al aceite, mientras que la de CHT se fijó en función de la proteína, con una relación 3:1 (proteína-polisacárido), de acuerdo con la bibliografía (Xiong et al., 2018; Zhang et al., 2015) y la experiencia previa del grupo.

Las emulsiones se prepararon en un homogeneizador Ultraturrax T-25 (IKA, Alemania) durante 2 min a 12.000 rpm. Una vez obtenidas las emulsiones, se utilizó HCl 0.5 N para ajustar el pH según correspondiera (3, 3.5, 4, 4.5 y 5). Las mediciones de pH se realizaron con un pH-metro Sartorius, modelo PR-15 (Alemania). Para disminuir el tamaño de gota, estas emulsiones fueron luego sometidas a un segundo paso de homogeneización mediante sonicación en un procesador ultrasónico (US) Vibra Cell Sonics, modelo VCX 750 (EE. UU.) en modo *duty cycle* (1

seg ON, 1 seg OFF) a 40 % de amplitud durante 4.5 min, en baño de hielo con agitación magnética constante.

Este procedimiento se empleó exclusivamente durante la etapa de puesta a punto, con el objetivo de evaluar el efecto del pH y establecer las condiciones necesarias para obtener emulsiones estables con doble capa interfacial.

Una vez seleccionado el pH más adecuado para la formulación de emulsiones, se reemplazó la sonicación por una tecnología más escalable: la homogeneización a altas presiones. Para ello, el segundo paso de homogeneización se realizó en un homogeneizador de dos etapas GEA PandaPLUS Lab Homogenizer 2000 (Italia), ya que este es uno de los equipos más utilizados en la industria alimentaria. Las condiciones de homogeneización seteadas fueron: 40 bar en la primera etapa y 10 bar en la segunda etapa. Estos parámetros se ajustaron mientras se circulaba agua por el equipo. Sin embargo, al pasar la emulsión - con una mayor viscosidad - la presión total final se incrementó hasta 110 bar.

Todas las emulsiones fueron evaluadas inmediatamente luego de ser preparadas.

4.1.2.2. Caracterización de emulsiones

4.1.2.2.1. Microscopía óptica

Las emulsiones fueron observadas en un microscopio óptico convencional Leica Microsystems (Alemania), equipado con una cámara fotográfica, en aumentos de 40X, colocando una gota de emulsión fresca entre un porta y un cubreobjetos. Durante la observación de los sistemas, se seleccionaron varios campos y se tomaron fotografías de los más representativos (Acosta et al., 2024).

4.1.2.2.2. Determinación del potencial zeta

Para evaluar la estabilidad coloidal de las emulsiones, se realizaron mediciones de potencial zeta empleando un equipo Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments (Reino Unido).

Además de las emulsiones secundarias, también se prepararon emulsiones primarias mezclando simultáneamente 10 % de fase oleosa (AL) y 90 % de fase acuosa, conteniendo SPC

y MDX, de manera que la composición final de las emulsiones (en % p/p) fue: 10 % de aceite, 1 % de SPC y 25 % de MDX.

Las emulsiones fueron previamente diluidas 1/100 en buffer acetato (según el pH que correspondiera) y luego fueron inyectadas en una celda capilar provista de dos electrodos a cada lado para medición de movilidad electroforética, a partir de la cual el equipo calcula el potencial zeta. Las mediciones se realizaron por quintuplicado (Acosta et al., 2024).

4.1.2.2.3. Evaluación macroscópica de cremado

La estabilidad de las emulsiones frente al cremado se determinó de acuerdo con Spotti et al. (2026), como un parámetro de la desestabilización global de las emulsiones luego de 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente. Para ello se colocaron 10 mL de emulsión en tubos graduados que se almacenaron a temperatura ambiente durante 7 días.

4.1.2.2.4. Determinación de coalescencia

El porcentaje de coalescencia de las emulsiones se determinó mediante la técnica descrita por Spotti et al. (2026). Se tomaron alícuotas de las emulsiones preparadas y se centrifugaron a 15000 $\times g$ a 25 °C durante 15 min en una centrífuga Capp CR1512 (Dinamarca). En la parte superior se observó si hubo liberación de aceite luego de la centrifugación y, en ese caso, se determinó la cantidad de aceite liberado por pesada. El porcentaje de coalescencia se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$Coalescencia (\%) = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad \text{Ec. 4.1}$$

donde m_1 : masa de aceite separado luego de la centrifugación, y m_2 : masa de aceite total (aceite adicionado a la emulsión).

4.1.2.2.5. Distribución de tamaños de gota

Se realizaron determinaciones de distribución de tamaños de gota por dispersión de luz dinámica (DLS) en un equipo Zeta Sizer Nano ZS, Malvern Instruments (Reino Unido), equipado con un láser He-Ne (633 nm) con un rango de medición entre 0.1 y 6000 nm. Las

mediciones se realizaron a 25 °C y un ángulo de dispersión fijo de 173°. Las emulsiones fueron previamente diluidas 1/100 en agua ultrapura. Por cada muestra se realizaron al menos cinco mediciones (Acosta et al., 2024).

4.1.2.3. Análisis estadístico de los datos

Cada experimento se realizó con su correspondiente réplica (dos repeticiones). Todos los ensayos se realizaron al menos por duplicado. A partir de estas mediciones se calcularon los valores promedio y las desviaciones estándar.

4.2. Resultados y Discusión

4.2.1. Estudio de las variables que afectan la formación y estabilidad de emulsiones

4.2.1.1. Efecto de las condiciones de homogeneización

El primer paso para lograr una adecuada microencapsulación del AL consiste en la formulación de una emulsión estable. Las proteínas son ampliamente utilizadas como agentes emulsionantes debido a sus propiedades funcionales, y a que su naturaleza anfifílica les permite adsorberse rápidamente en la interfase aceite-agua, formando una membrana elástica y resistente alrededor de las gotas (Taherian et al., 2011). Dado que se comportan como anfóliticos, su carga neta depende del pH del medio. Esta característica permite la interacción con biopolímeros de carga opuesta, favoreciendo la formación de capas interfaciales adicionales mediante interacciones electrostáticas. De este modo, es posible aumentar el espesor y la resistencia de la membrana interfacial, para proteger mejor a los compuestos encapsulados en el núcleo (Li et al., 2020).

En este sentido, en este capítulo se diseñaron emulsiones O/W doble capa para encapsular el AL, utilizando un concentrado de proteínas de soja como emulsionante y CHT como el componente más externo de la capa interfacial.

En primer lugar, se pusieron a punto las condiciones de homogeneización de las emulsiones, que permitieran lograr tamaños de gota adecuados para promover la estabilidad

de los sistemas frente al cremado. Este fenómeno de desestabilización está asociado al movimiento ascendente de las gotas debido a la diferencia de densidades de la fase dispersa y la fase continua. De acuerdo con la ley de Stokes, la velocidad de cremado de una gota en la emulsión es directamente proporcional al cuadrado de su radio, por lo que la reducción del tamaño de gota constituye una estrategia efectiva para disminuir la desestabilización por cremado (Robins, 2000).

En la Fig. 4.1 se muestra el aspecto macroscópico y microscópico de las emulsiones de AL obtenidas en los dos pasos de homogeneización.

Tal y como puede observarse, en los sistemas homogeneizados sólo con UT se observó una gran variabilidad de tamaños de gota y la presencia de flóculos (zonas más oscuras en la micrografía), Fig. 4.1 A. Sin embargo, con la aplicación de un tratamiento posterior con ultrasonido, las gotas disminuyeron su tamaño y presentaron una distribución más homogénea (Fig. 4.1 B), lo que podría promover una mayor estabilidad frente a la separación de fases por cremado.

Además, se observaron diferencias en la intensidad del color de las emulsiones según las diferentes etapas de homogeneización. Por un lado, las emulsiones con mayores tamaños de gota presentaron un color rojizo oscuro, que se fue aclarando y haciéndose más naranja cuando se disminuyó el tamaño de gota. Este comportamiento ha sido reportado en emulsiones O/W, donde la apariencia visual depende de la interacción de la luz con la microestructura del sistema (McClements, 2002). En particular, la dispersión de la luz - fuertemente influenciada por el tamaño y la concentración de las gotas - determina la luminosidad y la turbidez de la emulsión, mientras que la absorción de longitudes de onda específicas por compuestos cromóforos define el tono observado. En el caso de emulsiones formuladas con AL, la presencia de carotenoides, como ASX, contribuye significativamente a la absorción en la región visible, generando tonalidades rojizas. Por lo tanto, la disminución del tamaño de gota inducida por los tratamientos de homogeneización podría haber incrementado la dispersión de la luz incidente,

dando lugar a emulsiones visualmente más claras y con cambios en la tonalidad percibida, en concordancia con lo reportado en la literatura.

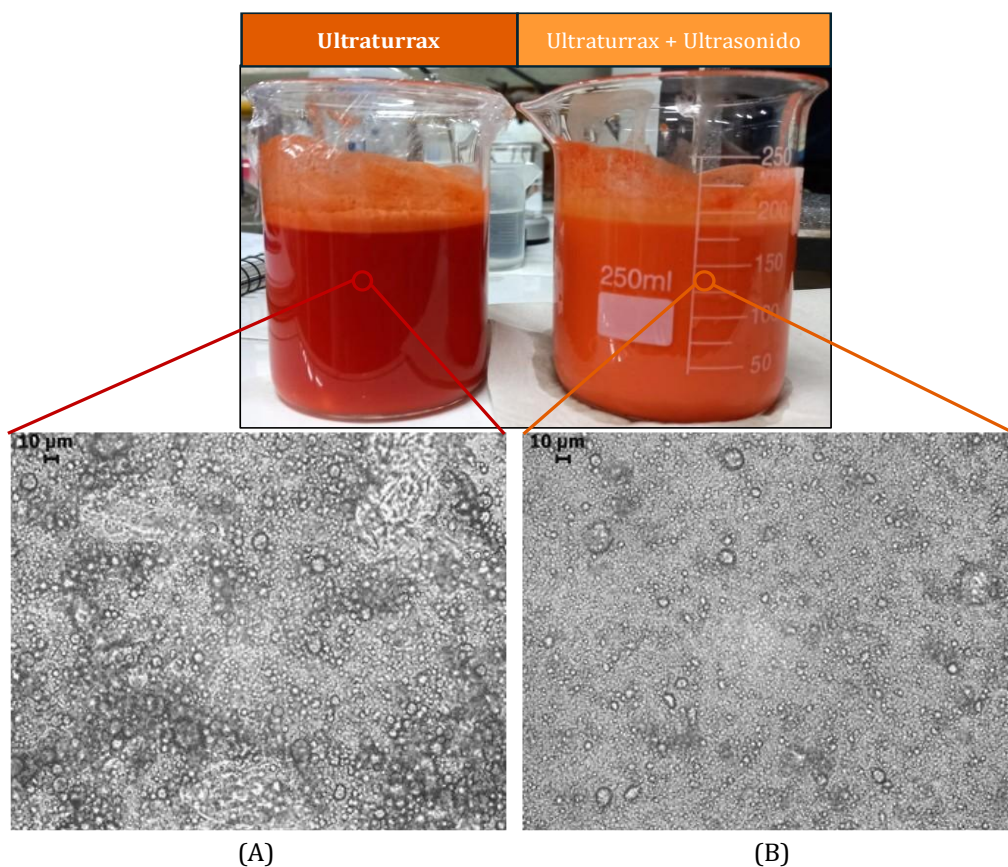


Figura 4.1. Aspecto macroscópico y microscópico de emulsiones O/W de AL (10 % aceite, 1 % SPC, 0.3 % CHT, pH 4), sometidas a uno y dos pasos de homogeneización.

Estos resultados preliminares mostraron que el uso combinado de UT y US puede contribuir a la mejora de la estabilidad de las emulsiones, al promover la disminución del tamaño y la aglomeración de las gotas. Por lo tanto, se decidió continuar preparando las emulsiones a partir de estas dos etapas secuenciales de homogenización.

4.2.1.2. Efecto del pH

En esta sección se analizó la influencia del pH sobre los tamaños de gota, la formación de la doble capa interfacial (SPC-CHT), y la estabilidad de las emulsiones. La formación de complejos electrostáticos entre proteínas y polisacáridos de carga opuesta ha sido ampliamente estudiada en bibliografía (Chen & Subirade, 2006; McClements & Li, 2010; Schmitt & Turgeon, 2011), y el pH es uno de los factores que más influye en la carga neta de los

biopolímeros. Es por ello que se evaluaron distintas condiciones de pH para promover la formación de la doble capa interfacial por medio de interacciones electrostáticas entre SPC-CHT (Klinkesorn & McClements, 2009).

4.2.1.2.1. Potencial Zeta

Una de las determinaciones más útiles para seguir el proceso de formación de las membranas interfaciales alrededor de la gota de aceite es la medición del potencial zeta de las emulsiones.

La Fig. 4.2 presenta los valores de potencial zeta de emulsiones primarias (SPC) y secundarias (SPC-CHT) en un rango de pH entre 3 – 4.5. Estos valores de pH se eligieron teniendo en cuenta que se observó que el CHT se volvía más insoluble a $\text{pH} > 5$.

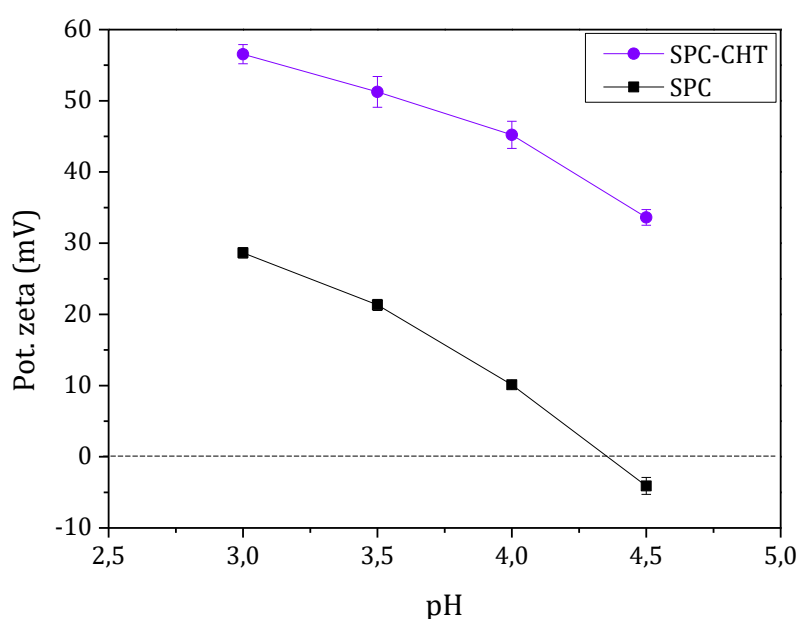


Figura 4.2. Efecto del pH sobre el potencial zeta de emulsiones primarias (10 % aceite, 1 % SPC) y secundarias (10 % aceite, 1 % SPC, 0.3 % CHT) de AL.

En primer lugar, se puede observar que el potencial superficial de las gotas de emulsiones primarias (en ausencia de CHT) varió desde -4 mV a 29 mV cuando el pH disminuyó desde 4.5 a 3, pasando por 0 mV a pH 4.3. Este comportamiento sería consistente con el valor de pI reportado para las proteínas de soja, cercano a pH 4.5 (Zhang et al., 2015). A valores de pH superiores al pI, la proteína presenta una densidad de carga neta negativa, cuya magnitud

aumenta a medida que se aleja del pI. Por el contrario, a valores de pH inferiores al pI, la proteína adquiere densidad de carga neta positiva, incrementándose su magnitud cuanto mayor es la diferencia respecto al pI.

Por su parte, el CHT es un polisacárido de estructura lineal compuesto por unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina unidas aleatoriamente mediante enlaces β -(1-4). La presencia de grupos amino primarios en las unidades de D-glucosamina de su cadena principal, confiere al CHT un carácter catiónico, es decir, una carga superficial positiva, lo que favorece solubilidad en soluciones acuosas ácidas diluidas ($\text{pH} \leq 5$) (Chapa González et al., 2021).

Tal y como se mencionó anteriormente, la solubilidad del CHT constituyó una de las principales restricciones en el diseño de emulsiones multicapa, ya que, a pH 5, las emulsiones se volvían demasiado viscosas - por la baja solubilidad del CHT - lo que dificultaba su tratamiento con el US para la disminución del tamaño de gota.

Cuando se prepararon emulsiones secundarias con SPC y CHT, se observó un incremento lineal en el valor absoluto del potencial zeta hacia valores más positivos en todo el rango de pH estudiado.

Este incremento del potencial zeta hacia valores más positivos tras la incorporación de CHT sugeriría la asociación del polisacárido al film interfacial formado por el SPC alrededor de las gotas de aceite. Este comportamiento sería consistente con el carácter catiónico del CHT, debido a la protonación de sus grupos amino en medio ácido (Bhattacharjee, 2016; Julio et al., 2018).

A pesar de que, a valores de pH inferiores al pI, el film interfacial de SPC presenta una carga neta positiva, la adsorción del quitosano puede explicarse por la presencia de dominios o "parches" localizados con carga negativa en la superficie de las proteínas. En efecto, aunque la carga global de las proteínas sea positiva, estas son moléculas anfóteras y estructuralmente heterogéneas que conservan residuos de aminoácidos ácidos expuestos, capaces de generar regiones con carga negativa (Jones & McClements, 2011). El CHT, al ser un polielectrolito catiónico de elevada densidad de carga, puede interactuar electrostáticamente con estos

dominios con carga negativa. Además de estas interacciones electrostáticas localizadas, es probable que la asociación entre SPC y CHT esté reforzada por interacciones no electrostáticas, como la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y amino del CHT y los grupos polares de la proteína, así como por interacciones hidrofóbicas entre regiones apolares expuestas del SPC y los segmentos acetilados del polisacárido. En conjunto, estos mecanismos podrían explicar la adsorción del CHT sobre la membrana interfacial formada por el SPC y el incremento del potencial zeta observado.

Cabe destacar que todas las emulsiones secundarias presentaron valores absolutos de potencial zeta superiores a 30 mV. Existen guías generales en la bibliografía que clasifican la estabilidad de las dispersiones de sistemas coloidales según los valores de potencial ζ , según rangos: (i) ± 0 a 10 mV altamente inestables, (ii) ± 10 a 20 mV relativamente inestables, (iii) ± 20 a 30 mV moderadamente estables, y (iii) $> \pm 30$ mV como altamente estables (Bhattacharjee, 2016). En este sentido, todas las emulsiones formuladas serían altamente estables, ya que las gotas tendrían mayor repulsión entre ellas y esto retardaría la desestabilización por fenómenos de floculación y/o coalescencia (Araiza-Calahorra & Sarkar, 2019).

4.2.1.2.2. Estabilidad frente al cremado

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables debido al contacto desfavorable entre las fases inmiscibles, y a la diferencia de densidades que existe entre ellas, lo que termina generando una separación de fases en el tiempo (McClements, 2005). La desestabilización, generalmente, es la resultante de varios procesos físicos, entre ellos: i) la floculación, que resulta en la unión de las gotas en racimos, ii) el cremado, que se produce por la migración de las gotas de aceite hacia arriba, por diferencia de densidades con la fase continua, dando lugar a una separación de fases, y iii) la coalescencia, que conlleva al aumento del tamaño de gota (Domian et al., 2015).

La determinación del índice de cremado es una de las técnicas más empleadas para monitorear la separación gravitacional de emulsiones (McClements, 2015). Por este motivo, para cada emulsión se determinó el índice de cremado a los 7 días, como un indicador de la

estabilidad global de los sistemas en un intervalo de tiempo prolongado. En la Fig. 4.3 se muestra la apariencia macroscópica de las emulsiones secundarias (SPC-CHT), donde se puede observar que el índice de cremado aumentó a medida que disminuyó el pH.

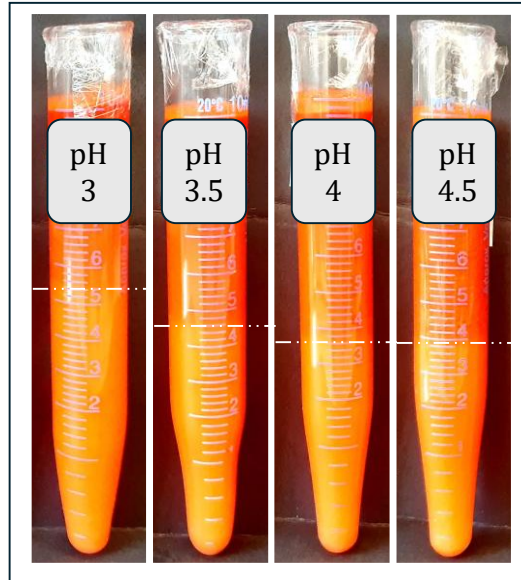


Figura 4.3. Aspecto macroscópico de índice de cremado de emulsiones secundarias (SPC-CHT) a distintos pH luego de 7 días de almacenamiento. La línea punteada marca la separación de fases.

Sin embargo, cabe destacar que, si bien se produjo la separación de una fracción de gotas que cremaron hacia la parte superior, esta no fue completa, ya que no se observa una fase límpida en el inferior de los tubos. Probablemente, cremaron las gotas de mayor tamaño mientras que las de menor tamaño permanecieron dispersas en el fondo del tubo.

Por su parte, la emulsión evaluada a pH 3 fue la que presentó el mayor índice de cremado. Es por eso que, en esta instancia, se descartó este pH para continuar con la formulación de emulsiones bicapa.

4.2.1.2.3. Tamaños de gota

En la Fig. 4.4 se muestran las micrográficas de las emulsiones secundarias preparadas a los valores de pH considerados en la sección anterior (3.5, 4 y 4.5). A pH 4 y 4.5 se observaron gotas de menor tamaño y con una distribución más uniforme. En cambio, a pH 3.5 se evidenciaron gotas de mayor tamaño y la presencia de algunas aglomeraciones.

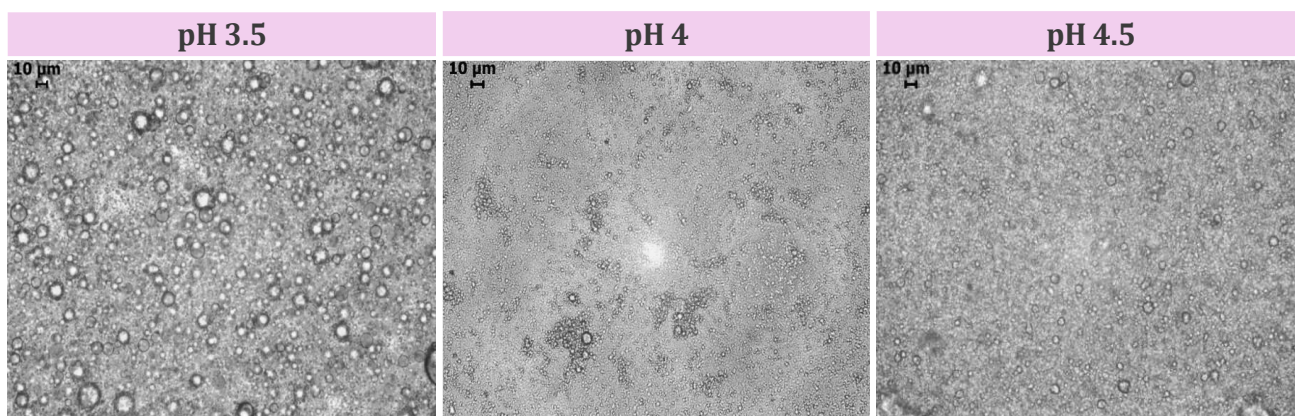


Figura 4.4. Efecto del pH sobre la microestructura de emulsiones secundarias (SPC-CHT). Aumento 40X, barra escala 10 μm .

En función de la estructura microscópica observada, el sistema a pH 3.5 fue descartado y se continuó con la caracterización de las emulsiones restantes, a fin de establecer las condiciones de preparación más adecuadas.

A las emulsiones a pH 4 y 4.5 se les realizaron mediciones de tamaños de gota mediante DLS. Es importante tener en cuenta que en el equipo en donde se realizaron las mediciones, se podían medir tamaños de gota de hasta 6 μm , por lo que los tamaños de gota mayores no pudieron ser cuantificados.

En la Fig. 4.5 se presentan las distribuciones de tamaños de gota, tanto en intensidad como en número para las emulsiones estudiadas.

La distribución por intensidad refleja la contribución relativa de diferentes tamaños de gota a la intensidad de la luz dispersada, que es proporcional a la sexta potencia del diámetro (d_6) de las gotas. Como las gotas más grandes dispersan mucha más luz que las más pequeñas, la presencia de gotas grandes podría “apantallar” la dispersión de luz de las pequeñas, generando un sesgo en la interpretación de los resultados obtenidos por DLS. Por este motivo, también se muestra la distribución en función de la fracción numérica de gotas con ese tamaño, donde la dispersión de luz es directamente proporcional al diámetro de las partículas (d_1) (Arzeni, 2014). No obstante, debe tenerse en cuenta que lo que realmente mide el equipo es intensidad de luz y la distribución de tamaños por número se alcanza por medio de una

transformación matemática de los datos. Por lo tanto, esta conversión podría amplificar el error inherente a la técnica de medición por DLS. Aun así, esta representación resulta útil para comparar la importancia relativa de las distintas poblaciones de gotas dentro de cada sistema.

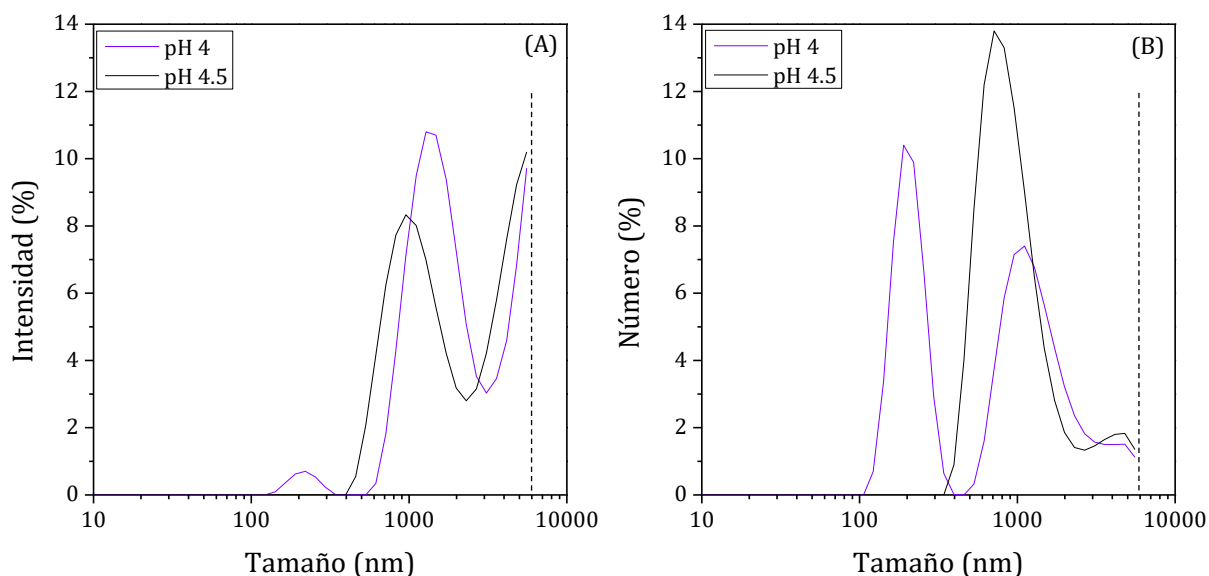


Figura 4.5. Distribución de tamaños de gota en (A) Intensidad y (B) Número, de emulsiones bicapa (SPC-CHT) preparadas a pH 4 y pH 4.5. La línea punteada representa el límite de medición del equipo.

Ambas emulsiones preparadas a pH 4 y 4.5 presentaron distribuciones multimodales, es decir, con varios picos. En la emulsión a pH 4.5 se observó una población de gotas predominante alrededor de 1000 nm en la distribución por intensidad (Fig. 4.5 A), mientras que en la distribución por número (Fig. 4.5 B), esa población se desplazó ligeramente hacia menores tamaños, con un pico cercano a 800 nm.

Por su parte, en la emulsión preparada a pH 4 también se evidenció una población principal con un pico alrededor de los 1400 nm en la distribución por intensidad, junto con una segunda población de menor tamaño, alrededor de los 190 nm (Fig. 4.5 A). Sin embargo, esta última adquirió más relevancia en la distribución por número (Fig. 4.5 B), lo que indicaría que a pH 4 existiría una mayor proporción de gotas pequeñas en comparación con pH 4.5.

En función de estos resultados, se seleccionó el valor de pH 4 para la preparación de emulsiones bicapa destinadas a la encapsulación de AL, ya que los menores tamaños de gota

contribuirían a una mayor estabilidad frente a la desestabilización por cremado durante el periodo comprendido entre la preparación de la emulsión y su deshidratación para obtener las microcápsulas en polvo. Además, este valor de pH estaría un poco más alejado del pI del SPC, lo que favorecería la solubilidad de la proteína durante la preparación de las soluciones acuosas.

4.2.2. Estudio de homogeneización de emulsiones mediante tecnología de altas presiones

Una vez seleccionado el pH más adecuado para la formulación de las emulsiones, se reemplazó el paso de sonicación por una tecnología más escalable: la homogeneización a altas presiones. Para ello, el segundo paso de homogeneización se llevó a cabo en un homogeneizador de dos etapas, uno de los equipos más utilizados en la industria alimentaria, especialmente en la industria láctea para reducir el tamaño de los glóbulos grasos de la leche y disminuir el cremado (Comuzzo et al., 2019; Plazzotta & Manzocco, 2018).

Las condiciones de homogeneización se definieron a partir de ensayos preliminares realizados por el grupo de investigación, con el objetivo de obtener emulsiones con distribuciones de tamaños de gota similares a las logradas mediante sonicación.

En la Fig. 4.6 se muestran las distribuciones de tamaño de gota ponderadas por intensidad y por número de las emulsiones bicapa preparadas a pH 4, sometidas a homogeneización a altas presiones y sonicación, respectivamente.

A diferencia de los sistemas sonicados, las emulsiones homogeneizadas a altas presiones mostraron distribuciones monomodales, con una población centrada alrededor de 750 nm en la distribución por intensidad (Fig. 4.6 A). En la distribución ponderada por número (Fig. 4.6 B), esta población se desplazó hacia menores tamaños, presentando un pico a 220 nm.

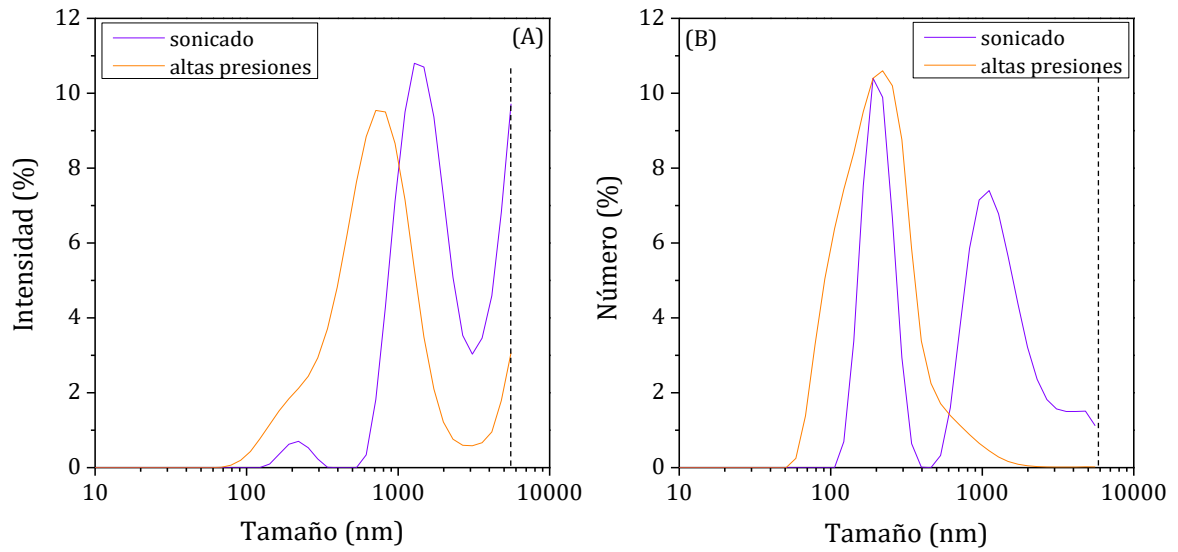


Figura 4.6. Distribución de tamaños de gota en función de (A) la Intensidad de luz dispersada y (B) el Número de gotas de emulsiones bicapa preparadas a pH 4. La línea punteada representa el límite de medición del equipo.

En síntesis, el proceso de homogeneización dio lugar a distribuciones de tamaño más homogéneas y a una mayor proporción de gotas pequeñas en comparación con las emulsiones sonicadas.

En la Fig. 4.7 puede observarse la microestructura de las emulsiones sometidas a altas presiones con predominio de gotas pequeñas pero una distribución de tamaños polidispersa.

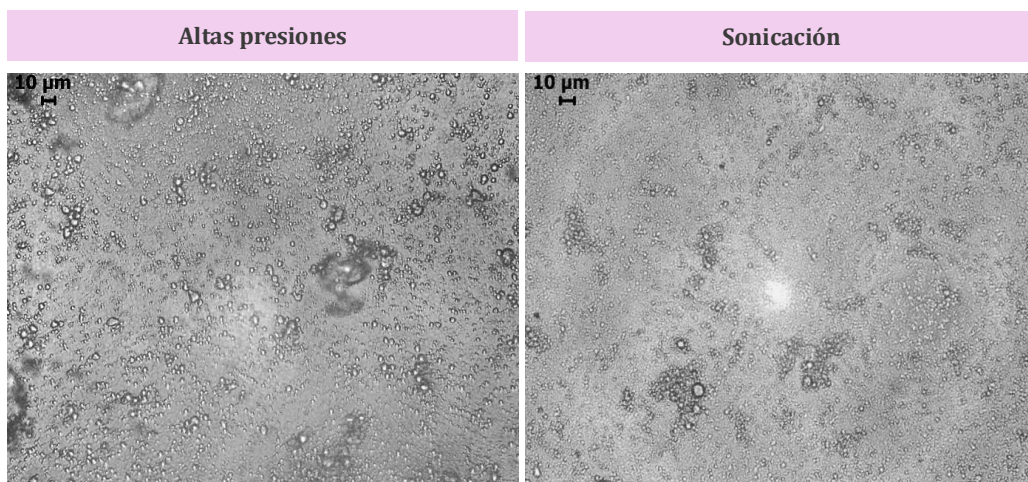


Figura 4.7. Micrografías de emulsiones bicapa preparadas a pH 4, homogeneizadas mediante (A) altas presiones y (B) sonicación. Aumento 40X, barra escala 10 μm.

Esto es consistente con el ensanchamiento de los picos en las distribuciones de tamaño determinadas por DLS para este tipo de emulsiones.

4.2.2.1. Estabilidad de las emulsiones frente a la liberación de aceite

Finalmente, se realizó un ensayo de coalescencia para evaluar la estabilidad de las emulsiones obtenidas por homogeneización a altas presiones. Para ello, las emulsiones se sometieron a centrifugación con el fin de inducir una desestabilización acelerada y evaluar si había liberación de aceite.

En la Fig. 4.8 se muestran las fotos de los tubos Eppendorf luego del centrifugado. No se observó coalescencia, ni liberación de aceite.



Figura 4.8. Tubos Eppendorf conteniendo emulsiones bicapa (SPC-CHT) a pH 4 obtenidas por homogeneización a altas presiones, luego de un paso de centrifugación (15000 $\times g$, 15 min).

Estos resultados indican que las membranas interfaciales presentaron una resistencia mecánica suficiente, asociada a su carácter viscoelástico, para permanecer intactas bajo las condiciones de desestabilización impuestas.

4.3. Conclusiones parciales

Se logró desarrollar una emulsión O/W bicapa, utilizando proteína de soja y CHT como materiales de pared, como estrategia de encapsulación orientada a preservar el AL y sus compuestos bioactivos frente a condiciones de procesamiento potencialmente degradativas.

Los resultados demostraron que la formación de una doble capa interfacial fue posible a pH 4, evidenciando la interacción entre ambos biopolímeros y la estabilidad del sistema emulsificado. Asimismo, se comprobó la viabilidad de utilizar homogeneización mediante altas presiones para la obtención de este tipo de sistemas, lo que representa una ventaja desde el punto de vista de su potencial escalabilidad industrial. Estas emulsiones constituyen una base adecuada para avanzar hacia la obtención de microcápsulas mediante secado por aspersión.

**5. CAPÍTULO 5: *Obtención y
caracterización de
encapsulados de aceite de
langostinos en polvo***

En este capítulo se llevó a cabo la deshidratación de las emulsiones doble capa, de AL, mediante secado por aspersión para obtener los encapsulados en polvo. Se evaluaron las características fisicoquímicas de los encapsulados obtenidos así también como la estabilidad del aceite encapsulado frente a la oxidación y la retención de ASX durante el almacenamiento a dos temperaturas diferentes (4 °C y 25 °C).

5.1. Materiales y Métodos

5.1.1. Materiales

Se utilizaron los mismos materiales descritos previamente (Sección 4.1.1.).

5.1.2. Métodos

5.1.2.1. Obtención de microcápsulas de AL en polvo

Las emulsiones más estables que se obtuvieron en el capítulo anterior (10 % de aceite, 1 % SPC, 0.3 % CHT, 25 % MDX y pH 4) se deshidrataron mediante secado por aspersión.

Este proceso se llevó a cabo en un secador por aspersión de escala laboratorio Spray Dryer Yamato, modelo ADL311 (Japón). Considerando la sensibilidad de la ASX frente a la degradación térmica observada en el capítulo 3, se evaluaron distintas temperaturas de secado. Las condiciones de operación del equipo fueron: temperatura de entrada (TE) de 85 °C, 110 °C, 140 °C y 150 °C; temperatura de salida (TS) entre 70-80 °C, caudal de aire 0.15 m³/min, presión de atomización 0.15 MPa, caudal de alimentación de las emulsiones 1.8 mL/min (TE 85 °C) y 3.8 mL/min (TE 110, 140 y 150 °C). Cabe aclarar que este secador por aspersión solo permite regular una de las temperaturas (entrada o salida), por este motivo se decidió mantener constante la temperatura de entrada, mientras que la de temperatura de salida varió dentro del rango informado.

Una vez obtenidos, los polvos fueron guardados en recipientes herméticos al resguardo de la luz y almacenados en refrigeración para su posterior caracterización.

5.1.2.2. Caracterización de microcápsulas de AL

5.1.2.2.1. Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación (EE) de las microcápsulas en polvo se determinó mediante el método descrito en Acosta et al. (2024). Se determinó el contenido de aceite superficial no encapsulado, también denominado aceite libre. Para ello, se pesaron 2 g de polvo, se agregaron 15 mL de hexano y se realizó una extracción agitando suavemente durante 2 min. Después de dejar el sistema decantar durante 5 min a temperatura ambiente (25 °C), el sobrenadante se filtró con un papel de filtro (MUNKTEL 00R) y se recuperó en un balón de destilación. Finalmente, el disolvente se evaporó en un evaporador rotatorio (BÜCHI R-124) a 60 °C durante 5 min. El extracto libre de solvente se secó en estufa a 105 °C hasta pesada constante. El aceite remanente determinado por gravimetría se consideró como el aceite libre. Por otro lado, para el aceite total se consideró el de AL pesado para formular las microcápsulas, asumiendo que, al no ser un compuesto volátil, no se evaporaría durante el secado por aspersión (Carneiro et al., 2013).

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. La EE se calculó relacionando el aceite libre con la cantidad de aceite inicial agregado a las formulaciones, según la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{\text{aceite total inicial (g)} - \text{aceite libre (g)}}{\text{aceite total inicial (g)}} \times 100 \quad \text{Ec. 5.1}$$

5.1.2.2.2. Microscopía electrónica de barrido

La morfología y microestructura de los encapsulados fue evaluada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un equipo Phenom World Pro X. Las muestras se observaron en diferentes aumentos (300x, 600x, 1000x, 3000x y 6000x) (Loyeau et al., 2026).

5.1.2.2.3. Determinación de actividad de agua

Se determinó a_w de las muestras en polvo en un equipo Aqualab Systems (EE. UU.) a temperatura ambiente (25 ± 0.1 °C) (Loyeau et al., 2026). Las mediciones se realizaron por triplicado.

5.1.2.2.4. Determinación de humedad

El contenido de humedad se determinó por gravimetría. Para ello se pesaron 1.5 g de muestra y se colocaron en una estufa de vacío a 60 °C, hasta pesada constante. El porcentaje de humedad se calculó por diferencia de pesada (Loyeau et al., 2026). Todas las medidas se realizaron por triplicado.

5.1.2.2.5. Dispersabilidad

La dispersabilidad (D) del encapsulado se evaluó utilizando la técnica descrita por Miranda-Linares et al. (2020). Se colocaron 5 mL de agua destilada a temperatura ambiente (25 °C) en un vaso de precipitados de vidrio de 25 mL. A continuación, se agregaron 0.5 g de muestra y se agitó vigorosamente con una espátula durante 15 s. La dispersión obtenida se filtró utilizando malla de filtrado de plástico con un tamaño de poro de 210 μm , y posteriormente se transfirieron 2 mL del filtrado a una cápsula de aluminio previamente tarada. La muestra se secó en estufa a 105 °C durante 4 h y se calculó el porcentaje de dispersabilidad mediante la ecuación:

$$D (\%) = \frac{(w + a) \times \%ST}{\left[a \times \left(\frac{100 - b}{100} \right) \right]} \quad \text{Ec. 5.2}$$

donde: w = peso del agua utilizada para dispersar (g), a = cantidad de polvo utilizada (g), b = contenido de humedad en el polvo y %ST = porcentaje de materia seca de la dispersión filtrada.

5.1.2.2.6. Solubilidad

La solubilidad (S) se determinó utilizando el método descrito por Miranda-Linares et al. (2020). Brevemente, se disolvieron 0.5 g de polvo en 5 mL de agua destilada a temperatura ambiente (25 °C), agitando vigorosamente la mezcla durante 5 min en vortex. Posteriormente,

la suspensión se centrifugó a 3000 x *g* durante 15 min. Se tomó una alícuota de 2 mL del sobrenadante, y se transfirió a una cápsula de aluminio previamente tarada, luego se secó en estufa a 105 °C hasta alcanzar peso constante. La solubilidad (%) se calculó en base seca por diferencia de peso.

5.1.2.2.7. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se obtuvieron espectros FTIR por Reflectancia Total Atenuada (ATR). Los espectros ATR-FTIR se registraron en un espectrómetro Nicolet iS50 (Thermo Scientific, EE. UU.) utilizando un cristal de diamante de única reflexión con 64 barridos a una resolución de 4 cm⁻¹. Las muestras analizadas fueron el AL puro, los materiales de pared (SPC, CHT y MDX) y las microcápsulas de aceite producidas. Estas mediciones se realizaron a 25 °C, en el rango de 400 a 4.000 cm⁻¹ (Pérez et al., 2025).

5.1.2.3. Estabilidad de microcápsulas durante el almacenamiento

Los encapsulados se almacenaron a 4 y 25 °C durante 3 meses. La estabilidad oxidativa se determinó midiendo los productos primarios y secundarios de la oxidación, mediante la cuantificación del IP y de TBARS, respectivamente. En simultáneo, se determinó el porcentaje de retención de ASX.

5.1.2.3.1. Determinación de parámetros de oxidación

(i) Índice de peróxidos

Se utilizó la técnica espectrofotométrica descrita en el Capítulo 3 (Sección 3.1.2.2.1). Inicialmente, 2 mL de emulsión reconstituida, con agua destilada, a partir del polvo (mismas proporciones que emulsión original) se extrajeron con 8 mL de una solución de hexano-isopropanol (3:1 v/v). La mezcla se homogeneizó en vortex durante 4 min, y se centrifugó durante 15 min a 3000 x *g*. Luego se tomaron 0.2 mL de la fase orgánica superior, y se siguieron los pasos previamente descritos en la técnica para calcular el IP.

(ii) Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Los productos de oxidación secundaria se determinaron según la metodología descrita en el Capítulo 3 (Sección 3.1.2.2.2). Para ello, se tomó una alícuota de 1 mL de la fase orgánica superior obtenida tras la extracción, de la emulsión reconstituida, con la mezcla hexano-isopropanol (3:1 v/v), y posteriormente se continuó con el procedimiento previamente descrito para la determinación de TBARS.

5.1.2.3.2. Determinación del porcentaje de retención de ASX

Se utilizó la técnica espectrofotométrica basada en el método descrito por Liu et al. (2011), descrita en el Capítulo 3 (Sección 3.1.2.2.3). Brevemente, una alícuota de la fase orgánica superior, obtenida tras la extracción de la emulsión reconstituida con la mezcla de hexano-isopropanol (3:1 v/v), se diluyó en una solución de etilacetato-etanol (1:1 v/v). Finalmente, se realizó un barrido espectrofotométrico entre 400 y 550 nm utilizando un espectrofotómetro Peet Lab, modelo PLC-7000 UV (China). La concentración de ASX se determinó a partir del valor de la derivada a 432 nm, utilizando una curva de calibración construida con un patrón de ASX. Los resultados para cada muestra se expresaron en porcentaje de ASX retenida, según la siguiente ecuación:

$$ASX_R(\%) = \frac{ASX_F}{ASX_I} \times 100 \quad \text{Ec. 5.3}$$

donde ASX_F es la concentración de ASX medida en cada muestra y ASX_I es la concentración inicial de ASX de cada sistema.

5.1.2.4. Análisis estadístico de los datos

Los valores promedio y sus desviaciones estándar fueron calculados y presentados en tablas y gráficos como pares de coordenadas acompañadas por su correspondiente barra de error. Para determinar diferencias significativas entre las distintas condiciones de ensayos se aplicó el test de ANOVA usando la prueba de Tukey HSD con un nivel de significancia $\alpha=0.05$. En los casos donde no se pudo aplicar ANOVA, se aplicaron pruebas no paramétricas (Kruskal Wallis, $p<0.05$) y gráficos de caja y bigotes para determinar diferencias entre las muestras.

5.2. Resultados y Discusión

5.2.1. Obtención de microcápsulas en polvo mediante secado por aspersión

Las emulsiones se sometieron a un secado por aspersión para obtener las microcápsulas de AL en polvo, y se evaluaron distintas temperaturas de entrada.

La Tabla 5.1 muestra los parámetros de oxidación (IP y TBARS) así también como el porcentaje de retención de ASX de los polvos obtenidos a cada temperatura de secado. La selección inicial de la temperatura de entrada de 150 °C se basó en antecedentes desarrollados dentro del grupo de investigación (Spotti et al., 2026), donde se encapsularon aceites ricos en AGPI ω -3 (aceite de chía) mediante secado por aspersión, obteniéndose valores bajos de IP a la salida del equipo (IP<5 meq O₂/kg de aceite).

Tabla 5.1. Valores de IP, TBARS y retención de ASX de los encapsulados de AL en polvo obtenidos mediante secado por aspersión a distintas temperaturas.

Temperatura de secado	IP (meq O ₂ /kg aceite)	TBARS (mmol MDA/kg aceite)	Retención de ASX (%)
150 °C	25.91 ± 0.01 ^c	0.77 ± 0.06 ^a	11.58 ± 3.28 ^a
140 °C	32.53 ± 6.34 ^c	0.27 ± 0.03 ^a	11.02 ± 1.40 ^a
110 °C	4.99 ± 1.79 ^a	0.35 ± 0.04 ^a	69.93 ± 1.08 ^b
85 °C	12.11 ± 0.73 ^b	0.56 ± 0.07 ^a	73.18 ± 4.54 ^b

Los datos se expresan como los promedios ± DE. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (p<0.05).

No obstante, considerando la elevada susceptibilidad de la ASX a la degradación térmica observada en el Capítulo 3, también se evaluaron temperaturas de secado inferiores. Sin embargo, la disminución de la temperatura de entrada se encuentra limitada por la necesidad de garantizar una evaporación eficiente del agua durante la atomización, a fin de obtener polvos con un contenido de humedad adecuado y evitar problemas de adherencia o secado incompleto dentro de la cámara del secador (Keshani et al., 2015).

Tal como puede observarse, las temperaturas de entrada más elevadas (140 °C y 150 °C) dieron lugar a la obtención de polvos con valores de IP superiores al límite sugerido (15 meq O₂/kg de aceite). Estos sistemas también presentaron bajos porcentajes de retención de

ASX (<20 %). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre ambas condiciones de secado ni en los valores de IP ni en la retención de ASX.

Por otro lado, las menores temperaturas de secado evaluadas (85 °C y 110 °C) permitieron obtener polvos con valores de IP inferiores al límite sugerido de 15 meq O₂/kg de aceite y porcentajes de retención de ASX cercanos al 70 %, considerablemente superiores a los observados a 140 °C y 150 °C. En particular, el sistema secado a 110 °C presentó el menor valor de IP (4.99 ± 1.79 meq O₂/kg de aceite), mientras que no se observaron diferencias en la retención de ASX entre ambas temperaturas.

Estos resultados indicarían que 110 °C constituye una condición de secado más adecuada para minimizar la oxidación lipídica y favorecer la conservación de ASX durante el proceso de secado por aspersión.

El-Messery et al. (2020) obtuvieron microcápsulas con aceite de krill mediante el secado por aspersión de nanoemulsiones a 130 °C y reportaron valores de IP en los polvos de 8.77 meq/kg aceite, con la diferencia que estos polvos solo tenían el 10 % de aceite, a diferencia de los que se obtuvieron en esta tesis con una mayor carga de aceite (cercana al 30 %). Por su parte, Takeungwongtrakul et al. (2014) reportaron IP también cercanos a 9 meq/kg aceite para encapsulados de aceite de camarón secados por aspersión utilizando una temperatura de entrada de 180 °C con polvos con 25 % de aceite.

Los elevados valores de IP observados a las temperaturas de secado más altas podrían explicarse, al menos en parte, por la degradación térmica de las ASX y otros carotenoides presentes en el AL. La estructura poliénica de los carotenoides presentes en el AL, si bien les proporciona valiosas propiedades antioxidantes, también promueve que los compuestos se degraden fácilmente en presencia de luz, oxígeno y/o calor (Minguez-Mosquera & Jaren-Galan, 1995).

El mecanismo de oxidación de los carotenoides es similar a la oxidación de lípidos. Se acelera con el calor y la reacción es catalizada por la presencia de oxígeno y luz. Zeb & Murkovic (2011) estudiaron el efecto de ASX y β -caroteno añadidos individualmente a aceite de oliva

refinado y sometidos posteriormente a oxidación acelerada mediante el ensayo Rancimat. Los autores reportaron que, luego de la degradación oxidativa de estos carotenoides, se observaba un aumento significativo del IP en el aceite de oliva, asociado a la formación de radicales y compuestos capaces de promover la reacción en cadena de la oxidación de lípidos. De este modo, los carotenoides podrían pasar de actuar como antioxidantes a comportarse como compuestos prooxidantes bajo ciertas condiciones.

Por su parte, si bien las dos menores temperaturas de secado evaluadas (85 °C y 110 °C) permitieron obtener polvos con valores de IP inferiores al límite sugerido (15 meq O₂/kg de aceite), el sistema secado a 110 °C presentó un valor significativamente menor que el obtenido a 85 °C (Tabla 5.1).

Temperaturas de entrada muy bajas pueden disminuir la velocidad de evaporación del agua durante el secado por aspersión, favoreciendo la obtención de microcápsulas con mayor contenido de humedad, menor fluidez y tendencia a la aglomeración. En este caso, las partículas tienden a adherirse a las paredes internas de la cámara de secado, lo que reduce el rendimiento del proceso (Mohammed et al., 2020). El mayor IP observado a 85 °C podría atribuirse al mayor tiempo de residencia de la muestra en la cámara de secado. Debido a la menor capacidad de evaporación del sistema a bajas temperaturas, fue necesario utilizar un menor caudal de alimentación de la emulsión para asegurar un secado adecuado, lo que prolongó el tiempo de exposición de las microcápsulas al calor y al oxígeno. Además, la presencia de agua residual durante el proceso podría haber promovido la hidrólisis parcial de los lípidos, generando ácidos grasos libres con mayor susceptibilidad a la oxidación. La combinación de estos compuestos más reactivos con las condiciones de elevada temperatura y disponibilidad de oxígeno habría favorecido el avance de las reacciones oxidativas. Estas condiciones podrían haber favorecido la formación y acumulación de hidroperóxidos, teniendo en cuenta que las reacciones de oxidación lipídica presentan un comportamiento autocatalítico, acelerándose a medida que aumenta la concentración de estos compuestos.

Finalmente, la TE de 110 °C permitió obtener microcápsulas con elevada retención de ASX ($\approx 70\%$), y el menor valor de IP entre todas las condiciones evaluadas, por lo que esta condición fue seleccionada como la más apropiada para el secado por aspersión del AL.

5.2.2. Caracterización de las microcápsulas de AL

En la Fig. 5.1 se presenta la apariencia macroscópica de los polvos de AL encapsulado obtenidos mediante secado por aspersión a una TE de 110 °C. Puede observarse que presentó un color anaranjado, sin apariencia aceitosa. Aunque a simple vista parecían aglomeradas, al tacto las partículas se separaban con facilidad, lo que sugiere una baja cohesión entre ellas. Este comportamiento da como resultado una textura fina y fluida, similar a la del talco.



Figura 5.1. Encapsulados de AL en polvo obtenidos mediante secado por aspersión de emulsiones bicapa.

La microestructura de los encapsulados se analizó mediante SEM, y las micrográficas se muestran en Fig. 5.2. En general, presentaron un rango amplio de tamaños de partícula (5-20 μm), con un mayor número de partículas de menor diámetro. Esta dispersión de tamaños es una característica típica de las partículas que se producen mediante secado por aspersión (Carneiro et al., 2013). La morfología de las partículas fue predominantemente esférica con algunas contracciones y con la presencia de cavidades superficiales. La formación de estas hendiduras o poros se ha relacionado con la rápida evaporación del agua y la contracción de membrana polimérica al inicio del secado (Francisco et al., 2022). Diversos autores han sugerido que la formación de estos poros podría estar asociada a fenómenos de cavitación durante el secado por aspersión (Both et al., 2020; Eijkelboom et al., 2023; Meng et al., 2014),

los cuales generarían una contracción no uniforme del material durante las etapas finales del proceso de secado (Klinkesorn et al., 2006; Li et al., 2019). Este tipo de fenómenos se vería particularmente favorecido en partículas de tamaño pequeño (entre 5-20 μm), ya que, en estas condiciones, la transferencia de calor y masa es más eficiente, lo que provoca una evaporación más rápida. Esta rápida eliminación del agua puede producir tensiones internas, favorecer la cavitación y dar lugar a la formación de huecos o poros en la superficie de las partículas. En consecuencia, las elevadas velocidades de secado asociadas a las gotas más pequeñas explicarían su mayor propensión a desarrollar estas morfologías porosas (Both et al., 2020).

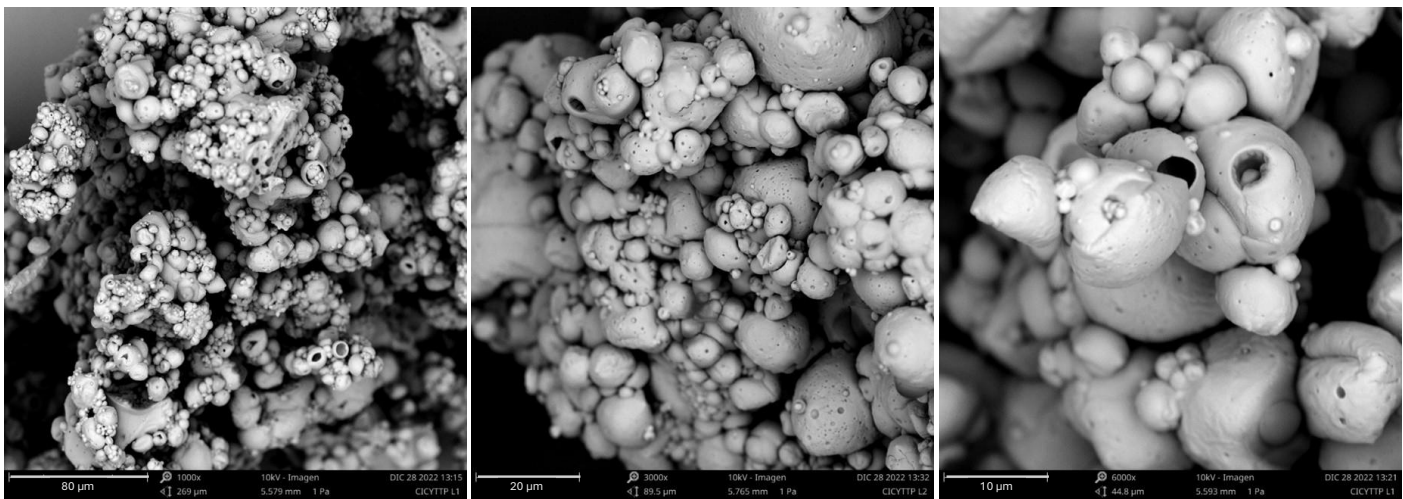


Figura 5.2. Micrografías obtenidas por SEM de las microcápsulas de AL en polvo secadas por aspersión (1000 x, 3000 x y 6000 x).

Si bien la microscopía electrónica de barrido permite caracterizar la morfología superficial de las partículas, y no proporciona evidencia directa sobre su estructura interna, es razonable inferir la formación de una estructura de encapsulación del tipo matricial, frecuente en sistemas obtenidos mediante secado por aspersión de emulsiones.

En la Tabla 5.2 se presentan los valores de eficiencia de encapsulación, humedad, a_w , solubilidad y dispersabilidad de las microcápsulas en polvo.

Tabla 5.2. Eficiencia de encapsulación (EE), Humedad (H), Actividad de agua (a_w), solubilidad (S) y dispersabilidad (D) de los encapsulados obtenidos mediante secado por aspersión.

EE (%)	H (%)	a_w	S (%)	D (%)
78.51 ± 10.81	2.03 ± 0.16	0.45 ± 0.02	60.45 ± 4.99	23.32 ± 2.84

Los datos se expresan como los promedios ± DE.

La EE es una variable que relaciona la capacidad de los materiales de pared para atrapar o retener el material a encapsular y se determinó para evaluar el grado de protección del aceite dentro de la microcápsula secada por aspersión. Los polvos mostraron valores de EE cercanos al 80 %, lo que evidenciaría una adecuada capacidad de retención del aceite por parte de la matriz encapsulante. Generalmente, valores elevados de EE (>80 %) se asocian con una mayor estabilidad oxidativa y una mejor protección del compuesto microencapsulado (Antonio-Gómez et al., 2021). Estos resultados confirmarían la capacidad del diseño de emulsiones multicapa SPC-CHT para mantener una estructura interfacial estable alrededor de las gotas de aceite y resistir las condiciones del proceso de secado por aspersión.

Por otro lado, el agua es uno de los principales componentes de los alimentos y un factor determinante para su conservación y seguridad. El contenido de humedad de productos en polvo es un parámetro crítico de la calidad, ya que influye directamente en su estabilidad durante el almacenamiento, y se considera que un contenido de humedad <4 % es adecuado para minimizar el riesgo frente al deterioro microbiano (da Silva Júnior et al., 2023; Zhang et al., 2022). Tal y como se observa en la Tabla 5.2, los encapsulados presentaron contenidos de humedad del 2 %, lo que se consideraría aceptable para productos en polvo de este tipo (Copado et al., 2021).

Por su parte, la a_w es un parámetro que mide la disponibilidad de agua libre en un alimento o material. Se expresa como un número entre 0 y 1, y se define como la relación entre la presión de vapor del agua en el alimento y la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura. Este parámetro tiene en cuenta no solo el contenido de agua sino también su interacción con los componentes de la matriz alimentaria en condiciones de equilibrio

termodinámico (Welti-Chanes et al., 2008). Su determinación es muy importante, ya que afecta la seguridad, estabilidad y calidad de los productos alimenticios (Beuchat & Rockland, 2017).

La mayoría de las reacciones químicas y el crecimiento microbiano se ven reducidos considerablemente cuando se disminuye a_w (<0.7). Sin embargo, la oxidación de lípidos insaturados presenta un comportamiento particular, ya que la velocidad de reacción aumenta a valores de a_w muy bajos (<0.2), debido a la actividad catalítica de iones metálicos cuando se remueve el agua de la esfera de hidratación que rodea a estos iones (St. Angelo, 1996).

En el caso de las microcápsulas en polvo, el valor de a_w fue de 0.45 (Tabla 5.2), lo que puede considerarse adecuado tanto para limitar el crecimiento microbiano y las reacciones enzimáticas ($a_w < 0.7$) como para contribuir al control de la oxidación lipídica, al mantenerse por encima del rango en el que estas reacciones tienden a acelerarse (Fioramonti et al., 2019).

La solubilidad y la dispersabilidad en agua son otros de los parámetros de calidad que se evalúan para productos en polvo, ya que reflejan su capacidad de reconstituirse de forma rápida y completa (Jafari et al., 2017; Syll et al., 2013). En general, se considera que los polvos tienen alta solubilidad cuando reportan valores mayores al 80 % (Campelo et al., 2018).

En la Tabla 5.2 se observa que los polvos presentaron una solubilidad del 60 %, indicando una capacidad de reconstitución moderada. Aunque la MDX fue el componente mayoritario de la matriz encapsulante y posee una elevada afinidad por el agua, la presencia de CHT podría haber afectado negativamente a la solubilidad del sistema, ya que en las condiciones en las que se llevaron a cabo los ensayos (al reconstituir las emulsiones con agua destilada tenían un pH 4.8), el CHT comienza a volverse menos soluble por la deprotonación progresiva de sus grupos amino (Ramanery et al., 2013).

Estos resultados son similares a los reportados por Marques et al. (2021) que obtuvieron encapsulados de aceite esencial de tomillo mediante secado por aspersión de emulsiones (10 % de aceite, 14 % de WPI, 14 % de MDX y 2 % de CHT) con 65 % de solubilidad. En este trabajo también observaron que la adición de CHT a la formulación producía una ligera disminución en la solubilidad de los polvos.

En cuanto a la dispersabilidad de las microcápsulas, se obtuvieron valores bajos (23 %) (Tabla 5.2). Este comportamiento podría estar relacionado, al menos en parte, con el reducido tamaño de las partículas observado en las micrografías (Fig. 5.2). Las partículas de menor tamaño presentan una elevada área superficial específica y mayores fuerzas cohesivas entre ellas, lo que puede dificultar la penetración del agua y retrasar su humectación durante la reconstitución. Además, estas características favorecen la formación de aglomerados y limitan su dispersión en el medio acuoso, afectando negativamente la dispersabilidad (Miranda-Linares et al., 2020; Syll et al., 2013). Por otra parte, el contenido de aceite superficial también podría contribuir a este comportamiento, al reducir la afinidad de las partículas por el agua y dificultar aún más su humectación.

El análisis FTIR se utilizó para identificar las bandas características de los componentes utilizados en la formulación y evaluar posibles interacciones entre el aceite encapsulado y los biopolímeros empleados como material de pared.

La Fig. 5.3 muestra los espectros FTIR de los diferentes componentes utilizados en el proceso de microencapsulación, y de las microcápsulas obtenidas. Las asignaciones de bandas se realizaron en base a la literatura y se presentan en la Tabla 5.3.

El espectro FTIR del AL presentó bandas típicas de aceites y fosfolípidos. Se observaron picos característicos a 3010 cm^{-1} , correspondientes al estiramiento de los dobles enlaces carbono-carbono cis, así como bandas a 2922 cm^{-1} y a 2852 cm^{-1} , asociadas a vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas de los grupos $-\text{CH}_2$ de cadenas de AG. El pico ubicado entre $1740\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ se atribuyó a los enlaces éster entre los AG y el glicerol, mientras que las bandas observadas alrededor de 1460 cm^{-1} podrían relacionarse con la presencia de AG libres. Asimismo, la banda a 1168 cm^{-1} se asoció al grupo de fosfato de fosfolípidos, abundantes en el AL. También se observaron picos 928 cm^{-1} y 720 cm^{-1} , correspondientes a hidrocarburos alifáticos y vibraciones oscilantes de $-\text{CH}_2$, respectivamente (Gulzar et al., 2022; Kim et al., 2023; Rajasekaran et al., 2022; Wang et al., 2024).

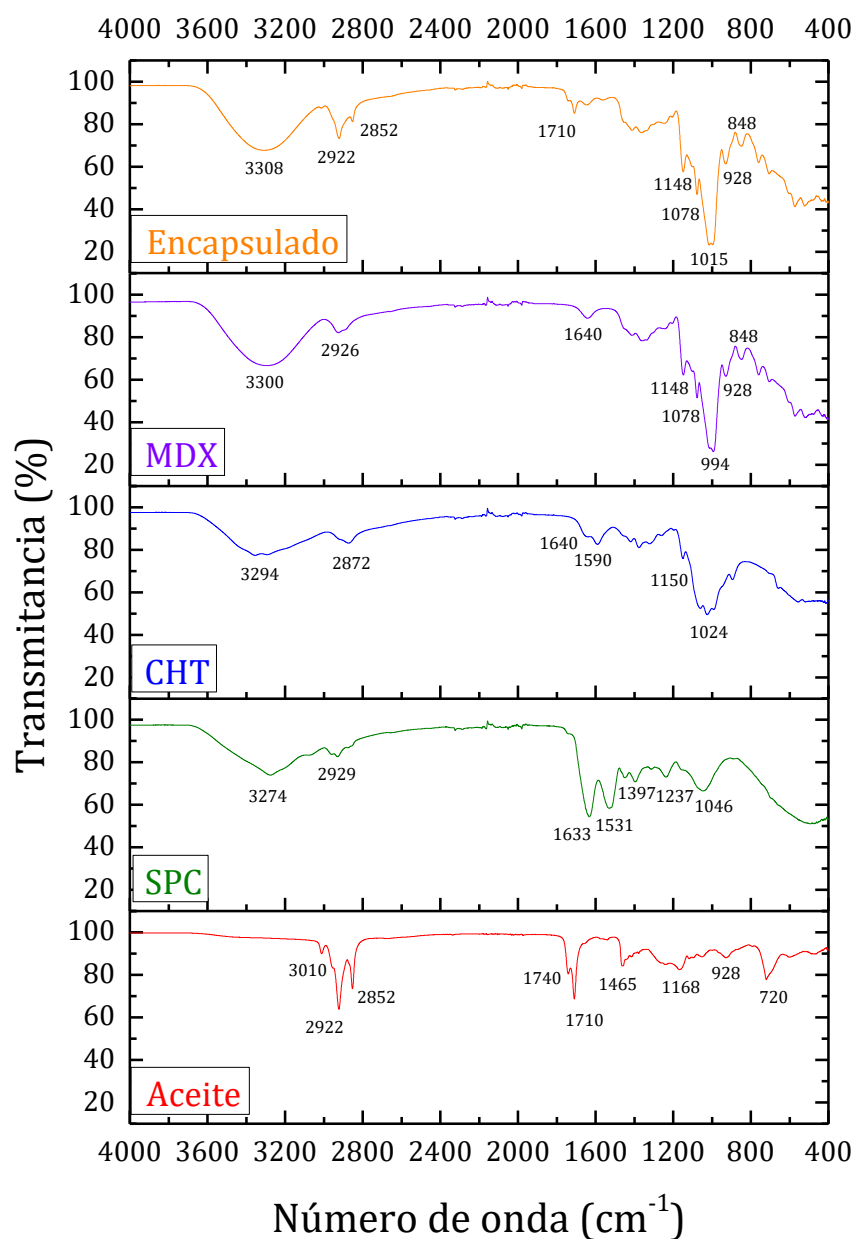


Figura 5.3. Espectros ATR-FTIR de los encapsulados de AL y de las materias primas utilizadas para su formulación.

El espectro correspondiente a SPC mostró las bandas características de las proteínas, principalmente regiones Amida I ($\approx 1633 \text{ cm}^{-1}$) y Amida II ($\approx 1531 \text{ cm}^{-1}$), asociadas al estiramiento C=O y a vibraciones de N-H , respectivamente. Debido al grado comercial del SPC, también se observaron señales atribuibles a lípidos y carbohidratos, tales como la banda ancha a 2929 cm^{-1} asociada a grupos metileno de AG, así como bandas a 1397 cm^{-1} , 1237 cm^{-1} y 1046 cm^{-1} , relacionadas con carbohidratos y enlaces éster. Además, se observó un pico amplio

alrededor de 3274 cm^{-1} atribuido a grupos hidroxilo y enlaces de hidrógeno (Gulzar et al., 2022; Kim et al., 2023).

El espectro FTIR del CHT presentó las bandas características reportadas para este polisacárido, incluyendo una banda de absorción alrededor de 3294 cm^{-1} (estiramiento de O-H), una señal a 2872 cm^{-1} (vibraciones de estiramiento del enlace C-H), otra banda a 1640 cm^{-1} (característica de amida I, atribuida a la vibración de estiramiento C=O de las unidades acetiladas -CONH₂), y un pico a 1590 cm^{-1} asociado a la amida III (deformación angular de -NH). Asimismo, los picos a 1150–1024 cm^{-1} se atribuyeron a enlace glucosídicos C-O-C (Huang et al., 2012; Noshad et al., 2015; Yuan et al., 2013).

Por su parte, el espectro FTIR de MDX presentó bandas características en la región de 1200-800 cm^{-1} , correspondiente a la huella digital de carbohidratos, incluyendo señales a 1148 cm^{-1} (estiramiento de C-O/flexión de C-O-H) y 1078/994 cm^{-1} (deformaciones angulares de enlaces CH y CH₂). También se muestra un pico amplio alrededor de 3300 cm^{-1} atribuido a grupos hidroxilo e interacciones por puente hidrógeno (Kim et al., 2023).

Para el espectro del encapsulado, se detectaron todos los picos principales para AL y MDX, principalmente. El espectro FTIR del encapsulado muestra bandas fuertes a 2922 y 2852 cm^{-1} , y también a 1710 cm^{-1} , lo que indicaría la presencia de aceite, además de las bandas correspondientes a los materiales de pared. La interacción entre los dos biopolímeros SPC/CHT cambió el FTIR en la región carbonil-amida. Los grupos -CONH₂ (banda a 1640 cm^{-1}), los grupos -NH₃⁺ (banda a 1590 cm^{-1}) y los grupos -COO⁻ (banda a 1633 cm^{-1}) y amidas (banda a 1531 cm^{-1}), desaparecieron, respectivamente, lo que podría estar relacionado con la interacción electrostática entre los grupos carboxilo y amino de SPC y CHT.

Tabla 5.3. Asignaciones de bandas FTIR para grupos funcionales encontrados en los espectros de las materias primas utilizadas para preparar los encapsulados.

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación de banda	Indicación	Fuente
3400-3200	$\nu(\text{O-H})$	Enlace de hidrógeno, interacción compuestos-agua, grupos hidroxilo (-OH)	SPC, CHT, MDX
3010	$\nu(\text{C-H})$ de <i>cis</i> -alqueno (-HC=CH-)	AGPI	AL
2929-2922	$\nu_{as}(\text{C-H})$ de grupos metileno (-CH ₂)	AG	AL, SPC, MDX
2872-2852	$\nu_s(\text{C-H})$ de grupos metileno (-CH ₂)	AG	AL, CHT
1740-1710	$\nu(\text{C=O})$ de grupos funcionales éster	Lípidos y AG	AL
1640-1633	$\nu(\text{C=O})$ / $\nu(\text{C-N})$		SPC, CHT, MDX
1590	Deformación angular $\delta(\text{N-H})$ de grupos -NH ₃ ⁺		CHT
1531	$\delta(\text{N-H})$, $\nu(\text{C-N})$	Enlaces peptídicos (CO-NH)	SPC
1465	$\delta_{as}(\text{C-H})$ en tijera de grupos metileno (-CH ₂)	AG libres	AL
1447	$\delta_{as}(\text{CH}_3)$ y $\delta_{as}(\text{CH}_2)$	Proteínas	SPC
1397	$\delta(\text{O-H})$, $\delta(\text{C-O-H})$, $\delta(\text{C-C-H})$	Carbohidratos	SPC
1237	$\nu(\text{C-O})$ de enlaces éster		SPC
1168	$\nu_{as}(\text{-PO}_4^{3-})$ de grupos fosfatos	Fosfolípidos	AL
1150-1148	$\nu(\text{C-O})$, $\delta(\text{C-O-H})$	Carbohidratos	CHT, MDX
1078	$\delta(\text{C-H})$ angulares de grupos CH y CH ₂		MDX
1046-1024	$\nu(\text{C-O})$		SPC, CHT
994	$\delta(\text{C-H})$ angulares de grupos CH y CH ₂		MDX
928	$\nu(\text{C-H})$		AL, MDX
720	$\delta(\text{C-H})$ oscilante de grupos metileno (-CH ₂)		AL

ν_{as} : estiramiento asimétrico, ν_s : estiramiento simétrico, δ_{as} : deformación asimétrica (curvatura), δ_s : deformación simétrica (curvatura). AGPI: ácidos grasos poliinsaturados

En general, perfil espectral de las microcápsulas fue similar al de los componentes individuales utilizados en la formulación. Se pudo corroborar la presencia de aceite encapsulado. Además, la ausencia de nuevas bandas características indicaría que el proceso de encapsulación no involucró la formación de nuevos enlaces covalentes entre el aceite y los biopolímeros, sino principalmente interacciones físicas e intermoleculares responsables de la estabilización de la matriz encapsulante.

5.2.3. Estabilidad de microcápsulas durante el almacenamiento

El deterioro oxidativo del AL puede provocar no sólo el desarrollo de sabores rancios, sino también la pérdida de compuestos bioactivos. Por este motivo, en cada etapa del proceso de encapsulación se evaluó la estabilidad oxidativa del aceite, mediante la determinación del IP, TBARS y contenido de ASX. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. IP, TBARS y retención de ASX en las distintas etapas del proceso de obtención de los encapsulados: aceite inicial, emulsiones, polvos obtenidos mediante secado por aspersión.

Muestra	IP (meq O ₂ /kg aceite)	TBARS (mmol MDA/kg aceite)	Retención de ASX (%)
Aceite	ND	0.10 ± 0.01 ^b	100.00 ± 0.38 ^c
Emulsión	0.67 ± 0.08 ^a	0.05 ± 0.01 ^a	80.25 ± 0.17 ^b
Encapsulado en polvo	4.99 ± 1.79 ^b	0.35 ± 0.04 ^c	69.93 ± 1.08 ^a

Los datos se expresan como los promedios ± DE. Las diferencias entre tratamientos se evaluaron mediante la prueba de Kruskal–Wallis ($p < 0.05$). ND = No detectable.

El AL no se encontraba oxidado al comienzo de los experimentos, dado que presentó un IP no detectable y bajos valores de TBAR. El proceso de emulsificación no afectó significativamente los parámetros de oxidación primaria y secundaria, ya que tanto el IP como TBARS se mantuvieron en valores bajos (< 1 meq O₂/kg aceite y < 1 mmol MDA/kg aceite, respectivamente). Sin embargo, durante esta etapa se observó una disminución de la concentración de ASX. Este comportamiento podría haber estado relacionado con los pasos de homogeneización empleados durante la preparación de las emulsiones. La energía mecánica aportada al sistema podría haber favorecido la incorporación de oxígeno y la generación de microgradientes de temperatura en el seno de las emulsiones, comprometiendo parcialmente la estabilidad de la ASX contenida en el aceite.

Por su parte, el proceso de secado tuvo un mayor impacto sobre la estabilidad oxidativa del aceite. Las microcápsulas en polvo presentaron un IP cercano a 5 meq/kg aceite que, si bien se mantuvo por debajo del límite sugerido por el *Codex Alimentarius* (Codex Alimentarius, 1981) para aceites prensados en frío (< 15 meq/kg aceite), constituye un valor relativamente elevado para el inicio del almacenamiento. No obstante, los valores de TBARS permanecieron

bajos (<1 mmol MDA/kg aceite) en todas las etapas analizadas, lo que indicaría que el aceite se encontraba principalmente en estadios tempranos del proceso de oxidación, con escasa formación de compuestos secundarios.

Además, el secado por aspersión afectó la estabilidad de ASX, ya que su concentración se vio reducida en un 30 % respecto de la concentración inicial determinada en el aceite. Aun así, los niveles remanentes de ASX podrían considerarse adecuados para contribuir al efecto antioxidante del ingrediente funcional en polvo.

Finalmente, se estudió la estabilidad del AL encapsulado en polvo durante el almacenamiento a distintas temperaturas ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 90 días.

La Fig. 5.4 muestra la evolución de los índices IP y TBARS de las microcápsulas en función del tiempo y la temperatura de almacenamiento. En ambos casos se observó un patrón característico de oxidación lipídica, con un aumento progresivo de los productos primarios de oxidación (IP) y posterior generación de los productos secundarios detectados mediante TBARS.

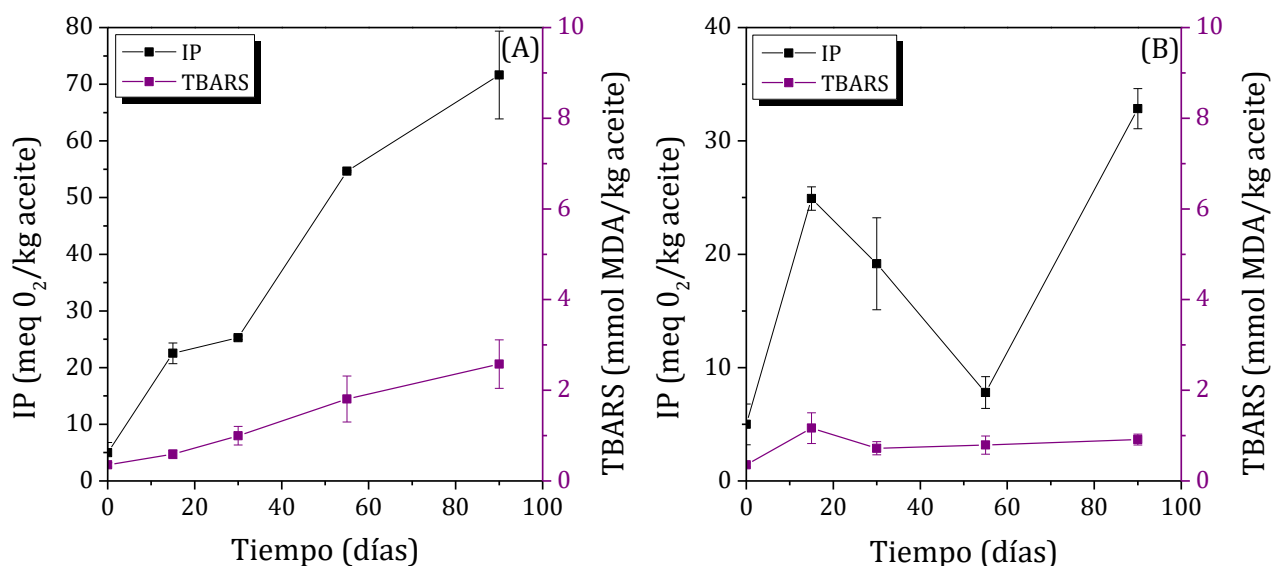


Figura 5.1. Estabilidad oxidativa de los microencapsulados de AL secados por aspersión y almacenados a (A) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y (B) $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En los sistemas almacenados a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 5.4 A), el IP fue aumentando gradual y continuamente durante todo el periodo de almacenamiento, alcanzando un máximo de 72

meq/kg aceite a los 90 días. Este comportamiento indicaría una acumulación progresiva de hidroperóxidos, asociada a una velocidad de formación superior a la de descomposición de estos compuestos (Musakhanian et al., 2022).

Por el contrario, las microcápsulas almacenadas a 25 °C (Fig. 5.4 B) presentaron un comportamiento diferente. A los 15 días se registraron valores de IP similares a los observados a 4 °C, mientras que a los 30 días los valores de IP ya se encontraban en la zona descendente de la curva y continuaron disminuyendo hasta los 45 días. Considerando que los hidroperóxidos son compuestos inestables y transitorios, es probable que el sistema ya se haya encontrado en la etapa de degradación de los peróxidos. Si esto fuera así, la concentración máxima de hidroperóxidos podría haberse alcanzado antes de cumplidos los 30 días de almacenamiento. En este sentido, los valores de IP relativamente menores observados a 25 °C no necesariamente indicarían una menor oxidación del sistema, sino una cinética oxidativa más acelerada, favorecida por la mayor temperatura de almacenamiento.

Además, a 25 °C se observó un segundo incremento del IP hacia el final del almacenamiento. Este comportamiento podría atribuirse al reinicio de nuevas etapas de peroxidación lipídica, producto de la oxidación progresiva de diferentes compuestos susceptibles presentes en el AL, tales como los AGPI y la ASX. Debido a las diferencias en susceptibilidad oxidativa, estabilidad química y localización dentro de la microcápsula, distintos componentes lipídicos podrían oxidarse a velocidades diferentes, generando múltiples etapas de formación y degradación de hidroperóxidos durante el almacenamiento.

Un comportamiento similar fue reportado por Liu et al. (2023) durante la fermentación y almacenamiento de salchichas, donde el PV aumentó inicialmente, luego disminuyó, y posteriormente volvió a incrementarse. Los autores atribuyeron este fenómeno a la elevada inestabilidad de los hidroperóxidos lipídicos, los cuales pueden descomponerse y oxidarse posteriormente a compuestos de menor peso molecular, como aldehídos y cetonas, afectando la evolución temporal del PV. Por su parte, Takeungwongtrakul et al. (2015) encapsularon aceite de camarón mediante secado por aspersión de emulsiones formuladas con distintos

tipos de biopolímeros (WPC, goma arábica, caseinato de sodio, jarabe de glucosa, maltodextrina) y también obtuvieron valores iniciales de IP elevados (≈ 9 meq O_2 /kg aceite) a la salida del secador. Cuando las microcápsulas de camarón se almacenaron a 30 °C, a las 2 semanas ya presentaban valores de IP alrededor de 32 meq O_2 /kg aceite, que siguió incrementándose hasta el final del almacenamiento.

Gulzar & Benjakul (2020) también observaron valores elevados de IP a la salida del secador por aspersión cuando obtuvieron encapsulados de aceite de camarón, cercanos a 25 meq O_2 /kg aceite, evidenciando la elevada sensibilidad de este tipo de aceites marinos conteniendo ASX al proceso de secado por aspersión.

La determinación de TBARS permitió complementar la interpretación de los valores de IP, ya que esta metodología detecta productos secundarios generados a partir de la descomposición de hidroperóxidos. De acuerdo con el mecanismo de autooxidación lipídica propuesto para lípidos poliinsaturados (Sampels & Sampels, 2013), la evolución temporal del IP debe interpretarse juntamente con los productos secundarios de oxidación, debido a que una disminución del IP no implica necesariamente una mejora en la estabilidad oxidativa del sistema. En la Fig. 5.4 puede observarse que los valores de TBARS aumentaron gradualmente durante el almacenamiento, confirmando la progresión de las reacciones oxidativas en ambos sistemas.

Finalmente, debe destacarse que en ambos sistemas el límite máximo sugerido para el IP en aceites destinados al consumo (15 meq O_2 /kg aceite) fue superado rápidamente, ya desde los primeros 15 días de almacenamiento. Esto evidenciaría que una fracción importante de la oxidación lipídica habría sido inducida durante la etapa de secado por aspersión. Por lo tanto, resulta fundamental minimizar la exposición al estrés térmico durante el procesamiento de las emulsiones, ya que una vez iniciadas las reacciones de autooxidación, la generación de radicales libres continuaría avanzando durante el almacenamiento, sin que las condiciones ensayadas lograran detener eficazmente el proceso oxidativo (Walker et al., 2015).

Por otro lado, también se evaluó la degradación de la ASX en los microencapsulados durante el almacenamiento a las mismas temperaturas (Fig. 5.5). El porcentaje inicial de retención de ASX fue cercano al 70 %, respecto al contenido presente en el aceite original previo a la encapsulación, tal y como se había observado en la Tabla 5.4.

Durante el almacenamiento, las microcápsulas conservadas a 4 °C presentaron una degradación significativamente más lenta de ASX que aquellas almacenadas a 25 °C. A 4 °C, la retención de ASX se mantuvo relativamente estable durante los primeros 60 días, conservándose aproximadamente el 63 % del contenido inicial. Recién a los 90 días se observó una disminución más marcada, alcanzando valores cercanos al 35 %. En contraste, los microencapsulados almacenados a 25 °C mostraron una rápida pérdida de ASX, ya que a los 15 días el porcentaje de retención había descendido aproximadamente al 20 %, continuando luego su disminución progresiva hasta alcanzar valores cercanos al 10 % al final del almacenamiento.

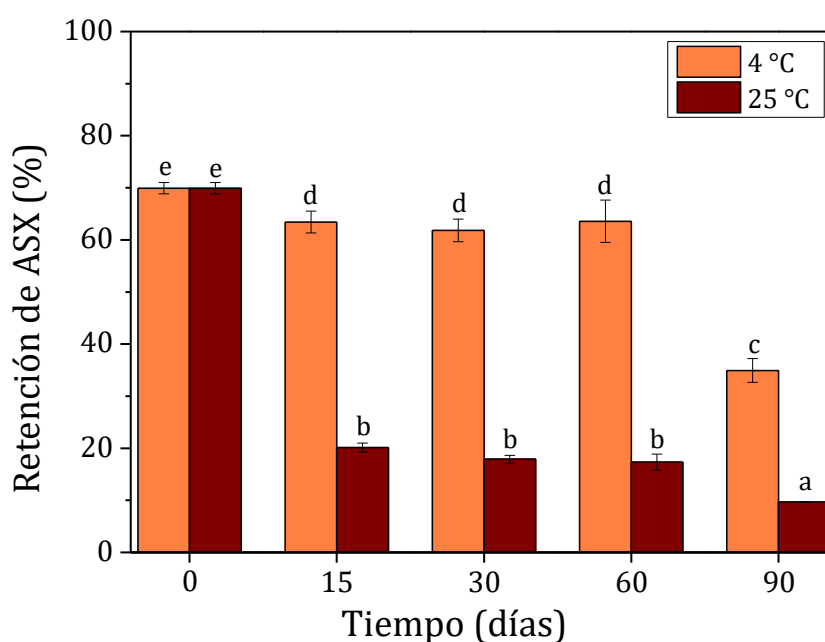


Figura 5.2. Porcentaje de retención de ASX en los microencapsulados secados por aspersión almacenados a 4 °C y 25 °C. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Este comportamiento confirmaría la marcada susceptibilidad de la ASX a los procesos oxidativos, especialmente a temperaturas elevadas. Debido a su estructura altamente

insaturada, la ASX puede actuar como agente antioxidante frente a especies radicalarias, pero simultáneamente resulta muy susceptible a su propia degradación oxidativa. En este sentido, la rápida disminución de ASX observada a 25 °C podría estar asociada con la mayor velocidad de oxidación lipídica detectada previamente mediante los análisis de IP y TBARS. De hecho, la degradación acelerada de ASX a esa temperatura coincidiría con la cinética oxidativa más intensa observada en las microcápsulas almacenadas a 25 °C, donde los hidroperóxidos se formaron y descompusieron más rápidamente (Fig. 5.4). Esto sugeriría que la ASX habría participado activamente en las reacciones oxidativas del sistema, consumiéndose progresivamente durante el almacenamiento como consecuencia del avance de la autooxidación lipídica.

5.3. Conclusiones parciales

En este capítulo fue posible obtener microcápsulas en polvo de AL mediante secado por aspersión de emulsiones multicapa SPC-CHT, logrando partículas con buena eficiencia de encapsulación, baja humedad y valores adecuados de a_w .

Sin embargo, el secado por aspersión favoreció el inicio de reacciones oxidativas que continuaron avanzando durante el almacenamiento, especialmente a 25 °C. La ASX mostró una elevada susceptibilidad a la degradación térmica y oxidativa, y su pérdida coincidió con una mayor velocidad de oxidación lipídica.

En este sentido, si bien el secado por aspersión permitió obtener microcápsulas físicamente estables, el estrés térmico del proceso comprometió la estabilidad oxidativa del AL. Por lo tanto, sería conveniente evaluar métodos alternativos de deshidratación menos agresivos, como la liofilización, con el fin de mejorar la conservación de ASX y minimizar la oxidación lipídica.

**6. CAPÍTULO 6: *Obtención y
caracterización de sistemas
bicomponentes de aceite de
langostinos y Bifidobacterium
animalis subsp. lactis INL1***

En este capítulo se llevó a cabo la deshidratación de las emulsiones doble capa de AL mediante liofilización, como alternativa al secado por aspersión, empleado en el capítulo anterior. Esta estrategia se planteó considerando que las altas temperaturas involucradas en el secado por aspersión podrían haber contribuido a los procesos oxidativos y a la degradación de ASX observados previamente en los encapsulados en obtenidos. Paralelamente se obtuvieron microcápsulas en polvo de bacterias potencialmente probióticas mediante secado por aspersión y, luego, ambos sistemas fueron combinados para producir sistemas bicomponentes en polvo.

Se evaluaron tanto las características fisicoquímicas de los sistemas, como la estabilidad durante el almacenamiento a distintas temperaturas, analizando los parámetros de oxidación del aceite y la viabilidad de las bacterias en el polvo.

6.1. Materiales y Métodos

6.1.1. Materiales

Se utilizaron los mismos materiales descriptos previamente (Sección 5.1.1.).

En particular, se empleó una cepa potencialmente probiótica *B. lactis* INL1, perteneciente al cepario del INLAIN, CONICET/UNL, que fue aislada de leche materna.

Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

6.1.2. Métodos

En esta sección se obtuvieron, por un lado, las microcápsulas de AL, por deshidratación de las emulsiones bicapa previamente estudiadas y, por otro lado, las microcápsulas conteniendo la cepa *B. lactis* INL1, también mediante deshidratación. Ambas fueron caracterizadas. A partir de ello, se preparó el sistema bicomponente, se caracterizó y se evaluó su estabilidad durante el almacenamiento a distintas temperaturas.

6.1.2.1. Obtención de microcápsulas con AL

Las emulsiones de AL más estables obtenidas en el Capítulo 4 (10 % de aceite, 1 % SPC, 0.3 % CHT, 25 % MDX y pH 4) se deshidrataron por liofilización (Loyeau et al., 2021). Para ello, fueron congeladas en un freezer a -80 °C durante 24 h y, posteriormente, liofilizadas en un equipo CHRIST (Alpha 1-4 LD Plus, Alemania) durante 22 h (Presión: 0.0010 mBar, Temperatura: -55 °C). No se incorporó azida sódica durante la preparación de las emulsiones.

Una vez obtenidos, los polvos fueron guardados en recipientes herméticos al resguardo de la luz y almacenados en refrigeración para su posterior caracterización.

6.1.2.2. Eficiencia de encapsulación

Se determinó según la metodología descrita en el Capítulo 5, Sección 5.1.2.2.1.

6.1.2.3. Obtención de microcápsulas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 en polvo

Se preparó una suspensión de bacterias según el procedimiento descrito por Senovieski et al. (2024), con algunas modificaciones. La cepa seleccionada para la encapsulación fue *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, aislada de leche materna y caracterizada por el INLAIN (Zacarías et al., 2011), debido a que previamente demostró potencial probiótico en estudios in vivo (Burns et al., 2017; Zacarías et al., 2014). La cepa se reactivó a partir de su stock congelado a -70 °C (MRS + glicerol 20 % v/v) y se realizaron dos repiques en caldo MRS a 37 °C durante 18 h en condiciones anaeróbicas. Los cultivos frescos se centrifugaron (6000 x g, 15 min), se lavaron dos veces con buffer fosfato salino (PBS) y se resuspendieron en una solución de MDX al 30 %, ajustando la concentración de bacterias a 10⁹ Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL. La suspensión se deshidrató mediante secado por aspersión (Yamato ADL311S, Japón), usando las siguientes condiciones: caudal de alimentación 4.5 mL/min, TE 170 ± 1 °C, TS 80 ± 1 °C, caudal de aire 0.15 m³/min y presión de atomización 0.15 MPa.

Una vez obtenidos, los polvos fueron guardados en recipientes herméticos al resguardo de la luz y almacenados en refrigeración para su posterior caracterización.

6.1.2.4. Viabilidad de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1

Se realizaron recuentos de bacterias antes y después del secado por aspersión para evaluar la supervivencia de la cepa al proceso de secado. El recuento celular se realizó mediante siembra en agar MRS e incubación a 37 °C durante 48 h en condiciones anaeróbicas (Anaero Pack-Anaero, Japón). Para realizar el recuento, las muestras en polvo se reconstituyeron, al volumen original de la suspensión (antes de secar), agregando agua de peptona estéril al 0.1 % p/v (Senovieski et al., 2024).

6.1.2.5. Obtención de sistemas bicomponentes

Para obtener los sistemas bicomponentes, se mezclaron en una relación 1:1 las microcápsulas obtenidas a partir de la liofilización de las emulsiones de AL (Sección 6.1.2.1), las cuales se molieron utilizando un molinillo a cuchillas modelo MCI (Dalvo, Argentina), y las microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión de la cepa *B. lactis* INL1 (Sección 6.1.2.3). Previamente a la mezcla, cada una de las fracciones fue tamizada por separado utilizando un tamiz de 1 mm, con el fin de eliminar posibles aglomerados y partículas de mayor tamaño. Posteriormente, ambos polvos fueron homogeneizados manualmente y la mezcla obtenida fue nuevamente pasada a través del mismo tamiz para favorecer una distribución uniforme de los componentes en el sistema en polvo. Este tipo de pretratamiento resulta habitual en mezclas de polvos, ya que la presencia de aglomerados y las diferencias de tamaño de partícula pueden afectar la homogeneidad y favorecer fenómenos de segregación (Alonso & Alguacil, 1999).

6.1.2.6. Caracterización de los sistemas bicomponentes

Los sistemas bicomponentes se caracterizaron utilizando los métodos descriptos en el Capítulo 5. Se les realizaron determinaciones de microscopía SEM (Sección 5.1.2.2.2),

a_w (Sección 5.1.2.2.3), humedad (Sección 5.1.2.2.4), y porcentaje de dispersabilidad (Sección 5.1.2.2.5) y solubilidad (Sección 5.1.2.2.6) en agua.

6.1.2.7. Estabilidad de los sistemas bicomponentes en el almacenamiento

Los sistemas bicomponentes en polvo se almacenaron a tres temperaturas (-18, 4 y 25 °C), durante 126 días. Para ello, una determinada cantidad de muestra se conservó en envases sellados herméticamente y al resguardo de la luz. Semanalmente se retiró un set de muestras para su análisis. La estabilidad de los sistemas bicomponentes se analizó mediante la determinación de (i) IP y TBARS, (ii) retención de ASX y (iii) viabilidad de *B. lactis* INL1. Para ello, se utilizaron las técnicas anteriormente descritas (Secciones 5.1.2.3 y 6.1.2.4).

6.1.2.8. Análisis estadístico de los datos

Los valores promedio y sus desviaciones estándar fueron calculados y presentados en tablas y gráficos como pares de coordenadas acompañadas por su correspondiente barra de error. Para determinar diferencias significativas entre las distintas condiciones de ensayos se aplicó el test de ANOVA usando la prueba de Tukey HSD con un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

6.2. Resultados y Discusión

6.2.1. Obtención de microcápsulas con AL mediante liofilización

Considerando la baja estabilidad oxidativa observada de los microencapsulados obtenidos mediante secado por aspersión en el capítulo anterior, se decidió modificar la metodología de deshidratación de las emulsiones y emplear liofilización como alternativa. Debido a las bajas temperaturas involucradas en este proceso, se esperaba favorecer la preservación de los compuestos termosensibles del AL y mejorar la estabilidad de las microcápsulas durante el almacenamiento.

La eficiencia de encapsulación (EE) del aceite en los polvos liofilizados fue de $64.01 \pm 2.72 \%$ ($n=3$), un valor inferior al obtenido para las microcápsulas producidas mediante secado por aspersión (78.51 ± 10.81) (Tabla 5.2). Esto podría atribuirse a las diferencias estructurales

generadas por ambos métodos de deshidratación. Durante el secado por aspersión, la rápida evaporación del agua favorece la formación de una matriz superficial relativamente compacta alrededor de las gotas de emulsión, promoviendo el atrapamiento del aceite dentro de la partícula. En cambio, la liofilización genera estructuras más porosas y de mayor superficie específica debido a la sublimación de los cristales de hielo, como consecuencia, la estructura resultante es más abierta y menos compacta, aumentando la accesibilidad del aceite al medio externo (Zhu et al., 2021).

Si bien se esperaban valores de EE más elevados, otros autores también han informado eficiencias de encapsulación similares para sistemas lipídicos obtenidos mediante liofilización. En general, se considera que una mayor EE contribuye a minimizar la oxidación lipídica, ya que reduce la cantidad de aceite superficial expuesto al oxígeno. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que la estabilidad oxidativa de los aceites microencapsulados no siempre se correlaciona directamente con el contenido de aceite libre o superficial presente en las partículas (Aberkane et al., 2013; Fioramonti et al., 2019; Tolve et al., 2017), por lo que resulta fundamental monitorear el estado oxidativo de los aceites encapsulados independientemente de la EE alcanzada.

Tabla 6.1. IP, TBARS y retención de ASX en las distintas etapas del proceso de obtención de los encapsulados: aceite inicial, emulsiones, polvos obtenidos por liofilización (n=4).

Muestra	IP (meq O ₂ /kg aceite)	TBARS (mmol MDA/kg aceite)	Retención de ASX (%)
Aceite	ND	0.16 ± 0.02 ^b	100.00 ± 2.41 ^b
Emulsión	0.95 ± 0.35 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	85.20 ± 0.91 ^a
Liofilizado	0.95 ± 0.26 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	83.98 ± 3.72 ^a

Los datos se expresan como los promedios ± DE. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (p<0.05). ND = No detectable.

En la Tabla 6.1 se puede observar que el proceso de liofilizado no tuvo un impacto significativo en la estabilidad oxidativa del aceite y en la concentración de ASX, ya que estos parámetros se mantuvieron prácticamente iguales a los de las emulsiones antes de liofilizar. En este sentido, se alcanzaron valores de IP iniciales menores a los que se habían obtenido en el

capítulo anterior con las microcápsulas secadas por aspersión (IP: 4.99 ± 1.79 meq O_2 /kg aceite, Tabla 5.2), y valores de retención de ASX ligeramente superiores (69.93 ± 1.08 %, Tabla 5.2).

6.2.2. Obtención y caracterización de sistemas bicomponentes de AL y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1

Una vez obtenidos los polvos liofilizados de AL, se prepararon los encapsulados de la cepa *B. lactis* INL1 mediante secado por aspersión, para posteriormente formular los sistemas bicomponentes. Si bien el secado por aspersión constituye una tecnología ampliamente utilizada para la conservación de microorganismos (Gullifa et al., 2023; Peralta et al., 2017), las elevadas temperaturas y fuerzas de corte involucradas pueden afectar la viabilidad celular (Iravani et al., 2015).

Por este motivo, se evaluó la supervivencia bacteriana luego del proceso de secado. El recuento inicial de la cepa suspendida en MDX fue de 9.27 ± 0.13 Log UFC/mL, mientras que los encapsulados obtenidos presentaron 9.37 ± 0.09 Log UFC/mL, sin diferencias significativas entre ambos valores. Estos resultados indicarían que el proceso de secado no afectó la viabilidad de *B. lactis* INL1, posiblemente debido al efecto protector ejercido por la matriz de MDX (Senovieski et al., 2024), así como a la capacidad de la cepa de tolerar las condiciones de estrés asociadas al secado por aspersión. Esta estabilidad frente al procesamiento constituye una característica tecnológica relevante para su potencial aplicación industrial.

A partir de estos resultados, se procedió a la formulación de los sistemas bicomponentes mezclando ambos polvos en una relación 1:1, tal y como se describió en la Sección 6.1.2.5.

6.2.2.1. Caracterización de los sistemas bicomponentes

En la Fig. 6.1 se muestra la apariencia macroscópica de la formulación de *B. lactis* INL1 obtenida mediante secado por aspersión, de los encapsulados de AL liofilizados, y de los sistemas bicomponentes obtenidos luego de la mezcla de ambos sistemas.

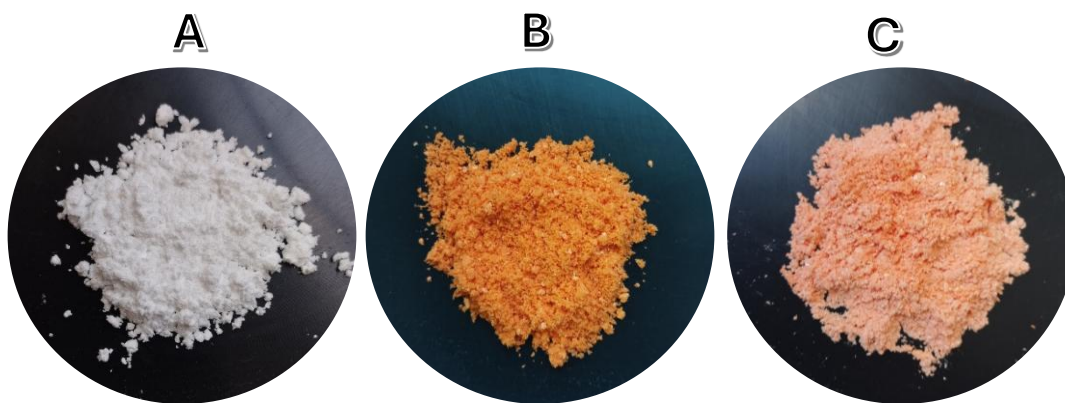


Figura 6.1. Apariencia visual de microcápsulas (A) de *B. lactis* INL1 secadas por aspersión, (B) de AL liofilizadas y (C) sistema bicomponente.

Tanto el liofilizado como el sistema bicomponente presentaron una coloración anaranjada, sin apariencia aceitosa, mientras que la formulación bacteriana con MDX exhibió un color blanquecino. Debido a la incorporación de este último polvo, la coloración del sistema bicomponente es menos intensa que la del liofilizado. Además, el tamizado aplicado durante el mezclado permitió obtener una apariencia más homogénea del sistema bicomponente.

La microestructura de los encapsulados se analizó mediante SEM, y en la Fig. 6.2 se muestran las micrografías del AL liofilizado, de la cepa secada por aspersión y de los sistemas bicomponentes. En general, se observaron morfologías claramente diferenciadas entre los sistemas obtenidos por liofilización y aquellos producidos mediante secado por aspersión, principalmente asociadas al mecanismo de deshidratación involucrado y a la composición de la formulación.

En la primera columna de la Fig. 6.2, se observa que las muestras liofilizadas presentaron estructuras altamente porosas, irregulares y con la presencia de poros hacia el interior de la matriz. Estas características son típicas de materiales obtenidos por liofilización y se atribuyen a la sublimación de los cristales de hielo formados durante la etapa de congelación, lo que origina matrices de elevada porosidad y baja densidad aparente. Estructuras similares han sido reportadas previamente para emulsiones liofilizadas (Eratte et al., 2015; Walendziak et al., 2025).

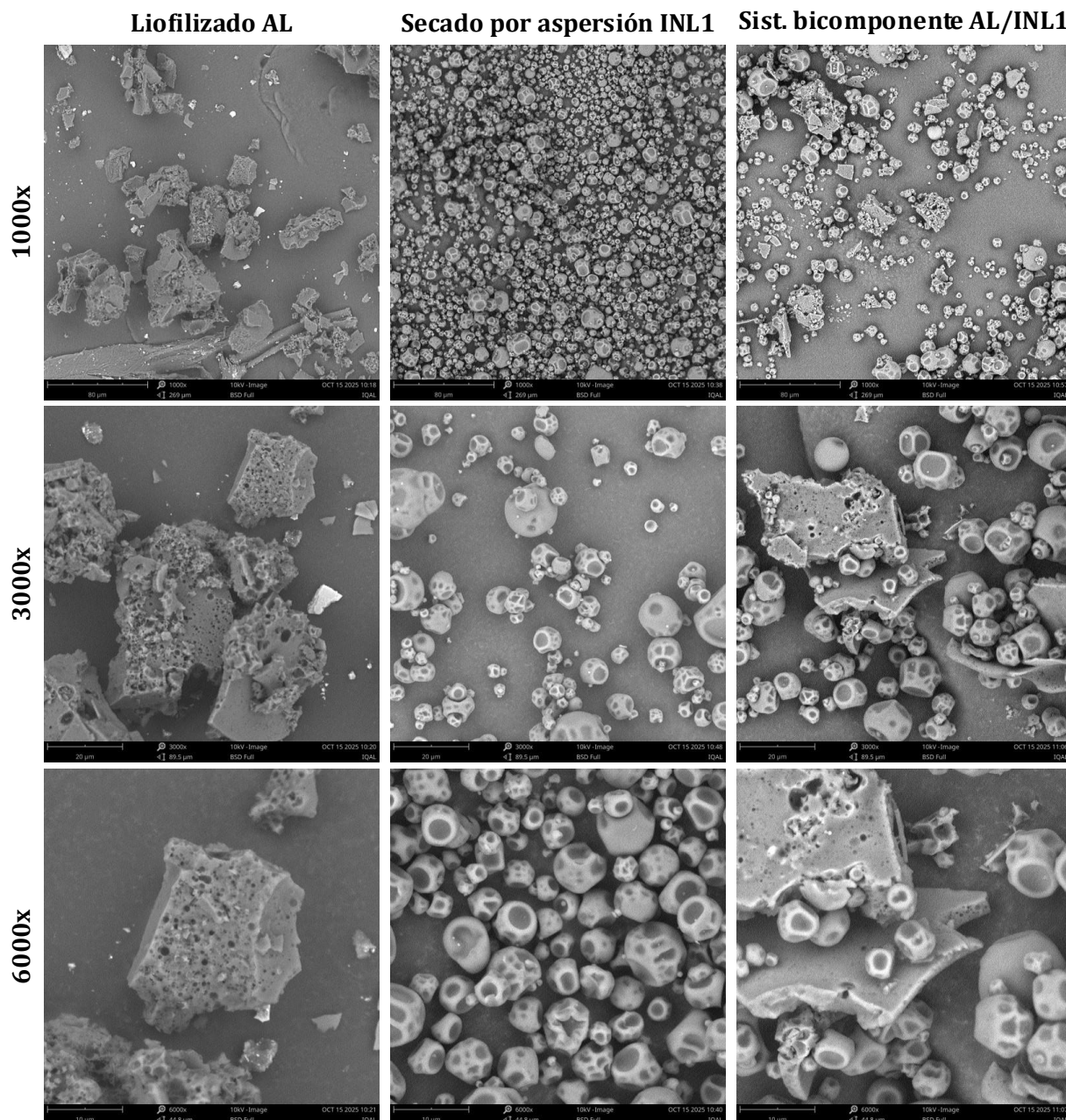


Figura 6.2. Micrografías de los encapsulados obtenidas por SEM en distintas magnificaciones. Liofilizado AL: Emulsiones de AL liofilizadas; Secado por aspersión INL1: polvos obtenidos mediante secado por aspersión de *B. lactis* INL1 con MDX; Sistema bicomponente AL/INL1: mezcla de los dos polvos anteriores en relación 1:1.

Por otro lado, la cepa secada por aspersión (segunda columna de la Fig. 6.2), presentó partículas predominantemente esféricas, con elevada polidispersidad de tamaños y diámetros mayormente inferiores a 10 µm, aunque también se observaron algunas partículas cercanas a 20 µm. Asimismo, las partículas exhibieron superficies rugosas con depresiones y

concavidades típicas de materiales obtenidos mediante secado por aspersión debido a la rápida evaporación del agua y posterior contracción de la matriz durante el secado (Evangelista et al., 2023; Jayaprakash et al., 2023; Slavutsky et al., 2017).

Finalmente, en las micrografías correspondientes a los sistemas bicomponentes se observaron simultáneamente ambas morfologías, evidenciando la presencia conjunta de las estructuras porosas provenientes del material liofilizado y de las partículas esféricas correspondientes al polvo bacteriano obtenido mediante secado por aspersión.

En la Tabla 6.2 se presentan los distintos parámetros fisicoquímicos determinados en los encapsulados obtenidos.

Tabla 6.2. Valores de humedad (H), actividad de agua (a_w), dispersabilidad (D) y solubilidad (S) de las microcápsulas de aceite de langostinos (AL) obtenidas por liofilización, de *B. lactis* INL1 secadas por aspersión y de los sistemas bicomponentes (n=3).

Muestra	H (%)	a_w	S (%)	D (%)
Liofilizado (AL)	ND	0.098 ± 0.004^a	69.86 ± 6.10^a	70.96 ± 0.13^a
Secado por aspersión (INL1)	2.70 ± 0.11^b	0.341 ± 0.005^c	82.45 ± 6.17^b	100.00 ± 0.40^c
Sist. bicomponentes (AL - INL1)	1.81 ± 0.27^a	0.268 ± 0.004^b	65.09 ± 3.24^a	87.19 ± 2.82^b

Los datos se expresan como los promedios $\pm$ DE. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$). ND = No detectable.

Todos los sistemas presentaron contenidos de humedad menores al 3 %, valores adecuados para productos en polvo de este tipo (Copado et al., 2021). En las emulsiones liofilizadas de AL, el contenido de humedad se encontró por debajo del límite de detección de la metodología gravimétrica empleada. Esto podría haber estado relacionado con la elevada eficiencia de eliminación de agua característica de la liofilización, junto con la formación de una estructura altamente porosa observada en las micrografías SEM (Fig. 6.2), la cual habría facilitado la sublimación y desorción de las moléculas de agua durante el secado. En alimentos liofilizados se han reportado contenidos de humedad residual inferiores al 1 % asociados a este tipo de estructuras porosas (Sui et al., 2025).

Por su parte, el sistema bicomponente presentó un contenido de humedad intermedio entre los sistemas individuales. La disminución observada respecto del polvo de INL1 obtenido

mediante secado por aspersión podría atribuirse al efecto de dilución generado por la incorporación del AL liofilizado, caracterizado por un contenido de agua residual extremadamente bajo, lo que redujo la humedad global del sistema.

Respecto de la actividad de agua de los polvos, también se obtuvieron valores bajos y se observó que el proceso de liofilización produjo una disminución significativa de este parámetro en las microcápsulas (Tabla 6.2). Los encapsulados de AL liofilizados presentaron los menores valores de a_w , probablemente debido a la elevada remoción de agua asociada a este proceso de deshidratación, mientras que el polvo de INL1secado por aspersión mostró valores significativamente mayores.

No obstante, debe destacarse que el AL liofilizado presentó valores de a_w inferiores a 0.2, rango en el cual podría verse favorecida la oxidación de lípidos insaturados (St. Angelo, 1996). Sin embargo, al incorporarse al sistema bicomponente junto con el polvo de INL1 obtenido mediante secado por aspersión, se observó un incremento significativo de a_w hasta valores intermedios (0.268). Este aumento podría contribuir a disminuir el riesgo de oxidación del aceite encapsulado, manteniendo al mismo tiempo valores adecuados para la estabilidad global del sistema durante el almacenamiento, minimizando el desarrollo microbiano y las reacciones enzimáticas ($a_w < 0.7$) (Fioramonti et al., 2019).

Respecto de la solubilidad y dispersabilidad de los polvos, en la Tabla 6.2 se observa que los encapsulados de *B. lactis* INL1 obtenidos mediante secado por aspersión fueron los más solubles, alcanzando valores $\approx 82\%$, y esto podría atribuirse al elevado contenido de MDX en la formulación, ya que este biopolímero posee una alta afinidad por el agua y favorece las propiedades de rehidratación de sistemas deshidratados (Ong et al., 2020). Asimismo, estos polvos también exhibieron los mayores valores de dispersibilidad ($\approx 100\%$), lo que indicaría una rápida incorporación y distribución de las partículas en el medio acuoso.

Por su parte, los liofilizados de AL, presentaron valores de solubilidad significativamente menores ($\approx 70\%$) esto puede deberse a los mismos motivos mencionados anteriormente en el Capítulo 5, y es que, aunque la MDX es el componente principal en los

encapsulados, la presencia de CHT podría haber contribuido a disminuir la solubilidad. La dispersabilidad de estos polvos también fue significativamente menor a la de los encapsulados de *B. lactis* INL1 secada por aspersión, efecto que también podría estar asociado a la presencia de CHT.

Sin embargo, en comparación con la dispersabilidad de los polvos de AL obtenidos mediante secado por aspersión del capítulo anterior (≈ 23 %, Tabla 5.2), los liofilizados mostraron una dispersabilidad considerablemente mayor (≈ 71 %), a pesar de presentar igual composición de aceite y biopolímeros. Esta diferencia evidenciaría la influencia de la tecnología de secado sobre las propiedades de rehidratación de los polvos. En particular, la estructura altamente porosa observada en las micrografías SEM de los liofilizados (Fig. 6.2) podría favorecer la penetración del agua dentro de la matriz y aumentar el área de contacto sólido-líquido, facilitando así la dispersión de las partículas. En contraste, los polvos obtenidos mediante secado por aspersión presentaron estructuras más compactas y colapsadas (Fig. 5.2), las cuales podrían dificultar la hidratación y dispersión del sistema (Chang et al., 2026).

En cuanto a los sistemas bicomponentes, presentaron valores de solubilidad similares a los observados en los liofilizados de AL, aunque exhibieron una dispersabilidad significativamente mayor. Este comportamiento podría atribuirse a la incorporación del polvo de *B. lactis* INL1 obtenido mediante secado por aspersión, cuya mayor capacidad de rehidratación y proporción relativa de MDX habrían favorecido la interacción de las partículas con el agua, mejorando la dispersabilidad del sistema bicomponente respecto de los liofilizados de AL.

6.2.3. Estabilidad de los sistemas bicomponentes durante el almacenamiento

Finalmente, se estudió la estabilidad de los sistemas bicomponentes en distintas condiciones de almacenamiento. Para ello, se almacenaron a distintas temperaturas (-18 , 4 y 25 °C) y se evaluó su estabilidad en el tiempo a través de la determinación de los índices IP y TBARS, la retención de ASX y la viabilidad de *B. lactis* INL1.

6.2.3.1. Estabilidad oxidativa

La Fig. 6.3 muestra la evolución de los valores de IP y TBARS en función del tiempo y de la temperatura de almacenamiento. En todos los sistemas se observó un incremento gradual del IP durante el almacenamiento, lo que evidenciaría la progresiva formación de hidroperóxidos como productos primarios de la oxidación lipídica.

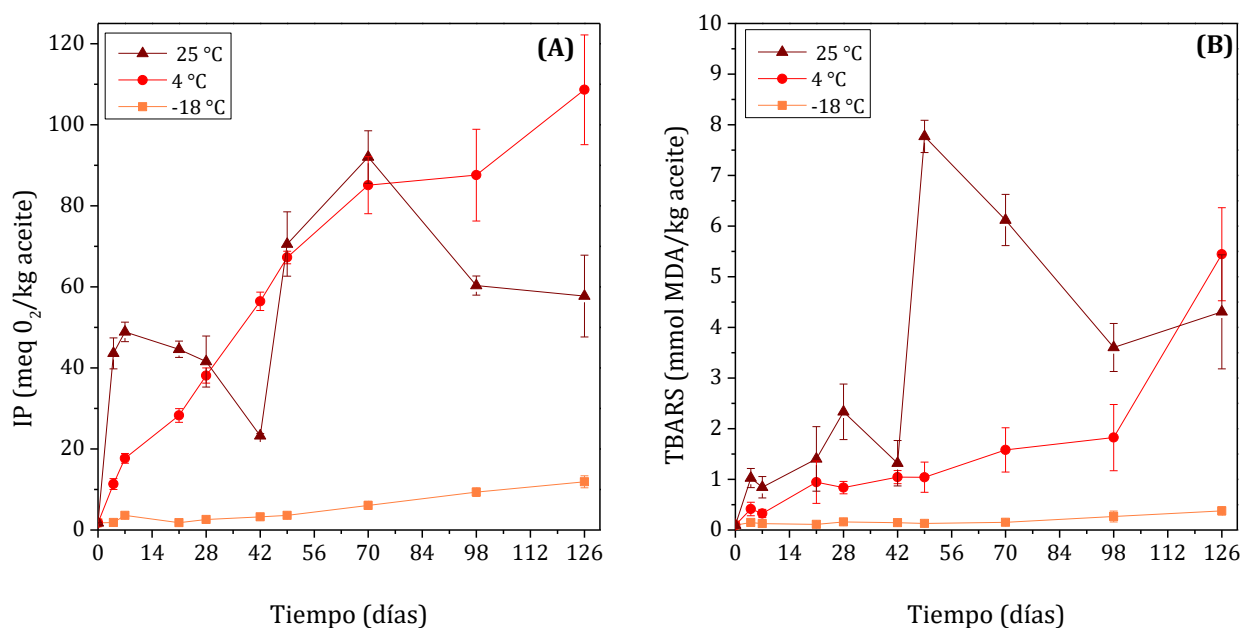


Figura 6.3. Evolución de (A) IP y (B) TBARS de sistemas bicomponentes de AL y *B. lactis* INL1 almacenados a -18 °C, 4 °C y 25 °C.

El sistema bicomponente conservado a -18 °C fue el más estable frente a la oxidación, alcanzando luego de 18 semanas un IP alrededor de 12 meq O₂/kg de aceite, valor que permaneció por debajo del umbral sugerido por el *Codex Alimentarius* (Fig. 6.3 A).

Por su parte, los sistemas bicomponentes conservados a 4 y 25 °C mostraron un avance más pronunciado de la oxidación respecto de aquellos almacenados a -18 °C. En ambos casos, los valores de IP superaron rápidamente el límite máximo sugerido por el Codex (15 meq O₂/kg aceite). Sin embargo, el deterioro oxidativo fue considerablemente más acelerado en los sistemas almacenados a 25 °C, que alcanzaron valores de IP cercanos a 50 meq O₂/kg aceite luego de la primera semana de almacenamiento, mientras que los conservados a 4 °C presentaron valores cercanos a 20 meq O₂/kg aceite.

En particular, los sistemas bicomponentes almacenados a 4 °C mostraron un incremento gradual de los valores de IP hasta alcanzar un máximo al final del almacenamiento (≈ 100 meq O₂/kg aceite). Esta tendencia fue similar a la observada en el capítulo anterior para los encapsulados de AL obtenidos mediante secado por aspersión (Fig. 5.4), los cuales alcanzaron valores cercanos a 80 meq O₂/kg aceite a los 90 días de almacenamiento.

Por otro lado, los sistemas bicomponentes almacenados a 25 °C se desestabilizaron más rápidamente. En estos sistemas el IP aumentó inicialmente, evidenciando la formación progresiva de hidroperóxidos, y transcurrida la primera semana de almacenamiento comenzó a disminuir hasta los 42 días, evidenciando una primera etapa de degradación de peróxidos. Posteriormente, se observó un segundo incremento del IP hasta alcanzar un nuevo máximo a los 70 días de almacenamiento, seguido nuevamente por una disminución gradual hacia el final del almacenamiento.

Se observa el mismo comportamiento que en los encapsulados de AL obtenidos mediante secado por aspersión y almacenados a 25 °C (Fig. 5.4). La evolución observada podría atribuirse principalmente a la oxidación de los AGPI presentes en el AL, cuyos peróxidos se forman y degradan continuamente durante el almacenamiento. A su vez, la degradación en paralelo de la ASX podría modificar el mecanismo de oxidación del sistema, contribuyendo a las variaciones registradas en los productos primarios de oxidación.

Cuando se evaluó el índice de TBARS (Fig. 6.3 B), los sistemas bicomponentes almacenados a -18 °C mantuvieron valores inferiores a 1 mmol MDA/kg aceite durante todo el período de almacenamiento, en concordancia con los bajos niveles de IP observados para estos sistemas. Por su parte, en los sistemas bicomponentes almacenados a 4 °C, la formación de compuestos secundarios de oxidación aumentó gradualmente con el tiempo.

En cambio, a 25 °C este incremento fue considerablemente más pronunciado, evidenciando una mayor velocidad de deterioro oxidativo. Posteriormente, luego de alcanzar un valor máximo, los valores de TBARS comenzaron a disminuir, probablemente debido a la degradación de los compuestos secundarios formados durante la oxidación lipídica. Estos

resultados corroboran que los sistemas bicomponentes almacenados a 25 °C se desestabilizaron más rápidamente que aquellos conservados a -18 y 4 °C.

En bibliografía no se encontraron estudios acerca de la estabilidad oxidativa de microencapsulados de AL obtenidos por liofilización. Sin embargo, distintos autores evaluaron la estabilidad oxidativa de microcápsulas aceite de camarón – otro aceite marino que contiene naturalmente ASX – obtenidas mediante secado por aspersión. Takeungwongtrakul et al. (2014) utilizaron diferentes materiales de pared (WPC, caseinato de sodio, goma arábica, jarabe de glucosa y maltodextrina) para formular microencapsulados de aceite de camarón mediante secado por aspersión, y reportaron valores iniciales de IP cercanos a 9 meq O₂/kg en los polvos. Durante el almacenamiento a 30 °C de estos polvos, los valores de IP aumentaron rápidamente hasta aproximadamente 50 meq O₂/kg aceite a las 4 semanas y 170 meq O₂/kg aceite a las 6 semanas, evidenciando la elevada susceptibilidad oxidativa de estos sistemas.

De manera similar, Gulzar et al. (2022) encapsularon aceite de camarón en mezclas 1:1 con aceite de semillas de té mediante secado por aspersión y reportaron valores de IP cercanos a 30 meq O₂/kg aceite luego de 6 semanas de almacenamiento a temperatura ambiente.

Estos antecedentes, junto con los resultados obtenidos en la presente tesis, evidencian la elevada susceptibilidad oxidativa de los aceites marinos ricos en AGPI y ASX. En los trabajos previamente reportados, el marcado incremento del IP fue asociado al secado por aspersión y al posterior almacenamiento de los polvos a temperaturas moderadas. Sin embargo, aun cuando la liofilización permitió obtener encapsulados con menores niveles iniciales de oxidación respecto del secado por aspersión, durante el almacenamiento los sistemas liofilizados también presentaron un importante deterioro oxidativo a 4 y 25 °C (Fig. 6.3).

Estos resultados sugieren que la inestabilidad oxidativa de este tipo de aceites no estaría asociada exclusivamente a las altas temperaturas de procesamiento, sino también a la elevada exposición al oxígeno durante el almacenamiento. La emulsificación previa al secado aumenta considerablemente el área superficial del aceite, mientras que la estructura altamente porosa generada por la liofilización favorece la penetración y difusión de oxígeno dentro de la

matriz. En consecuencia, aún en ausencia de tratamientos térmicos severos, pueden acelerarse las reacciones de oxidación de los AGPI presentes en el aceite.

6.2.3.2. Estabilidad de la ASX

Paralelamente a la estabilidad oxidativa, se evaluó la degradación de ASX en los sistemas bicomponentes durante el almacenamiento. Tal y como se muestra en la Fig. 6.4, tras 18 semanas (4.5 meses) de almacenamiento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, se conservó aproximadamente el 80 % del contenido inicial de ASX presente en el AL, lo que evidenciaría una elevada estabilidad del compuesto bajo estas condiciones. Sin embargo, al incrementarse la temperatura de almacenamiento, la degradación de ASX se aceleró significativamente. Al final del almacenamiento, los sistemas conservados a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ presentaron una retención cercana al 11 %, mientras que en aquellos almacenados a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ la ASX no pudo ser detectada luego de 6 semanas.

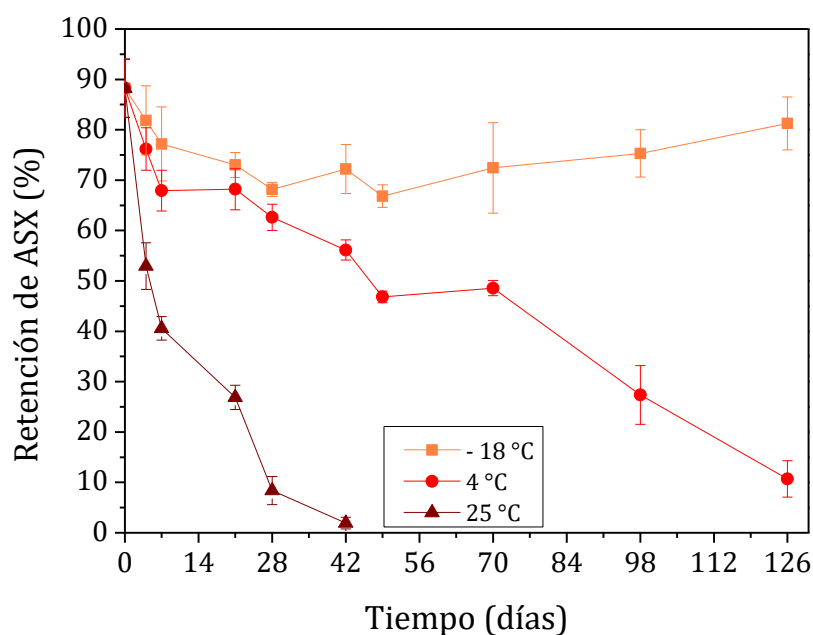


Figura 6.4. Evolución del porcentaje de retención de ASX en los sistemas bicomponentes almacenados a distintas temperaturas ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$), en relación con el contenido inicial de ASX en el aceite sin encapsular.

Estos resultados fueron consistentes con el comportamiento oxidativo discutido anteriormente, ya que a 25 °C se observó el mayor deterioro oxidativo de los sistemas bicomponentes (Fig. 6.3), lo que probablemente habría favorecido un consumo más rápido de la ASX debido a su acción antioxidante frente a las reacciones de autooxidación lipídica.

Además, en la Fig. 6.5 puede observarse el cambio de coloración de los sistemas bicomponentes, al final del almacenamiento a las distintas temperaturas, un fenómeno probablemente asociado a la degradación oxidativa de la ASX.

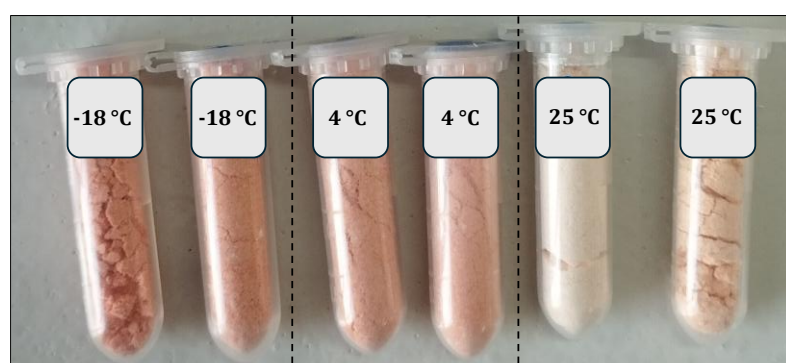


Figura 6.5. Muestras de sistemas bicomponentes (original y replica), luego de 18 semanas de almacenamiento a -18, 4 y 25 °C.

Estos resultados evidencian que la temperatura de almacenamiento constituye un factor crítico en la estabilidad oxidativa de los sistemas bicomponentes, dado que el incremento de la temperatura aceleraría las reacciones de autooxidación y la degradación de compuestos bioactivos sensibles como la ASX.

6.2.3.3. Estabilidad de la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1

Los recuentos de INL1 realizados en los sistemas bicomponentes durante el almacenamiento a las diferentes temperaturas se muestran en la Fig. 6.6 B. Asimismo, se evaluó como sistema control la viabilidad de encapsulados de INL1 en ausencia de aceite, con el fin de analizar la influencia del aceite encapsulado sobre la supervivencia bacteriana (Fig. 6.6 A).

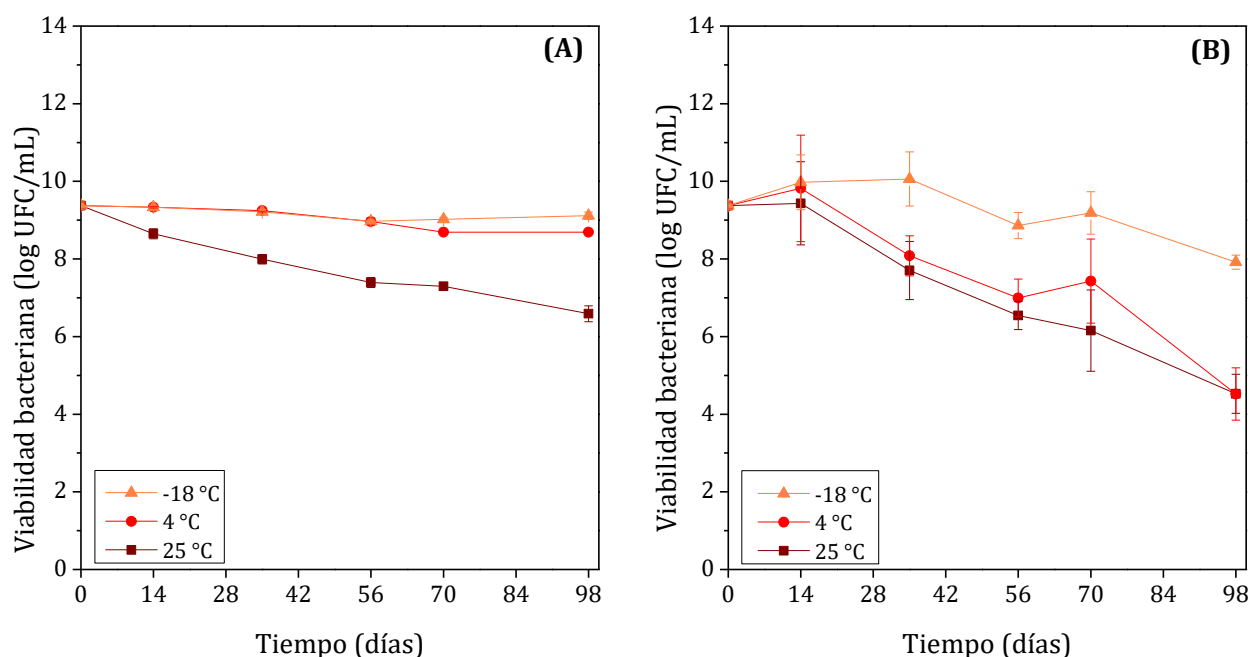


Figura 6.4. Recuentos para la cepa *B. lactis* INL1 (A) solo con MDX y (B) sistemas bicomponentes con AL, para los sistemas almacenados a -18, 4 y 25 °C.

En la Fig. 6.6 A puede observarse que los sistemas control almacenados a -18 y 4 °C mantuvieron niveles de viabilidad relativamente constantes durante todo el período de almacenamiento, con recuentos del orden de 9 log UFC/mL. No obstante, los sistemas conservados a 25 °C presentaron una disminución de aproximadamente 2 órdenes logarítmicos hacia el final del almacenamiento. Estos resultados son consistentes con lo reportado en la literatura para microorganismos probióticos encapsulados en polvo, donde la viabilidad bacteriana disminuye a medida que aumenta la temperatura de almacenamiento (Barbosa et al., 2015; Wang et al., 2004). Senovieski et al. (2024) trabajaron con encapsulados de INL1 obtenidos mediante secado por aspersión, y observaron una mayor pérdida de viabilidad en los sistemas almacenados a temperatura ambiente (22 °C) respecto de aquellos conservados a 5 °C, lo que evidenciaría que el almacenamiento refrigerado o congelado contribuye significativamente a preservar la viabilidad bacteriana en polvos probióticos deshidratados.

En los sistemas bicomponentes se observó una disminución de la viabilidad bacteriana durante el almacenamiento para las tres temperaturas evaluadas, evidenciando que la

incorporación del liofilizado de AL al sistema afectó la supervivencia de la bacteria, en comparación con los sistemas control (Fig. 6.6 B). Sin embargo, el efecto de la temperatura fue determinante sobre la magnitud de esta pérdida de viabilidad.

En este sentido, los sistemas bicomponentes almacenados a -18 °C mostraron la mayor estabilidad microbiológica, registrándose únicamente una disminución cercana a 1 orden logarítmico luego de 14 semanas de almacenamiento, alcanzando valores finales alrededor de 8 log UFC/mL. En contraste, los sistemas conservados a 4 y 25 °C presentaron una reducción mucho más pronunciada de la viabilidad bacteriana, del orden de 4 órdenes logarítmicos hacia el final del almacenamiento, alcanzando valores finales cercanos a 4.5 log UFC/mL.

La menor viabilidad bacteriana observada en los sistemas bicomponentes respecto de los sistemas control podría atribuirse, al menos parcialmente, a la presencia de aceite libre, ya que algunos compuestos presentes en ciertos aceites han sido asociados en la literatura con efectos antimicrobianos (Inguglia et al., 2020; Loyeau et al., 2021; Zhao et al., 2013). Asimismo, la presencia de CHT en la formulación, aunque en baja proporción, también podría haber contribuido a este efecto debido a la reconocida actividad antimicrobiana de este polisacárido (Kong et al., 2010; Vilar Junior et al., 2016).

Adicionalmente, la marcada disminución de viabilidad observada a 4 y 25 °C podría estar relacionada con el elevado deterioro oxidativo registrado en estos sistemas durante el almacenamiento, tal como se discutió previamente para los valores de IP y TBARS (Fig. 6.3). En particular, la acumulación de hidroperóxidos y otros compuestos secundarios de oxidación podría haber generado un ambiente desfavorable para la supervivencia bacteriana (Hansen et al., 2015). Esto resultaría consistente con la mayor estabilidad observada en los sistemas bicomponentes almacenados a -18 °C, donde el avance de la oxidación fue considerablemente menor y los valores de IP permanecieron dentro del límite sugerido por el Codex durante todo el almacenamiento.

6.3. Conclusiones parciales

En este capítulo fue posible obtener sistemas bicomponentes de AL y *B. lactis* INL1 mediante la combinación de emulsiones liofilizadas de AL y encapsulados de la cepa obtenidos mediante secado por aspersión.

La liofilización de las emulsiones de AL permitió disminuir el deterioro oxidativo inicial respecto de los encapsulados obtenidos mediante secado por aspersión en el capítulo anterior, evidenciado por menores valores de IP y una mayor retención inicial de ASX. Sin embargo, la estructura altamente porosa de los liofilizados no logró evitar el avance de la oxidación lipídica durante el almacenamiento a 4 y 25 °C, donde se observó un marcado incremento de los valores de IP y TBARS, acompañado por una elevada degradación de ASX.

En contraste, el almacenamiento a -18 °C permitió alcanzar una mayor estabilidad oxidativa de los sistemas bicomponentes, manteniendo los valores de IP por debajo del límite sugerido por el *Codex Alimentarius* durante las 18 semanas de almacenamiento y reteniendo aproximadamente el 80 % del contenido inicial de ASX.

Asimismo, la presencia de AL en los sistemas bicomponentes afectó la viabilidad de *B. lactis* INL1 durante el almacenamiento, especialmente a 4 y 25 °C. No obstante, a -18 °C fue posible preservar la cepa con recuentos cercanos a 8 log UFC/mL al final del almacenamiento.

7. CAPÍTULO 7: *Análisis de las propiedades bioactivas del sistema bicomponente*

En este Capítulo se evaluaron las propiedades bioactivas del ingrediente funcional en polvo mediante ensayos de digestión gastrointestinal simulada *in vitro* y mediante el análisis *in vitro* de la actividad citotóxica y antiproliferativa de los digestos frente a líneas celulares tumorales de cáncer colorrectal (HT-29 y Caco-2) y de cáncer de hígado (HepG2), este último considerado el primer sitio metastásico de cáncer colorrectal.

7.1. Materiales y Métodos

7.1.1. Digestión gastrointestinal *in vitro*

Para evaluar la estabilidad de los sistemas y la liberación de aceite durante el tracto gastrointestinal, se empleó un modelo *in vitro* ampliamente aceptado que simula la digestión gástrica e intestinal secuencial, con algunas modificaciones (Brodkorb et al., 2019; Visentini et al., 2020). Estos ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Fase gástrica: Los sistemas en polvo se reconstituyeron agregando la cantidad de agua eliminada en el paso de deshidratación, y se combinaron con un volumen igual de fluido gástrico simulado 1X (FGS 1X). Para ello, se hidrataron 0.7 g de polvo con agua desionizada hasta alcanzar un volumen final de 2 mL y luego se mezclaron con 2 mL de FGS 1X. La solución de FGS 1.25X contenía 6.9 mM de KCl, 0.9 mM de KH_2PO_4 , 25 mM de NaHCO_3 , 47.2 mM de NaCl, 0.1 mM de MgCl_2 y 0.5 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Posteriormente, se añadió CaCl_2 0.3 M para alcanzar una concentración final de CaCl_2 de 0.075 mM. El pH se ajustó a 3 con HCl, seguido de la adición de solución de pepsina (8 UI/mg de sustrato) y el volumen de agua necesario para obtener el FGS 1X. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 2 h con agitación orbital a 60 rpm (Rotator Multi Bio RS-24, BOECO). Posteriormente, los tubos pasaron a la siguiente fase.

Fase intestinal: Tras la fase gástrica, se añadió un volumen equivalente (4 mL) de fluido intestinal simulado 1X (FIS 1X) al tubo de reacción gástrica. La solución FIS 1.25X contenía 6.8 mM de KCl, 0.8 mM de KH_2PO_4 , 85 mM de NaHCO_3 , 38.4 mM de NaCl y 0.33 mM de MgCl_2 . Posteriormente, se añadió CaCl_2 hasta alcanzar una concentración final de 0.3 mM y se introdujo una solución de sales biliares (0.8 μmol /mg de sustrato). El pH se ajustó a 7. A

continuación, se añadió la solución de pancreatina, previamente disuelta en FIS 1.25X (0.8 UI/mg de sustrato, según la actividad de la tripsina), con el volumen de agua necesario para obtener FIS 1X. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 2 h con agitación orbital a 60 rpm (Rotator Multi Bio RS-24, BOECO). Una vez finalizada la reacción intestinal, las muestras se guardaron a -80 °C hasta su análisis.

7.1.1.1. Estabilidad y bioaccesibilidad de AL

Tras el proceso de digestión *in vitro*, se evaluó la estabilidad y la bioaccesibilidad del AL según métodos descritos previamente en la literatura (Finos et al., 2024). Al finalizar la digestión intestinal, la mitad de las muestras se centrifugaron a 10000 x *g* y 25 °C durante 30 min para eliminar la materia sólida insoluble y se consideró que los sobrenadantes (fase micelar) contenían el aceite liberado del sistema. Solo el aceite liberado se considera disponible para la absorción y, por lo tanto, representa la fracción bioaccesible. Posteriormente, se procedió a extraer, con hexano, el aceite presente tanto en el digesto total como en la fase micelar, siguiendo la metodología descrita por Timilsena et al. (2017). Para ello se mezcló la muestra con hexano, en una relación 1:5, y la fase orgánica se separó por centrifugación (15 min, 3000 x *g*). Finalmente, se midió la absorbancia de la fase orgánica a 465 nm (longitud de onda correspondiente al $\lambda_{\max}$ del AL). La concentración de aceite se determinó a partir de una curva de calibrado preparada con cantidades conocidas de AL disueltas en hexano.

La estabilidad del aceite (E^*) se definió como la fracción que permaneció sin transformarse en el intestino después del proceso de digestión *in vitro*:

$$E^* (\%) = \frac{C_{\text{Digesto}}}{C_{\text{Inicial}}} \times 100 \quad \text{Ec. 7.1}$$

donde C_{Digesto} y C_{Inicial} son las concentraciones de aceite en el digesto total recogido después de la etapa intestinal y en la muestra inicial, respectivamente.

Por otro lado, la bioaccesibilidad (B^*) se definió como la fracción de aceite liberada del sistema en polvo y solubilizada en la fase micelar tras la digestión *in vitro*:

$$B^* (\%) = \frac{C_{Micelar}}{C_{Digesto}} \times 100 \quad \text{Ec. 7.2}$$

donde $C_{Micelar}$ es la concentración del aceite en la fase micelar.

Finalmente, se calculó la bioaccesibilidad efectiva (EB), definida como la fracción de aceite ingerido presente en la fase micelar:

$$EB = E^* \times B^* = \frac{C_{Micelar}}{C_{Inicial}} \times 100 \quad \text{Ec. 7.3}$$

7.1.1.2. Retención de ASX

A partir de las mismas extracciones con hexano llevadas a cabo en el punto anterior, también se evaluó la concentración de ASX luego de la digestión simulada *in vitro* mediante la metodología descrita anteriormente en el Capítulo 5, Sección 5.1.2.3.2.

7.1.1.3. Viabilidad de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* INL1

La viabilidad de las bacterias potencialmente probióticas se evaluó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en el Capítulo 6, Sección 6.1.2.4. Los recuentos se realizaron antes e inmediatamente después del proceso de digestión gastrointestinal simulado.

7.1.2. Estudio de citotoxicidad de los sistemas bicomponentes sobre líneas celulares tumorales

Se realizaron estudios *in vitro* de evaluación de citotoxicidad de los sistemas bicomponentes digeridos en la sección anterior, aplicados sobre tres líneas celulares tumorales (hígado y cáncer colorrectal) y una línea celular normal.

La línea celular HT-29 es un modelo humano de adenocarcinoma colorrectal con morfología epitelial adherente, utilizado en investigación del cáncer de colon, transporte intestinal y respuesta a quimioterapéuticos debido a sus características similares a células intestinales maduras. La línea celular de cáncer colorrectal denominada Caco-2 corresponde a células humanas de adenocarcinoma colorrectal que se diferencian espontáneamente en células similares a enterocitos, por lo que se utilizan ampliamente como modelo *in vitro* de barrera epitelial intestinal y permeabilidad de fármacos. La línea HepG2 son células humanas

de carcinoma hepatocelular de origen hepático, comúnmente empleadas para estudiar metabolismo hepático, toxicidad de xenobióticos y mecanismos de daño hepatocelular *in vitro*. La línea celular Vero proviene de células epiteliales renales de mono verde africano (*Chlorocebus sabaeus*) y es ampliamente empleada en evaluación de fármacos. Estas líneas fueron provistas por la ATCC (*American Type Culture Collection*, EE. UU.).

Las líneas celulares se cultivaron en el medio de cultivo completo conformado por DMEM-F12 (Gibco™, EE. UU.) y suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, EE. UU.) a 37 °C en atmósfera con 5 % de CO₂ en incubadora (Binder, Alemania), durante el periodo detallado en cada prueba (48 h).

7.1.2.1. Evaluación de viabilidad celular de líneas tumorales y normales

La viabilidad celular para la determinación de la actividad citotóxica de los diferentes compuestos sobre el cultivo de células HT-29, HepG2, Caco-2 y Vero se evaluó mediante el ensayo MTT (Bernas & Dobrucki, 2002; Mosmann, 1983). Los extractos se diluyeron en medio de cultivo completo, por triplicado, y se ajustaron según la concentración de AL en el rango de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L, de acuerdo con Kim et al. (2022). Se utilizaron como controles positivos de viabilidad medio de cultivo completo y PBS 1X (pH 7), y como control negativo se usó peróxido de hidrogeno al 5 % (Cicarelli, Argentina).

Se evaluaron los siguientes extractos: (i) AL diluido en etanol 0.1 %, (ii) AL microencapsulado, (iii) materiales de pared (SPC, CHT, MDX), (iv) digesto de materiales de pared (SPC, CHT, MDX), (v) cepa *B. lactis* INL1 microencapsulada, (vi) digesto de *B. lactis* INL1 microencapsulada, (vii) sistema bicomponente de AL+INL1, (viii) digesto de sistema bicomponente de AL+INL1, (ix) medio de digestión gastrointestinal *in vitro* conteniendo sólo sales y enzimas, y (x) etanol 0.1 %. Para los extractos que no contenían aceite – como los de la cepa *B. lactis* INL1 o de los materiales de pared – las concentraciones se ajustaron para igualar los niveles que estos componentes presentaban en los sistemas bicomponentes con aceite.

Las células inicialmente cultivadas en frascos T25 (Jet Biofil, China), fueron tratadas con tripsina-EDTA (Gibco™, EE. UU.) durante 5 min a 37 °C para proceder al disgregado de la

monocapa celular. Luego, las células se sembraron en placas de 96 pocillos (5×10^3 células/pocillo) y se incubaron durante 24 h a 37°C y 5 % CO_2 . Se adicionaron los distintos sistemas en estudio (digestos y controles) y se incubaron durante 48 h en iguales condiciones. Se descartó el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS 1X (pH 7) y se incubó durante 4 h en medio de cultivo con 0.5 mg/L de MTT (3-(4,5 dimethylthiazol 2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide, Invitrogen, EE. UU.). Los cristales de formazán formados mediante la reducción del colorante (MTT) por las células viables de cada pocillo se disolvieron en 100 μL de dimetilsulfóxido (Mp Biomedicals, EE. UU.) y se midió la absorbancia a 540 nm y 690 nm (como fondo) en el espectrofotómetro SPECTROstar Nano (BGM LABTECH, Alemania).

La viabilidad celular (%) se determinó de acuerdo con:

$$Viabilidad (\%) = \frac{ABS_{muestra}}{ABS_{medio}} \times 100 \quad \text{Ec. 7.4}$$

donde la $ABS_{muestra}$ corresponde a la absorbancia de la muestra en estudio y ABS_{medio} a la absorbancia de las células en el medio de cultivo.

Con los resultados obtenidos se construyó la curva de viabilidad celular (%) en función de la concentración del sistema de estudio. A partir de la curva construida de absorbancia en función de la concentración, se determinó para los digestos la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), definida como la concentración necesaria para reducir la población celular al 50 %.

A partir de los resultados de IC_{50} se calculó el índice de selectividad (IS) con respecto a las células normales mediante la siguiente ecuación:

$$(IS) = IC_{50} \text{ línea celular normal} / IC_{50} \text{ línea celular tumoral} \quad \text{Ec. 7.5}$$

7.1.3. Análisis estadístico de los datos

Los valores promedios y sus desviaciones estándar fueron calculados y presentados en tablas y gráficos como pares de coordenadas acompañadas por su correspondiente barra de error. Para determinar diferencias significativas entre las distintas condiciones de ensayos se aplicó el test de ANOVA usando la prueba de Tukey HSD con un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

7.2. Resultados y Discusión

7.2.1. Digestión gastrointestinal *in vitro*

Para analizar la digestibilidad de los sistemas y la liberación de los compuestos bioactivos, se utilizó un modelo *in vitro*, que reproduce de manera secuencial las etapas gástrica e intestinal de la digestión.

Durante este proceso, el aceite liberado desde las microcápsulas queda expuesto a reacciones lipolíticas catalizadas principalmente por las lipasas intestinales, mientras que los materiales de pared pueden sufrir transformaciones proteolíticas y/o estructurales. La extensión y velocidad de estos fenómenos dependen en gran medida de las características fisicoquímicas del sistema, incluyendo la composición de la matriz encapsulante, la estructura de las partículas y la naturaleza de la interface aceite-material de pared. En sistemas encapsulados mediante proteínas y polisacáridos, estas características pueden modificar la accesibilidad de las enzimas digestivas al sustrato lipídico y, en consecuencia, influir sobre la liberación y biodisponibilidad de los compuestos bioactivos (Timilsena et al., 2017).

7.2.1.1. Estabilidad y bioaccesibilidad de AL y ASX

Tras el proceso de digestión *in vitro* de los sistemas bicomponentes, se evaluó la estabilidad y bioaccesibilidad del AL, midiendo la cantidad total de aceite remanente en las fases total y micelar (Finos et al., 2024). Estos resultados se utilizaron para calcular la estabilidad (E^*), la bioaccesibilidad (B^*) y la bioaccesibilidad efectiva (EB) del aceite (Tabla 7.1).

Tabla 7.1. Parámetros de E^* , B^* y EB de AL y ASX después de la digestión gastrointestinal *in vitro* (n=3).

Muestra	E^* (%)	B^* (%)	EB (%)
AL	42.92 ± 1.65	12.26 ± 1.78	5.28 ± 0.93
ASX	34.18 ± 1.73	13.63 ± 2.14	4.68 ± 0.92

Los datos se expresan como los promedios $\pm$ DE.

Después de la digestión *in vitro*, la fracción de AL que permaneció en un estado no transformado (E^*) fue 42.92 ± 1.65 %. Este comportamiento podría estar asociado a los cambios estructurales que experimentan las microcápsulas durante las etapas gástrica e intestinal. En condiciones gástricas, el medio ácido favorecería la protonación tanto del CHT como de las proteínas de soja, aumentando su solubilidad y modificando las interacciones electrostáticas presentes en la matriz encapsulante. Además, la acción proteolítica de la pepsina sobre las proteínas interfaciales podría promover una desestructuración parcial de las cápsulas y facilitar la liberación del aceite al medio digestivo.

Posteriormente, durante la etapa intestinal, el aumento del pH podría inducir la desprotonación y pérdida de solubilidad del CHT, favoreciendo la formación de agregados o estructuras menos permeables. Este comportamiento podría limitar parcialmente el acceso de las lipasas pancreáticas a las gotas lipídicas, retardando la hidrólisis de los triacilglicéridos. Diversos estudios han demostrado que recubrimientos basados en CHT pueden disminuir la velocidad de digestión lipídica debido a efectos de barrera física, agregación de partículas o interferencias en la interacción entre las lipasas y la interfase aceite-agua (Hu et al., 2009; Klinkesorn & McClements, 2009).

Por otra parte, la fracción de aceite que habría sido liberada durante la digestión intestinal probablemente sufrió hidrólisis enzimática, dando lugar a la formación de ácidos grasos libres, monoacilglicéridos y otros productos de lipólisis. Debido a que la cuantificación del AL se realizó mediante extracción con hexano y posterior detección espectrofotométrica del aceite no transformado, es posible que estos productos de hidrólisis no hayan sido extraídos ni detectados eficientemente mediante la metodología empleada. En consecuencia, la disminución observada en los valores de estabilidad podría atribuirse, al menos parcialmente, a la transformación del aceite en compuestos derivados de la lipólisis (Timilsena et al., 2017).

Luego, se determinó la B^* del AL, cuantificando la concentración de aceite en la fase micelar después de la digestión intestinal, obteniéndose un valor de 12.26 ± 1.78 %. Este

resultado indicaría que solo una pequeña fracción del aceite permaneció dispersa en la fase micelar tras la digestión gastrointestinal *in vitro*.

La bioaccesibilidad de los aceites depende en gran medida de los componentes del sistema de encapsulación, el grado de digestión y sus interacciones con los componentes del fluido intestinal simulado (enzimas, sales biliares, etc.) (Timilsena et al., 2017).

La baja bioaccesibilidad observada podría relacionarse con el comportamiento de las interacciones SPC-CHT en condiciones intestinales. Tal y como se mencionó anteriormente, a pH neutro, el CHT disminuiría su solubilidad, favoreciendo la formación de agregados o precipitados insolubles capaces de retener parte del aceite liberado. Como consecuencia, una fracción del AL podría haber sedimentado junto con el material insoluble durante la centrifugación, reduciendo la cantidad de aceite recuperada en el sobrenadante correspondiente a la fase micelar.

Asimismo, se ha reportado que recubrimientos basados en CHT pueden limitar la digestibilidad lipídica al dificultar el acceso de las lipasas a la interfase aceite-agua y promover la agregación de partículas en condiciones cercanas a pH neutro (Hu et al., 2009). Este comportamiento podría haber restringido tanto la liberación del aceite desde la matriz encapsulante como su incorporación a micelas mixtas estables con sales biliares.

Por otra parte, dado que las sales biliares utilizadas en la digestión *in vitro* presentaban una fracción insoluble, parte del AL podría haber formado micelas mixtas que posteriormente precipitaron durante la centrifugación junto con esta fracción (Visentini et al., 2020).

En contraste, El-Messery et al. (2020) reportaron valores de bioaccesibilidad considerablemente mayores (20–83 %) en nanoemulsiones de aceite de krill estabilizadas mediante WPC, goma arábiga y maltodextrina. Las diferencias observadas podrían atribuirse, al menos en parte, a que estos biopolímeros permanecen solubles tanto en medio gástrico como intestinal, mientras que el CHT disminuye su solubilidad a pH neutro, favoreciendo la formación de agregados capaces de retener parte del aceite fuera de la fase micelar.

Finalmente, se determinó la EB, definida como la fracción del total de AL ingerido presente en la fase micelar y disponible para su absorción, obteniéndose un valor del $5.28 \pm 0.93 \%$ (Tabla 7.1). Este bajo valor refleja el efecto combinado de la reducida estabilidad del aceite durante la digestión y de su limitada incorporación a la fase micelar.

No obstante, la retención de una fracción del AL en la matriz encapsulante no necesariamente implicaría una pérdida total de funcionalidad biológica. Parte del aceite podría alcanzar el intestino grueso aún asociado al sistema encapsulante y liberarse posteriormente durante la fermentación colónica, permitiendo ejercer efectos locales a nivel intestinal. En este sentido, la capacidad de los sistemas bicomponentes para vehiculizar compuestos bioactivos hacia el colon podría resultar particularmente interesante. Por ello en este capítulo se evaluó además la actividad citotóxica de los sistemas bicomponentes sobre las líneas celulares HT-29 y Caco-2.

De manera similar a lo observado para el AL, se evaluaron E*, B* y EB de la ASX presente en el aceite encapsulado.

Después de la digestión *in vitro*, la fracción de ASX que permaneció en un estado no transformado (E*) fue de $34.18 \pm 1.73 \%$, mientras que la B* alcanzó un valor de $13.63 \pm 2.14 \%$. Por último, la EB de la ASX fue de $4.68 \pm 0.92 \%$.

Como era de esperarse, la ASX presentó un comportamiento similar al observado para el AL, ya que se encuentra naturalmente disuelta en la fracción lipídica. En consecuencia, los fenómenos que afectaron la liberación, digestión y recuperación del aceite durante el proceso digestivo probablemente también condicionaron la estabilidad y bioaccesibilidad de la ASX.

7.2.1.2. Viabilidad de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* INL1

Antes y después del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* de los sistemas bicomponentes se realizaron recuentos de la cepa *B. lactis* INL1. En simultáneo se evaluó un sistema control constituido por la cepa encapsulada únicamente en MDX, en ausencia de aceite.

El recuento inicial del sistema control fue de 9.21 ± 0.07 Log UFC/mL, mientras que el correspondiente a los sistemas bicomponentes resuspendidos fue de 9.09 ± 1.15 Log UFC/mL.

Luego de la digestión gastrointestinal, los digestos obtenidos a partir del sistema control presentaron un nivel de células viables de 6.97 ± 0.28 Log UFC/mL, evidenciando una buena supervivencia de la cepa frente a las condiciones ensayadas. Esta resistencia de *B. lactis* INL1 frente a condiciones gastrointestinales ya había sido reportada por Vinderola et al. (2012), quienes evaluaron la supervivencia de la cepa encapsulada con distintos crioprotectores. Los autores observaron que, luego de la digestión gastrointestinal simulada, las células encapsuladas con leche descremada y lactosa disminuyeron aproximadamente un orden logarítmico, mientras que aquellas encapsuladas con sacarosa presentaron una disminución de tres órdenes logarítmicos, partiendo en todos los casos de recuentos iniciales cercanos a 8 Log UFC/mL.

Sin embargo, en los sistemas bicomponentes no se detectaron células viables luego del proceso de digestión gastrointestinal. Una posible explicación de este comportamiento es que el AL pueda presentar cierta actividad antimicrobiana. En este sentido, la liberación del aceite desde la microcápsula durante la digestión, junto con el estrecho contacto entre el AL y la cepa bacteriana, podría haber afectado negativamente la viabilidad de *B. lactis* INL1.

El AL utilizado para el desarrollo de esta tesis fue un aceite no refinado obtenido a partir del caparazón y cabeza de langostinos. Debido a su naturaleza no refinada, el AL podría contener compuestos con potencial actividad antimicrobiana (Zhao et al., 2013). Éstos compuestos podrían ser responsables de la disminución en los recuentos bacterianos, ya que la principal diferencia entre los sistemas bicomponentes y el sistema control radica en la presencia del aceite y los materiales de pared empleados para la encapsulación (SPC y CHT). En relación con esto último, uno de los materiales de pared utilizado fue el CHT, un biopolímero también obtenido a partir de residuos de langostinos, sobre el cual se ha reportado actividad antimicrobiana (Vilar Junior et al., 2016). En un trabajo publicado por Fawwaz et al. (2019) se demostró la actividad antibacteriana de un extracto de caparazón de camarones. Estos antecedentes sugieren que tanto componentes presentes en el AL como el CHT podrían haber contribuido a la pérdida de viabilidad observada en *B. lactis* INL1 durante la digestión *in vitro*.

Aunque la cepa probiótica no logró sobrevivir al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* en los sistemas bicomponentes, esto no necesariamente implica la ausencia de un potencial efecto beneficioso. Tradicionalmente, los probióticos se definen como microorganismos viables no patógenos capaces de conferir beneficios para la salud del huésped. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que muchos de los efectos atribuidos a las células viables de probióticos, también pueden ser ejercidos por componentes celulares liberados tras su lisis (D'ambrosio et al., 2024; de la Fuente-Muñoz et al., 2025).

En este contexto, surge el concepto de “paradoja probiótica”, según el cual tanto las células vivas como las muertas en productos probióticos pueden inducir respuestas biológicas beneficiosas. Este fenómeno podría explicarse por la liberación de compuestos bioactivos durante la degradación o ruptura de las células bacterianas en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, el efecto de los probióticos podría ser dual: mientras las células viables podrían modular la microbiota intestinal y ejercer un efecto inmunomodulador, los componentes derivados de las células no viables podrían participar en respuestas antiinflamatorias (Adams, 2010; Akter et al., 2020).

7.2.2. Estudio de citotoxicidad de los sistemas bicomponentes sobre líneas celulares tumorales

Considerando que numerosas drogas han sido descubiertas a partir de materias primas naturales mediante diferentes ensayos biológicos, el estudio de sistemas que contienen compuestos bioactivos de origen natural ha ido cobrando creciente importancia para la búsqueda de potenciales agentes anticancerígenos (Ma & Wang, 2009; Puri et al., 2022). En esta Sección se analizó la actividad citotóxica y antiproliferativa *in vitro* de los sistemas bicomponentes, previamente sometidos a digestión gastrointestinal simulada *in vitro*, según las condiciones descritas anteriormente, frente a dos líneas celulares de cáncer colorrectal (HT-29 y Caco-2), una línea celular de cáncer hepático (HepG2) y una línea normal epitelial derivada del riñón del mono verde africano (Vero).

7.2.2.1. Evaluación de la viabilidad celular

Para evaluar el potencial citotóxico de los sistemas bicomponentes sobre líneas celulares, se realizó inicialmente un ensayo de viabilidad celular mediante el ensayo MTT sobre las líneas tumorales HT-29 y HepG2 (Bernas & Dobrucki, 2002; Mosmann, 1983). La línea HT-29 constituye un modelo ampliamente utilizado de adenocarcinoma colorrectal humano y se caracteriza por presentar un fenotipo menos diferenciado y altamente proliferativo, por lo que resulta adecuada para estudios de citotoxicidad y evaluación de compuestos con potencial antiproliferativo. Además, las células HT-29 son generalmente sensibles a los quimioterápicos utilizados para el tratamiento del cáncer colorrectal (Ribas et al., 2021). Por su parte, la línea HepG2 representa un modelo de carcinoma hepatocelular humano frecuentemente empleado en estudios de compuestos bioactivos y toxicidad.

En la Fig. 7.1, se muestra el porcentaje de viabilidad celular de las líneas HepG2 (Fig. 7.1 A) y HT-29 (Fig. 7.1 B) tratadas con los digestos de los sistemas bicomponentes, de la cepa *B. lactis* INL1 encapsulada con MDX, y de los materiales de pared (SPC-CHT-MDX), en el rango de concentraciones de 100-500 µg/mL.

La reducción de la viabilidad por debajo del 70 % permite caracterizar a una droga o bioproducto como citotóxico, de acuerdo con las normas ISO (Cannella et al., 2019; Srivastava et al., 2018).

En primer lugar, se observó que los digestos correspondientes a la cepa probiótica y a los materiales de pared no produjeron disminuciones significativas en el porcentaje de viabilidad celular en ninguna de las concentraciones evaluadas. En todos los casos, los valores de viabilidad se mantuvieron por encima del 70 %, indicando ausencia de actividad citotóxica bajo las condiciones ensayadas. Es importante recordar que en los digestos de *B. lactis* INL1, la bacteria se mantuvo viable y presentó elevados niveles de recuento ($\approx 7 \log$ UFC/mL).

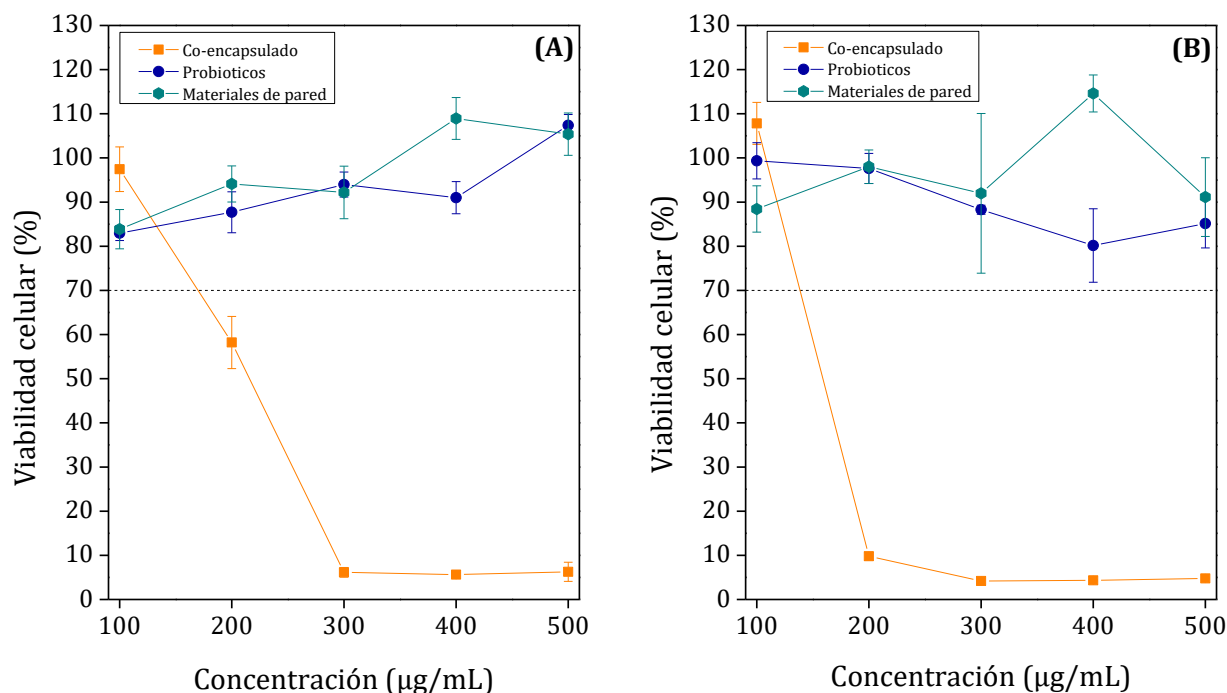


Figura 7.1. Viabilidad celular (%) de las líneas celulares tumorales A) HepG2 y B) HT-29 en función de la concentración de los digestos mediante análisis de MTT. Cada punto indica el % de viabilidad como la media $\pm$ DE. La línea de puntos horizontal indica una viabilidad del 70 %.

Sin embargo, los digestos provenientes de los sistemas bicomponentes AL-INL1 produjeron una marcada disminución de la viabilidad celular en ambas líneas tumorales desde ≈ 100 a 4-6 % a medida que aumentó la concentración desde 100 hasta los 500 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados sugerirían que la actividad citotóxica observada en los sistemas bicomponentes digeridos estaría asociada principalmente al AL presente en el sistema, dado que en la sección anterior se observó que la cepa bacteriana no sobrevivió al proceso de digestión gastrointestinal en los sistemas bicomponentes. Esto se encuentra en consonancia con otros autores, quienes evaluaron extractos de langostinos y krill ricos en EPA, DHA y ASX, demostrando la actividad citotóxica frente a distintas líneas celulares tumorales (Gulzar et al., 2020; Jayathilake et al., 2016; Kannan et al., 2011; Kim et al., 2022; Nirmal et al., 2020; Xie et al., 2019).

Además, puede observarse que la sensibilidad frente al tratamiento con el sistema bicomponente digerido fue diferente entre ambas líneas celulares. En las células HT-29, la viabilidad disminuyó por debajo del 10 % ya a concentraciones de 200 µg/mL, mientras que en las células HepG2 fue necesario alcanzar concentraciones de 300 µg/mL para obtener niveles de viabilidad similares. Estos resultados indicarían una mayor sensibilidad de las células de cáncer colorrectal frente a los compuestos presentes en el AL respecto de las células hepáticas tumorales.

Los valores obtenidos de porcentaje de viabilidad para las líneas HepG2 y HT-29 respecto a peróxido de hidrogeno, utilizado como control positivo de toxicidad, fueron de 7.05 ± 0.55 % y 5.18 ± 1.37 %, respectivamente.

A partir de los resultados obtenidos en HT-29, se decidió profundizar el estudio sobre otra línea celular tumoral de origen intestinal. Las células Caco-2, si bien derivan de un adenocarcinoma colorrectal humano, presentan una elevada capacidad de diferenciación y constituyen uno de los modelos más utilizados para representar el epitelio intestinal. Debido a ello, resulta particularmente útil para evaluar el efecto de compuestos bioactivos luego de procesos de digestión gastrointestinal simulada. En paralelo, se incorporó la línea celular normal Vero (no tumoral), con la finalidad de evaluar la selectividad de la actividad citotóxica observada y comparar la respuesta entre células tumorales y no tumorales.

La viabilidad celular de las líneas Caco-2 y Vero luego de la incubación durante 48 h con el sistema bicomponente, digerido y sin digerir, en concentraciones crecientes de 100 a 500 µg/mL, se evaluó a través del ensayo de MTT (Fig. 7.2).

El sistema bicomponente digerido inhibió la proliferación celular de manera dependiente de la concentración en ambas líneas celulares (Fig. 7.2 A y B).

En las células Caco-2, la disminución significativa de la viabilidad se observó a partir de la concentración de 200 µg/mL, mientras que en las células Vero, el efecto citotóxico ocurrió a partir de los 100 µg/mL, evidenciando una mayor sensibilidad frente a los digestos.

Por otro lado, los sistemas bicomponentes sin digerir presentaron porcentajes de viabilidad celular superiores al 60 % en las concentraciones de 100 a 400 $\mu\text{g/mL}$. Por lo tanto, la mayor actividad citotóxica observada en los digestos respecto de las muestras sin digerir podría atribuirse a que durante la digestión gastrointestinal in vitro se produjo la liberación del aceite presente en las microcápsulas, aumentando así la disponibilidad de los compuestos bioactivos para interactuar con las células.

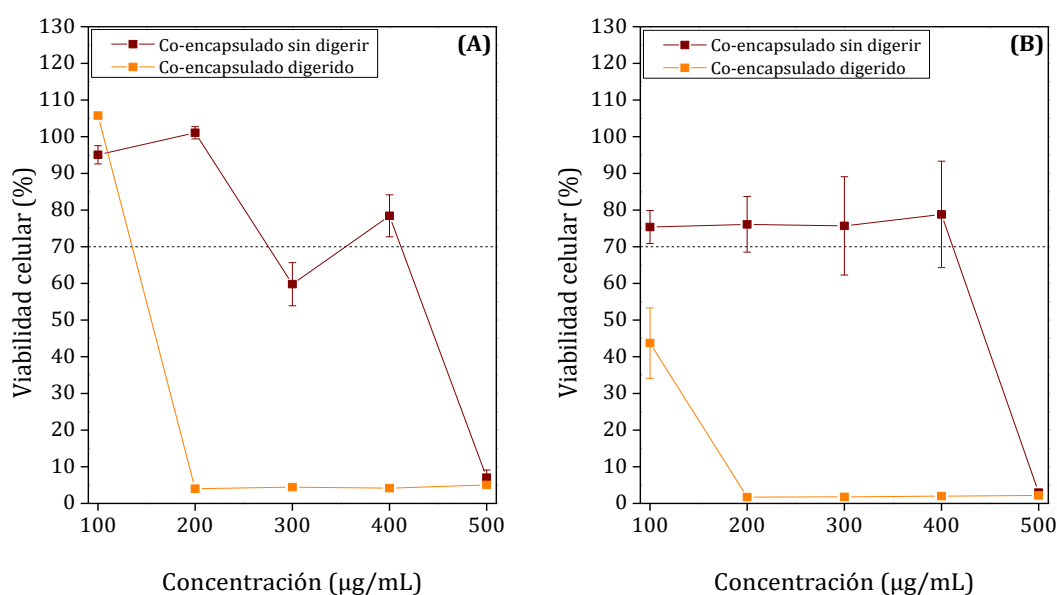


Figura 7.2. Viabilidad celular (%) de la línea tumoral Caco-2 (A) y de la línea normal Vero (B), en función de la concentración de los sistemas bicomponentes, digeridos y sin digerir, mediante el ensayo MTT. Cada punto representa el porcentaje de células viables como media $\pm$ DE.

Los valores obtenidos de porcentaje de viabilidad para las líneas Caco-2 y Vero respecto a peróxido de hidrogeno, utilizado como control positivo de toxicidad, fueron de $6.43 \pm 0.86 \%$ y $3.72 \pm 0.55 \%$, respectivamente.

Con el fin de comparar la actividad citotóxica de los sistemas bicomponentes digeridos en las distintas líneas celulares se determinaron los valores de IC_{50} que se muestran en la Tabla 7.2.

Tabla 7.2. Valores IC_{50} de los sistemas bicomponentes digeridos frente a las líneas HepG2, HT-29, Caco-2 y Vero.

Línea celular	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
HepG2	205.31 ± 3.44^a
HT-29	160.03 ± 3.29^b
Caco-2	113.48 ± 22.07^c
Vero	98.22 ± 18.95^c

Los datos se expresan como los promedios $\pm$ DE. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Respecto a las líneas tumorales, los menores valores de IC_{50} se obtuvieron para las líneas Caco-2 y HT-29, indicando una mayor sensibilidad de las células de cáncer colorrectal frente a la actividad citotóxica y los efectos antiproliferativos de los sistemas bicomponentes ($p < 0.05$), siendo la más sensible dentro de ellas la línea Caco-2. Por su parte, la línea HepG2 presentó el mayor valor del IC_{50} , evidenciando una menor sensibilidad al tratamiento. Estos resultados demuestran que los sistemas bicomponentes desarrollados en esta tesis poseen actividad citotóxica sobre distintas líneas celulares tumorales.

También, se evaluó el índice de selectividad (IS) para determinar si los digestos de los sistemas bicomponentes presentaban una mayor actividad citotóxica frente a células tumorales que frente a células normales, en cuyo caso el IS debería ser mayor que 1. El IS calculado a partir de la relación entre los valores de IC_{50} obtenidos para la línea normal Vero y las líneas tumorales HepG2, HT-29 y Caco-2 fue de 0.48 ± 0.08 , 0.61 ± 0.11 y 0.87 ± 0.01 , respectivamente. En conjunto, estos resultados indican que los digestos de los sistemas bicomponentes no evidenciaron selectividad hacia las células tumorales bajo las condiciones evaluadas.

Aun así, los resultados obtenidos representan una primera aproximación relevante para el estudio del potencial biológico de sistemas bicomponentes basados en aceite de langostino y probióticos, y ponen de manifiesto la necesidad de profundizar futuras investigaciones orientadas a identificar los compuestos responsables de la actividad observada, optimizar las formulaciones y evaluar mecanismos de acción más específicos sobre células tumorales colorrectal.

7.3. Conclusiones parciales

Los ensayos de digestión gastrointestinal simulada in vitro demostraron una baja bioaccesibilidad intestinal del AL y de la ASX presentes en los sistemas bicomponentes. Sin embargo, los digestos obtenidos presentaron actividad citotóxica y antiproliferativa in vitro, lo que sugiere que la fracción liberada durante la digestión fue suficiente para ejercer efectos biológicos sobre las líneas celulares evaluadas.

La cepa *B. lactis* INL1 encapsulada únicamente con MDX sobrevivió al proceso de digestión gastrointestinal simulada, mientras que en los sistemas bicomponentes AL-INL1 no se detectaron células viables luego de la digestión, sugiriendo un posible efecto adverso del AL y/o del CHT sobre la supervivencia bacteriana.

Los sistemas bicomponentes digeridos presentaron actividad citotóxica sobre las líneas tumorales HT-29, Caco-2 y HepG2, observándose mayor sensibilidad en las células de origen colorrectal. Además, los digestos de la cepa probiótica encapsulada y de los materiales de pared no mostraron actividad citotóxica, indicando que el efecto observado estaría asociado principalmente al AL liberado durante la digestión.

8. CAPÍTULO 8: *Conclusiones y consideraciones finales*

En este trabajo de tesis se logró diseñar un sistema bicomponente de aceite de langostino y una cepa potencialmente probiótica, empleando la tecnología de emulsiones multicapa para obtener un ingrediente funcional en polvo.

En primer lugar, se validó con éxito un método espectrofotométrico rápido y sencillo para la determinación del IP en aceites altamente pigmentados que, además de minimizar el uso de reactivos y la generación de residuos, permitió analizar varias muestras de manera simultánea.

Posteriormente, se formularon y caracterizaron emulsiones O/W para encapsular el aceite de langostino mediante el diseño de una doble capa interfacial utilizando concentrado de proteínas de soja, quitosano y maltodextrina como materiales de pared. Las emulsiones obtenidas presentaron estabilidad coloidal frente al cremado y la coalescencia, sin evidenciar liberación de aceite, lo que demostró la adecuada resistencia de sus membranas interfaciales.

Sin embargo, la selección del método de deshidratación de las emulsiones tuvo un papel crucial en la estabilidad oxidativa del aceite encapsulado. Los encapsulados de AL obtenidos mediante secado por aspersión mostraron una rápida oxidación durante el almacenamiento a 4 y 25 °C, probablemente asociada a la sensibilidad de la ASX y de los ácidos grasos poliinsaturados frente a las altas temperaturas aplicadas durante el secado.

Por este motivo, se modificó la estrategia de deshidratación mediante liofilización para formular posteriormente los sistemas bicomponentes, incorporando la cepa *B. lactis* INL1 encapsulada con MDX mediante secado por aspersión.

Si bien los sistemas bicomponentes presentaron inicialmente bajos valores de índice de peróxidos y una elevada retención de ASX, la estructura altamente porosa de los sistemas liofilizados favoreció la degradación oxidativa del aceite durante el almacenamiento a 4 y 25 °C, superando el límite de oxidación sugerido por *Codex Alimentarius* (15 meq O₂/kg aceite). Únicamente los sistemas bicomponentes almacenados a -18 °C lograron mantener valores de IP por debajo de dicho límite durante 4.5 meses, conservando además aproximadamente el 88 % del contenido inicial de ASX.

Respecto de la viabilidad bacteriana, la presencia de AL en los sistemas bicomponentes afectó la supervivencia de *B. lactis* INL1 durante el almacenamiento, especialmente a 4 y 25 °C. No obstante, a -18 °C fue posible preservar la viabilidad de la cepa con recuentos cercanos a 8 log UFC/mL al final del período evaluado.

Por otra parte, los ensayos preliminares de actividad biológica demostraron que los digestos de los sistemas bicomponentes presentaron actividad citotóxica y antiproliferativa *in vitro* sobre las líneas celulares tumorales HT-29, Caco-2 y HepG2. Sin embargo, dado que no se detectaron células viables de *B. lactis* INL1 luego de la digestión gastrointestinal simulada, la actividad citotóxica observada estaría asociada principalmente a compuestos presentes en el AL. Asimismo, la ausencia de selectividad frente a células normales indica la necesidad de profundizar los estudios biológicos mediante la incorporación de nuevos controles y modelos experimentales.

En conjunto, los resultados obtenidos permiten considerar al aceite de langostino como una fuente promisorio de compuestos bioactivos con potencial aplicación en el desarrollo de ingredientes funcionales y nutraceuticos, basados en el aprovechamiento de este subproducto de la industria alimentaria. No obstante, futuros estudios deberán orientarse a optimizar la estabilidad oxidativa y la viabilidad probiótica de los sistemas encapsulados, mediante el diseño de matrices más protectoras y menos permeables al oxígeno, así como profundizar la evaluación biológica mediante ensayos *in vivo* que permitan comprender con mayor precisión sus posibles efectos fisiológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abegunde, A. T., Muhammad, B. H., Bhatti, O., & Ali, T. (2016). Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: Evidence based literature review. *Http://Www.Wjgnet.Com/*, 22(27), 6296–6317. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i27.6296>
- Aberkane, L., Roudaut, G., & Saurel, R. (2013). Encapsulation and Oxidative Stability of PUFA-Rich Oil Microencapsulated by Spray Drying Using Pea Protein and Pectin. *Food and Bioprocess Technology* 2013 7:5, 7(5), 1505–1517. <https://doi.org/10.1007/S11947-013-1202-9>
- Abuzaytoun, R., Budge, S., Hansen, L. T., & MacKinnon, S. (2020). Modification of the Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Method for Determination of Peroxide Value in Highly Pigmented Sea Cucumber Viscera Lipid. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 97(5), 509–516. <https://doi.org/10.1002/aocs.12344>
- Acosta, C. A., Acosta-Müller, C., Cappa, E. R., Spotti, M. L., Castel, M. V., & Fioramonti, S. A. (2026). Haematococcus pluvialis and Chia Oil Blends as a Source of Astaxanthin and Omega-3: Evaluation of Stability During Storage. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*. <https://doi.org/10.1002/aocs.70064>
- Acosta, C. A., Spotti, M. L., Vassallo, M., Spotti, M. J., Carrara, C. R., & Fioramonti, S. A. (2024). The prooxidant effect of natural antioxidants combination when co-encapsulated to chia oil-based nutraceutical edible powders: More is not always better. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 126(1). <https://doi.org/10.1002/ejlt.202300156>
- Acosta-Müller, C., Hein, G. J., Angeli, E., Carrara, C. R., Acosta, C. A., Spotti, M. L., & Fioramonti, S. A. (2025). Streamlined and rapid spectrophotometric method for determination of peroxide value in highly pigmented marine oils containing astaxanthin. *Journal of Food Composition and Analysis*, 148. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2025.108477>
- Adams, C. A. (2010). The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutrition Research Reviews*, 23(1), 37–46. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000090>

- Akter, S., Park, J. H., & Jung, H. K. (2020). Potential Health-Promoting Benefits of Paraprobiotics, Inactivated Probiotic Cells. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 30(4), 477–481. <https://doi.org/10.4014/JMB.1911.11019>
- Alam, M. A., Subhan, N., Hossain, H., Hossain, M., Reza, H. M., Rahman, M. M., & Ullah, M. O. (2016). Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutrition & Metabolism*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0080-3>
- Alfonso Valenzuela, B., Julio Sanhueza, C., & Fernando de la Barra, D. (2012). FISH OIL: YESTERDAY AN INDUSTRIAL WASTE, TODAY A PRODUCT OF HIGH NUTRITIONAL VALUE. *Revista Chilena de Nutrición*, 39(2), 201–209. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182012000200009>
- Alonso, M., & Alguacil, F. J. (1999). Dry mixing and coating of powders. *Revista de Metalurgia*, 35(5), 315–328. <https://doi.org/10.3989/REVMETALM.1999.V35.I5.640>
- Alu'datt, M. H., Alrosan, M., Gammoh, S., Tranchant, C. C., Alhamad, M. N., Rababah, T., Zghoul, R., Alzoubi, H., Ghatasheh, S., Ghazlan, K., & Tan, T. C. (2022). Encapsulation-based technologies for bioactive compounds and their application in the food industry: A roadmap for food-derived functional and health-promoting ingredients. *Food Bioscience*, 50, 101971. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101971>
- Ambati, R. R., Moi, P. S., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. G. (2014). Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - A review. In *Marine Drugs* (Vol. 12, Number 1, pp. 128–152). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md12010128>
- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 240–251. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.004>

- Anandharamakrishnan, C., & Padma Ishwarya, S. (2015). Spray Drying Techniques for Food Ingredient Encapsulation. *Spray Drying Techniques for Food Ingredient Encapsulation*, 1–296. <https://doi.org/10.1002/9781118863985>
- Antonio-Gómez, M. V., Salinas-Moreno, Y., Hernández-Rosas, F., Martínez-Bustos, F., Andrade-González, I., & Herrera-Corredor, J. A. (2021). Optimized Extraction, Microencapsulation, and Stability of Anthocyanins from *Ardisia compressa* K. Fruit. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 71(3), 299–310. <https://doi.org/10.31883/PJFNS/140404>
- AOAC International. (2000). *Official Method 965.33 Peroxide Value of Oils and Fats* (Official Methods of Analysis of AOAC International, Ed.; 17th edn.).
- Araiza-Calahorra, A., & Sarkar, A. (2019). Pickering emulsion stabilized by protein nanogel particles for delivery of curcumin: Effects of pH and ionic strength on curcumin retention. *Food Structure*, 21, 100113. <https://doi.org/10.1016/J.FOOSTR.2019.100113>
- Armenta, R. E., & Isabbl, G. L. (2009). Stability Studies on Astaxanthin Extracted from Fermented Shrimp Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 6095–6100. <https://doi.org/10.1021/jf901083d>
- Arzeni, C. (2014). *Modificación molecular y funcional de proteínas de clara de huevo mediante ultrasonidos de alta intensidad : aplicación de esta tecnología al diseño de nanovehículos para ácido fólico*. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/collection/tesis/document/tesis_n5480_Arzeni
- Atta, E. M., Mohamed, N. H., & Abdelgawad, A. A. M. (2017). ANTIOXIDANTS: AN OVERVIEW ON THE NATURAL AND SYNTHETIC TYPES. *European Chemical Bulletin*, 6(8), 365. <https://doi.org/10.17628/ecb.2017.6.365-375>
- Augustin, M. A., & Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, 38(4), 902–912. <https://doi.org/10.1039/b801739p>

- Bae, E. K., & Lee, S. J. (2008). Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of Microencapsulation*, 25(8), 549–560. <https://doi.org/10.1080/02652040802075682>
- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., & Liang, L. (2016). Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 143–182. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12179>
- Barbosa, J., Borges, S., & Teixeira, P. (2015). Influence of sub-lethal stresses on the survival of lactic acid bacteria after spray-drying in orange juice. *Food Microbiology*, 52, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.06.010>
- Barsky, M., & Blesson, C. S. (2020). Oocytes, obesity, and omega-3 fatty acids. *Fertility and Sterility*, 113(1), 71–72. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.09.022>
- Bernas, T., & Dobrucki, J. (2002). Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, 47(4), 236–242. <https://doi.org/10.1002/cyto.10080>
- Berton-Carabin, C. C., & Schroën, K. (2015). Pickering emulsions for food applications: Background, trends, and challenges. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(Volume 6, 2015), 263–297. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-081114-110822>
- Beuchat, L. R. ., & Rockland, L. B. . (2017). *Water activity : theory and applications to food*. 424.
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.06.017>
- Bilić-Zulle, L. (2011). Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochemia Medica*, 21 (1), 49–52. <https://doi.org/doi:10.11613/bm.2011.010>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA).

- Bodoira, R. M., Penci, M. C., Ribotta, P. D., & Martínez, M. L. (2017). Chia (*Salvia hispanica* L.) oil stability: Study of the effect of natural antioxidants. *LWT*, 75, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.031>
- Bordón, M. G., Bodoira, R. M., González, A., Piloni, R., Ribotta, P. D., & Martínez, M. L. (2022). Spray-Drying, Oil Blending, and the Addition of Antioxidants Enhance the Storage Stability at Room Temperature of Omega-3-Rich Microcapsules Based on Chia Oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 124(4), 2100181. <https://doi.org/10.1002/ejlt.202100181>
- Both, E. M., Boom, R. M., & Schutyser, M. A. I. (2020). Particle morphology and powder properties during spray drying of maltodextrin and whey protein mixtures. *Powder Technology*, 363, 519–524. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2020.01.001>
- Boyer, K. W., Horwitz, W., & Albert, R. (1985). Interlaboratory Variability in Trace Element Analysis. *Analytical Chemistry*, 57(2), 454–459. <https://doi.org/10.1021/ac50001a031>
- Britos, S., Saraví, A., & Vilella, F. (2010). *Buenas prácticas para una alimentación saludable de los argentinos*.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols* 2019 14:4, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Bruzos, S. C. C., Candela, C. G., Nomdedeu, C. L., & Bordonada, M. Á. R. (2011). Nutrición, salud y alimentos funcionales. *Manual de Alimentacion Planificacion Alimentaria*, 3(Agosto), 49–58. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=572282&info=resumen&idioma=SPA>
- Burgos-Díaz, C., Wandersleben, T., Marqués, A. M., & Rubilar, M. (2016). Multilayer emulsions stabilized by vegetable proteins and polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 25, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.06.014>

- Burns, P., Alard, J., Hrdy, J., Boutillier, D., Paéz, R., Reinheimer, J., Pot, B., Vinderola, G., & Grangette, C. (2017). Spray-drying process preserves the protective capacity of a breast milk-derived *Bifidobacterium lactis* strain on acute and chronic colitis in mice. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep43211>
- Cai, Z., Wei, Y., Shi, A., Zhong, J., Rao, P., Wang, Q., & Zhang, H. (2023). Correlation between interfacial layer properties and physical stability of food emulsions: current trends, challenges, strategies, and further perspectives. *Advances in Colloid and Interface Science*, 313, 102863. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102863>
- Calder, P. C. (2017). Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochemical Society Transactions*, 45(5), 1105–1115. <https://doi.org/10.1042/BST20160474>
- Calder, P. C. (2018). Very long-chain n-3 fatty acids and human health: fact, fiction and the future. *Proceedings of the Nutrition Society*, 77(1), 52–72. <https://doi.org/10.1017/S0029665117003950>
- Calderón-Oliver, M., & Ponce-Alquicira, E. (2022). The Role of Microencapsulation in Food Application. *Molecules* 2022, Vol. 27, 27(5). <https://doi.org/10.3390/molecules27051499>
- Campelo, P. H., Sanches, E. A., Fernandes, R. V. de B., Botrel, D. A., & Borges, S. V. (2018). Stability of lime essential oil microparticles produced with protein-carbohydrate blends. *Food Research International*, 105, 936–944. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.034>
- Cámpora, M. C. (2016). Alimentos funcionales: tecnología que hace la diferencia. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 42(2), 131–137. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86447075004>
- Cannella, V., Altomare, R., Chiaramonte, G., Di Bella, S., Mira, F., Russotto, L., Pisano, P., & Guercio, A. (2019). Cytotoxicity Evaluation of Endodontic Pins on L929 Cell Line. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3469525>
- Carneiro, H. C. F., Tonon, R. V., Grosso, C. R. F., & Hubinger, M. D. (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different

- combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 443–451.
<https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2012.03.033>
- Chaiyasit, W., Elias, R. J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2007). Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(3), 299–317.
<https://doi.org/10.1080/10408390600754248>
- Chang, C., & Nickerson, M. T. (2018). Encapsulation of omega 3-6-9 fatty acids-rich oils using protein-based emulsions with spray drying. *Journal of Food Science and Technology*, 55(8), 2850–2861. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3257-0>
- Chang, Y., Yang, H., Zeng, B., Song, M., Hou, J., Ma, L., Feng, H., & Zhang, Y. (2026). Microencapsulation of *Idesia polycarpa* Oil: Physicochemical Properties via Spray Drying vs. Freeze Drying. *International Journal of Molecular Sciences* 2026, Vol. 27, Page 1363, 27(3), 1363. <https://doi.org/10.3390/IJMS27031363>
- Chapa González, C., Navarro Arriaga, J. U., & García Casillas, P. E. (2021). Physicochemical properties of chitosan–magnetite nanocomposites obtained with different pH. *Polymers and Polymer Composites*, 29(9), S1009–S1016.
<https://doi.org/10.1177/096739112111038461>
- Chen, L., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 17(5), 272–283.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.011>
- Chen, L., & Subirade, M. (2006). Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials*, 27(26), 4646–4654.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.04.037>
- Christophersen, A. G., Jun, H., Jorgensen, K., & Skibsted, L. H. (1991). Original paper Photobleaching of astaxanthin and canthaxanthin Quantum-yields dependence of solvent, temperature, and wavelength of irradiation in relation to packaging and storage of carotenoid pigmented salmonoids. In *Z Lebensm Unters Forsch* (Vol. 192).

- Chung, C., & McClements, D. J. (2015). Structure and texture development of food-emulsion products. *Modifying Food Texture: Novel Ingredients and Processing Techniques*, 133–155. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-333-1.00007-3>
- Codex Alimentarius. (1981). *Norma para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales (CXS 19-1981)*.
- Comuzzo, P., Calligaris, S., Comuzzo, P., & Calligaris, S. (2019). Potential Applications of High Pressure Homogenization in Winemaking: A Review. *Beverages 2019*, Vol. 5, 5(3). <https://doi.org/10.3390/BEVERAGES5030056>
- Copado, C. N., Julio, L. M., Diehl, B. W. K., Ixtaina, V. Y., & Tomás, M. C. (2021). Multilayer microencapsulation of chia seed oil by spray-drying using electrostatic deposition technology. *LWT*, 152, 112206. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112206>
- Cretton, M., Malanga, G., Mazzuca Sobczuk, T., & Mazzuca, M. (2021). Lipid Fraction from Industrial Crustacean Waste and Its Potential as a Supplement for the Feed Industry: A Case Study in Argentine Patagonia. *Waste and Biomass Valorization*, 12(5), 2311–2319. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01162-7>
- da Silva Júnior, M. E., Araújo, M. V. R. L., Martins, A. C. S., dos Santos Lima, M., da Silva, F. L. H., Converti, A., & Maciel, M. I. S. (2023). Microencapsulation by spray-drying and freeze-drying of extract of phenolic compounds obtained from ciriguela peel. *Scientific Reports 2023 13:1*, 13(1), 15222-. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40390-4>
- da Silva, P. T., Fries, L. L. M., de Menezes, C. R., Holkem, A. T., Schwan, C. L., Wigmann, É. F., Bastos, J. de O., & da Silva, C. de B. (2014). Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*, 44(7), 1304–1311. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971>
- D'ambrosio, S., Dabous, A., Sadiq, S., Casillo, A., Schiraldi, C., Cassese, E., Bedini, E., Corsaro, M. M., & Cimini, D. (2024). *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 live probiotics and postbiotics: production strategies and bioactivity evaluation for potential therapeutic

- properties. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12, 1379574.
<https://doi.org/10.3389/FBIOE.2024.1379574/TEXT>
- de la Fuente-Muñoz, M., Román-Carmena, M., Amor, S., González-Hedström, D., Martínez-Ríos, V., Martorell, P., Inarejos-García, A. M., García Bou, R., Guilera-Bermell, S., García-Villalón, Á. L., & Granado, M. (2025). Supplementation with the Postbiotic BPL1™-HT (Heat-Inactivated *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*) Attenuates the Cardiovascular Alterations Induced by Angiotensin II Infusion in Mice. *Antioxidants* 2025, Vol. 14, Page 193, 14(2), 193. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX14020193>
- de la Garza, J., Moriondo Danovaro, P., Fernández, M., Ravalli, C., Souto, V., & Waessle, J. (2017). *An overview of the argentine red shrimp (Pleoticus muelleri, Decapoda, Solenoceridae) fishery in Argentina: biology, fishing, management and ecological interactions*. <http://hdl.handle.net/1834/15133>
- Dias, M. I., Ferreira, I. C. F. R., & Barreiro, M. F. (2015). Microencapsulation of bioactives for food applications. *Food & Function*, 6(4), 1035–1052. <https://doi.org/10.1039/c4fo01175a>
- DiNicolantonio, J. J., & O’Keefe, J. (2021). The Importance of Maintaining a Low Omega-6/Omega-3 Ratio for Reducing the Risk of Autoimmune Diseases, Asthma, and Allergies. *Missouri Medicine*, 118(5), 453. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8504498/>
- Domian, E., Brynda-Kopytowska, A., & Oleksza, K. (2015). Rheological properties and physical stability of o/w emulsions stabilized by OSA starch with trehalose. *Food Hydrocolloids*, 44, 49–58. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2014.08.020>
- Donoso, A., González-Durán, J., Muñoz, A. A., González, P. A., & Agurto-Muñoz, C. (2021). “Therapeutic uses of natural astaxanthin: An evidence-based review focused on human clinical trials.” *Pharmacological Research*, 166, 105479. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105479>
- Dorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., & Nedović, V. (2014). Trends in Encapsulation Technologies for

- Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Engineering Reviews* 2015 7:4, 7(4), 452–490.
<https://doi.org/10.1007/s12393-014-9106-7>
- Drusch, S., & Berg, S. (2008). Extractable oil in microcapsules prepared by spray-drying: Localisation, determination and impact on oxidative stability. *Food Chemistry*, 109(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.016>
- Eijkelboom, N. M., van Boven, A. P., Siemons, I., Wilms, P. F. C., Boom, R. M., Kohlus, R., & Schutyser, M. A. I. (2023). Particle structure development during spray drying from a single droplet to pilot-scale perspective. In *Journal of Food Engineering* (Vol. 337). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2022.111222>
- El-Messery, T. M., Altuntas, U., Altin, G., & Özçelik, B. (2020). The effect of spray-drying and freeze-drying on encapsulation efficiency, in vitro bioaccessibility and oxidative stability of krill oil nanoemulsion system. *Food Hydrocolloids*, 106, 105890. <https://doi.org/10.1016/j.FOODHYD.2020.105890>
- Eratte, D., McKnight, S., Gengenbach, T. R., Dowling, K., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2015). Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates. *Journal of Functional Foods*, 19, 882–892. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.037>
- Espinaco, B. Y., Niizawa, I., Zorrilla, S. E., & Sihufe, G. A. (2023). Whey protein aggregates-alginate composite gel for astaxanthin-chia oil encapsulation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 125(8), 2300010. <https://doi.org/10.1002/ejlt.202300010>
- European Commission. (2021). *REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2021/808 DE LA COMISIÓN*. http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2021/808/oj
- Evangelista, A. G., Matté, E. H. C., Corrêa, J. A. F., Gonçalves, F. D. R., dos Santos, J. V. G., Biauki, G. C., Milek, M. M., Costa, L. B., & Luciano, F. B. (2023). Bioprotective potential of lactic acid bacteria for Salmonella biocontrol in vitro. *Veterinary Research Communications*, 47(3), 1357–1368. <https://doi.org/10.1007/S11259-023-10083-4>

- FAO/WHO. (2002). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, London, Ontario.
<https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=1540497>
- Farhoosh, R., & Hoseini-Yazdi, S. Z. (2014). Evolution of oxidative values during kinetic studies on olive oil oxidation in the Rancimat test. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(2), 281–293. <https://doi.org/10.1007/S11746-013-2368-Z;WGROU:STRING:PUBLICATION>
- Fawwaz, M., Pratama, M., & Hasrawati, A. (2019). POTENTIAL OF ASTAXANTHIN FROM ASIAN TIGER SHRIMP (*Penaeus monodon*) SHELL EXTRACT AS AN ANTIBACTERIAL AND ANT INFLAMMATORY. *Journal of Global Pharma Technology*.
<https://jgpt.co.in/index.php/jgpt/article/view/2086>
- Fereidoon, S., & Ying, Z. (2010). Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*, 39(11), 4067–4079. <https://doi.org/10.1039/b922183m>
- Finos, M. B., Visentini, F. F., Cian, R., Fernández, J. L., Santiago, L. G., & Perez, A. A. (2024). Nanosupplements based on protein-polysaccharide coacervates loaded with essential oils: Evaluation of antioxidant and antidiabetic properties. *Food Hydrocolloids*, 155. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110248>
- Fioramonti, S. A., Arzeni, C., Pilosof, A. M. R., Rubiolo, A. C., & Santiago, L. G. (2015). Influence of freezing temperature and maltodextrin concentration on stability of linseed oil-in-water multilayer emulsions. *Journal of Food Engineering*, 156, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.01.013>
- Fioramonti, S. A., Rubiolo, A. C., & Santiago, L. G. (2017). Characterisation of freeze-dried flaxseed oil microcapsules obtained by multilayer emulsions. *Powder Technology*, 319, 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.06.052>
- Fioramonti, S. A., Stepanic, E. M., Tibaldo, A. M., Pavón, Y. L., & Santiago, L. G. (2019). Spray dried flaxseed oil powdered microcapsules obtained using milk whey proteins-alginate double

- layer emulsions. *Food Research International*, 119, 931–940.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.079>
- Francisco, C. R. L., Paulo, B. B., De Oliveira Júnior, F. D., Pereira, A. P. A., Pastore, G. M., Prata, A. S., Alvim, I. D., & Hubinger, M. D. (2022). The porosity of carbohydrate-based spray-dried microparticles containing limonene stabilized by pea protein: Correlation between porosity and oxidative stability. *Current Research in Food Science*, 5, 878–885.
<https://doi.org/10.1016/j.CRFS.2022.05.003>
- Fuller, I. D., Cumming, A. H., Card, A., Burgess, E. J., Barrow, C. J., Perry, N. B., & Killeen, D. P. (2020). Free Fatty Acids in Commercial Krill Oils: Concentrations, Compositions, and Implications for Oxidative Stability. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 97(8), 889–900. <https://doi.org/10.1002/aocs.12368>
- Gabriels, M. G., Cirunay, J., Alafandy, M., Brisaert, M., De Taevernier, M., Camu, F., & Plaizier-Vercammen, J. (2000). Determination of Hydroperoxides in Liposomes by the Modified IDF and the Modified Tiron Methods. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*, 83.
<https://academic.oup.com/jaoac/article/83/3/589/5656307>
- Galarza, J. I., Bryan, B., Zhunio, P., Estatal, U., De, P., Elena, S., Arredondo-Vega, B. O., Sara, B., & Tomalá, R. (2023). Astaxantina: El antioxidante natural con múltiples beneficios para la salud. Una revisión: Astaxanthin: The natural antioxidant with multiple health benefits. A review. *REVISTA CIENTÍFICA ECOCIENCIA*, 10(4), 1–23.
<https://doi.org/10.21855/ecociencia.104.782>
- Gałaszka, A., Migaszewski, Z., & Namieśnik, J. (2013). The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 50, pp. 78–84). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>
- Gao, S., Yang, M., Luo, Z., Ban, Z., Pan, Y., Tu, M., Ma, Q., Lin, X., Xu, Y., & Li, L. (2022). Soy protein/chitosan-based microsphere as Stable Biocompatible Vehicles of Oleanolic Acid:

- An Emerging Alternative Enabling the Quality Maintenance of Minimally Processed Produce. *Food Hydrocolloids*, 124. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107325>
- Geranpour, M., Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2020). Recent advances in the spray drying encapsulation of essential fatty acids and functional oils. *Trends in Food Science & Technology*, 102, 71–90. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.028>
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voille, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>
- Gómez-Cruz, N. I., & Jiménez-Munguía, M. T. (2014). *Métodos de secado de emulsiones alimentarias*.
- Gómez-Estaca, J., Alemán, A., López-Caballero, M. E., Baccan, G. C., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2019). Bioaccessibility and antimicrobial properties of a shrimp demineralization extract blended with chitosan as wrapping material in ready-to-eat raw salmon. *Food Chemistry*, 276, 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.031>
- Gómez-Estaca, J., Calvo, M. M., Álvarez-Acero, I., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2017). Characterization and storage stability of astaxanthin esters, fatty acid profile and α -tocopherol of lipid extract from shrimp (*L. vannamei*) waste with potential applications as food ingredient. *Food Chemistry*, 216, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.016>
- Granato, D., Barba, F. J., Bursać Kovačević, D., Lorenzo, J. M., Cruz, A. G., & Putnik, P. (2020). Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annual Review of Food Science and Technology*, 11(Volume 11, 2020), 93–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>
- Griffiths, K., Aggarwal, B. B., Singh, R. B., Buttar, H. S., Wilson, D., & Meester, F. De. (2016). Food Antioxidants and Their Anti-Inflammatory Properties: A Potential Role in Cardiovascular Diseases and Cancer Prevention. *Diseases* 2016, Vol. 4, 4(3), 28. <https://doi.org/10.3390/diseases4030028>

- Gullifa, G., Risoluti, R., Mazzoni, C., Barone, L., Papa, E., Battistini, A., Martin Fraguas, R., & Materazzi, S. (2023). Microencapsulation by a Spray Drying Approach to Produce Innovative Probiotics-Based Products Extending the Shelf-Life in Non-Refrigerated Conditions. *Molecules* 2023, Vol. 28, Page 860, 28(2), 860. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28020860>
- Gulzar, S., & Benjakul, S. (2020). Nanoliposome Powder Containing Shrimp Oil Increases Free Flowing Behavior and Storage Stability. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 122(6). <https://doi.org/10.1002/ejlt.202000049>
- Gulzar, S., Nilsuwan, K., Raju, N., & Benjakul, S. (2022). Whole Wheat Crackers Fortified with Mixed Shrimp Oil and Tea Seed Oil Microcapsules Prepared from Mung Bean Protein Isolate and Sodium Alginate. *Foods*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/foods11020202>
- Gulzar, S., Raju, N., Chandragiri Nagarajarao, R., & Benjakul, S. (2020). Oil and pigments from shrimp processing by-products: Extraction, composition, bioactivities and its application- A review. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 100, pp. 307–319). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.005>
- Guzey, D., & McClements, D. J. (2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 128–130, 227–248. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2006.11.021>
- Hansen, M. L. R. W., Petersen, M. A., Risbo, J., Hümmer, M., & Clausen, A. (2015). Implications of modifying membrane fatty acid composition on membrane oxidation, integrity, and storage viability of freeze-dried probiotic, *Lactobacillus acidophilus* La-5. *Biotechnology Progress*, 31(3), 799–807. <https://doi.org/10.1002/BTPR.2074;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>
- Hosomi, R., Yoshida, M., & Fukunaga, K. (2012). Seafood Consumption and Components for Health. *Global Journal of Health Science*, 4(3), 72. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v4n3p72>
- Hu, M., Li, Y., Decker, E. A., Xiao, H., & McClements, D. J. (2009). Influence of Tripolyphosphate Cross-Linking on the Physical Stability and Lipase Digestibility of Chitosan-Coated Lipid

- Droplets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 1283–1289.
<https://doi.org/10.1021/JF903270Y>
- Huang, G. Q., Sun, Y. T., Xiao, J. X., & Yang, J. (2012). Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. *Food Chemistry*, 135(2), 534–539.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.140>
- Inguglia, L., Chiaramonte, M., Di Stefano, V., Schillaci, D., Cammilleri, G., Pantano, L., Mauro, M., Vazzana, M., Ferrantelli, V., Nicolosi, R., & Arizza, V. (2020). Salmo salar fish waste oil: Fatty acids composition and antibacterial activity. *PeerJ*, 8, e9299.
<https://doi.org/10.7717/PEERJ.9299/SUPP-5>
- International Dairy Federation (IDF). (1991). *International IDF Standards*.
- International Organization for Standardization (ISO). (2017). *ISO 3960:2017, Animal and vegetable fats and oils — Determination of peroxide value — Iodometric (visual) endpoint determinationn*.
- Iravani, S., Korbekandi, H., & Mirmohammadi, S. V. (2015). Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 4679–4696. <https://doi.org/10.1007/S13197-014-1516-2/METRICS>
- Ixtaina, V. Y., Hoffman, E., Copado, C. N., Diehl, B. W. K., & Tomás, M. C. (2023). Microencapsulation of Chia Seed Oil by Spray-Drying: Influence of the Antioxidant Addition. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 125(1), 2200134.
<https://doi.org/10.1002/ejlt.202200134>
- Jafari, S. M., Ghalegi Ghalenoei, M., & Dehnad, D. (2017). Influence of spray drying on water solubility index, apparent density, and anthocyanin content of pomegranate juice powder. *Powder Technology*, 311, 59–65. <https://doi.org/10.1016/J.POWTEC.2017.01.070>
- Jayaprakash, P., Gaiani, C., Edoth, J. M., Borges, F., Beaupeux, E., Maudhuit, A., & Desobry, S. (2023). Comparison of Electrostatic Spray Drying, Spray Drying, and Freeze Drying for

- Lactaseibacillus rhamnosus GG Dehydration. *Foods* 2023, Vol. 12, Page 3117, 12(16), 3117. <https://doi.org/10.3390/FOODS12163117>
- Jayathilake, A. G., Senior, P. V., & Su, X. Q. (2016). Krill oil extract suppresses cell growth and induces apoptosis of human colorectal cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1311-x>
- Jeurink, P. V., van Bergenhenegouwen, J., Jiménez, E., Knippels, L. M. J., Fernández, L., Garssen, J., Knol, J., Rodríguez, J. M., & Martín, R. (2013). Human milk: a source of more life than we imagine. *Beneficial Microbes*, 4(1), 17–30. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0040>
- Jiménez-Gómez, C. P., & Cecilia, J. A. (2020). Chitosan: A Natural Biopolymer with a Wide and Varied Range of Applications. *Molecules* 2020, Vol. 25, 25(17). <https://doi.org/10.3390/molecules25173981>
- Jones, O. G., & McClements, D. J. (2011). Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein–polysaccharide complexes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1–2), 49–62. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2010.10.006>
- Julio, L. M., Copado, C. N., Diehl, B. W. K., Ixtaina, V. Y., & Tomás, M. C. (2018). Chia bilayer emulsions with modified sunflower lecithins and chitosan as delivery systems of omega-3 fatty acids. *LWT*, 89, 581–590. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2017.11.044>
- Kandra, P., Challa, M. M., & Kalangi Padma Jyothi, H. (2012). Efficient use of shrimp waste: present and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), 17–29. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3651-2>
- Kannan, A., Hettiarachchy, N. S., Marshall, M., Raghavan, S., & Kristinsson, H. (2011). Shrimp shell peptide hydrolysates inhibit human cancer cell proliferation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(10), 1920–1924. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4464>
- Keshani, S., Daud, W. R. W., Nourouzi, M. M., Namvar, F., & Ghasemi, M. (2015). Spray drying: An overview on wall deposition, process and modeling. *Journal of Food Engineering*, 146, 152–162. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2014.09.004>

- Khutoryanskiy, V. V. (2014). Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems. *Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems*, 9781119941439, 1–332. <https://doi.org/10.1002/9781118794203>
- Kim, C., & Kim, B. (2018). Anti-Cancer Natural Products and Their Bioactive Compounds Inducing ER Stress-Mediated Apoptosis: A Review. *Nutrients*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/nu10081021>
- Kim, H., Roh, Y., Yong Park, S., Lee, C., Lim, S., Cho, S., Lee, H. Y., Auck Hong, S., Jin Lee, T., Chul Myung, S., Yun, S. J., Hyun Choi, Y., Kim, W. J., & Moon, S. K. (2022). In vitro and in vivo anti-tumor efficacy of krill oil against bladder cancer: Involvement of tumor-associated angiogenic vasculature. *Food Research International*, 156. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111144>
- Kim, W., Wang, Y., Vongsivut, J., Ye, Q., & Selomulya, C. (2023). On surface composition and stability of β -carotene microcapsules comprising pea/whey protein complexes by synchrotron-FTIR microspectroscopy. *Food Chemistry*, 426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136565>
- Klinkesorn, U., & McClements, D. J. (2009). Influence of chitosan on stability and lipase digestibility of lecithin-stabilized tuna oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 114(4), 1308–1315. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.012>
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2006). Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Research International*, 39(4), 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.FOODRES.2005.09.008>
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., & McClements, D. J. (2004). Stability and rheology of corn oil-in-water emulsions containing maltodextrin. *Food Research International*, 37(9), 851–859. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.05.001>

- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>
- Kuhn, K. R., & Cunha, R. L. (2012). Flaxseed oil – Whey protein isolate emulsions: Effect of high pressure homogenization. *Journal of Food Engineering*, 111(2), 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.016>
- Kumar, S., Kumar, R., Kumari, A., & Panwar, A. (2022). Astaxanthin: A super antioxidant from microalgae and its therapeutic potential. *Journal of Basic Microbiology*, 62(9), 1064–1082. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100391>
- Larussa, T., Imeneo, M., & Luzzza, F. (2017). Potential role of nutraceutical compounds in inflammatory bowel disease. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 23, Number 14). <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i14.2483>
- Lavecchia, R., & Zuorro, A. (2008). Shelf stability of lutein from marigold (*Tagetes erecta* L.) flowers in vegetable oils. *CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS*, 14, 199–204. <https://iris.uniroma1.it/handle/11573/530119>
- Leonard, H. P. (2006). Nutracéuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, XL(3), 20–28. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120665003>
- Li, M., McClements, D. J., Liu, X., & Liu, F. (2020). Design principles of oil-in-water emulsions with functionalized interfaces: Mixed, multilayer, and covalent complex structures. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 19, Number 6, pp. 3159–3190). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12622>
- Li, Q., Chen, J., Huyan, Z., Kou, Y., Xu, L., Yu, X., & Gao, J. M. (2019). Application of Fourier transform infrared spectroscopy for the quality and safety analysis of fats and oils: A review. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 59, Number 22, pp. 3597–3611). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1500441>

- Li, X., Wu, J., & Liu, M. (2023). Improved colloidal and oxidative stability of krill oil using natural biopolymers via spray drying microencapsulation. *Food Bioengineering*, 2(3), 242–250. <https://doi.org/10.1002/fbe2.12064>
- Li, X. yu, Wu, M. bin, Xiao, M., Lu, S. huan, Wang, Z. ming, Yao, J. ming, & Yang, L. rong. (2019). Microencapsulated β -carotene preparation using different drying treatments. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* 2019 20:11, 20(11), 901–909. <https://doi.org/10.1631/JZUS.B1900157>
- Liu, X. J., Wu, Y. H., Zhao, L. C., Xiao, S. Y., Zhou, A. M., & Liu, X. (2011). Determination of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* by first-order derivative spectrophotometry. *JAOC*, 94(6), 1752–1757. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.10-177>
- Liu, Y., Cao, Y., Yohannes Woldemariam, K., Zhong, S., Yu, Q., & Wang, J. (2023). Antioxidant effect of yeast on lipid oxidation in salami sausage. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1113848. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.1113848/TEXT>
- Loyeau, P. A., Spotti, M. J., Vanden Braber, N. L., Rossi, Y. E., Montenegro, M. A., Vinderola, G., & Carrara, C. R. (2018). Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 using whey proteins and dextrans conjugates as wall materials. *Food Hydrocolloids*, 85. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.051>
- Loyeau, P. A., Spotti, M. J., Vinderola, G., & Carrara, C. R. (2021). Encapsulation of potential probiotic and canola oil through emulsification and ionotropic gelation, using protein/polysaccharides Maillard conjugates as emulsifiers. *LWT*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111980>
- Loyeau, P. A., Spotti, M. L., Castel, V., Acosta-Müller, C., Acosta, C. A., Fioramonti, S., Vinderola, G., & Spotti, M. J. (2026). Enhanced viability of encapsulated probiotics using whey protein isolate-dextran conjugates: Effect of dextran molar mass. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150357. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2026.150357>
- Lu, C. C., & Yen, G. C. (2015). Antioxidative and anti-inflammatory activity of functional foods. *Current Opinion in Food Science*, 2, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.11.002>

- Ma, B., Lu, J., Kang, T., Zhu, M., Xiong, K., & Wang, J. (2022). Astaxanthin supplementation mildly reduced oxidative stress and inflammation biomarkers: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition Research*, 99, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2021.09.005>
- Ma, X., & Wang, Z. (2009). Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. *Drug Discovery Today*, 14(23–24), 1136–1142. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.09.006>
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Ghorbani, M., & Assadpoor, E. (2014). Spray-Drying Microencapsulation of Anthocyanins by Natural Biopolymers: A Review. *Drying Technology*, 32(5), 509–518. <https://doi.org/10.1080/07373937.2013.839562>
- Maiuolo, J., Gliozzi, M., Carresi, C., Musolino, V., Oppedisano, F., Scarano, F., Nucera, S., Scicchitano, M., Bosco, F., Macri, R., Ruga, S., Cardamone, A., Coppoletta, A., Mollace, A., Cognetti, F., & Mollace, V. (2021). Nutraceuticals and Cancer: Potential for Natural Polyphenols. *Nutrients*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/nu13113834>
- Mangialavori, G., Defusto, S., Sandonato, ; Selva, Panaggio, C., Aquino, C., Lara, ;, Gómez, V., María, ;, López, V., & Elorriaga, N. (2022). Encuesta de factores de riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles en la Universidad Nacional de La Matanza, Argentina. Año 2019. *Revista de La Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba*, 79(4), 358–362. <https://doi.org/10.31053/1853.0605.v79.n4.35436>
- Mansouri, R. A. (2020). Oxidative Stabilization of Olive Oil by Punicalagin During Storage. *Journal of Biochemical Technology*, 11(2–2020), 10–16. <https://doi.org/10.51847/kpbviuy>
- Maqsood, S., Benjakul, S., Abushelaibi, A., & Alam, A. (2014). Phenolic Compounds and Plant Phenolic Extracts as Natural Antioxidants in Prevention of Lipid Oxidation in Seafood: A Detailed Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6), 1125–1140. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12106>

- Marion-Letellier, R., Savoye, G., Beck, P. L., Panaccione, R., & Ghosh, S. (2013). Polyunsaturated fatty acids in inflammatory bowel diseases: A reappraisal of effects and therapeutic approaches. In *Inflammatory Bowel Diseases* (Vol. 19, Number 3). <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e3182810122>
- Marques, G. R., Fernandes, R. V. de B., Lago, A. M. T., Borges, S. V., Bertolucci, S. K. V., Lima, A. de J. B., & Botrel, D. A. (2021). Spray-dried thyme essential oil microparticles using different polymeric matrices. *Drying Technology*, 39(12), 1883–1894. <https://doi.org/10.1080/07373937.2021.1871917>;CSUBTYPE:STRING:SPECIAL;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER
- Martínez-Delgado, A. A., Khandual, S., & Villanueva-Rodríguez, S. J. (2017). Chemical stability of astaxanthin integrated into a food matrix: Effects of food processing and methods for preservation. *Food Chemistry*, 225, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.092>
- McCall, B., McPartland, C. K., Moore, R., Frank-Kamenetskii, A., & Booth, B. W. (2018). Effects of Astaxanthin on the Proliferation and Migration of Breast Cancer Cells In Vitro. *Antioxidants 2018, Vol. 7*, 7(10). <https://doi.org/10.3390/antiox7100135>
- McClements, D. J. (2002). Theoretical prediction of emulsion color. *Advances in Colloid and Interface Science*, 97(1–3), 63–89. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(01\)00047-1](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(01)00047-1)
- McClements, D. J. (2005). Theoretical Analysis of Factors Affecting the Formation and Stability of Multilayered Colloidal Dispersions. *Langmuir*, 21(21), 9777–9785. <https://doi.org/10.1021/LA0512603>
- McClements, D. J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 24(6), 621–625. <https://doi.org/10.1016/j.BIOTECHADV.2006.07.003>
- McClements, D. J. (2010). Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 241–269. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100722>

- McClements, D. J. (2012). Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(5), 235–245. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.06.002>
- McClements, D. J. (2015). Food Emulsions: PRINCIPLES, PRACTICES, AND TECHNIQUES, THIRD EDITION. *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, Third Edition*, 1–676. <https://doi.org/10.1201/B18868/FOOD-EMULSIONS-DAVID-JULIAN-MCCLEMENTS/RIGHTS-AND-PERMISSIONS>
- McClements, D. J., & Jafari, S. M. (2018). Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 251, 55–79. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.12.001>
- 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(2), 213–228. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2010.06.010>
- Meng, F., Doi, M., & Ouyang, Z. (2014). Cavitation in Drying Droplets of Soft Matter Solutions. *Physical Review Letters*, 113(9), 098301. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.113.098301>
- Minguez-Mosquera, M. I., & Jaren-Galan, M. (1995). Kinetics of the decolouring of carotenoid pigments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67(2), 153–161. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740670203>
- Miranda-Linares, V., Quintanar-Guerrero, D., Del Real, A., & Zambrano-Zaragoza, M. L. (2020). Spray-drying method for the encapsulation of a functionalized ingredient in alginate-pectin nano- and microparticles loaded with distinct natural actives: Stability and antioxidant effect. *Food Hydrocolloids*, 101. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105560>
- M'Koma, A. E. (2013). Inflammatory bowel disease: an expanding global health problem. *Clinical Medicine Insights. Gastroenterology*, 6, 33–47. <https://doi.org/10.4137/CGast.S12731>

- Mohammed, N. K., Tan, C. P., Manap, Y. A., Muhialdin, B. J., & Hussin, A. S. M. (2020). Spray Drying for the Encapsulation of Oils—A Review. In *Molecules* (Vol. 25, Number 17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25173873>
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. In *Journal of Immunological Methods* (Vol. 65).
- Mota, G. C. P., Moraes, L. B. S. de, Oliveira, C. Y. B., Oliveira, D. W. S., Abreu, J. L. de, Dantas, D. M. M., & Gálvez, A. O. (2022). Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*: processes, applications, and market. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 52(5), 598–609. <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1966802>
- Mularczyk, M., Michalak, I., & Marycz, K. (2020). Astaxanthin and other Nutrients from *Haematococcus pluvialis*—Multifunctional Applications. *Marine Drugs* 2020, Vol. 18, 18(9). <https://doi.org/10.3390/md18090459>
- Musakhanian, J., Rodier, J. D., & Dave, M. (2022). Oxidative Stability in Lipid Formulations: a Review of the Mechanisms, Drivers, and Inhibitors of Oxidation. *AAPS PharmSciTech* 2022 23:5, 23(5), 151-. <https://doi.org/10.1208/S12249-022-02282-0>
- Naguib, Y. M. A. (2000). Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1150–1154. <https://doi.org/10.1021/jf991106k>
- Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., & Coppola, R. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.001>
- Neiryneck, N., Van der Meeren, P., Lukaszewicz-Lausecker, M., Cocquyt, J., Verbeken, D., & Dewettinck, K. (2007). Influence of pH and biopolymer ratio on whey protein–pectin interactions in aqueous solutions and in O/W emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 298(1–2), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.12.001>

- Niamnuy, C., Devahastin, S., Soponronnarit, S., & Vijaya Raghavan, G. S. (2008). Kinetics of astaxanthin degradation and color changes of dried shrimp during storage. *Journal of Food Engineering*, 87(4), 591–600. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.01.013>
- Nirmal, N. P., Santivarangkna, C., Rajput, M. S., & Benjakul, S. (2020). Trends in shrimp processing waste utilization: An industrial prospective. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 103, pp. 20–35). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.001>
- Nodari, S., Triggiani, M., Campia, U., Manerba, A., Milesi, G., Cesana, B. M., Gheorghide, M., & Dei Cas, L. (2011). Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on left ventricular function and functional capacity in patients with dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 57(7), 870–879. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.11.017>
- Noshad, M., Mohebbi, M., Shahidi, F., & Koocheki, A. (2015). Effect of layer-by-layer polyelectrolyte method on encapsulation of vanillin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 803–808. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.012>
- Olatunde, O. O., & Benjakul, S. (2022). Antioxidants from Crustaceans: A Panacea for Lipid Oxidation in Marine-Based Foods. In *Food Reviews International* (Vol. 38, Number 1, pp. 1–31). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1717522>
- OMS. (2003). *OMS, Serie de Informes Técnicos 916 DIETA, NUTRICIÓN Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES CRÓNICAS Organización Mundial de la Salud Ginebra*.
- Ong, X. Y., Taylor, S. E., & Ramaioli, M. (2020). Rehydration of food powders: Interplay between physical properties and process conditions. *Powder Technology*, 371, 142–153. <https://doi.org/10.1016/j.POWTEC.2020.05.066>
- Özbek, Z. A., & Ergönül, P. G. (2017). A Review on Encapsulation of Oils. *Celal Bayar University Journal of Science*, 13(2), 293–309. <https://doi.org/10.18466/cbayarfbe.313358>
- Ozturk, B., & McClements, D. J. (2016). Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Current Opinion in Food Science*, 7, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.008>

- Park, J. S., Chyun, J. H., Kim, Y. K., Line, L. L., & Chew, B. P. (2010). Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutrition & Metabolism* 2010 7:1, 7(1), 18-. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-18>
- Partanen, R., Raula, J., Seppänen, R., Buchert, J., Kauppinen, E., & Forssell, P. (2008). Effect of Relative Humidity on Oxidation of Flaxseed Oil in Spray Dried Whey Protein Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5717–5722. <https://doi.org/10.1021/jf8005849>
- Pascual-Silva, C., Alemán, A., Pilar Montero, M., & Carmen Gómez-Guillén, M. (2022). Extraction and characterization of Argentine red shrimp (*Pleoticus muelleri*) phospholipids as raw material for liposome production. *Food Chemistry*, 374, 131766. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131766>
- Passing, H., & Bablok, W. (1983). A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part I. In *J. Clin. Chem. Clin. Biochem* (Vol. 21).
- Patel, A., Desai, S. S., Mane, V. K., Enman, J., Rova, U., Christakopoulos, P., & Matsakas, L. (2022). Futuristic food fortification with a balanced ratio of dietary ω -3/ ω -6 omega fatty acids for the prevention of lifestyle diseases. *Trends in Food Science & Technology*, 120(3), 140–153. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.006>
- Paudel, P., Seong, S. H., Zhou, Y., Park, H. J., Jung, H. A., & Choi, J. S. (2019). Anti-Alzheimer's Disease Activity of Bromophenols from a Red Alga, *Symphyocladia latiuscula* (Harvey) Yamada. *ACS Omega*, 4(7), 12259. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01557>
- Peralta, G. H., Bergamini, C. V., Audero, G., Páez, R., Wolf, I. V., Perotti, M. C., & Hynes, E. R. (2017). Spray-dried adjunct cultures of autochthonous non-starter lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 255, 17–24. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2017.05.014>

- Pérez, A. L., Kemmerer, A., Citta, M. de los M., Suarez, S., Baggio, R., Crespi, A. F., Lázaro-Martínez, J. M., Ramos, C. A., Vasquez Mansilla, M., & Brondino, C. D. (2025). Water-mediated isotropic exchange in an extended Cu(II) crystal lattice: a structural, magnetic and EPR study. *Dalton Transactions*, 54(31), 11895–11904. <https://doi.org/10.1039/d5dt01377a>
- Piñeiro-Corrales, G., Lago Rivero, N., & Culebras-Fernández, J. M. (2013). Papel de los ácidos grasos omega-3 en la prevención de enfermedades cardiovasculares. *Nutrición Hospitalaria*, 28(1), 1–5. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6312>
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control*, 31(2), 593–606. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.039>
- Plazzotta, S., & Manzocco, L. (2018). Effect of ultrasounds and high pressure homogenization on the extraction of antioxidant polyphenols from lettuce waste. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 50, 11–19. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2018.10.004>
- Pu, J., Bechtel, P. J., & Sathivel, S. (2010). Extraction of shrimp astaxanthin with flaxseed oil: Effects on lipid oxidation and astaxanthin degradation rates. *Biosystems Engineering*, 107(4), 364–371. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2010.10.001>
- Pu, J., & Sathivel, S. (2011). Kinetics of lipid oxidation and degradation of flaxseed oil containing crawfish (*Procambarus clarkii*) astaxanthin. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(5), 595–601. <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1713-8>
- Pudziuvelyte, L., Marksa, M., Sosnowska, K., Winnicka, K., Morkuniene, R., & Bernatoniene, J. (2020). Freeze-Drying Technique for Microencapsulation of Elsholtzia ciliata Ethanolic Extract Using Different Coating Materials. *Molecules* 2020, Vol. 25, 25(9). <https://doi.org/10.3390/molecules25092237>
- Puri, V., Nagpal, M., Singh, I., Singh, M., Dhingra, G. A., Huanbutta, K., Dheer, D., Sharma, A., & Sangnim, T. (2022). A Comprehensive Review on Nutraceuticals: Therapy Support and Formulation Challenges. *Nutrients*, 14(21). <https://doi.org/10.3390/NU14214637>

- R Foundation for Statistical Computing. (2023). *R: A language and environment for statistical computing*. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rajasekaran, B., Singh, A., & Benjakul, S. (2022). Combined effect of chitosan and bovine serum albumin/whey protein isolate on the characteristics and stability of shrimp oil-in-water emulsion. *Journal of Food Science*, 87(7), 2879–2893. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16226>
- Ramanery, F. P., Mansur, A. A. P., & Mansur, H. S. (2013). One-step colloidal synthesis of biocompatible water-soluble ZnS quantum dot/chitosan nanoconjugates. *Nanoscale Research Letters* 2013 8:1, 8(1), 512-. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-512>
- Ranga Rao, A., Baskaran, V., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2013). In vivo bioavailability and antioxidant activity of carotenoids from microalgal biomass — A repeated dose study. *Food Research International*, 54(1), 711–717. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.067>
- Rayees, R., Gani, A., Noor, N., Ayoub, A., & Ashraf, Z. U. (2024). General approaches to biopolymer-based Pickering emulsions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 267, 131430. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131430>
- Reque, P. M., & Brandelli, A. (2021). Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.022>
- Ribas, L. E., Baravalle, M. E., Gasser, F. B., Renna, M. S., Addona, S., Ortega, H. H., Savino, G. H., Van de Velde, F., & Hein, G. J. (2021). Extraction of phenolic compounds from the shells of pecan nuts with cytotoxic activity through apoptosis against the colon cancer cell line HT-29. *Journal of Food Science*, 86(12), 5409–5423. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15950>
- Ribeiro, H. S., Rico, L. G., Badolato, G. G., & Schubert, H. (2005). Production of O/W emulsions containing astaxanthin by repeated premix membrane emulsification. *Journal of Food Science*, 70(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07083.x>

- Robins, M. M. (2000). Emulsions — creaming phenomena. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5(5–6), 265–272. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(00\)00065-0](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(00)00065-0)
- Rodrigo Durán, C., & Alfonso Valenzuela, B. (2010). LA EXPERIENCIA JAPONESA CON LOS ALIMENTOS FOSHU: ¿LOS VERDADEROS ALIMENTOS FUNCIONALES? *Revista Chilena de Nutrición*, 37(2), 224–233. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182010000200012>
- Rodrigo Valenzuela, B., Karla Bascuñan, G., Rodrigo Chamorro, M., & Alfonso Valenzuela, B. (2011). ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 Y CÁNCER, UNA ALTERNATIVA NUTRICIONAL PARA SU PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO. *Revista Chilena de Nutrición*, 38(2), 219–226. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182011000200012>
- Rodríguez R., Y. A., Rojas G., A. F., & Rodríguez B., S. (2016). Encapsulación de probióticos para aplicaciones alimenticias. *Biosalud*, 15(2), 106–115. <https://doi.org/10.17151/biosa.2016.15.2.10>
- Ross, R. P., Desmond, C., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2005). Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1410–1417. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2005.02654.X>
- Sain, J., Scanarotti, I. G., Gerstner, C. D., Fariña, A. C., Lavandera, J. V., & Bernal, C. A. (2023). Enriched functional milk fat ameliorates glucose intolerance and triacylglycerol accumulation in skeletal muscle of rats fed high-fat diets. *European Journal of Nutrition*, 62(3), 1535–1550. <https://doi.org/10.1007/s00394-023-03098-9>
- Saini, R. K., & Keum, Y. S. (2018). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. *Life Sciences*, 203, 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.049>
- Saini, R. K., Song, M. H., Rengasamy, K. R. R., Ko, E. Y., & Keum, Y. S. (2020). Red Shrimp Are a Rich Source of Nutritionally Vital Lipophilic Compounds: A Comparative Study among Edible Flesh and Processing Waste. *Foods* 2020, Vol. 9, 9(9). <https://doi.org/10.3390/foods9091179>

- Sampels, S., & Sampels, S. (2013). Oxidation and Antioxidants in Fish and Meat from Farm to Fork. *Food Industry*. <https://doi.org/10.5772/53169>
- Schmitt, C., & Turgeon, S. L. (2011). Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1–2), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.10.001>
- Senovieski, M. L., Loyeau, P. A., Puntillo, M., Binetti, A., & Vinderola, G. (2024). Cheese whey for production of breast milk-derived bifidobacteria: Influence of fermentation conditions on the survival to spray drying and storage. *International Journal of Dairy Technology*, 77(3), 853–861. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.13079>
- Seyedsadjadi, N., & Grant, R. (2020). The Potential Benefit of Monitoring Oxidative Stress and Inflammation in the Prevention of Non-Communicable Diseases (NCDs). *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(1), 1–32. <https://doi.org/10.3390/antiox10010015>
- Shishir, M. R. I., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., & Chen, W. (2018). Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 34–60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.018>
- Simopoulos, A. P. (2016). An increase in the Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. In *Nutrients* (Vol. 8, Number 3). <https://doi.org/10.3390/nu8030128>
- Singh, K. N., Patil, S., & Barkate, H. (2020). Protective effects of astaxanthin on skin: Recent scientific evidence, possible mechanisms, and potential indications. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(1), 22–27. <https://doi.org/10.1111/jocd.13019>
- Slavutsky, A. M., Chávez, M. C., Favaro-trindade, C. S., & Bertuzzi, M. A. (2017). Encapsulation of *Lactobacillus Acidophilus* in a Pilot-Plant Spray-Dryer. Effect of Process Parameters on Cell Viability. *Journal of Food Process Engineering*, 40(2), e12394. <https://doi.org/10.1111/JFPE.12394>

- Sobel, R., Versic, R., & Gaonkar, A. G. (2014). Introduction to Microencapsulation and Controlled Delivery in Foods. *Microencapsulation in the Food Industry: A Practical Implementation Guide*, 3–12. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404568-2.00001-7>
- Spotti, M. L., Acosta, C. A., Loyeau, P. A., Acosta-Müller, C., Spotti, M. J., Castel, M. V., & Fioramonti, S. A. (2026). Nanoparticle Morphology Outweighs Antioxidant Properties in Whey Protein–Dextran Maillard Conjugates for Oxidative Stabilization of Chia Oil Powders. *Food and Bioprocess Technology*, 19(3). <https://doi.org/10.1007/s11947-026-04216-1>
- Srivastava, G. K., Alonso-Alonso, M. L., Fernandez-Bueno, I., Garcia-Gutierrez, M. T., Rull, F., Medina, J., Coco, R. M., & Pastor, J. C. (2018). Comparison between direct contact and extract exposure methods for PFO cytotoxicity evaluation. *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), 1425-. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19428-5>
- St. Angelo, A. J. (1996). Lipid Oxidation in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(3), 175–224. <https://doi.org/10.1080/10408399609527723;PAGE=STRING:ARTICLE/CHAPTER>
- Su, F., Huang, B., & Liu, J. (2018). The carotenoids of shrimps (Decapoda: Caridea and Dendrobranchiata) cultured in China. *Journal of Crustacean Biology*, 38(5), 523–530. <https://doi.org/10.1093/jcbiol/ryy049>
- Sui, W., Wang, S., Chen, Y., Li, X., Zhuang, X., Yan, X., & Song, Y. (2025). Insights into the Structural and Nutritional Variations in Soluble Dietary Fibers in Fruits and Vegetables Influenced by Food Processing Techniques. *Foods* 2025, Vol. 14, Page 1861, 14(11), 1861. <https://doi.org/10.3390/FOODS14111861>
- Sultana, A., Takashige, S., Maki, Y., Fermin, A., Adachi, S., & Yoshii, H. (2021). Oxidative stability of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in krill oil microencapsulated by spray drying. *Food Hydrocolloids for Health*, 1. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2021.100031>
- Sun, W., Shi, B., Xue, C., & Jiang, X. (2019). The comparison of krill oil extracted through ethanol–hexane method and subcritical method. *Food Science and Nutrition*, 7(2), 700–710. <https://doi.org/10.1002/fsn3.914>

- Syll, O., Khalloufi, S., & Schuck, P. (2013). Dispersibility and morphology of spray-dried soy powders depending on the spraying system. *Dairy Science & Technology* 2013 93:4, 93(4), 431–442. <https://doi.org/10.1007/S13594-013-0112-Y>
- Taherian, A. R., Britten, M., Sabik, H., & Fustier, P. (2011). Ability of whey protein isolate and/or fish gelatin to inhibit physical separation and lipid oxidation in fish oil-in-water beverage emulsion. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 868–878. <https://doi.org/10.1016/j.FOODHYD.2010.08.007>
- Takeungwongtrakul, S., & Benjakul, S. (2016). Astaxanthin degradation and lipid oxidation of Pacific white shrimp oil: kinetics study and stability as affected by storage conditions. *International Aquatic Research*, 8(1), 15–27. <https://doi.org/10.1007/s40071-015-0120-z>
- Takeungwongtrakul, S., Benjakul, S., & H-kittikun, A. (2014). Micro-encapsulation of Pacific white shrimp oil as affected by emulsification condition. *Food Science and Human Wellness*, 3(3–4), 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.12.001>
- Takeungwongtrakul, S., Benjakul, S., & H-kittikun, A. (2015). Wall materials and the presence of antioxidants influence encapsulation efficiency and oxidative stability of micro-encapsulated shrimp oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(4), 450–459. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400235>
- Taneja, A., & Singh, H. (2012). Challenges for the delivery of long-chain n-3 fatty acids in functional foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 105–123. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101130>
- Tavares, L., Santos, L., & Noreña, C. P. Z. (2021). Microencapsulation of organosulfur compounds from garlic oil using β -cyclodextrin and complex of soy protein isolate and chitosan as wall materials: A comparative study. *Powder Technology*, 390, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2021.05.080>

- Thompson, M., Ellison, S. L. R., & Wood, R. (2002). Resulting from the Symposium on Harmonization of Quality Assurance Systems for Analytical Laboratories. In *Pure Appl. Chem* (Vol. 74, Number 5).
- Timilsena, Y. P., Adhikari, R., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2017). Digestion behaviour of chia seed oil encapsulated in chia seed protein-gum complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 66, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.017>
- Tolve, R., Condelli, N., Can, A., & Tchuenbou-Magaia, F. L. (2017). Development and Characterization of Phytosterol-Enriched Oil Microcapsules for Foodstuff Application. *Food and Bioprocess Technology* 2017 11:1, 11(1), 152–163. <https://doi.org/10.1007/S11947-017-1990-4>
- Valenzuela, R., & Videla, L. A. (2011). The importance of the long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in development of non-alcoholic fatty liver associated with obesity. *Food & Function*, 2(11), 644–648. <https://doi.org/10.1039/c1fo10133a>
- Vilar Junior, J. C., Ribeaux, D. R., Alves Da Silva, C. A., & De Campos-Takaki, G. M. (2016). Physicochemical and Antibacterial Properties of Chitosan Extracted from Waste Shrimp Shells. *International Journal of Microbiology*, 2016(1), 5127515. <https://doi.org/10.1155/2016/5127515>
- Vinderola, C. G., Medici, M., & Perdígón, G. (2004). Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 96(2), 230–243. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2004.02158.x>
- Vinderola, G., Zacarías, M. F., Bockelmann, W., Neve, H., Reinheimer, J., & Heller, K. J. (2012). Preservation of functionality of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 after incorporation of freeze-dried cells into different food matrices. *Food Microbiology*, 30(1), 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.004>
- Visentini, F. F., Perez, A. A., Baravalle, M. E., Renna, M. S., Ortega, H. H., & Santiago, L. G. (2020). In vitro gastrointestinal digestion and cytotoxic effect of ovalbumin-conjugated linoleic

- acid nanocomplexes. *Food Research International*, 137, 109381.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109381>
- Vitetta, L. (2022). Can krill oil from small crustaceans be a panacea that alleviates symptoms of knee osteoarthritis? In *American Journal of Clinical Nutrition* (Vol. 116, Number 3, pp. 621–622). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqac151>
- Walendziak, W., Douglas, T. E. L., & Kozłowska, J. (2025). Design, Optimization, and Characterization of Freeze-Dried Emulsions Based on Sodium Alginate and Whey Protein Isolate Intended for Cosmetic and Dermatological Applications. *ACS Omega*, 10(23), 24932–24949. <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.5C02358>
- Walker, R., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2015). Development of food-grade nanoemulsions and emulsions for delivery of omega-3 fatty acids: opportunities and obstacles in the food industry. *Food & Function*, 6(1), 41–54. <https://doi.org/10.1039/C4FO00723A>
- Wang, J., Han, L., Wang, D., Sun, Y., Huang, J., & Shahidi, F. (2021). Stability and stabilization of omega-3 oils: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 118, 17–35.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.09.018>
- Wang, J. J., Lei, K. F., & Han, F. (2018). Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(12), 3855–3864. <https://doi.org/10.26355/eurrev-201806-15270>
- Wang, X., Gu, Y., Lin, W., & Zhang, Q. (2024). Rapid quantitative authentication and analysis of camellia oil adulterated with edible oils by electronic nose and FTIR spectroscopy. *Current Research in Food Science*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100732>
- Wang, Y. C., Yu, R. C., & Chou, C. C. (2004). Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology*, 93(2), 209–217.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.001>
- Welti-Chanes, J., Pérez, E., Guerrero-Beltrán, J. A., Alzamora, S. M., & Vergara-Balderas, F. (2008). Applications of Water Activity Management in the Food Industry. *Water Activity in Foods:*

- Fundamentals and Applications*, 341–357.
<https://doi.org/10.1002/9780470376454.CH13;ISSUE:ISSUE:DOI>
- Williamson, E. M., Liu, X., & Izzo, A. A. (2020). Trends in use, pharmacology, and clinical applications of emerging herbal nutraceuticals. *British Journal of Pharmacology*, 177(6), 1227–1240. <https://doi.org/10.1111/bph.14943>
- Xie, D., Gong, M., Wei, W., Jin, J., Wang, X., Wang, X., & Jin, Q. (2019). Antarctic Krill (*Euphausia superba*) Oil: A Comprehensive Review of Chemical Composition, Extraction Technologies, Health Benefits, and Current Applications. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 18, Number 2, pp. 514–534). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12427>
- Xiong, W., Ren, C., Tian, M., Yang, X., Li, J., & Li, B. (2018). Emulsion stability and dilatational viscoelasticity of ovalbumin/chitosan complexes at the oil-in-water interface. *Food Chemistry*, 252, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.067>
- Yuan, Y., Wan, Z. L., Yang, X. Q., & Yin, S. W. (2014). Associative interactions between chitosan and soy protein fractions: Effects of pH, mixing ratio, heat treatment and ionic strength. *Food Research International*, 55, 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.016>
- Yuan, Y., Wan, Z. L., Yin, S. W., Yang, X. Q., Qi, J. R., Liu, G. Q., & Zhang, Y. (2013). Characterization of complexes of soy protein and chitosan heated at low pH. *LWT*, 50(2), 657–664. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.034>
- Zabot, G. L., Schaefer Rodrigues, F., Polano Ody, L., Vinícius Tres, M., Herrera, E., Palacin, H., Córdova-Ramos, J. S., Best, I., & Olivera-Montenegro, L. (2022). Encapsulation of Bioactive Compounds for Food and Agricultural Applications. *Polymers* 2022, Vol. 14, 14(19). <https://doi.org/10.3390/polym14194194>
- Zacarías, M. F., Binetti, A., Laco, M., Reinheimer, J., & Vinderola, G. (2011). Preliminary technological and potential probiotic characterisation of bifidobacteria isolated from

- breast milk for use in dairy products. *International Dairy Journal*, 21(8), 548–555.
<https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2011.03.007>
- Zacarias, M. F., Reinheimer, J., Forzani, L., Grangette, C., & Vinderola, G. (2014). Mortality and translocation assay to study the protective capacity of *Bifidobacterium lactis* INL1 against *Salmonella Typhimurium* infection in mice. *Beneficial Microbes*, 5(4), 427–436.
<https://doi.org/10.3920/BM2013.0086>
- Zeb, A., & Murkovic, M. (2011). Carotenoids and triacylglycerols interactions during thermal oxidation of refined olive oil. *Food Chemistry*, 127(4), 1584–1593.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.02.022>
- Zhang, C., Xu, W., Jin, W., Shah, B. R., Li, Y., & Li, B. (2015). Influence of anionic alginate and cationic chitosan on physicochemical stability and carotenoids bioaccessibility of soy protein isolate-stabilized emulsions. *Food Research International*, 77, 419–425.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.020>
- Zhang, F., Cai, X., Ding, L., & Wang, S. (2021). Effect of pH, ionic strength, chitosan deacetylation on the stability and rheological properties of O/W emulsions formulated with chitosan/casein complexes. *Food Hydrocolloids*, 111, 106211.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106211>
- Zhang, X., Li, Y., Li, J., Liang, H., Chen, Y., Li, B., Luo, X., Pei, Y., & Liu, S. (2022). Edible oil powders based on spray-dried Pickering emulsion stabilized by soy protein/cellulose nanofibrils. *LWT*, 154, 112605. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112605>
- Zhao, J., Dong, J. N., Wang, H. G., Zhao, M., Sun, J., Zhu, W. M., Zuo, L. G., Gong, J. F., Li, Y., Gu, L. L., Li, N., & Li, J. S. (2017). Docosahexaenoic Acid Attenuated Experimental Chronic Colitis in Interleukin 10-Deficient Mice by Enhancing Autophagy Through Inhibition of the mTOR Pathway. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 41(5), 824–829.
<https://doi.org/10.1177/0148607115609308>

- Zhao, L., Yin, B., Liu, Q., & Cao, R. (2013). Purification of antimicrobial peptide from Antarctic Krill (*Euphausia superba*) and its function mechanism. *Journal of Ocean University of China* 2013 12:3, 12(3), 484–490. <https://doi.org/10.1007/S11802-013-2180-2>
- Zhu, Y., Peng, Y., Wen, J., & Quek, S. Y. (2021). A Comparison of Microfluidic-Jet Spray Drying, Two-Fluid Nozzle Spray Drying, and Freeze-Drying for Co-Encapsulating β -Carotene, Lutein, Zeaxanthin, and Fish Oil. *Foods* 2021, Vol. 10, Page 1522, 10(7), 1522. <https://doi.org/10.3390/FOODS10071522>
- Zimet, P., & Livney, Y. D. (2009). Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 23(4), 1120–1126. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.10.008>