



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**

TESIS

**“EFECTO DE UN ACEITE DE PESCADO COMERCIAL
RICO EN ÁCIDOS GRASOS *n-3* (EPA Y DHA) Y DE UN
ACEITE VEGETAL EN LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE
EMULSIONES CÁRNICAS MODELO Y EN LA
INTERACCIÓN LÍPIDO-PROTEÍNA”**

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M. en B. Violeta Ugalde Benítez

Directora de Tesis: Dra. Isabel Guerrero Legarreta

Codirector: Dr. Arturo Rojo Domínguez

Asesora: Dra. María Eugenia Jaramillo Flores

MÉXICO, D. F., MARZO 2013

El programa de doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT.

El trabajo de investigación que se presenta en este documento se realizó con el apoyo de una beca de posgrado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

La redacción y escritura de la tesis fue financiada con una beca otorgada por el convenio UAM-ICYTDF para alumnos de maestría y doctorado que se encuentren en el proceso de conclusión de la idónea comunicación de resultados o tesis.

México, D. F., a 25 de marzo del 2013

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“Efecto de un aceite de pescado comercial rico en ácidos grasos *n*-3 (EPA y DHA) y de un aceite vegetal en la estabilidad oxidativa de emulsiones cárnicas modelo y en la interacción lípido-proteína”

Que presentó:

Violeta Ugalde Benítez

El día 25 de marzo del 2013

Comité Tutorial:

Directora: Dra. María Isabel del Carmen Guerrero Legarreta

Codirector: Dr. Arturo Rojo Domínguez

Asesora: Dra. María Eugenia Jaramillo Flores

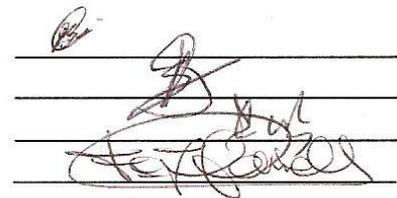
Jurado:

Presidenta: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Secretario: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Vocal: Dr. Carlos Regalado González

Vocal: Dr. Francisco José Fernández Perrino



Agradecimientos

A la UAM-I y al Posgrado en Biotecnología por permitirme continuar con mi formación profesional.

Al ICYTDF en convenio con la UAM por la beca otorgada para la escritura e idónea comunicación de la tesis doctoral.

A la Dra. Isabel Guerrero, por su apoyo profesional y la libertad que me concedió para desarrollar este proyecto y satisfacer mi curiosidad intelectual.

Al comité tutorial y al jurado por su apoyo, participación y aportaciones durante la revisión de este documento.

Al laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas S-130, compañeros de posgrado y doctores con los que tuve la oportunidad de interactuar.

A la Dra. Gloria Trejo por el apoyo y libertad concedida para operar el GC-MS.

A la Dra. Margarita Salazar por su disposición, buen trato y préstamo de las lámparas fluorescentes.

Al Dr. Jaime Vernon y sus alumnos, por permitirme hacer uso del equipo de ultrasonido de alta potencia.

Al coordinador del Posgrado en Biotecnología, Dr. Francisco José Fernández Perrino por la información y apoyo.

Agradecimientos especiales

A mi familia nuclear y a mi tía L.

A Rocío Zúñiga, por su profesionalismo y apoyo.

Al M. en B. Rafael Alejandro Ángel Cuapio por facilitarme insumos, charlas breves y buena onda.

Al M. en B. Raúl Reyes Bautista, amigo y compañero del Posgrado.

Al Dr. Isaías Nava Villagómez, 3>.

Al M. en B. Marco Polo Carballo Sánchez, por el tiempo compartido y el aprendizaje.

Resumen

El presente trabajo estuvo basado en la formación y análisis de la estabilidad física y oxidativa de emulsiones modelo simples aceite en agua (o/w) denominadas emulsiones modelo cárnicas, debido a que se utilizó un extracto miofibrilar obtenido del músculo de cerdo *Longissimus dorsi* como agente emulsificante y dos tipos de aceite, por separado como fase dispersa de la emulsión: aceite de pescado MEG-3®, o bien, aceite de maíz. De manera paralela y con el objetivo de contrastar el comportamiento del extracto miofibrilar, se formularon emulsiones modelo o/w, utilizando ovoalbúmina grado II como agente emulsificante control y los aceites mencionados anteriormente por separado, como la fase dispersa. Se eligió a la ovoalbúmina como agente emulsificante control, puesto que se usa ampliamente en la industria de los alimentos para formar y estabilizar emulsiones. De tal manera que se formaron cuatro emulsiones modelo, las cuales se analizaron por separado, éstas se denominaron: (A) extracto miofibrilar-MEG-3®, (B) extracto miofibrilar-aceite de maíz, (C) ovoalbúmina-MEG-3® y (D) ovoalbúmina-aceite de maíz.

Antes de preparar las emulsiones y en vista de que resultó importante conocer la naturaleza de los materiales utilizados para formular los sistemas modelo o/w evaluados, se llevó a cabo la caracterización de las proteínas utilizadas como emulsificantes obteniendo los perfiles electroforéticos SDS-PAGE y se determinó la composición de ácidos grasos de los aceites (MEG-3® o maíz) utilizados como fase dispersa de la emulsión. El extracto miofibrilar resultó ser una solución proteica compleja en la que estuvieron presentes más de siete proteínas con pesos moleculares en el intervalo 16-200 kDa, mientras que la solución de ovoalbúmina grado II, empleada como emulsificante control, estuvo compuesta principalmente por esa proteína, aún cuando se detectaron trazas de posible ovotransferrina. Por otro lado, el análisis por CG del perfil de ácidos grasos del aceite de pescado MEG-3® y del aceite de maíz, permitió observar que el tipo y concentración de ácidos grasos en cada aceite fue función de la naturaleza de los mismos. El aceite MEG-3® mostró un perfil de ácidos grasos más diverso y presentó concentraciones altas de ácidos grasos polinsaturados de cadena larga *n-3*: EPA y DHA.

La evaluación de la estabilidad oxidativa de las emulsiones modelo o/w investigadas en este trabajo, requirió de la determinación previa del nivel de oxidación del aceite de pescado MEG-3® y del aceite de maíz, los cuales al emplearse por separado constituyeron la fase dispersa de los sistemas modelo. Para evaluar el nivel de oxidación de los aceites bajo análisis se adaptó la versión II del método de oxidación ferrosa de naranja xilenol (FOX2), el cual permite cuantificar hidroperóxidos

en aceites. La adaptación del método FOX2 realizada durante el desarrollo de esta tesis, mostró que al utilizar soluciones de aceite en concentración 5 mg de aceite/mL de propan-1-ol y alícuotas de 100 μ L de dichas soluciones se garantiza la evaluación correcta, reproducible y sensible de la concentración de hidroperóxidos en muestras de aceite de diferente naturaleza y con distintos grados de oxidación. En adición, el método FOX2 adaptado permitió observar que el aceite de pescado MEG-3®, es más susceptible a la oxidación comparado con el aceite de maíz.

Por primera vez, se optimizaron por separado las propiedades índice de actividad (EAI) e índice de estabilidad de la emulsión (ESI) en las cuatro emulsiones modelos bajo investigación al aplicar la metodología de superficies de respuesta (MSR). De manera general, se observó que la optimización de los índices EAI y ESI por MSR de las emulsiones modelo fue dependiente no sólo de la concentración de proteína utilizada, sino también del tipo y porcentaje de aceite empleado como fase dispersa para formar la emulsión. Se decidió utilizar la combinación de proteína y porcentaje de aceite con la que se obtuvo la respuesta óptima máxima del ESI (128 min) para formular las cuatro emulsiones modelo bajo análisis y evaluar su oxidación, ya que una de las condiciones para realizar estos experimentos es que la emulsión se mantenga estable durante el periodo de tiempo en el que se realicen los análisis. Dicha combinación correspondió a solución de proteína (extracto miofibrilar u ovoalbúmina) y aceite (MEG-3® o maíz) en concentraciones: 10.7 mg/mL y 9.3%, respectivamente.

El efecto del porcentaje de amplitud de ultrasonido en la disminución del tamaño promedio de los glóbulos en la emulsión y en el aumento de la estabilidad de los sistemas modelo almacenados a 37°C mostró que el proceso de sonicación suministrando 50% de amplitud de ultrasonido permitió estabilizar por 120 h las emulsiones modelo: extracto miofibrilar-MEG-3®, ovoalbúmina-MEG-3® y ovoalbúmina-aceite de maíz. Por otro lado, la estabilización hasta por 72 h de las emulsiones extracto miofibrilar-aceite de maíz requirió de la aplicación de un porcentaje de amplitud de ultrasonido del 60%. Se comprobó que la separación de las fases en función al tiempo en estos sistema, no sólo fue dependiente del tamaño de partícula, sino que también se vio afectada por el tipo e intensidad de las interacciones que ocurren entre las proteínas adsorbidas en el glóbulo y los ácidos grasos contenidos en el aceite.

En general, las emulsiones modelo cárnicas incubadas a 37°C se oxidaron más que las emulsiones control, sin importar el tipo de aceite empleado como fase dispersa de la emulsión, posiblemente por la presencia de iones metálicos en el extracto crudo miofibrilar. Por otro lado, la oxidación lipídica de las emulsiones modelo preparadas con aceite de pescado MEG-3® fue mayor durante las

primeras 24 h de almacenamiento a 37°C, en comparación con los sistemas que se formularon empleando aceite de maíz, independientemente de la naturaleza de la proteína emulsificante. Lo cual seguramente estuvo relacionado con la presencia de ácidos grasos EPA y DHA en ese aceite marino. Sin embargo, se observó que el uso de una concentración alta de proteína para formular las emulsiones (10.7 mg/mL) disminuyó la concentración de hidroperóxidos y TBARS en los sistemas preparados con aceite MEG-3® a medida que transcurría el tiempo de incubación a 37 °C de las emulsiones, consecuencia de un posible efecto antioxidante dinámico ocurrido entre las proteínas adsorbidas en el glóbulo de la emulsión y las presentes en exceso en la fase continua.

Summary

This work studied conditions for model meat emulsions (o/w) formation, as well as physical and oxidative stability related to this system. Emulsions were formulated with two oil types as disperse phase (corn oil and commercial fish oil, MEG-3®) and a myofibrillar protein extract obtained from pork *Longissimus dorsi* as emulsifying agent. As a means of comparison, an o/w emulsions containing grade II ovalbumin was also studied; this protein was used as a control due that it is widely applied in the food industry as emulsifying agent and stabilizer. Therefore, four model emulsion were studied: (A) myofibrillar extract-MEG-3®; (B) myofibrillar extract-corn oil; (C) ovalbumin-MEG-3®; (D) ovalbumin-corn oil.

In a preliminary study, SDS-PAGE was performed on the myofibrillar extract and ovalbumin solution; fatty-acid composition of MEG-3® and corn oil was also studied. According to the results, the myofibrillar extract contained a complex mixture of more than seven proteins, the molecular weight ranging from 16 to 200 kDa, whereas grade II ovalbumin contained protein traces, presumably ovotransferrin. MEG-3® fatty-acid profile showed high concentrations of EPA and DHA.

In order to study emulsions' oxidative stability, previous studies on the oxidation level of corn and fish oil MEG-3® were carried out. A version of the ferrous oxidation-xylenol orange method (FOX2) was adapted in order to quantify oil hydroperoxide content. The adapted FOX2 method was reproducible, sensitive, and precise if 5 mg oil/mL propan-1-ol and 100 µL solution aliquots were used. Under these conditions, hydroperoxide concentration in oil samples of different nature and various oxidation degrees were accurately analyzed. In addition, using the adapted FOX2 to MEG-3® showed that this oil was more sensitive to oxidation than corn oil.

Emulsion activity (EAI) and emulsion stability indexes (ESI) were optimized for the four studied emulsion formulations, by a response surface methodology (RSM). In general, EAI and ESI optimization by RSM were dependent, not only on protein concentration, but also on nature and percentage of oil used as the emulsion disperse phase. As the emulsions must be stable to proceed with oxidation studies, and based on the amount of protein and oil necessary to get the highest optimal ESI response (128 min), protein and oil amounts rendering the most stable conditions were used: 10.7 mg/mL protein solution (myofibrillar extract or ovalbumin solution), and 9.3% MEG-3® or corn oil.

Studies on emulsion sonication on oil droplet size reduction and stability increase in model emulsions stored at 37 °C, gave as a result that 50% ultrasound amplitude during sonication stabilized for 120 h the following formulations: myofibrillar extract-MEG-3®, ovalbumin-MEG-3® and ovalbumin-corn oil. Stabilization up to 72 h of the myofibrillar extract-corn oil emulsion was achieved with 60% amplitude. Phase separation as time proceeded depended, not only on oil droplet size, but also on type and intensity of interactions of proteins adsorbed in the fat globule and fatty acids in the oil.

In general, model meat emulsions stored at 37 °C showed higher oxidation degrees as compared to control emulsions, regardless oil nature forming the disperse phase probably due to metallic ions present in the myofibrillar crude extract. During the initial 24 h of storage at 37 °C, lipid oxidation in MEG-3® model emulsions was higher than in corn oil emulsions, regardless of the emulsifying protein, as a possible result of EPA and DHA presence. However, high protein concentrations (10.7 mg/mL) decreased hydroperoxide concentration and TBARS throughout time in emulsions containing MEG-3®, as a possible dynamic antioxidant effect of proteins adsorbed to the fat globule, and in excess in the continuous phase.

Índice

Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Revisión Bibliográfica	4
1.1 Lípidos y su importancia en la dieta humana	5
1.1.1 Definición	5
1.2 Ácidos grasos	5
1.3 Ácidos grasos polinsaturados (PUFAS)	6
1.4 Ácidos grasos polinsaturados de cadena larga eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA)	7
1.4.1 Fuentes de EPA y DHA	8
1.4.2 Efectos benéficos asociados al consumo de EPA y DHA	9
1.5 Aceite de pescado MEG-3®	10
1.6 Aceite de maíz	10
1.7 Oxidación de aceites	11
1.8 Métodos para medir la oxidación de lípidos en aceites	11
1.9 Método FOX2	12
1.10 Emulsiones	12
1.11 Emulsiones modelo estabilizadas por proteínas	14
1.11.1 Propiedades de la emulsión	14
1.11.1.1 Actividad de emulsión	15
1.11.1.2 Estabilidad de emulsión	15
1.12 Proteínas miofibrilares	15
1.13 Emulsiones cárnicas	16
1.14 Optimización	17
1.14.1 Metodología de superficies de respuesta	18
1.15 Ultrasonido de alta potencia	20
1.15.1 Emulsificación por ultrasonido	21
1.16 Oxidación de emulsiones	21
Capítulo 3. Justificación	23

Capítulo 4. Hipótesis	25
Capítulo 5. Objetivos	27
5.1 Objetivo general	28
5.2 Objetivos particulares	28
Capítulo 6. Materiales y Métodos	29
6.1 Carne de cerdo	30
6.2 Albúmina de huevo	30
6.2 Aceites	30
6.2.1 Aceite de maíz	30
6.2.2 Aceite de pescado	30
6.3 Estrategia experimental	30
6.4 Técnicas analíticas	35
6.4.1 Extracto proteico miofibrilar	35
6.4.1.1 Extracción de proteínas miofibrilares	35
6.4.2 Ovoalbúmina	35
6.4.2.1 Preparación de solución de ovoalbúmina	36
6.4.3 Determinación de proteína	36
6.4.4 Evaluación del perfil electroforético en condiciones desnaturalizantes	36
6.4.5 Determinación del perfil de ácidos grasos en aceites	37
6.4.5.1 Preparación de metil ésteres	37
6.4.5.2 Separación e identificación de ésteres metílicos de ácidos grasos por cromatografía de gases	38
6.4.5.2.1 Aceite MEG-3®	38
6.4.5.2.2 Aceite de maíz	38
6.4.6 Adaptación del método de oxidación ferrosa de naranja xilenol (FOX2) para cuantificar hidroperóxidos lipídicos en aceite	39
6.4.6.1 Tratamiento de las muestras de aceite	39
6.4.6.1.1 MEG-3®	39
6.4.6.1.2 Aceite de maíz	40
6.4.6.2 Preparación del reactivo de oxidación ferrosa de naranja xilenol (FOX2)	40
6.4.6.3 Evaluación del efecto de la concentración de aceite en el desempeño	

del ensayo FOX2	40
6.4.6.3.1 MEG-3®	40
6.4.6.3.2 Aceite de maíz	41
6.4.6.4 Influencia del volumen de la alícuota de aceite solubilizado en propan-1-ol en la determinación de hidroperóxidos por el método FOX2	41
6.4.6.4.1 MEG-3®	41
6.4.6.4.2 Aceite de maíz	42
6.4.6.5 Cuantificación de hidroperóxidos por el método FOX2	42
6.4.6.6 Diseño experimental y análisis estadístico de los datos	42
6.4.6.6.1 Evaluación preliminar del efecto del volumen de la alícuota de una solución de aceite en propan-1-ol en la concentración de hidroperóxidos utilizando el método FOX2	42
6.4.6.6.1.1 MEG-3®	43
6.4.6.6.1.2 Aceite de maíz	43
6.4.6.6.2 Evaluación del efecto del volumen de la alícuota de una solución de aceite en propan-1-ol y de las condiciones de almacenamiento del aceite en la concentración de hidroperóxidos utilizando el método FOX2	43
6.4.6.6.2.1 MEG-3®	43
6.4.6.6.2.2 Aceite de maíz	44
6.4.7 Validación de la adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite	44
6.4.7.1 Tratamiento previo de las muestras de aceite	44
6.4.7.1.1 Oxidación de aceite MEG-3®	44
6.4.7.1.2 Oxidación de aceite de maíz	45
6.4.7.2 Cuantificación de hidroperóxidos lipídicos en muestras de aceite	45
6.4.7.2.1 Método FOX2 adaptado	45
6.4.7.2.2 Valor peróxido (VP)	46
6.4.8 Emulsión modelo	46
6.4.8.1 Emulsión modelo cárnica	46
6.4.8.2 Emulsión modelo control	47
6.4.8.3 Formación de la emulsión	47
6.4.8.4 Índice de actividad de la emulsión (EAI)	47
6.4.8.5 Índice de estabilidad de la emulsión (ESI)	48

6.4.8.6. Evaluación del efecto de la concentración de proteína y del tipo y porcentaje de aceite en las propiedades emulsificantes EAI y ESI	48
6.4.8.6.1 Diseño experimental	48
6.4.8.6.2 Análisis estadístico de los datos	49
6.4.9 Optimización de los índices EAI y ESI por la metodología de superficies de respuesta (MSR)	49
6.4.9.1 Formación de la emulsión	49
6.4.9.2 Índice de actividad de la emulsión (EAI)	49
6.4.9.3 Índice de estabilidad de la emulsión (ESI)	49
6.4.9.4 Diseño experimental	50
6.4.9.4.1 Emulsión modelo cárnica: extracto miofibrilar-MEG-3®	51
6.4.9.4.2 Emulsión modelo cárnica: extracto miofibrilar-aceite de maíz	52
6.4.9.4.3 Emulsión modelo control: ovoalbúmina-MEG-3®	53
6.4.9.4.4 Emulsión modelo control: ovoalbúmina-aceite de maíz	54
6.4.9.5 Análisis estadístico	55
6.4.9.6 Optimización	55
6.4.10 Estabilización de emulsiones modelo	56
6.4.10.1 Formación de la emulsión	56
6.4.10.2 Evaluación del efecto de la amplitud de ultrasonido en el tamaño de los glóbulos de la emulsión	56
6.4.10.3 Determinación del tamaño de los glóbulos en la emulsión	57
6.4.10.4 Evaluación de la estabilidad física de emulsiones modelo sometidas a sonicación	57
6.4.11 Oxidación de emulsiones	58
6.4.11.1 Pruebas preliminares	58
6.4.11.2 Determinación de hidroperóxidos lipídicos	58
6.4.11.3 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	59

Capítulo 7. Caracterización de materiales empleados para formar emulsiones

modelo	60
7.1 Evaluación del perfil electroforético en condiciones desnaturalizantes de las proteínas empleadas como emulsificantes	61
7.1.1 Extracto miofibrilar	61
7.1.2 Ovoalbúmina grado II	64

7.2 Perfil de ácidos grasos del aceite de pescado MEG-3®	66
7.3 Perfil de ácidos grasos del aceite comercial de maíz	68

Capítulo 8. Adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite

8.1 Aceite de pescado MEG-3®	72
8.1.1 Efecto de la concentración de aceite en el desempeño del método FOX2	73
8.1.2 Influencia del volumen de la alícuota de aceite solubilizado en propan-1-ol en la determinación de hidroperóxidos por el método FOX2	76
8.1.3 Validación de la adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite de pescado MEG-3®	82
8.1.3.1 Comparación entre métodos analíticos	82
8.2 Aceite de maíz	85
8.2.1 Efecto de la concentración de aceite en el desempeño del método FOX2	85
8.2.2 Influencia del volumen de la alícuota de aceite solubilizado en propan-1-ol en la determinación de hidroperóxidos por el método FOX2	86
8.2.3 Validación de la adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite de maíz	90
8.2.3.1 Comparación entre métodos analíticos	90

Capítulo 9. Optimización de los índices de actividad (EAI) y estabilidad (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

9.1 Estudio preliminar	94
9.1.1 Evaluación del efecto de la concentración de proteína y del tipo y porcentaje de aceite en las propiedades emulsificantes EAI y ESI	95
9.2 Optimización de EAI y ESI en emulsiones modelo cárnicas: extracto miofibrilar-MEG-3®	99
9.2.1 EAI	99
9.2.1.1 Análisis de superficies de respuesta	99
9.2.1.2 Optimización	103
9.2.1.3 Validación del modelo de superficie de respuesta reducido	104
9.2.2 ESI	106
9.2.2.1 Análisis de superficies de respuesta	106

9.2.2.2 Optimización	112
9.2.2.3 Validación del modelo de superficie de respuesta	112
9.3 Optimización de EAI y ESI en emulsiones modelo cárnicas: extracto miofibrilar- aceite de maíz	115
9.3.1 EAI	115
9.3.1.1 Análisis de superficies de respuesta	115
9.3.1.2 Optimización	119
9.3.1.3 Validación del modelo de superficie de respuesta reducido	120
9.3.2 ESI	122
9.3.2.1 Análisis de superficies de respuesta	122
9.3.2.2 Optimización	127
9.3.2.3 Validación del modelo de superficie de respuesta	127
9.4 Optimización de EAI y ESI en emulsiones modelo: ovoalbúmina-aceite MEG-3®	130
9.4.1 EAI	130
9.4.1.1 Análisis de superficies de respuesta	130
9.4.1.2 Optimización	135
9.4.1.3 Validación del modelo de superficie de respuesta reducido	135
9.4.2 ESI	137
9.4.2.1 Análisis de superficies de respuesta	137
9.4.2.2 Optimización	143
9.4.2.3 Validación del modelo de superficie de respuesta	143
9.5 Optimización de EAI y ESI en emulsiones modelo: ovoalbúmina-aceite de maíz	145
9.5.1 EAI	145
9.5.1.1 Análisis de superficies de respuesta	145
9.5.1.2 Optimización	150
9.5.1.3 Validación del modelo de superficie de respuesta reducido	150
9.5.2 ESI	152
9.5.2.1 Análisis de superficies de respuesta	152
9.5.2.2 Optimización y validación de un modelo lineal	157
Capítulo 10. Estabilización de emulsiones modelo por sonicación	164
10.1 Evaluación del efecto de la amplitud de ultrasonido en el tamaño de los glóbulos de la emulsión	165
10.2 Estabilidad de emulsiones modelo sonicadas	169

Capítulo 11. Oxidación de emulsiones modelo	173
11.1 Estandarización del nivel de oxidación de las muestras de aceite	175
11.2 Estabilidad oxidativa de emulsiones modelo	175
11.2.1 Efecto del tipo de aceite usado como fase dispersa en la estabilidad oxidativa de emulsiones modelo	177
11.2.2 Influencia de la naturaleza de la solución proteica emulsificante en la estabilidad oxidativa de emulsiones modelo	178
Capítulo 12. Conclusiones y perspectivas	182
Capítulo 13. Referencias	187
Capítulo 14. Anexos	199
Anexo I. Curva patrón para la determinación de proteína por el método de Biuret	200
Anexo II. Curva patrón para estimar masas moleculares de proteínas separadas por electroforesis SDS-PAGE	201
Anexo III. Cromatograma del perfil de ácidos grasos de aceite MEG-3® obtenido por CG	202
Anexo IV. Cromatograma del perfil de ácidos grasos de aceite de maíz obtenido por CG-MS	203
Anexo V. Curva patrón para cuantificar hidroperóxidos durante la adaptación del método FOX2	204
Anexo VI. Ejemplo de los datos del DCC para la optimización de EAI por MSR en emulsiones modelo cárnicas preparadas con aceite de maíz como fase dispersa	205
Anexo VII. Ejemplo de la optimización de EAI por MSR en emulsiones modelo cárnicas preparadas con aceite de maíz como fase dispersa, con ayuda de Statgraphics Centurion XVI	207
Anexo VIII. Análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del tipo de emulsión y del porcentaje de amplitud de ultrasonido en el diámetro promedio de los glóbulos de aceite ($d_{3,2}$ en μm) en los sistemas o/w. Ejemplo de los datos obtenidos con ayuda del programa estadístico Minitab® v.11	209

Anexo IX. Análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiple de Tukey, para determinar diferencias significativas ($P < 0.05$) en el diámetro medio ($d_{3,2}$ en μm) de los glóbulos de aceite en emulsiones modelo almacenadas a $37\text{ }^\circ\text{C}$. Ejemplo para los sistemas ovoalbúmina-MEG-3® sonicados con una amplitud de ultrasonido de 50%. Los datos se analizaron con ayuda del programa estadístico Minitab® v.11	210
Anexo X. Curva patrón para determinar productos primarios de oxidación (hidroperóxidos) en emulsiones modelo o/w	211
Anexo XI. Curva patrón para determinar productos secundarios de oxidación (TBARS) en emulsiones modelo o/w	212
Anexo XII. Publicación en revista internacional indexada	213

CAPITULO 1
INTRODUCCIÓN

La tendencia actual de los consumidores es obtener alimentos convenientes formulados con ingredientes naturales que les proporcionen efectos benéficos al consumirlos de manera habitual en sus dietas. Por lo anterior, el interés en los ácidos grasos polinsaturados de cadena larga *n-3*, particularmente eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA) ha aumentado, puesto que su importancia nutricional se encuentra bien documentada e incluye efectos antitrombóticos, antiinflamatorios e incluso un aumento en la ingesta conduce a la reducción del riesgo de enfermedad coronaria (Givens y Gibbs, 2006). Los ácidos grasos polinsaturados de cadena larga *n-3* presentes de manera natural en los aceites de alga y pescado se oxidan fácilmente produciendo rancidez y productos volátiles con sabor y olor desagradable, cuando se exponen al aire, luz, temperaturas elevadas y metales de transición (Harris, 2007). Por lo tanto, la alta susceptibilidad a la oxidación que presentan estos ácidos limita su uso en alimentos procesados y como suplementos nutricionales en productos fortificados (Frankel et al., 2002). Aún así, se han desarrollado productos alimenticios a los que se les han adicionado ácidos EPA y/o DHA, algunos de ellos se caracterizan por ser emulsiones aceite en agua (o/w). No obstante, estos sistemas también resultan ser susceptibles a la oxidación.

El desarrollo de estos productos ha requerido de un análisis previo de la estabilidad oxidativa de emulsiones modelo o/w, formuladas con aceites de alga o ácidos polinsaturados específicos como el linoleico, y estabilizadas con proteínas con actividad emulsificante como caseína bovina o caprina, proteínas de aislado de suero, etcétera (Mora-Gutierrez et al., 2010; Ries et al., 2010).

El uso de proteínas como agentes emulsificantes para estabilizar emulsiones o/w formuladas empleando aceites marinos con alto contenido de ácidos grasos EPA y DHA resulta interesante, puesto que se ha reportado que proteínas como la albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) tiene la habilidad de suprimir la formación de hidroperóxidos lipídicos y aldehídos derivados de la descomposición de esos compuestos, como consecuencia de la reacción entre radicales alcoxil formados a partir de hidroperóxidos con los residuos de aminoácidos de la proteína (Refsgaard et al., 2000).

Además de las proteínas mencionadas anteriormente, existen otras que también poseen propiedades de superficie importantes que les brindan la capacidad de actuar como compuestos emulsificantes potentes, tal es el caso de las proteínas miofibrilares, las cuales se extraen del tejido muscular de distintas especies animales como: cerdo, res, pescado, entre otros.

Si bien, diversos autores han determinado las propiedades emulsificantes como los índices de actividad y estabilidad (EAI y ESI), en emulsiones modelo o/w preparadas con proteínas miofibrilares y aceite de maíz u oliva, como fase dispersa de la emulsión (Feng y Xiong, 2003; Sato et al., 2003; Zorba, 2006). No hay trabajos científicos concretos que reporten las propiedades emulsificantes y la estabilidad física y oxidativa de sistemas modelo o/w, formulados con proteínas miofibrilares y aceites con alto contenido de ácidos grasos polinsaturados de cadena larga *n-3*.

Con base en lo expuesto en los párrafos anteriores, esta investigación se realizó para aportar conocimiento relacionado con el efecto de la utilización de un aceite de pescado comercial con alto contenido de ácidos grasos EPA y DHA, en los índices EAI, ESI y en la estabilidad física y oxidativa de emulsiones modelo o/w denominadas cárnicas, por ser preparadas con un extracto crudo de proteínas miofibrilares obtenido de lomo de cerdo.

CAPITULO 2
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Lípidos y su importancia en la dieta humana

Uno de los consejos en cuanto a la alimentación se refiere, es llevar una dieta reducida en grasas, eligiendo alternativas con contenidos lipídicos bajos cuando sea posible, sin embargo es necesaria cierta cantidad de grasa en una dieta saludable. Los lípidos juegan un papel importante en la salud y nutrición humana ya que aportan cerca del 40% del total de las calorías del régimen alimenticio de los países más industrializados. Son una fuente energética importante puesto que cada gramo genera 9 kcal (Badui, 1990). Además, dichos compuestos son indispensables en la dieta humana ya que son la fuente de ácidos grasos esenciales. Las plantas y los animales, incluyendo las especies marinas, proporcionan las cantidades de lípidos necesarias para el buen funcionamiento de los organismos. Las grasas vegetales contribuyen con el 70% de la producción global de aceite, mientras que los aceites marinos contribuyen con el 2%, siendo el resto, los obtenidos de animales terrestres (Narayan et al., 2006).

1.1.1 Definición

Los lípidos constituyen un grupo diverso de compuestos, generalmente solubles en disolventes orgánicos pero con escasa solubilidad en agua. Son los componentes principales del tejido adiposo y junto con las proteínas y los carbohidratos, constituyen los componentes estructurales de las células vivas (Nawar, 2000). Estos compuestos no sólo aseguran que se cubran los requerimientos necesarios de energía, son además un componente esencial de las membranas celulares, ya que les brindan estabilidad y contribuyen con la regulación de la actividad biológica de las células asegurando que éstas puedan funcionar correctamente (Pierini y Punta, 2006). Asimismo, permiten la absorción y asimilación de vitaminas liposolubles, carotenoides. Incluso actúan como aislantes en el hombre y en los animales, ya que el tejido adiposo mantiene estable la temperatura del organismo. Otra definición menciona que los lípidos son un grupo de compuestos generalmente constituidos por carbono, hidrógeno y oxígeno, que integran cadenas hidrocarbonadas alifáticas o aromáticas, aunque en ocasiones también tienen fósforo y nitrógeno (Badui, 1990).

1.2 Ácidos grasos

La grasa dietaria se encuentra normalmente en forma de triacilglicéridos, los cuales consisten en una molécula de glicerol que contiene esterificadas tres cadenas de ácidos grasos (Bentley, 2007).

Los ácidos grasos están formados por una cadena de carbonos que contiene en sus extremos, un metil (CH₃) y un ácido (COOH) como grupos terminales (Figura 1).



Figura 1. Ácido esteárico (Hornstra, 2002).

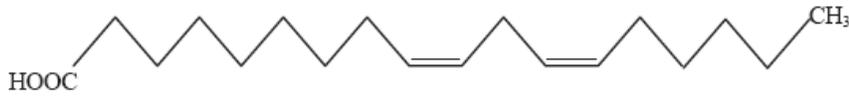
Existen dos tipos de ácidos grasos: saturados e insaturados. Los ácidos grasos insaturados pueden ser divididos en ácidos grasos monoinsaturados, los cuales contienen una doble ligadura, y ácidos grasos polinsaturados (PUFAS por sus siglas en inglés), que contienen dos o más dobles enlaces en su estructura. La composición de los ácidos grasos en los lípidos varía en función a la fuente. Los lípidos marinos generalmente contienen un intervalo más amplio de ácidos grasos, comparados con su contraparte terrestre, incluyendo plantas y animales. Los aceites vegetales están constituidos normalmente por ácidos grasos saturados e insaturados con cadenas de 16 a 18 carbonos, mientras que los aceites marinos están compuestos principalmente de ácidos grasos que contienen de 14 a 22 carbonos (Narayan et al., 2006). La mayoría de los ácidos grasos son sintetizados en el cuerpo, excepto los ácidos grasos polinsaturados llamados “esenciales”, ya que el cuerpo humano carece de las enzimas necesarias para producirlos. Es por lo anterior, que resulta importante obtenerlos a través de los alimentos. Dichos ácidos grasos polinsaturados son: el ácido α -linolénico (*n-3*) y el ácido linoleico (*n-6*) (Bentley, 2007; Warude y Kalpana, 2006).

1.3 Ácidos grasos polinsaturados (PUFAS)

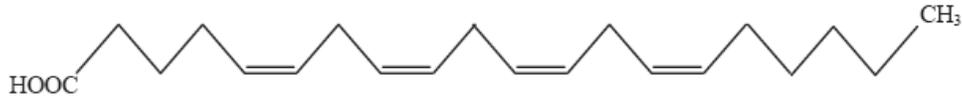
El ácido α -linolénico (ALA) y el ácido linoleico (LA) son los ácidos grasos polinsaturados esenciales de los cuales se derivan las familias omega 3 (*n-3*) y omega 6 (*n-6*), respectivamente (Warude y Kalpana, 2006). Estos ácidos se han clasificado de esa manera, tomando en cuenta, la posición del primer doble enlace presente en la cadena de carbonos, partiendo del grupo metil terminal (Figura 2).

Los ácidos grasos ALA y LA pueden participar en procesos de desaturación y elongación, para formar ácidos grasos polinsaturados de cadena larga.

FAMILIA DEL ÁCIDO LINOLEICO (Ácidos grasos *n*-6)

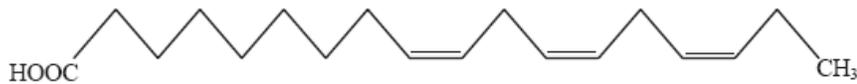


Ácido linoleico (LA; 18:2 *n*-6)
(ácido cis9, cis 12-octadecadienoico)



Ácido araquidónico (AA; 20:4 *n*-6)
(ácido cis5, cis8, cis11, cis14-eicosatetranoico)

FAMILIA DEL ÁCIDO LINOLÉNICO (Ácidos grasos *n*-3)



Ácido α -linolénico (ALA; 18:3 *n*-3)
(ácido cis9, cis12, cis15-octadecatrienoico)



Ácido eicosapentanoico (EPA; 20:5 *n*-3)
(ácido cis5, cis8, cis11, cis14, cis17-eicosapentanoico)



Ácido docosahexanoico (DHA; 22:6 *n*-3)
(ácido cis4, cis7, cis10, cis13, cis16, cis19-docosahexanoico)

Figura 2. Estructuras químicas de ácidos grasos polinsaturados *n*-3 y *n*-6 (Narayan et al., 2006).

1.4 Ácidos grasos polinsaturados de cadena larga eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA)

Los ácidos eicosapentanoico (EPA; 20:5 *n*-3) y docosahexanoico (DHA; 22:6 *n*-3) son ácidos grasos importantes que pertenecen a la familia *n*-3, conocida comúnmente como omega 3. Estos ácidos grasos son los más insaturados, ya que contienen 5 y 6 dobles enlaces, respectivamente. Tanto el EPA como el DHA se derivan del ALA, sin embargo, el metabolismo de los mamíferos no

puede sintetizar el ALA, por tanto su deficiencia conduce a la de los ácidos EPA y DHA. De manera general, los mamíferos no pueden elongar y desaturar de manera eficiente el ALA para producir EPA y DHA. Lo anterior se debe a que la enzima desaturasa involucrada en la conversión de ALA a EPA y DHA ataca competitivamente al ALA y al LA, lo cual, se traduce en la inhibición de la síntesis *in vivo* de EPA/DHA a partir de ALA. Es por ello, que los humanos deben asegurar una ingesta directa de ALA, EPA y DHA para obtener los efectos fisiológicos relacionados con EPA y DHA (Narayan et al., 2006).

1.4.1 Fuentes de EPA Y DHA

Las fuentes más ricas en EPA y DHA son los aceites de pescado (Bentley, 2007). Estos ácidos se encuentran principalmente en peces grasos como el salmón, arenque, sardinas, entre otros (Stanner, 2000). Hornstra (2002), menciona que sólo una pequeña cantidad de estos ácidos está presente en la carne (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Fuentes animales de EPA y DHA.

Fuente	(EPA+DHA) g/100 g
Macarela o caballa	2.5
Salmón	1.8
Arenque	1.6
Atún	1.6
Res	0.25
Cordero (pierna)	0.5
Cerdo	0.7

Además de la ingesta de pescado existen otras alternativas para garantizar un consumo óptimo de ácidos grasos polinsaturados de cadena larga *n-3*, como diversos suplementos alimenticios y alimentos enriquecidos con aceite de pescado o bien, polvo de aceite de pescado obtenido por microencapsulación (Kolanowski et al., 2007). Bauch et al. (2006) reportaron la reciente introducción al mercado europeo de dos nuevos aceites ricos en DHA que cumplieron con la regulación vigente, producidos a partir de microalgas.

En los últimos años ha aumentado el número de productos alimenticios que han sido fortificados o enriquecidos con DHA, por ejemplo, productos lácteos, pasta, crema de cacahuete, cereal e incluso huevos con concentraciones altas de DHA. Sin embargo, el área más importante en el desarrollo de la aplicación de DHA es la de las fórmulas lácteas infantiles, donde se aprecia y promueve en las etiquetas como un ingrediente esencial (Vosburgh, 2008).

1.4.2 Efectos benéficos asociados al consumo de EPA y DHA

Los ácidos polinsaturados de cadena larga *n-3* como el EPA y el DHA están asociados con procesos fisiológicos que intervienen en la salud humana. Estos ácidos son componentes esenciales de las membranas y constituyen cerca del 30% de los ácidos grasos en el cerebro. En la retina, el DHA conforma más del 60% del total de ácidos grasos (Warude y Kalpana, 2006).

Los efectos fisiológicos de los ácidos grasos *n-3* en los humanos han atraído un mayor interés entre los bioquímicos y nutriólogos. Los ácidos EPA y DHA han provocado cambios bioquímicos y fisiológicos significativos en el cuerpo. Muchos de estos cambios ejercen una influencia positiva en la nutrición y salud humana (Narayan et al., 2006). Los beneficios asociados a dichos ácidos están bien documentados e incluyen efectos antitrombóticos, antiinflamatorios e incluso un aumento en la ingesta conduce a la reducción del riesgo de enfermedad coronaria (Givens y Gibbs, 2006). El EPA y DHA ayudan a prevenir el crecimiento de células cancerígenas. Recientemente se evaluó su habilidad para prevenir cáncer de próstata, mama y colon (Vosburgh, 2008). Además permiten que los tejidos absorban y metabolicen de una manera más eficiente la glucosa. Lo anterior sugiere que el EPA y el DHA juegan un papel importante en la regulación del metabolismo celular, particularmente en las membranas celulares (Narayan et al., 2006). Diversas investigaciones sugieren que un nivel elevado de ácidos grasos *n-3* en los fosfolípidos que componen las membranas celulares puede mejorar la permeabilidad permitiendo el paso de la insulina, la cual controla el consumo de glucosa en las células. Estudios clínicos muestran que el DHA es esencial en el crecimiento y desarrollo del cerebro de los infantes y en el mantenimiento del funcionamiento normal del cerebro en adultos (Stanner, 2000).

Con base en lo mencionado anteriormente, se han lanzado al mercado un gran número de productos alimenticios que han sido adicionados o enriquecidos con ácidos grasos *n-3*. Muchos de estos alimentos se caracterizan por ser sistemas de emulsiones aceite en agua.

1.5 Aceite de pescado MEG-3®

El aceite MEG-3® es un producto purificado derivado de aceite crudo de pescado extraído de múltiples especies marinas comestibles capturadas en la costa de Perú. Estas especies de pescado incluyen principalmente a la anchoa (95-99%), sardina (1-5%), jurel del Pacífico y otras especies ocasionales. Aproximadamente en promedio, 30% del aceite MEG-3® está compuesto de dos ácidos grasos omega-3, el ácido eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA), los cuales se encuentran en la forma de triacilglicéridos. El contenido total de EPA+DHA se encuentra en el intervalo 23-36%, donde el EPA constituye cerca de 10-21% y el DHA 8-20% del producto.

El aceite MEG-3® producido por la compañía Ocean Nutrition Canada Ltd. (ONC) es un producto “reconocido generalmente como seguro” (GRAS, por sus siglas en inglés) y es sustancialmente similar a otros aceites de pescado comestibles reconocidos por el gobierno de los Estados Unidos de América para su adición en alimentos, como el aceite de arenque y aceite de pequeños pescados pelágicos planctívoros, éste último derivado primariamente de sardina y anchoa, los mismos peces de los cuales se obtiene el producto MEG-3®.

La forma comercial del aceite MEG-3® apropiada para su adición directa a los alimentos involucra un proceso de purificación del aceite de pescado crudo que requiere de pasos básicos como: refinado con álcalis, filtración en frío, deodorización, blanqueado y mezclado con tocoferoles naturales u otros antioxidantes (www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/grn000138.pdf).

1.6 Aceite de maíz

Tradicionalmente, el aceite de maíz se extrae del germen aislado del grano durante el proceso de molienda húmeda, usando hexano (Winkler-Moser y Breyer, 2011).

El aceite de maíz juega un papel muy importante en la dieta humana. Es una fuente concentrada de energía (calorías), es muy digerible, proporciona ácidos grasos esenciales, vitamina E y es una fuente rica de ácidos grasos polinsaturados, los cuales ayudan a regular los niveles de colesterol en sangre y a reducir la presión arterial elevada (Hauman, 1985; Dupont et al., 1990).

Giacometti et al. (2012) reportaron que la composición de ácidos grasos del aceite de maíz obtenida por cromatografía de gases, mostró que este aceite vegetal contiene principalmente ácido linoleico 18:2 *n-6* (57.06%) con un ratio de ácidos grasos *n-6/n-3* de aproximadamente 190:1, constituido por niveles totales de *n-6* y *n-3* de 57.06% y 0.3%, respectivamente. Winkler-Moser y Breyer

(2011) también encontraron que los ácidos grasos más abundantes en el aceite extraído del germen de grano de maíz fueron el linoleico (18:2 *n-6*) 55.0%, oleico (18:1) 29.2% y palmítico (16:0) 13.1%.

Los usos principales del aceite de maíz en los alimentos (ya sea como consumidor o productor) incluyen: aceite para cocinar y en ensaladas, margarina, mezcla para mantequilla, mayonesa y aderezos tipo emulsión (CRA, 2006).

1.7 Oxidación de aceites

La oxidación lipídica limita la utilización de aceites con altos contenidos de ácidos grasos polinsaturados, como ciertos aceites vegetales y particularmente aceite de pescado, en alimentos procesados y como suplementos nutricionales en alimentos fortificados (Frankel et al., 2002).

La oxidación de los lípidos inicia con la producción de compuestos intermedios inestables como los radicales libres e hidroperóxidos. Los hidroperóxidos lipídicos son los productos primarios de la oxidación en cadena por radicales libres (Punta et al., 2005). La reacción posterior de los hidroperóxidos con el oxígeno lleva a la formación de peróxidos cíclicos (Pierini y Punta 2006), aldehídos, cetonas y alcoholes, los cuales son responsables de olores y sabores desagradables (Ladikos y Lougovois, 1990). La evaluación de la oxidación de los lípidos presentes en aceites se ha llevado a cabo utilizando diversas técnicas, algunas de las cuales se mencionan a continuación.

1.8 Métodos para medir la oxidación de lípidos en aceites

Los métodos usados para la valoración de la oxidación lipídica en aceites comestibles miden los productos de la fase de iniciación y de las fases de propagación, los productos de la fase de terminación, consumo de oxígeno o sustrato. El método más usado, es el valor peróxido (PV), el cual mide la concentración total de peróxidos e hidroperóxidos formados en la fase inicial de oxidación. Sin embargo, las principales limitantes del PV son su baja sensibilidad, las grandes cantidades de muestra requeridas y las dificultades para determinar el fin de la titulación. Por otro lado, la prueba de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) permite cuantificar malonaldehído y otros aldehídos, sin embargo, valores bajos en la prueba no son un indicador absoluto de la calidad de un aceite. Los aldehídos pueden no haberse formado todavía o haberse perdido durante el procesamiento y almacenamiento. La limitante de los métodos utilizados

comúnmente es su baja especificidad debido principalmente a la interferencia de compuestos menores que no son hidroperóxidos. La cromatografía de gases (CG) y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) permiten el análisis de los productos de descomposición de hidroperóxidos, pero se requiere de equipos específicos y en el caso del HPLC el análisis cuantitativo resulta difícil, puesto que no está disponible un detector universal (Kolanowski et al., 2007). Métodos más simples que miden hidroperóxidos por titulación y métodos colorimétricos basados en oxidación de yodo o hierro están disponibles. Sin embargo, un método simple de rutina debe ser reproducible y sensible. En este marco y basado en las propiedades oxidantes de los hidroperóxidos, el método de oxidación ferrosa de naranja xilenol (FOX) es de interés.

1.9 Método FOX2

El método FOX está basado en la habilidad de los hidroperóxidos de convertir iones ferrosos en férricos los cuales subsecuentemente forman un complejo con el naranja xilenol (XO) que es determinado mediante espectrofotometría. Este método ofrece la posibilidad de determinar el contenido total de hidroperóxidos rápidamente con un costo bajo y evaluar la susceptibilidad a la oxidación. Además, se ha reportado que el método FOX es simple, sensible y selectivo para medir la cantidad total de hidroperóxidos con una buena precisión y con un potencial de utilidad en una variedad de matrices (Bou et al., 2008). En su versión II (FOX2), el método permite la cuantificación de concentraciones bajas de hidroperóxidos en presencia de niveles altos de ácidos grasos no peroxidados (DeLong et al., 2002).

1.10 Emulsiones

Las emulsiones son muy importantes para la industria de los alimentos, ya que estos sistemas están presentes en una gran cantidad de productos naturales y procesados (Palazolo et al., 2004). Friberg (2007) señala que tradicionalmente una emulsión se ha definido como un sistema formado por dos líquidos macroscópicamente dispersos (agua y aceite), en el cual uno de ellos se encuentra disperso en el otro en forma de glóbulos macroscópicos. La definición de emulsión descrita por McClements (2007), Decker et al. (2005) y Basu et al. (2004) menciona que una emulsión consiste de dos líquidos inmiscibles, donde uno de los líquidos está disperso en forma de pequeños glóbulos esféricos en el otro líquido.

El diámetro promedio de los glóbulos en productos alimenticios emulsificados típicamente cae en el intervalo de 0.1 a 100 μm . Las emulsiones alimenticias pueden ser clasificadas de manera conveniente de acuerdo a la distribución espacial relativa de las diferentes fases (McClements, 2007). De esta manera Decker et al. (2005) mencionan que las emulsiones pueden ser: (a) aceite en agua o/w y (b) agua en aceite w/o (por sus siglas en inglés). Una emulsión o/w, es aquella en la que los glóbulos de aceite se encuentran dispersos en la fase acuosa, ejemplos de este tipo de emulsión son: la leche, crema, helado, aderezos, mayonesas, bebidas, sopas y salsas. Por otro lado, una emulsión w/o, es un sistema en el que glóbulos de agua se hayan dispersos en una fase de aceite, la margarina y mantequilla son ejemplos de emulsiones agua en aceite (Friberg, 2007; McClements, 2007). La materia que forma los glóbulos se denomina usualmente fase dispersa, discontinua o interna. A su vez, la materia que conforma el líquido circundante es conocida como fase dispersante, continua o externa. Además de los sistemas mencionados anteriormente, es posible crear varios tipos de emulsiones múltiples. Si una emulsión o/w se emulsifica en aceite, se obtiene una emulsión doble o/w/o (Friberg, 2007). Se pueden preparar también, emulsiones agua en aceite en agua, w/o/w y aceite en agua en agua, o/w/w (McClements, 2007).

Las emulsiones son termodinámicamente inestables debido a la energía libre positiva que necesitan para aumentar el área superficial entre las fases de aceite y agua. En consecuencia, tienden a formar fases separadas después de transcurrido un determinado tiempo, en una fase de aceite localizada en la parte superior (densidad menor) de la fase acuosa (densidad mayor). Para obtener emulsiones que sean estables por un periodo de tiempo razonable (días, meses o incluso años) es necesario adicionar sustancias químicas conocidas como estabilizantes antes de llevar a cabo la homogenización de las fases (Decker et al., 2005). Los estabilizantes pueden ser clasificados, en función a su modo de operación, en emulsificantes o modificadores de textura.

Los emulsificantes son moléculas activas que se adsorben en la superficie de los glóbulos de la emulsión durante la homogenización. Estas moléculas forman una membrana protectora que previene la agregación de los glóbulos al evitar que se acerquen demasiado unos a otros. Los emulsificantes más utilizados en la industria de los alimentos son proteínas (caseína, proteínas del suero, soya y huevo), polisacáridos, fosfolípidos (de huevo, lecitina de soya), pequeñas moléculas surfactantes como el Tween y partículas sólidas (Decker et al., 2005; McClements, 2007).

Se puede considerar que una emulsión está formada por tres regiones: el interior de los glóbulos, la fase continua y la membrana interfacial. La membrana interfacial está compuesta por una estrecha región que rodea cada glóbulo de la emulsión, la cual es una mezcla de aceite, agua y emulsificante.

Las diferentes moléculas presentes en la emulsión se particionan en estas tres regiones de acuerdo a su polaridad y a su actividad surfactante. Las moléculas no polares se localizan predominantemente en la fase de aceite, las moléculas polares en la fase acuosa y las moléculas surfactantes en la interfase. El ambiente molecular de las especies presentes en la emulsión puede tener un efecto significativo en su reactividad química. Por tanto, la naturaleza de la membrana interfacial del glóbulo de la emulsión es importante en las reacciones de oxidación de los lípidos porque dictaría la manera en que los lípidos (ácidos grasos insaturados e hidroperóxidos) podrían interactuar con los prooxidantes de la fase acuosa, tales como: metales de transición y especies reactivas del oxígeno (Decker et al., 2005).

1.11 Emulsiones modelo estabilizadas por proteínas

Las proteínas son biomoléculas complejas de elevado peso molecular constituidas por cadenas de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos (Schut, 1976) y se caracterizan por poseer propiedades funcionales que les permiten desempeñar un papel importante en los procesos de producción de alimentos y en la obtención de atributos de calidad de los mismos. De manera puntual, las propiedades de superficie son importantes e interesantes, puesto que están relacionadas con la capacidad que poseen las proteínas para formar y estabilizar emulsiones (Pour-El, 1981). Además, dichas biomoléculas son aditivos que han sido calificados como generalmente seguros (GRAS), por lo tanto, pueden ser utilizados en los alimentos para producir emulsiones físicamente estables, debido a que alteran las propiedades de la interfase del glóbulo de la emulsión aumentando su estabilidad física y oxidativa.

Asimismo, investigaciones previas han mostrado que las proteínas de pescado presentan propiedades funcionales que les permiten ser utilizadas en productos alimenticios, ya que bajo ciertas condiciones, éstas han sido efectivas para formular y emulsificar sistemas modelo o/w. Petursson et al. (2004) demostraron que las proteínas miofibrilares de pescado (principalmente miosina) pueden ser utilizadas para obtener emulsiones modelo aceite en agua estables.

1.11.1 Propiedades de la emulsión

La habilidad de las proteínas para formar y estabilizar una emulsión es dependiente del balance adecuado entre su peso molecular, carga, hidrofobicidad y flexibilidad molecular (Zhang et al.,

2009). Las propiedades emulsificantes de las proteínas como la capacidad de emulsificación y el índice de actividad y estabilidad de la emulsión permiten caracterizar la efectividad de una proteína utilizada como emulsificante.

1.11.1.1 Actividad de emulsión

Se define como el área interfacial creada por el emulsificante. El método más utilizado para evaluar la actividad de la emulsión, es el propuesto por Pearce y Kinsella (1978), basado en técnicas turbidimétricas. Dicho método considera que la turbidez producida por una dispersión de partículas es proporcional al área interfacial. Asimismo, estos autores definen la actividad de emulsión como el área interfacial creada (medida en m^2) y estabilizada por una concentración dada de proteína (determinada en gramos) diluida 250 veces en un medio estabilizante. El índice de actividad depende del volumen de la emulsión, el tipo de homogenizador empleado, la velocidad y duración de la homogenización, la concentración de proteína y la cantidad de aceite adicionado, por lo que debe tenerse cuidado en las condiciones experimentales, así como, evitar la incorporación de aire, la formación de flóculos y el cremado durante las lecturas (Wagner, 2000).

1.11.1.2 Estabilidad de emulsión

La medición de la estabilidad de una emulsión involucra el análisis de los cambios ocurridos en la emulsión, como la pérdida de integridad del sistema por la separación de fases debido a los mecanismos de desestabilización en la emulsión. Una de las formas más sencillas y más utilizadas para cuantificar los cambios en la emulsión, es la aplicación de métodos turbidimétricos (Pearce y Kinsella, 1978), basados en medidas espectrofotométricas a lo largo de un intervalo de tiempo.

1.12 Proteínas miofibrilares

De manera particular, las proteínas cárnicas que participan de una manera más significativa en las propiedades funcionales de un alimento, son las proteínas miofibrilares. Estas desarrollan un papel importante en la elaboración de productos cárnicos, puesto que son capaces de retener agua, emulsificar y gelificar (García-Barrientos, 2007). El estado fisicoquímico de las proteínas miofibrilares afecta la funcionalidad de los sistemas cárnicos y juega un papel directo en el valor y

la calidad de la carne procesada (Li, 2006). Entre las proteínas miofibrilares, la miosina y la actina son las más importantes (Zorba, 2006). Estas proteínas se encuentran presentes en el tejido muscular en porcentajes de cerca del 42% y 16%, respectivamente, y constituyen alrededor del 55-60% del total de las proteínas miofibrilares (Feiner, 2006).

Miosina

La miosina es la proteína más abundante en la carne. Presenta un peso molecular de entre 200 y 510 kDa, contiene grandes cantidades de residuos de ácido aspártico, ácido glutámico y una pequeña cantidad de residuos de aminoácidos alcalinos histidina, lisina y arginina. Debido a su composición de aminoácidos se espera que la miosina esté cargada negativamente a pH fisiológico.

Actina

La actina forma parte de las proteínas contráctiles. Puede existir en dos formas: globular (actina G) cuando el ATP está unido a ella y fibrosa (actina F), cuando es extraída del tejido muscular con agua o sales neutras. La actina G polimeriza a la forma F, con la simultánea transformación de ATP a ADP. La actina G tiene un peso molecular cercano a los 40-60 kDa (Schut, 1976).

Se han reportado diferencias en la funcionalidad de las proteínas miofibrilares obtenidas de diferentes especies (pescados, cerdo, pollo) y de distintos tipos de tejidos musculares (liso, estriado, cardíaco), dichas diferencias están relacionadas con el polimorfismo de la miosina (García-Barrientos, 2007). Petursson et al. (2004) señalan que la actomiosina de merluza posee una actividad y estabilidad emulsificante mayor que la actomiosina de pollo y cerdo, siendo por tanto, más efectiva para producir emulsiones estables.

1.13 Emulsiones cárnicas

Las emulsiones cárnicas son mezclas de carne compuestas por agua, proteína, grasa, sal y pequeñas cantidades de otros ingredientes. Productos como salchichas Frankfurt, bologna, etcétera, son emulsiones que ocupan un lugar importante en la dieta de los países desarrollados.

Las proteínas de la carne funcionan como emulsificantes naturales en las emulsiones cárnicas. Para obtener una emulsión estable, estas proteínas deben rodear las partículas de grasa presentes en la mezcla, antes de someter la emulsión a cocimiento. La miosina es la proteína más importante encargada de emulsificar las grasas y retener agua en carnes procesadas. Dicha proteína logra lo anterior, al formar y mantener unida la interfase aceite-agua durante los pasos de la emulsificación. La estabilidad de una emulsión aumenta cuando las partículas de grasa se vuelven más pequeñas y está presente una cantidad suficiente de proteína para cubrir a todas las partículas de grasa. La temperatura de la emulsión aumenta durante el proceso de corte y homogenización, lo anterior provoca que la tensión en la superficie de las partículas de grasa disminuya. Este descenso en la tensión superficial favorece el proceso de reducción del tamaño de partícula e incrementa el área superficial de las partículas de grasa, en consecuencia, se requiere de una mayor cantidad de proteína para emulsificar los glóbulos de grasa. El aumentar la proporción de tejido magro permite extraer una mayor cantidad de proteínas miofibrilares que actúen como emulsificantes.

La obtención de una emulsión cárnica estable es dependiente de varios factores y requiere de: (a) una reducción adecuada de los tamaños de partícula de la carne y la grasa, (b) una extracción y dispersión de proteínas miofibrilares y de (c) mantener al mínimo la desnaturalización de las proteínas miofibrilares durante el proceso de cortado, para así asegurar que éstas cubran de manera óptima los glóbulos de grasa, antes de someter la emulsión a cocimiento (Álvarez et al., 2007).

Gordon y Barbut (1992) mencionan que existen dos teorías que explican la estabilización de emulsiones cárnicas: la teoría de emulsión y la teoría de atrapamiento físico. La teoría de emulsión explica que la estabilización de una emulsión es resultado de la formación de una película de proteína alrededor del glóbulo de grasa, de esta manera el sistema cárnico es catalogado como una emulsión o/w. Por otro lado, la teoría de atrapamiento físico hace énfasis en el papel que ejerce una matriz de proteínas para atrapar a la grasa y mantenerla en la red proteica, durante los procesos subsecuentes de cortado y cocción.

1.14 Optimización

La optimización consiste en determinar la región de los factores importantes de un proceso que conduzca a la mejor respuesta posible. Para localizar el rendimiento óptimo, es necesario llevar a cabo un experimento en el que se hagan variar conjuntamente al menos dos factores que afecten de manera significativa la respuesta de un procedimiento, al cual se le conoce como diseño factorial.

Este primer diseño permite ubicar la dirección general de aumento de la variable dependiente (respuesta) en función de los niveles de los factores analizados. A continuación, se realizan experimentos adicionales en esa dirección, lo que permitirá optimizar el proceso de interés. Una vez que se ha encontrado la posible región de respuesta óptima, el siguiente paso típico consiste en realizar un segundo experimento que tiene como objetivo principal desarrollar un modelo empírico del proceso y obtener una estimación más precisa de las condiciones óptimas de operación. A este enfoque para la optimización de un procedimiento o proceso se le llama metodología de superficies de respuesta. Usualmente se utiliza un diseño central compuesto, el cual es uno de los diseños experimentales más importantes que se aplican en las investigaciones de optimización de procesos.

1.14.1 Metodología de superficies de respuesta

La metodología de superficies de respuesta, o MSR, es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas útiles en el modelado y el análisis de problemas en los que una respuesta de interés recibe la influencia de diversas variables y donde el objetivo es optimizar esta respuesta.

El último objetivo de la MSR es determinar las condiciones de operación óptimas del sistema o determinar una región del espacio de los factores en la que se satisfagan los requerimientos de operación (Montgomery, 2008). Se ha reportado que la (MSR) es una herramienta efectiva para la optimización de un proceso cuando las variables independientes tienen un efecto combinado en la respuesta deseada (Koocheki et al., 2009).

Por lo general, el efecto simultáneo de distintos factores en el comportamiento de la variable dependiente de interés (y) se representa gráficamente con una superficie de respuesta. Es decir, $E(y) = f(x_1, x_2) = \eta$, donde η se grafica contra los valores de x_1 y x_2 .

En la mayoría de los problemas abordados con MSR, la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes es desconocida. Por lo tanto, el primer paso de MSR es encontrar una aproximación adecuada de la verdadera relación funcional entre la variable dependiente (y) y el conjunto de las variables independientes. Por lo general se emplea un polinomio de orden inferior en alguna región de las variables independientes. Si la respuesta está bien modelada por una función lineal, entonces el modelo de aproximación es de primer orden. Por otro lado, si hay curvatura en el sistema, entonces debe usarse un polinomio de orden superior, tal como el modelo de segundo orden o cuadrático.

Después de generar una superficie de respuesta, el análisis de ésta se realiza utilizando la superficie ajustada. Si la superficie ajustada es una aproximación adecuada de la verdadera función de la respuesta, entonces el análisis de la superficie ajustada será un equivalente aproximado del estudio del sistema real. Además, el investigador puede por lo general caracterizar la forma de la superficie y localizar el punto óptimo con una precisión razonable. De manera general el óptimo, también llamado punto estacionario podría estar representado en una gráfica de superficie de respuesta como: (1) un punto de respuesta máxima, (2) un punto de respuesta mínima, o (3) un punto silla.

Los parámetros del modelo de superficie de respuesta ajustado para optimizar el proceso de interés pueden estimarse de manera más eficiente cuando se emplean los diseños experimentales apropiados para recolectar los datos, uno de estos diseños es el denominado central compuesto (DCC).

El DCC permite ajustar un modelo de segundo orden y es de los más populares para ese tipo de modelos. En general, el DCC consta de un factorial 2^k (k = factores), con puntos axiales o estrella y centrales. Si bien, el DCC es un diseño muy eficiente para ajustar un modelo cuadrático hay dos parámetros que deben especificarse: la distancia α de las corridas experimentales axiales y el número de puntos centrales. La elección de α hace rotatable el DCC, la rotabilidad es importante en un modelo de segundo orden puesto que permite una precisión de estimación igual en todas las direcciones de la región que se analiza con el diseño.

Mirhosseini et al. (2008) reportaron que una de las ventajas principales del uso de MSR y DCC es que con un número reducido de experimentos es posible evaluar múltiples parámetros y sus interacciones.

Procesos de optimización con ayuda de MSR y aplicando DCC rotables o rotacionales para la microencapsulación de aceite de semillas de soya (Ahn et al., 2008), liberación mínima de volátiles en emulsiones preparadas con aceite de naranja (Mirhosseini et al., 2008), formulación de emulsiones estabilizadas con proteínas vegetales (Karaca et al., 2011), extracción por ultrasonido de fosfolípidos de fibra de palma prensada (Chua et al., 2009), por mencionar sólo algunos, han resultado exitosos.

1.15 Ultrasonido de alta potencia

Aún cuando el ultrasonido ha sido usado en el área de investigación y diagnóstico, los mayores avances en la aplicación de ondas ultrasónicas se han hecho en los últimos 10 años, transformando esta tecnología de prototipo de laboratorio en un proceso comercial completamente operacional a través de Europa y los Estados Unidos de América.

El ultrasonido de alta potencia se ha convertido en una herramienta eficiente para aplicaciones comerciales a gran escala, como la emulsificación, homogenización, extracción, cristalización, pasteurización a baja temperatura, degasificación, activación o inactivación de enzimas, reducción de tamaño de partícula y alteración de la viscosidad.

El efecto fundamental del ultrasonido en un fluido continuo es imponer presión acústica en adición a la presión hidrostática que actúa sobre el medio. La presión acústica es una onda sinusoidal dependiente del tiempo, frecuencia y amplitud de presión máxima de la onda. A una intensidad (amplitud) baja, la onda de presión induce movimiento y mezclado dentro del fluido, la llamada corriente acústica. Con intensidades más altas, la presión local en la fase de expansión del ciclo por debajo de la presión de vapor del líquido, provoca que pequeñas burbujas creadas por el gas en el núcleo del fluido crezcan. A medida que el área de la superficie de las burbujas aumenta dentro de un intervalo crítico de tamaño, la oscilación de la pared de la burbuja coincide con la de la frecuencia aplicada de las ondas de sonido causando que la burbuja implote durante un ciclo sencillo de compresión. El proceso de compresión y rarefacción de las partículas del medio y el consecuente colapso de las burbujas comprende el fenómeno conocido como cavitación, el efecto más importante en el ultrasonido de alta potencia. Las condiciones a las que las burbujas implotan son dramáticas, con temperaturas de 5000 K y presiones de hasta 1000 atmósferas, lo cual produce ondas de cizalla de muy alta energía y turbulencia en la zona de cavitación.

El ultrasonido de las ondas mecánicas a la frecuencia por arriba del umbral del oído humano, puede ser dividido en tres intervalos de frecuencia: ultrasonido de potencia (16-100 kHz), ultrasonido de alta frecuencia (100 kHz–1 MHz) y ultrasonido de diagnóstico (1–10 MHz) (Patist y Bates, 2008). Lorimer y Mason (1987) publicaron que la frecuencia es inversamente proporcional al tamaño de la burbuja, por lo tanto, el ultrasonido de frecuencia baja (es decir, el ultrasonido de potencia a 16-100 kHz) genera una mayor cavitación de las burbujas, lo que resulta en mayores presiones y temperaturas en la zona de cavitación. A medida que la frecuencia aumenta, la cavitación se vuelve menos violenta y en el intervalo de megahertz (MHz) no se observa el fenómeno, siendo el mecanismo predominante la corriente acústica.

El uso de ultrasonido en procesos de laboratorio o industriales requiere de dos aspectos: un medio líquido (aún si el elemento líquido forma sólo el 5% de la totalidad del medio) y una fuente de energía de vibración (ultrasonido). La energía vibracional se conoce como transductor, puesto que transfiere la vibración (después de amplificarla) al sonótrodo o punta, el cual es el dispositivo en contacto directo con el medio a procesar (Patist y Bates, 2008).

1.15.1 Emulsificación por ultrasonido

El objetivo del proceso de emulsificación usualmente es producir glóbulos tan pequeños como sea posible (Jafari et al., 2008). Si una burbuja de cavitación colapsa cerca de la superficie de la capa formada entre dos líquidos inmiscibles, el impacto de la onda resultante puede proporcionar un mezclado muy eficiente de las fases. Un aporte relativamente bajo de energía por la aplicación de ultrasonido (16-100 kHz) puede resultar en la formación de emulsiones muy finas y estables, en alimentos como jugos de frutas, mayonesa y salsa cátsup. Se requiere de la adición, si es que es necesario, de muy poco emulsificante adicional para mantener la estabilidad del sistema. Particularmente, para productos como la mayonesa se produce un color blanco excelente, lo que refleja un tamaño de partícula pequeño y una distribución de los glóbulos de la emulsión reducida (Patist y Bates, 2008).

La obtención de emulsiones estables o/w a partir de conjugados de proteína de soya y dextrano, aplicando ultrasonido para emulsificar las fases ha sido publicada por Xu y Yao (2009). Por otro lado, Lad y Murthy (2012) reportaron el efecto del ultrasonido en la reducción del tamaño de partícula y aumento de la estabilidad de emulsiones o/w formuladas con aceite de girasol y proteínas de leche de coco. Estos autores escribieron que las emulsiones sonicadas con un sonótrodo fueron muy estables aún variando la concentración de sales del sistema. La minimización del tamaño de los glóbulos de aceite por emulsificación ultrasónica también fue reportada por Leong et al. (2009).

1.16 Oxidación de emulsiones

Recientemente un gran número de investigaciones se han centrado en el estudio de la oxidación en emulsiones aceite en agua (o/w), ya que es más común encontrar estos sistemas en los productos alimenticios actuales (Hu et al., 2003). Emulsiones o/w como la leche, fórmulas infantiles, aderezos

para ensaladas, mayonesa, salsas, sopas, bebidas, crema y algunos postres son algunas de las formas más comunes de lípidos emulsificados en alimentos. La oxidación lipídica puede ocurrir rápidamente en las emulsiones o/w puesto que poseen un área de superficie mayor, la cual facilita las interacciones entre los lípidos y los prooxidantes solubles de la fase acuosa. Existen muchos factores que potencialmente pueden influenciar la velocidad de la oxidación de los lípidos en las emulsiones como: la composición de ácidos grasos; pH y composición iónica de la fase acuosa; tipo y concentración de antioxidantes y prooxidantes; concentración de oxígeno; características de los glóbulos de aceite como tamaño de partícula, concentración y estado físico; y propiedades interfaciales del glóbulo en la emulsión tales como grosor, carga, reología y permeabilidad.

El mecanismo de la oxidación lipídica en las emulsiones o/w difiere de la de los lípidos en el aceite, ya que las emulsiones tienen una fase acuosa que contiene tanto antioxidantes como prooxidantes y una interfase que ejerce un impacto en las interacciones entre el aceite y los componentes acuosos. Se ha reportado que los metales de transición son los mayores prooxidantes en las emulsiones o/w, particularmente, se cree que el hierro es el metal de transición más importante (Waraho et al., 2011).

La presencia de emulsificantes en las emulsiones ejerce un papel importante en la estabilidad oxidativa de los glóbulos de aceite (Fomuso et al., 2002). En muchos de los estudios de oxidación en emulsiones o/w, se han preparado emulsiones modelo usando surfactantes sintéticos como el dodecil sulfato de sodio (SDS), Brij y Tween. Sin embargo, estos surfactantes no han sido aprobados para su uso en alimentos.

Hu et al. (2003) mencionan que las proteínas del suero de leche inhiben la oxidación lipídica en emulsiones aceite en agua al encontrarse tanto en la superficie del glóbulo, como en la fase acuosa. Waraho et al. (2011) reportaron que las proteínas que unen específicamente hierro como la transferrina, lactoferrina, inhiben fuertemente la oxidación de los lípidos en las emulsiones aceite en agua. Nielsen et al. (2004) publicaron que la lactoferrina utilizada como emulsificante, mostró un ligero efecto antioxidante al estar presente en concentraciones de 8-12 μM en emulsiones alimenticias como la leche y la mayonesa, pero mostró una actividad prooxidante al usar concentraciones elevadas. Refsgaard et al. (2000), señalaron que la albúmina bovina (BSA) tiene la habilidad de suprimir la formación de hidroperóxidos lipídicos y aldehídos derivados, como consecuencia de la reacción entre radicales alcoxi formados a partir de hidroperóxidos con los residuos de aminoácidos de la proteína.

CAPITULO 3
JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de alimentos tipo emulsión que han sido adicionados o fortificados con ácidos grasos polinsaturados de cadena larga $n-3$ como el EPA y DHA, requirió de la realización previa de investigaciones científicas que analizaron la oxidación lipídica de emulsiones modelo o/w, preparadas con aceites marinos ricos en esos ácidos. Estas emulsiones se estabilizaron con compuestos sintéticos, o bien, con una proteína.

Las proteínas son biomoléculas que producen propiedades de superficie que les permiten emulsificar aceites y que además pueden actuar como antioxidantes en una emulsión. Diversas publicaciones han reportado la oxidación lipídica de emulsiones formuladas con proteínas utilizadas como agentes emulsificantes para estabilizar emulsiones o/w y retrasar su oxidación.

La búsqueda de emulsificantes proteicos adicionales que se caractericen por ser seguros para el consumo humano y que además representen una alternativa natural útil para formular emulsiones o/w, ha promovido el desarrollo de diversas investigaciones cuyo objetivo ha sido determinar las propiedades de la emulsión: índice de actividad y estabilidad, en sistemas modelo (o/w) formulados con proteínas miofibrilares y distintos aceites vegetales. Sin embargo existe muy poca o nada de información acerca de esos índices y de la estabilidad física y oxidativa de emulsiones (o/w) preparadas con aceites de origen marino con alto contenido de ácidos grasos polinsaturados de cadena larga $n-3$ y estabilizadas por proteínas miofibrilares.

Es por lo anterior, que en este trabajo se investigan las propiedades emulsificantes y la estabilidad física y oxidativa de emulsiones cárnicas modelo o/w, preparadas con un extracto de proteínas miofibrilares de carne de cerdo y dos aceites diferentes empleados por separado como fase dispersa de la emulsión: aceite de pescado MEG-3® y aceite de maíz. Asimismo, el comportamiento de las emulsiones cárnicas se contrasta con emulsiones modelo denominadas control, formuladas con ovoalbúmina grado II como agente emulsificante y los aceites mencionados anteriormente, también por separado.

CAPITULO 4
HIPÓTESIS

Debido a su número de dobles ligaduras, es posible que los ácidos grasos polinsaturados *n-3* EPA y DHA, presentes en el aceite de pescado comercial MEG-3®, se oxiden más rápidamente que otros ácidos grasos en el sistema. Una vez oxidados, aceleran la oxidación lipídica de emulsiones aceite en agua (o/w). Sin embargo, puede haber un efecto estabilizante contra la oxidación en emulsiones cárnicas modelo o/w, debido a dos fenómenos: la interacción entre los ácidos grasos y la proteína adsorbida en la interfase del glóbulo de grasa; y las interacciones entre las proteínas adsorbidas y no adsorbidas de la fase continua.

CAPITULO 5

OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de un aceite comercial de pescado (MEG-3®), rico en ácidos grasos polinsaturados de cadena larga EPA y DHA, en la estabilidad física y oxidativa de emulsiones cárnicas modelo o/w, en comparación con un aceite vegetal.

5.2 Objetivos particulares

- Realizar la caracterización de los materiales empleados para formular emulsiones cárnicas modelo y control, por obtención del perfil electroforético de proteínas miofibrilares extraídas del músculo de cerdo *Longissimus dorsi* y ovoalbúmina comercial grado II; así como del perfil de ácidos grasos de los aceites: MEG-3® y maíz, por cromatografía de gases.
- Determinar el nivel de oxidación inicial de los dos aceites empleados por separado como fase dispersa de las emulsiones modelo, por adaptación del método FOX2 y de esta manera recabar la mayor información posible acerca de los sistemas modelos investigados.
- Evaluar el comportamiento de las proteínas (miofibrilares u ovoalbúmina grado II) y de los aceites (MEG-3® o maíz) en una emulsión cárnica modelo o/w y una emulsión control, a través del efecto del tipo de aceite, de la concentración de proteína y del porcentaje de aceite adicionado en las propiedades de la emulsión: índice de actividad (EAI) e índice de estabilidad (ESI).
- Optimizar mediante la metodología de superficies de respuesta los índices EAI y ESI por separado en las emulsiones modelo: (a) extracto miofibrilar-MEG-3®, (b) extracto miofibrilar-aceite de maíz, (c) ovoalbúmina-MEG-3® y (d) ovoalbúmina-aceite de maíz.
- Determinar el efecto del porcentaje de amplitud de ultrasonido en la disminución del tamaño de partícula y en la estabilidad física de las emulsiones cárnicas modelo y control a través de los cambios en el tamaño de los glóbulos de la emulsión en función al tiempo de incubación.
- Evaluar la estabilidad oxidativa de las emulsiones cárnicas modelo y control almacenadas a 37 °C, a través de la concentración de productos primarios y secundarios de oxidación.

CAPITULO 6

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Carne de cerdo

Muestras del músculo de cerdo *Longissimus dorsi* se obtuvieron de un mercado local cercano a la universidad, se cortaron en trozos de 60 g y se colocaron por separado en bolsas Cryovac LB-50, posteriormente se empacaron al vacío en un equipo Multivac D-8941 (Koch, KC, USA) a -700 mBars y se almacenaron a -20 °C hasta el momento de ser utilizadas.

6.2 Albúmina de huevo

La proteína albúmina de huevo, también denominada ovoalbúmina fue obtenida de Sigma (St. Louis, MO, USA), como ovoalbúmina grado II (62-88% de albúmina en ensayos de geles de agarosa).

6.2 Aceites

6.2.1 Aceite de maíz

Se adquirieron botellas de aceite de maíz del mismo lote, en una tienda departamental cercana a la universidad, estas botellas se mantuvieron en condiciones de luz atenuada para evitar su oxidación.

6.2.2 Aceite de pescado

El aceite de pescado comercial MEG-3® concentrado y refinado, con alto contenido de ácidos grasos EPA y DHA, derivado principalmente de los peces sudamericanos de aguas frías, anchoa (*Engraulis ringens*) y sardina (*Sardinops sagax*), fue proporcionado por la compañía canadiense Ocean Nutrition Canada Limited™ (Halifax, NS, Canadá).

6.3 Estrategia experimental

El desarrollo del presente trabajo se centró en dos aspectos principales: (1) la formación de emulsiones modelo cárnicas aceite en agua (o/w), formuladas utilizando como emulsificante un extracto proteico miofibrilar obtenido del músculo *Longissimus dorsi* de carne de cerdo y como fase

dispersa de la emulsión dos tipos de aceite, por separado: aceite de pescado MEG-3®, o bien, aceite de maíz; y (2) el análisis del efecto de la composición de ácidos grasos presentes en el aceite utilizado como fase dispersa, en la estabilidad oxidativa de las emulsiones modelo.

De manera paralela y con el objetivo de contrastar el comportamiento del extracto miofibrilar, se formularon emulsiones modelo o/w, utilizando ovoalbúmina grado II como agente emulsificante control y los aceites mencionados anteriormente por separado, como la fase dispersa.

El trabajo experimental se dividió en cuatro etapas principales. La etapa I involucró la realización de una serie de experimentos que permitieron caracterizar los materiales utilizados para la formación de emulsiones modelo aceite en agua (o/w); la etapa II consistió en la formulación de emulsiones modelo, aplicando la metodología de superficies de respuesta para establecer las condiciones óptimas de concentración de proteína (mg/mL), utilizada como emulsificante para estabilizar la emulsión, y porcentaje de aceite (%) utilizado como fase dispersa, que permitieron obtener la respuesta máxima en las propiedades emulsificantes índice de actividad (EAI) e índice de estabilidad de la emulsión (ESI); la etapa III consistió en la estabilización de las emulsiones modelo bajo análisis, por medio de la aplicación de ultrasonido; finalmente, la etapa IV consistió en el monitoreo de la oxidación de las emulsiones modelo almacenadas a 37 °C, determinando productos primarios y secundarios de oxidación.

Los análisis más importantes de las etapas experimentales mencionadas anteriormente, se describen de manera general a continuación:

Etapas I

Obtención de extracto proteico miofibrilar

Se procesaron muestras del músculo *Longissimus dorsi* de carne de cerdo para separar las proteínas presentes y obtener un extracto proteico miofibrilar. A este extracto se le determinó la cantidad de proteína por el método de biuret y se evaluó su pureza realizando electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés).

Solución de ovoalbúmina

Se prepararon soluciones de ovoalbúmina comercial grado II en amortiguador fosfatos de sodio. Se cuantificó la concentración de proteína por el método de biuret y se analizó la pureza de la ovoalbúmina en solución, analizando el perfil electroforético en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Caracterización de aceites

Se tomaron muestras de aceite MEG-3®, o bien, aceite de maíz. A estas muestras se les determinó por separado, el perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases (GC), se cuantificó la cantidad de hidroperóxidos presentes y se evaluó su oxidación, mediante la adaptación del método de oxidación ferrosa de naranja xilenol (FOX2).

Etapas II

Emulsión modelo cárnica

El extracto proteico miofibrilar se utilizó como emulsificante para formar emulsiones modelo cárnica aceite en agua (o/w), utilizando dos tipos de aceite por separado, como fase dispersa: MEG-3® o maíz. Las emulsiones se formularon aplicando diseños factoriales para evaluar el efecto de la concentración de proteína miofibrilar (mg/mL), y del tipo y porcentaje de aceite (%), en las propiedades emulsificantes EAI y ESI.

Emulsión modelo control

Se prepararon emulsiones modelo o/w utilizando ovoalbúmina grado II en solución, como agente emulsificante y aceite MEG-3®, o bien, aceite de maíz, como fase dispersa. Nuevamente, las emulsiones se formularon aplicando diseños factoriales y se determinó el efecto de la concentración de ovoalbúmina (mg/mL) y del tipo y porcentaje de aceite (%), en la respuesta de EAI y ESI.

Optimización de emulsiones modelo

Se aplicó la metodología de superficies de respuesta (MSR) para caracterizar y ajustar modelos cuadráticos que permitieron calcular la concentración de proteína (mg/mL) y el porcentaje de aceite (%) óptimos, que maximizaba la respuesta de EAI y ESI, en cada una de las emulsiones modelo siguientes: (a) extracto proteico miofibrilar-aceite MEG-3®; (b) extracto proteico miofibrilar-aceite de maíz; (c) ovoalbúmina-aceite MEG-3®; (d) ovoalbúmina-aceite de maíz.

Etapa III

Estabilización de emulsiones modelo

Se formaron emulsiones modelo (o/w), identificadas anteriormente como: (a), (b), (c) y (d), empleando las combinaciones de concentración de proteína emulsificante (mg/mL) y porcentaje de aceite (%) obtenidas en la optimización por MSR. Estas emulsiones se sometieron a sonicación a una frecuencia constante de 20 kHz y se evaluó el efecto del porcentaje de amplitud de ultrasonido (%) en la estabilidad de emulsiones modelo.

Etapa IV

Oxidación de emulsiones modelo

Las emulsiones modelo estables se almacenaron a 37 °C y se monitoreó su oxidación en función al tiempo de incubación, determinando la concentración de hidroperóxidos lipídicos y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés), denominados productos primarios y secundarios de oxidación, respectivamente.

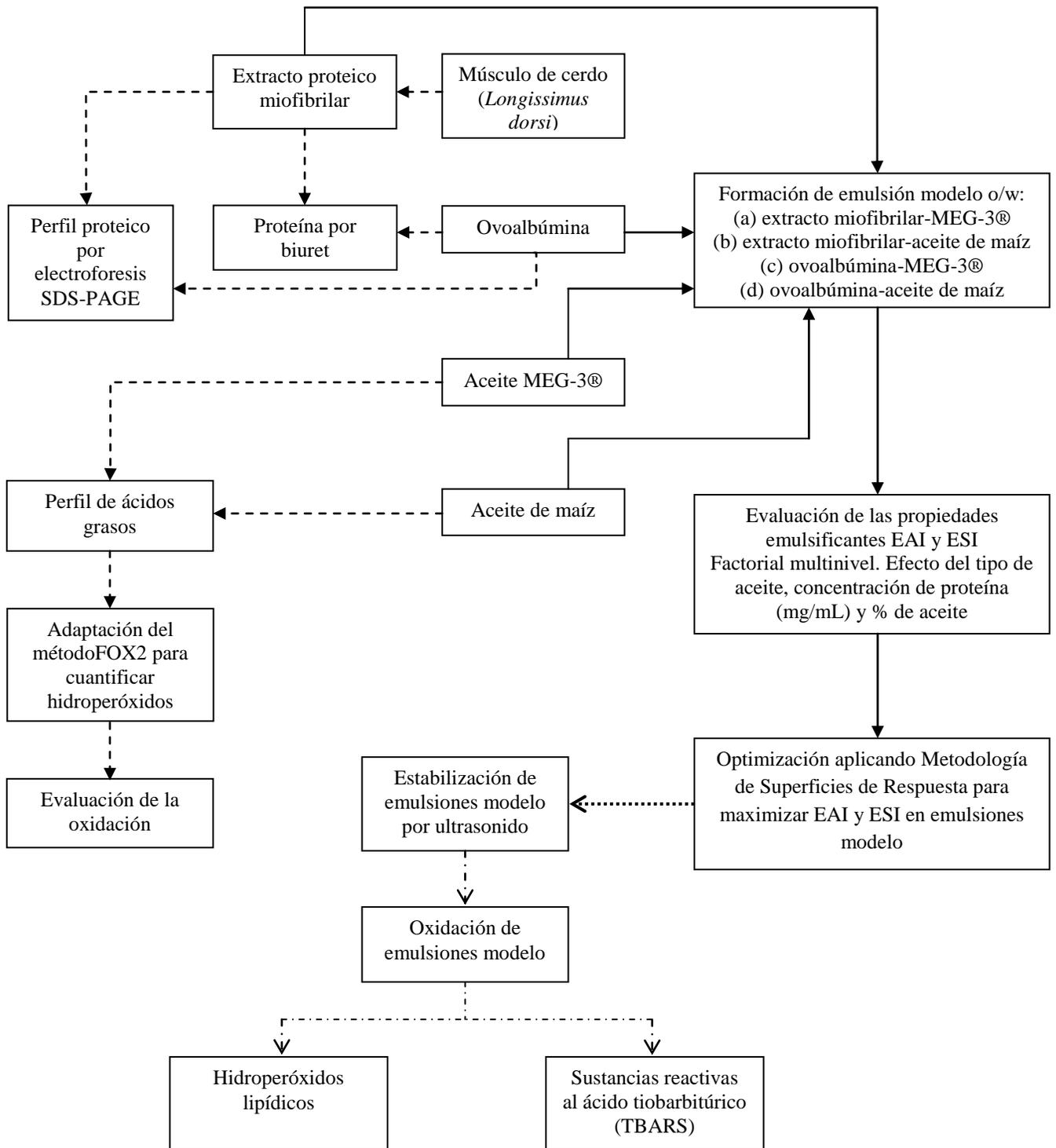


Figura 6.1. Estrategia experimental: etapa I (- ->); etapa II (—>); etapa III (.....>); etapa IV (- ·>).

6.4 Técnicas analíticas

6.4.1 Extracto proteico miofibrilar

Se denominó extracto proteico miofibrilar a la solución de proteínas miofibrilares extraídas de carne de cerdo. El extracto se utilizó como emulsificante para formar y estabilizar emulsiones (o/w), las cuales fueron el sistema modelo analizado durante el desarrollo de este trabajo.

6.4.1.1 Extracción de proteínas miofibrilares

Las proteínas miofibrilares se extrajeron de muestras del músculo *Longissimus dorsi* de carne de cerdo, de acuerdo a la metodología reportada por Ngapo (1992) y modificada por García-Barrientos (2007). Muestras de carne molida de cerdo se homogenizaron en una licuadora por 2 min con hielo y agua deionizada en proporciones 1:1:1 (p/v). La mezcla anterior se mantuvo en agitación constante en un baño con hielo por 10 min, posteriormente, se filtró 2 veces utilizando gasa. Al filtrado obtenido se le adicionó agua deionizada en proporción 1:1.5 (v/v), previamente enfriada a 4 °C. Posteriormente, se sometió a agitación por 15 min. Las muestras se centrifugaron a 4000 rpm/15 min y a 4 °C, el sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en amortiguador miofibrilar fosfatos de sodio 50 mM pH 7 y NaCl 0.6 M.

6.4.2 Ovoalbúmina

Con el objetivo de contrastar el comportamiento del extracto proteico miofibrilar en la formación y estabilización de emulsiones, se utilizó ovoalbúmina comercial grado II como emulsificante control para formular emulsiones modelo (o/w), ya que se ha reportado que esta proteína presenta propiedades emulsificantes importantes y por lo tanto, se ha utilizado ampliamente en la industria de los alimentos.

6.4.2.1 Preparación de solución de ovoalbúmina

La proteína ovoalbúmina grado II se disolvió en amortiguador fosfatos de sodio 0.01 M pH 7, manteniendo la mezcla en agitación moderada y constante durante 15 min. Posteriormente, la solución se filtró utilizando papel filtro Watman 1.

6.4.3 Determinación de proteína

La cantidad de proteína presente en el extracto proteico miofibrilar y en la solución de ovoalbúmina se determinó por triplicado usando el método de biuret (Gornall et al., 1948). El cual consistió en mezclar 1 mL de muestra y 3 mL de reactivo de biuret en un tubo de ensaye. Posteriormente el tubo se agitó en un vortex y se dejó reposar durante 30 min. La absorbencia del complejo colorido formado se registró a 540 nm. Finalmente, las absorbencias obtenidas se interpolaron en una curva estándar de ovoalbúmina, preparada previamente.

6.4.4 Evaluación del perfil electroforético en condiciones desnaturalizantes

La pureza del extracto de proteínas miofibrilares y de la solución de ovoalbúmina se evaluó realizando ensayos de electroforesis SDS-PAGE de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli (1970). Se utilizaron cámaras de electroforesis BIO-RAD Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Hercules, CA, USA). Para realizar los análisis se formularon geles verticales de poliacrilamida compuestos por: gel separador 12% y concentrador 4%. Las muestras se prepararon mezclando 25 μ L de extracto miofibrilar o solución de ovoalbúmina y 75 μ L de amortiguador muestra (proporción 1:4). El amortiguador muestra contenía: azul de bromofenol 0.1% (p/v), dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% (p/v), glicerol 10.5% (v/v), Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 y β -mercaptoetanol al 5%. Una vez preparadas las muestras, éstas se sumergieron durante 5 min en un baño con agua a ebullición, se enfriaron y se inyectaron 10 μ L por carril en los geles preparados previamente. Como referencia se utilizó un marcador de proteínas estándares de alto peso molecular BIO-RAD SDS-PAGE 161-0303 (Hercules, CA, USA) que contenía: miosina 200 kDa, β -galactosidasa 116.25 kDa, fosforilasa b 97.4 kDa, albúmina bovina 66.2 kDa y ovoalbúmina 45 kDa. El amortiguador de corrida (Tris base 1.5%, glicina 0.7%, SDS 0.5%) se vertió dentro de la cámara y ésta se conectó a una fuente de poder con un voltaje constante de 200 V. Una vez terminada la separación, los geles se tiñeron empleando una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.1%, metanol 40% y ácido acético al 10%

durante 30 min. Posteriormente, se eliminó la coloración empleando una solución de metanol al 40% y ácido acético al 10%. Finalmente, los geles obtenidos se leyeron en un autoanalizador de imágenes BIO-RAD Gel Doc™ 2000 (Richmond, CA, USA) para cuantificar los pesos moleculares de las bandas obtenidas. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

6.4.5 Determinación del perfil de ácidos grasos en aceites

6.4.5.1 Preparación de metil ésteres

Los ésteres metílicos de ácidos grasos de aceite MEG-3®, o bien, aceite comercial de maíz se obtuvieron siguiendo la metodología oficial 969.33 reportada por la AOAC (Firestone, 1995). Muestras de 20 mg de aceite fueron colocadas por separado dentro de matraces volumétricos con dos perlas de ebullición conectados a un sistema de reflujo. A continuación se adicionaron 6 mL de solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0.5 N en metanol, a través del tubo refrigerante a cada una de las muestras. Posteriormente, la muestras se calentaron a ebullición por aproximadamente 10 min hasta que los glóbulos de grasa se dispersaron en la solución. Una vez ocurrido lo anterior, se adicionaron 7 mL de trifluoruro de boro en metanol (BF₃/MeOH) al 12% a cada uno de los matraces y se llevaron a ebullición por 5 min. Después, se agregaron 1.5 mL de hexano y se dejó ebullición la mezcla por 1 min. Al término de ese tiempo, los matraces se enfriaron en un baño con hielo y se agregó solución saturada de cloruro de sodio (NaCl) hasta llevar la fase orgánica al cuello del matraz. La fase orgánica recuperada después de procesar las muestras de aceite MEG-3® se retiró utilizando pipetas Pasteur y se colocó dentro de viales de vidrio Agilent Technologies de 2 mL con tapa y septos de silicón (Santa Clara, CA, USA), que posteriormente se sellaron y almacenaron a temperatura de refrigeración (4-5 °C); por otro lado, la fase orgánica obtenida después de la derivatización de las muestras de aceite de maíz, se colocó en insertos SUN-SRi™ de vidrio de 200 µL (Rockwood, TN, USA) , los cuales, se introdujeron dentro de viales de vidrio Agilent Technologies de 2 mL con tapa y septos de silicón (Santa Clara, CA, USA). Las muestras se almacenaron a 4 °C por un periodo no mayor a 6 h, antes de ser analizadas por cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés).

6.4.5.2 Separación e identificación de ésteres metílicos de ácidos grasos por cromatografía de gases

6.4.5.2.1 Aceite MEG-3®

El análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos se realizó utilizando un cromatógrafo de gases Varian CP 3800 equipado con un detector de ionización de flama. La separación de los ésteres metílicos se realizó en una columna capilar Varian Chrompack Capillary Column WCOT CP WAX 52CB (30 m x 0.25 mm i. d. x 0.10 μm de espesor de la película) (Walnut Creek, CA, USA). El volumen de la muestra inyectada fue 1 μL y se utilizó nitrógeno (N_2) como gas acarreador con un flujo de 1.8 mL/min, un ratio de split 1:10 y una presión de 10 psi. El horno se mantuvo a 150 °C por 2 min y se programó para elevar la temperatura hasta 240 °C con una velocidad de 2 °C/min. Las temperaturas del detector y del inyector se mantuvieron a 270 y 250 °C, respectivamente. Los tiempos de retención y las áreas bajo los picos fueron procesados con el programa Varian Star Chromatography Workstation (Walnut Creek, CA, USA). La identificación y cuantificación de los ésteres metílicos de ácidos grasos se realizó comparando los tiempos de retención (R_t , por sus siglas en inglés) de estándares de ácidos grasos, previamente metil esterificados e interpolando las áreas bajo los picos en curvas patrón de cada uno de los ésteres metílicos de ácidos grasos identificados. Los resultados se expresaron como porcentaje de cada ácido graso con respecto al total de ácidos grasos presentes y como gramos de ácido graso en 100 gramos de aceite (g ácido/100 g aceite). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

6.4.5.2.2 Aceite de maíz

El análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS, por sus siglas en inglés) utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masas (5975B VL MSD). La separación de los ésteres metílicos se realizó en una columna capilar Agilent HP-5MS (30 m x 0.25 mm i. d. x 0.25 μm de espesor de la película) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) utilizando helio (He) como gas acarreador con un flujo de 1.8 mL/min y una presión de 22.5 psi. La temperatura inicial del horno fue de 150 °C, manteniéndose así por 2 min, posteriormente se elevó la temperatura hasta 240 °C utilizando una rampa de calentamiento de 2 °C/min. El tiempo total del experimento fue de 47 min. La temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C, se utilizó un modo de inyección splitless y un

volumen de inyección de 1 μL . La identificación de los picos correspondientes a los ésteres metílicos de ácidos grasos se realizó utilizando la librería Nist 05a y por comparación de los tiempos de retención (Rt). Las áreas bajo los picos se obtuvieron con el programa Agilent Chemstation (Santa Clara, CA, USA) y la concentración de los ésteres metílicos se determinó empleando una mezcla de estándares internos que contenía los ésteres metílicos de ácidos grasos: pentanoico, heptanoico, nonadecanoico y araquidónico. Los resultados se expresaron como porcentaje de cada ácido graso con respecto al total de ácidos grasos presentes y gramos de ácido graso en 100 gramos de aceite (g ácido/100 g de aceite). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

6.4.6 Adaptación del método de oxidación ferrosa de naranja xilenol (FOX2) para cuantificar hidroperóxidos lipídicos en aceite

Debido a que resultó necesario desarrollar un método que permitiera determinar de una manera rápida, sencilla, sensible y reproducible la concentración de hidroperóxidos presentes en el aceite empleado como fase dispersa para formar emulsiones modelo (o/w), se llevó a cabo la adaptación de la versión II del método de oxidación ferrosa de naranja xilenol (FOX2).

El método FOX2 se adaptó por separado para los dos aceites utilizados en este trabajo: MEG-3® o maíz, evaluando el efecto de la concentración de aceite disuelto en propan-1-ol en el desempeño del método FOX2 y la influencia del volumen de la alícuota de aceite solubilizado en propan-1-ol adicionada a la mezcla de reacción en la cuantificación de hidroperóxidos. Las muestras de aceite empleadas para el análisis de estos efectos se sometieron a los tratamientos que se describen a continuación.

6.4.6.1 Tratamiento de las muestras de aceite

6.4.6.1.1 MEG-3®

Muestras de 2 mL de aceite se colocaron en frascos ámbar de vidrio de 5 mL, se sometieron a un flujo de nitrógeno (N_2) para desplazar el oxígeno presente y evitar la oxidación del aceite, se

sellaron y se almacenaron a -20 °C por 6 días (T1). Posteriormente, una parte de éstas muestras, se mantuvieron a 20 °C por 2 días en contacto con aire (T2).

6.4.6.1.2 Aceite de maíz

Se colocaron 2 mL de aceite de maíz en frascos ámbar. Una parte de estas muestras se analizó en el momento de abrir las botellas de aceite (T1). Las muestras restantes se dividieron en dos grupos, el primero se mantuvo a 20 °C por 2 días en contacto con aire (T2) y el segundo a 65 °C por 2 días en contacto con aire (T3).

6.4.6.2 Preparación del reactivo de oxidación ferrosa de naranja xilenol (FOX2)

El reactivo FOX2 se preparó siguiendo la metodología descrita por Eymard y Genot (2003). Sulfato ferroso de amonio hexahidrato ($(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (2.5 mM), se disolvió en ácido sulfúrico (H_2SO_4) 250 mM. Una alícuota (10 mL) de la solución anterior se mezcló con 7.6 mg de sal tetrasódica de naranja xilenol ($\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{Na}_4\text{O}_{13}\text{S}$), previamente disuelta en 20 mL de metanol grado HPLC. Finalmente, el volumen de la mezcla se aforó a 100 mL con metanol grado HPLC. Las concentraciones del naranja xilenol, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y H_2SO_4 fueron 100 μM , 0.25 mM y 25 mM, respectivamente. El reactivo FOX2 se preparó justo antes de ser utilizado.

6.4.6.3 Evaluación del efecto de la concentración de aceite en el desempeño del ensayo FOX2

6.4.6.3.1 MEG-3®

Se disolvieron 0.75, 1, 2, 5, 10, 20, 40 y 80 mg de aceite en 1 mL de propan-1-ol por separado. Las mezclas se homogenizaron y alícuotas de 150 μL de aceite solubilizado se combinaron con 1350 μL de reactivo FOX2 en tubos eppendorf de 1.5 mL. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente y en condiciones de luz atenuada durante 50 min (Eymard y Genot, 2003); posteriormente, se centrifugó a 12000g/5 min para remover micelas. El sobrenadante se decantó cuidadosamente y se midió la absorbencia a 560 nm (Nourooz-Zadeh et al., 1995). El efecto de la concentración de aceite en el desempeño del ensayo FOX2 para cuantificar hidroperóxidos lipídicos

se evaluó por separado en las muestras de aceite MEG-3®: T1 y T2, sometidas al tratamiento descrito en el punto 6.4.6.1.1. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada masa de aceite evaluada y en cada una de las condiciones de almacenamiento (T1 y T2).

6.4.6.3.2 Aceite de maíz

El análisis del efecto de la concentración de aceite en el desempeño del ensayo FOX2 para cuantificar hidroperóxidos lipídicos en muestras de aceite de maíz, se realizó siguiendo la misma metodología descrita para el aceite MEG-3® y detallada en el punto 6.4.6.3.1. Los experimentos se realizaron por separado para las muestras de aceite: T1, T2 y T3, las cuales fueron sometidas al tratamiento descrito en el punto 6.4.6.1.2. Los ensayos se realizaron por triplicado para las masas de aceite analizadas, bajo cada uno de los tratamientos.

6.4.6.4 Influencia del volumen de la alícuota de aceite solubilizado en propan-1-ol en la determinación de hidroperóxidos por el método FOX2

6.4.6.4.1 MEG-3®

Se disolvieron 5 mg y 20 mg de aceite T1 o T2 (sometido a las condiciones de almacenamiento detalladas en el punto 6.4.6.1.1) en 1 mL de propan-1-ol por separado. De las soluciones de aceite obtenidas se tomaron alícuotas de 25, 50, 75, 100, 125 y 150 μL , se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL y se llevaron a un volumen final de 150 μL con propan-1-ol. Posteriormente se adicionaron 1350 μL de reactivo FOX2. Las mezclas de reacción se incubaron a temperatura ambiente y en condiciones de luz atenuada durante 50 min (Eymard y Genot, 2003); a continuación, se centrifugaron a 12000g/5 min. El sobrenadante se decantó cuidadosamente y se midió la absorbencia a 560 nm (Nourooz-Zadeh et al., 1995) contra un blanco (150 μL de propan-1-ol y 1350 μL de reactivo FOX2). Los ensayos se realizaron por triplicado para las muestras de aceite T1, T2 y para cada volumen de alícuota analizado.

6.4.6.4.2 Aceite de maíz

La influencia del volumen de la alícuota de aceite de maíz solubilizado en propan-1-ol en la determinación de hidroperóxidos por medio del método FOX2 se evaluó aplicando la misma estrategia utilizada para las muestras de aceite MEG-3®, detallada en el punto 6.4.6.4.1. Los análisis se realizaron empleando muestras de aceite de maíz denominadas T1, T2 y T3, las cuales fueron sometidas a los tratamientos descritos en el punto 6.4.6.1.2. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

6.4.6.5 Cuantificación de hidroperóxidos por el método FOX2

Se preparó una curva estándar con soluciones de hidroperóxido de cumeno (CHP) en metanol. Las concentraciones en la mezcla de reacción se encontraron en el intervalo 0-15 μM (Eymard y Genot, 2003). La curva estándar permitió la conversión de las absorbencias detectadas a 560 nm a concentración de equivalentes de CHP (μM) presentes en la mezcla de reacción. Finalmente, la cantidad de hidroperóxidos fue expresada como milimoles equivalentes de hidroperóxido de cumeno/kilogramo de aceite (mmol CHP eq/kg aceite).

6.4.6.6 Diseño experimental y análisis estadístico de los datos

6.4.6.6.1 Evaluación preliminar del efecto del volumen de la alícuota de una solución de aceite en propan-1-ol en la concentración de hidroperóxidos utilizando el método FOX2

Se realizó la prueba de comparación múltiple de la diferencia mínima significativa de Fisher (LSD, por sus siglas en inglés), mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para observar las diferencias significativas en las concentraciones de hidroperóxidos (mmol CHP eq/kg aceite). Las comparaciones se llevaron a cabo entre los distintos volúmenes de aceite solubilizado en propan-1-ol utilizados en el ensayo FOX2. Se empleó el paquete estadístico Minitab® v.11 (State College, PA, USA). Las diferencias significativas se establecieron con un nivel de significancia de $P < 0.05$.

6.4.6.6.1.1 MEG-3®

La prueba LSD de Fisher se realizó por separado para cada una de las siguientes condiciones: (1) solución 5 mg de aceite MEG-3®/mL de propan-1-ol mantenido bajo las condiciones de almacenamiento T1; (2) solución 5 mg de aceite MEG-3®/mL de propan-1-ol mantenido bajo las condiciones de almacenamiento T2; (3) solución 20 mg de aceite MEG-3®/mL de propan-1-ol mantenido bajo las condiciones T1; y (4) solución 20 mg de aceite MEG-3®/mL de propan-1-ol mantenido bajo las condiciones de almacenamiento T2.

6.4.6.6.1.2 Aceite de maíz

En el caso del aceite de maíz, la prueba LSD de Fisher se realizó por separado para cada una de las siguientes condiciones: (1) solución 5 mg de aceite de maíz/mL de propan-1-ol mantenido bajo las condiciones de almacenamiento T1; (2) solución 5 mg de aceite de maíz/mL de propan-1-ol mantenido bajo las condiciones de almacenamiento T2; y (3) solución 5 mg de aceite de maíz/mL de propan-1-ol mantenido bajo las condiciones T3.

6.4.6.6.2 Evaluación del efecto del volumen de la alícuota de una solución de aceite en propan-1-ol y de las condiciones de almacenamiento del aceite en la concentración de hidroperóxidos utilizando el método FOX2

6.4.6.6.2.1 MEG-3®

Una vez que se determinaron los volúmenes de la alícuota de aceite solubilizado en propan-1-ol que permitieron obtener concentraciones de hidroperóxidos reproducibles, bajo cada una de las condiciones mencionadas en el punto 6.4.6.6.1.1, se realizó un ANOVA de dos vías anidado para determinar las diferencias significativas en las concentraciones de hidroperóxidos (mmol CHP eq/kg aceite), al utilizar una solución de 5 mg de aceite MEG-3® disuelto en 1 mL de propan-1-ol. Las comparaciones se llevaron a cabo entre las condiciones de almacenamiento: T1 y T2, el volumen de la alícuota de aceite solubilizado en propan-1-ol que permitió obtener concentraciones de hidroperóxidos reproducibles y las réplicas (las mediciones para cada tratamiento se realizaron

por triplicado). Se empleó el paquete estadístico Minitab® v.11 (State College, PA, USA) y las diferencias significativas se establecieron con un nivel de significancia de $P < 0.05$.

6.4.6.6.2 Aceite de maíz

Después de establecer los volúmenes de la alícuota de aceite de maíz solubilizado en propan-1-ol que permitieron obtener concentraciones de hidroperóxidos reproducibles (mmol CHP eq/kg aceite) en cada una de las condiciones descritas en el punto 6.4.6.6.1.2, al utilizar el método FOX2 adaptado, se decidió realizar un ANOVA multifactor para determinar las diferencias significativas en las concentraciones de hidroperóxidos al utilizar una solución de 5 mg de aceite de maíz disueltos en 1 mL de propan-1-ol, por efecto de las condiciones de almacenamiento del aceite: T1, T2 y T3; el volumen de la alícuota de aceite solubilizado en propan-1-ol y las réplicas (los experimentos se realizaron por triplicado). El nivel de significancia para las comparaciones se estableció con un valor de $P < 0.05$. Nuevamente, el análisis se realizó con ayuda del paquete estadístico Minitab® v.11 (State College, PA, USA).

6.4.7 Validación de la adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite

Después de realizar la adaptación del método FOX2 para determinar hidroperóxidos tanto en aceite MEG-3®, como en aceite de maíz, se validó su desempeño en la cuantificación de hidroperóxidos en muestras de aceite sometidas a condiciones oxidantes. La validación se realizó comparando la respuesta del método FOX2 adaptado, con la obtenida al utilizar la metodología oficial Valor Peróxido (VP) 965.33 descrita por la AOAC (Firestone, 1995).

Los tratamientos oxidantes a los que fueron sometidos los aceites se mencionan a continuación.

6.4.7.1 Tratamiento previo de las muestras de aceite

6.4.7.1.1 Oxidación de aceite MEG-3®

Se colocaron muestras de 25 g de aceite MEG-3® en frascos de vidrio con la misma morfología. Una parte de los frascos se sometió a un flujo de N_2 y se almacenó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ por 6 días. El resto de

las muestras se mantuvo a 20 °C en contacto con aire y luz durante 30 horas. Se realizó un muestreo periódico pasadas las primeras 12 h, en intervalos de 6 h para cuantificar el contenido de hidroperóxidos en las muestras.

6.4.7.1.2 Oxidación de aceite de maíz

Se pesaron 25 g de aceite de maíz dentro de frascos de vidrio de morfología idéntica. A continuación, una parte de los frascos se mantuvo a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) y en contacto con aire durante 72 horas. El resto de las muestras se mantuvo en una estufa a una temperatura constante de 85 °C y se realizó un muestreo periódico pasadas 18 h, 24 h y 36 h, para determinar la concentración de hidroperóxidos en el aceite.

6.4.7.2 Cuantificación de hidroperóxidos lipídicos en muestras de aceite

La concentración de hidroperóxidos presente en las muestras de aceite MEG-3® y aceite de maíz sometidas a oxidación, se cuantificó con los dos métodos que se describen a continuación.

6.4.7.2.1 Método FOX2 adaptado

Se disolvieron 5 mg de aceite en 1 mL de propan-1-ol. De la mezcla anterior se tomaron alícuotas de 100 µL, se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL y se llevaron a un volumen final de 150 µL con propan-1-ol. Posteriormente se adicionaron 1350 µL de reactivo FOX2. Las mezclas de reacción se incubaron a temperatura ambiente y en condiciones de luz atenuada durante 50 min; después, se centrifugaron a 12000g/5 min. El sobrenadante se decantó cuidadosamente y se midió la absorbencia a una longitud de onda 560 nm contra un blanco (150 µL de propan-1-ol y 1350 µL de reactivo FOX2). Los ensayos se realizaron por triplicado para cada una de las muestras analizadas. La concentración de hidroperóxidos se calculó interpolando los valores de absorbencia detectados a 560 nm en una curva patrón de CHP, preparada previamente. La cantidad de hidroperóxidos se expresó como mmol CHP eq/kg aceite.

6.4.7.2.2 Valor peróxido (VP)

El VP se determinó siguiendo la metodología oficial 965.33 descrita por la AOAC (Firestone, 1995). Muestras de 5.00 ± 0.05 g de aceite se pesaron dentro de matraces Erlenmeyer de 250 mL. A continuación, se adicionaron 30 mL de solución ácido acético glacial-cloroformo (3:2) y los matraces se agitaron por 5 minutos para disolver el aceite. Posteriormente, se adicionaron 0.5 mL de solución saturada de yoduro de potasio, la mezcla se dejó reposar por exactamente un minuto y se sometió a agitación ocasional, transcurrido ese tiempo, se agregaron 30 mL de agua destilada (hervida y enfriada previamente). Después, se realizó una titulación lenta con solución estándar de tiosulfato de sodio 0.01 N, hasta casi desaparecer el color amarillo de la solución. Una vez que ocurrió lo anterior, se adicionaron 0.5 mL de solución de almidón al 1 % y se continuó con la titulación, agitando vigorosamente el matraz para liberar todo el yodo de la capa de cloroformo hasta extinguir el color azul de la solución. El VP se calculó con la fórmula:

$$VP = \frac{S \times N \times 1000}{g \text{ de muestra}}$$

Dónde, S= mL de tiosulfato de sodio (corregido contra un blanco) y N= normalidad de la solución de tiosulfato de sodio. Finalmente, el VP de las muestras de aceite se expresó como miliequivalentes de peróxido por kilogramo de aceite (meq peróxido/kg aceite).

6.4.8 Emulsión modelo

6.4.8.1 Emulsión modelo cárnica

El extracto proteico miofibrilar se utilizó como emulsificante para formar emulsiones modelo aceite en agua (o/w), utilizando dos tipos de aceite por separado, como fase dispersa. Las emulsiones obtenidas fueron: (1) extracto miofibrilar-MEG-3® y (2) extracto miofibrilar-aceite de maíz. Una vez formadas las emulsiones, se evaluó el efecto de la concentración de proteína presente en el extracto miofibrilar, del porcentaje de aceite y del tipo de aceite empleado como fase dispersa, en las propiedades emulsificantes índice de actividad e índice de estabilidad de la emulsión (EAI y ESI por sus siglas en inglés, respectivamente).

6.4.8.2 Emulsión modelo control

Se prepararon emulsiones modelo o/w utilizando ovoalbúmina grado II en solución, como agente emulsificante control y aceite de maíz o MEG-3®, como fase dispersa. Las emulsiones obtenidas fueron: (1) ovoalbúmina-MEG-3® y (2) ovoalbúmina-aceite de maíz. Nuevamente, se determinó en ambas emulsiones, el efecto de la concentración de ovoalbúmina y del tipo y porcentaje de aceite, en la respuesta de EAI y ESI.

6.4.8.3 Formación de la emulsión

Se formaron emulsiones modelo o/w, de 4 mL de volumen final, siguiendo las combinaciones de concentración de proteína y porcentaje de aceite, generadas con diseños factoriales multinivel completos. Las soluciones de proteína: extracto miofibrilar o bien, ovoalbúmina (1-8 mg/mL), utilizadas como fase continua y el aceite de maíz ó MEG-3® (15-25%), empleado como fase dispersa se homogenizaron por agitación a una velocidad de 15000 rpm por 30 s (Mu et al., 2009) y a 4 °C con un homogenizador IKA T10 basic ULTRA-TURRAX® (Wilmington, NC, USA). Cada emulsión modelo se preparó por triplicado.

6.4.8.4 Índice de actividad de la emulsión (EAI)

El EAI se midió utilizando técnicas turbidimétricas, de acuerdo a la metodología descrita por Pearce y Kinsella (1978), con las modificaciones descritas a continuación. Inmediatamente después de la homogenización de la emulsión modelo, alícuotas de 10 µL de la emulsión se tomaron del fondo del recipiente y se diluyeron hasta alcanzar un volumen de 1 mL con solución NaCl 0.1 M y SDS 0.1%. La emulsión diluida se agitó en un vortex y se registró la absorbencia a 500 nm (Kim et al., 2003). El EAI (m²/g) se calculó utilizando la ecuación corregida por Cameron et al. (1991):

$$EAI(m^2 / g) = \frac{2T}{(1 - \Phi)C}$$

Dónde Φ es la fracción de aceite y C es la concentración de proteína (g/m³). La turbidez, T , se calculó con la ecuación $(2.303 \times A \times FD)/L$, dónde A corresponde a la absorbencia detectada a 500 nm, FD al factor de dilución (100) y L al ancho de celda (0.01 m).

6.4.8.5 Índice de estabilidad de la emulsión (ESI)

Alícuotas de 10 μ L de la emulsión modelo se tomaron del fondo del recipiente después de la homogenización y se diluyeron hasta alcanzar un volumen de 1 mL con solución NaCl 0.1 M y SDS 0.1% (Kim et al., 2003). La emulsión diluida se agitó en un vortex y se midió la absorbencia a una longitud de onda de 500 nm inmediatamente después de la homogenización y después de 10 min. El ESI se calculó utilizando la ecuación reportada por Tang et al. (2006):

$$ESI(\text{min}) = \frac{A_0}{(A_0 - A_{10})} \times 10$$

Dónde A_0 y A_{10} son las absorbencias de las emulsiones diluidas registradas al tiempo 0 y después de 10 minutos.

6.4.8.6. Evaluación del efecto de la concentración de proteína y del tipo y porcentaje de aceite en las propiedades emulsificantes EAI y ESI

6.4.8.6.1 Diseño experimental

Con el objetivo de obtener la mayor información posible acerca de las propiedades emulsificantes de las emulsiones modelo o/w, se evaluó el efecto de la concentración de proteína y del tipo y porcentaje de aceite utilizado como fase dispersa, en la respuesta del EAI y ESI. Para lograr lo anterior, se utilizó un diseño factorial multinivel completo con 3 réplicas (54 experimentos). Los factores y niveles del diseño fueron: concentración de proteína (1, 4.5 y 8 mg/mL); porcentaje de aceite utilizado como fase dispersa en la emulsión (15, 20 y 25%) y tipo de aceite (MEG-3® o maíz). Las combinaciones de concentración de proteína, porcentaje de aceite y tipo de aceite, generadas con el diseño se emplearon para preparar las emulsiones modelo o/w, siguiendo la técnica descrita en el punto 6.4.8.3. El factorial multinivel completo se aplicó por separado para: (1) emulsiones modelo formadas con extracto proteico miofibrilar; y (2) emulsiones modelo control preparadas con ovoalbúmina.

6.4.8.6.2 Análisis estadístico de los datos

El análisis del diseño factorial multinivel para determinar las diferencias significativas en las variables respuesta EAI y ESI, por efecto de los factores y sus interacciones se realizó aplicando ANOVA. Se estableció un nivel de significancia con $P < 0.05$. El diseño experimental y el análisis estadístico se llevaron a cabo con ayuda de los paquetes estadísticos Statgraphics Centurion XVI versión 16.0.07 (StatPoint Technologic Inc., Warrenton, VA, USA) y Minitab® v.11 (State College, PA, USA).

6.4.9 Optimización de los índices EAI y ESI por la metodología de superficies de respuesta (MSR)

6.4.9.1 Formación de la emulsión

Se formaron 36 emulsiones modelo o/w (4 mL de volumen final), siguiendo las combinaciones de concentración de proteína (mg/mL) y porcentaje de aceite (%), generadas con diseños centrales compuestos rotables (DCC) para evaluar el efecto de estos dos factores en la respuesta de los índices EAI y ESI, por separado. Las soluciones de proteína extracto miofibrilar o bien, ovoalbúmina, utilizadas como fase continua y el aceite MEG-3® o de maíz, empleado como fase dispersa para formar la emulsión modelo, se homogenizaron por agitación siguiendo la técnica descrita en el punto 6.4.8.3.

6.4.9.2 Índice de actividad de la emulsión (EAI)

El EAI en las emulsiones modelo formulada a partir del DCC se midió utilizando técnicas turbidimétricas, de acuerdo a la metodología detallada en el punto 6.4.8.4.

6.4.9.3 Índice de estabilidad de la emulsión (ESI)

La determinación del ESI en emulsiones modelo preparadas siguiendo las combinaciones de concentración de proteína y porcentaje de aceite, generadas en un DCC, se realizó con la metodología descrita previamente en el punto 6.4.8.5.

6.4.9.4 Diseño experimental

Se utilizó la metodología de superficies de respuesta (MSR) para investigar el efecto de dos variables independientes denominadas: x_1 (concentración de proteína emulsificante en mg/mL), y x_2 (contenido de aceite empleado como fase dispersa para formar la emulsión modelo, en %) en los índices EAI o ESI, los cuales, fueron considerados las variables respuesta bajo análisis.

El proceso de optimización aplicando la MSR consistió en generar diseños centrales compuestos rotatables (DCC) 2^k con cuatro puntos axiales $\alpha = \pm\sqrt{2} = \pm 1.4142$, cuatro puntos centrales y tres réplicas con ayuda del paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI versión 16.0.07 (Warrenton, VA, USA), para: (1) evaluar el efecto principal y combinado de las variables independientes x_1 y x_2 en las variables respuesta EAI o ESI; (2) obtener una superficie de respuesta y caracterizarla; (3) crear modelos empíricos entre las variables, por medio del ajuste de una ecuación cuadrática y (4) optimizar la proporción de los componentes utilizados para preparar la emulsión modelo en términos de las variables respuestas investigadas para maximizar por separado, los índices EAI y ESI en los sistemas modelo de emulsiones: (a) extracto miofibrilar-MEG-3®; (b) extracto miofibrilar-maíz; (c) ovoalbúmina- MEG-3®; y (c) ovoalbúmina-aceite de maíz.

Se prepararon 36 emulsiones (correspondientes a 36 tratamientos), siguiendo las combinaciones de las dos variables independientes (x_1 y x_2) en 5 niveles, generadas en el DCC. Los tratamientos del DCC se realizaron en bloques y se aleatorizaron para minimizar los efectos de factores externos y de la variabilidad no explicada. Se asumió que los bloques no tuvieron impacto en la naturaleza y forma de la superficie de respuesta. La ventaja del DCC rotatable fue que permitió estudiar simultáneamente los efectos principales y las interacciones de las dos variables independientes en las variables respuestas EAI o ESI.

Las variables x_1 y x_2 , los valores correspondientes a los niveles de las variables, la matriz del DCC y los tratamientos para formular cada emulsión modelo bajo estudio se muestran a continuación.

6.4.9.4.1 Emulsión modelo cárnica: extracto miofibrilar-MEG-3®

EAI

Los niveles de las variables independientes, utilizados en el DCC para optimizar la respuesta del EAI en la emulsión modelo cárnica: extracto miofibrilar-MEG-3®, se muestran en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Niveles de las variables independientes evaluadas en la optimización del EAI en emulsiones modelo formuladas a partir de extracto miofibrilar y aceite MEG-3®.

Variables	Variable codificada	Niveles				
		Axial	Bajo	Central	Alto	Axial
Proteína (mg/mL)	x_1	1.38	2	3.50	5	5.62
Aceite MEG-3® (%)	x_2	12.93	15	20.0	25	27.07

ESI

Los niveles de las variables independientes: concentración de proteína en el extracto miofibrilar y porcentaje de aceite MEG-3® (x_1 y x_2 , respectivamente), empleados en el DCC para optimizar la respuesta del ESI en la emulsión modelo cárnica se especifican en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Niveles de las variables independientes evaluadas en la optimización del ESI en emulsiones modelo formuladas a partir de extracto miofibrilar y aceite MEG-3®.

Variables	Variable codificada	Niveles				
		Axial	Bajo	Central	Alto	Axial
Proteína (mg/mL)	x_1	10.74	11	11.63	12.25	12.51
Aceite MEG-3® (%)	x_2	9.23	9.5	10.00	10.50	10.71

6.4.9.4.2 Emulsión modelo cárnica: extracto miofibrilar-aceite de maíz

EAI

Las variables independientes y sus niveles, utilizados en el DCC para optimizar la respuesta del EAI en la emulsión modelo cárnica: extracto miofibrilar-aceite de maíz, se muestran en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3. Niveles de las variables independientes evaluadas en la optimización del EAI en emulsiones modelo formuladas a partir de extracto miofibrilar y aceite de maíz.

Variables	Variable codificada	Niveles				
		Axial	Bajo	Central	Alto	Axial
Proteína (mg/mL)	x_1	0.19	0.50	1.25	2.00	2.31
Aceite de maíz (%)	x_2	12.93	15.00	20.00	25.00	27.07

ESI

La Tabla 6.4 denota los niveles de las variables independientes: concentración de proteína en el extracto miofibrilar y porcentaje de aceite de maíz, empleados en el DCC para optimizar la concentración de los componentes de la emulsión y maximizar la respuesta del ESI en la emulsión modelo cárnica analizada.

Tabla 6.4. Niveles de las variables independientes evaluadas en la optimización del ESI en emulsiones modelo formuladas a partir de extracto miofibrilar y aceite de maíz.

Variables	Variable codificada	Niveles				
		Axial	Bajo	Central	Alto	Axial
Proteína (mg/mL)	x_1	9.58	10.00	11.00	12.00	12.41
Aceite de maíz (%)	x_2	9.29	9.50	10.00	10.50	10.71

6.4.9.4.3 Emulsión modelo control: ovoalbúmina-MEG-3®

EAI

Los niveles de las variables independientes, utilizados en el DCC para optimizar la respuesta del EAI en la emulsión modelo control: ovoalbúmina-MEG-3®, se observan en la Tabla 6.5.

Tabla 6.5. Niveles de las variables independientes evaluadas en la optimización del EAI en emulsiones modelo formuladas a partir de ovoalbúmina y aceite MEG-3®.

Variables	Variable codificada	Niveles				
		Axial	Bajo	Central	Alto	Axial
Proteína (mg/mL)	x_1	0.72	0.80	1.00	1.20	1.28
Aceite MEG-3® (%)	x_2	17.93	20.00	25.00	30.00	32.07

ESI

Los niveles de las variables independientes: concentración de proteína en la solución de ovoalbúmina y porcentaje de aceite MEG-3® (x_1 y x_2 , respectivamente), empleados en el DCC para optimizar la respuesta del ESI en la emulsión modelo control se especifican en la Tabla 6.6.

Tabla 6.6. Niveles de las variables independientes evaluadas en la optimización del ESI en emulsiones modelo formuladas a partir de ovoalbúmina y aceite MEG-3®.

Variables	Variable codificada	Niveles				
		Axial	Bajo	Central	Alto	Axial
Proteína (mg/mL)	x_1	0.83	0.85	0.90	0.95	0.97
Aceite MEG-3® (%)	x_2	9.29	9.50	10.00	10.50	10.71

6.4.9.4.4 Emulsión modelo control: ovoalbúmina-aceite de maíz

EAI

La Tabla 6.7 especifica las variables independientes y sus niveles, utilizados en el DCC para optimizar la respuesta del EAI en la emulsión modelo control ovoalbúmina-aceite de maíz.

Tabla 6.7. Niveles de las variables independientes evaluadas en la optimización del EAI en emulsiones modelo formuladas a partir ovoalbúmina y aceite de maíz.

Variables	Variable codificada	Niveles				
		Axial	Bajo	Central	Alto	Axial
Proteína (mg/mL)	x_1	0.72	0.80	1.00	1.20	1.28
Aceite de maíz (%)	x_2	17.93	20.00	25.00	30.00	32.07

ESI

La Tabla 6.8 permite observar los niveles de las variables independientes: concentración de proteína en la solución de ovoalbúmina y porcentaje de aceite de maíz, empleados en el DCC para optimizar la concentración de los componentes de la emulsión y maximizar la respuesta del ESI en la emulsión modelo control bajo investigación.

Tabla 6.8. Niveles de las variables independientes evaluadas en la optimización del ESI en emulsiones modelo formuladas a partir de ovoalbúmina y aceite de maíz.

Variables	Variable codificada	Niveles				
		Axial	Bajo	Central	Alto	Axial
Proteína (mg/mL)	x_1	1.22	1.30	1.50	1.70	1.78
Aceite de maíz (%)	x_2	9.29	9.50	10.00	10.50	10.71

6.4.9.5 Análisis estadístico

El efecto de dos variables independientes en las variables respuesta, índice de actividad (EAI) o índice de estabilidad (ESI) de la emulsión, en 36 emulsiones modelo, se investigó utilizando superficies de respuesta. Se realizó un análisis de regresión por ajuste de los datos experimentales de EAI o ESI a un modelo polinomial cuadrático. El modelo polinomial generalizado propuesto que permitió predecir las variables respuesta, se describe a continuación:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2$$

Dónde Y_i es la variable respuesta predicha: EAI en m^2/g , o bien, ESI en min; β_0 es el intercepto, β_1 , β_2 , β_{11} , β_{22} , y β_{12} , son las constantes correspondientes a los coeficientes estimados de los términos lineal, cuadrático y la interacción generados para la ecuación de regresión. Los términos x_1 y x_2 corresponden a las variables independientes no codificadas: concentración de proteína y porcentaje de aceite. El ajuste cuadrático satisfactorio de los modelos obtenidos se evaluó por ANOVA del modelo, prueba de falta de ajuste (lack of fit, por sus siglas en inglés) y evaluación del coeficiente de determinación (R^2). El análisis de los términos significativos para el ajuste del modelo polinomial de segundo orden se estableció con un valor $P < 0.05$. Los modelos cuadráticos reducidos contenían los factores más significativos ($P < 0.05$), sin embargo, en algunos de ellos se decidió conservar variables no significativas ($P > 0.05$), debido a que el término cuadrático o la interacción resultó significativo y contenía dicha variable. Todos los análisis se realizaron con ayuda de los paquetes estadísticos Statgraphics Centurion XVI versión 16.0.07 (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA) y Minitab® v.11 (State College, PA, USA).

6.4.9.6 Optimización

La optimización de los índices EAI y ESI se realizó de forma numérica con ayuda de la función de optimización de los paquetes estadísticos Statgraphics Centurion XVI versión 16.0.07 (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA) y Minitab® v.11 (State College, PA, USA). Dicho proceso se llevó a cabo por separado, para cada índice y consistió en utilizar el modelo polinomial cuadrático obtenido para calcular los niveles de los componentes principales de la emulsión modelo,

que permitieron maximizar la respuesta de EAI, o bien, ESI. Finalmente, la optimización numérica se validó aplicando una prueba estadística *t* para determinar las diferencias significativas ($P < 0.05$) en los valores de los índices EAI o ESI obtenidos de forma numérica, con respecto a los determinados experimentalmente en emulsiones modelo formuladas con las combinaciones de los niveles de concentración de proteína y porcentaje de aceite que maximizaban los índices EAI o ESI.

6.4.10 Estabilización de emulsiones modelo

Después de optimizar las propiedades emulsificantes EAI y ESI en cada una de las emulsiones investigadas en el presente trabajo, se prepararon emulsiones modelo con los niveles de concentración de proteína emulsificante (mg/mL) y porcentaje de aceite (%) que permitieron obtener la respuesta máxima de ESI en emulsiones modelo cárnicas. A continuación, estas emulsiones se sometieron a un tratamiento por ultrasonido de alta potencia para reducir el tamaño de los glóbulos en la emulsión y aumentar su estabilidad.

6.4.10.1 Formación de la emulsión

Se formularon emulsiones modelo o/w: (a) extracto miofibrilar-MEG-3®; (b) extracto miofibrilar-maíz; (c) ovoalbúmina- MEG-3-®; y (c) ovoalbúmina-aceite de maíz. Las emulsiones modelo de 4 mL de volumen final se prepararon utilizando soluciones de extracto miofibrilar o bien, ovoalbúmina (10.7 mg/mL) como fase continua, y aceite de maíz ó MEG-3® (9.3%), como fase dispersa. Las fases de la emulsión se colocaron dentro de viales ámbar Wheaton de 8 mL (Millville, NJ, USA) y se homogenizaron por agitación a una velocidad de 15000 rpm por 2 min (Alamed et al., 2006) y a 4 °C en un baño con hielo con un homogenizador IKA T10 basic ULTRA-TURRAX® (Wilmington, NC, USA). Cada emulsión modelo se preparó al menos, por triplicado.

6.4.10.2 Evaluación del efecto de la amplitud de ultrasonido en el tamaño de los glóbulos de la emulsión

Las emulsiones modelo previamente homogenizadas se sometieron a sonicación utilizando un equipo SONICS vibracell™ VCX130 (Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA) con un sonótrodo de aleación de titanio de 3 mm de diámetro operado a 130 W y a una frecuencia de 20

kHz. Se analizó el efecto de la amplitud de ultrasonido en la distribución del tamaño de los glóbulos en la emulsión utilizando porcentajes de amplitud: 30, 50 y 70%. La punta del sonótrodo se introdujo a una profundidad de 1 cm dentro del vial ámbar que contenía la emulsión, el cual se mantuvo en un baño con hielo durante todo el proceso de sonicación. La aplicación de ultrasonido (para cada amplitud evaluada) se realizó en tres ciclos de 4 min, con 1 min de descanso entre cada ciclo de sonicación (Lad y Murthy, 2012). Los análisis se llevaron a cabo en emulsiones frescas preparadas al menos por triplicado.

6.4.10.3 Determinación del tamaño de los glóbulos en la emulsión

La distribución del tamaño de partícula en las emulsiones modelo o/w se determinó bajo el principio de difracción láser, de acuerdo a la teoría de Mie de la dispersión de la luz por efecto de partículas grandes. Se utilizó un equipo Malvern MasterSizer Micro (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK) equipado con una unidad de dispersión para muestras pequeñas, la cual contenía agua destilada. La longitud de onda de la luz láser emitida por el equipo fue 633 nm. Las muestras de las emulsiones bajo análisis se adicionaron gota a gota con ayuda de una pipeta Pasteur dentro de la unidad hasta alcanzar un porcentaje de obscuración en el intervalo 10-30%. Las mediciones de la distribución del tamaño de partícula se determinaron en términos del diámetro medio del volumen equivalente $d_{4,3}$ (μm), también denominado media de De Broucker, y del diámetro medio de la superficie equivalente o diámetro medio de Sauter, $d_{3,2}$ (μm), con ayuda del programa Malvern MasterSizer version Micro. Los resultados correspondientes al tamaño de partícula en las emulsiones se obtuvieron del promedio de cinco mediciones realizadas en al menos tres emulsiones preparadas por separado.

6.4.10.4 Evaluación de la estabilidad física de emulsiones modelo sometidas a sonicación

Las emulsiones modelo sometidas a sonicación utilizando los distintos porcentajes de amplitud de ultrasonido de alta potencia, mencionados en el punto 6.4.10.2, se incubaron a 37 °C y se evaluó su estabilidad física en función al tiempo de incubación, midiendo el tamaño medio de los glóbulos siguiendo la técnica descrita en el punto 6.4.10.3. El $d_{3,2}$ (μm) se registró después de formar la emulsión y en intervalos de 24 h, por un tiempo total de hasta 120 h de incubación.

6.4.11 Oxidación de emulsiones

Finalmente, se monitoreó la oxidación de emulsiones modelo almacenadas a 37 °C. Se realizó un muestreo periódico cada 24 h en un intervalo de tiempo: 0-120 h, y se determinó la cantidad de hidroperóxidos y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés) denominados productos primarios y secundarios de oxidación, respectivamente. Todas las pruebas se realizaron por separado y para cada una de las emulsiones modelo: (a) extracto miofibrilar-MEG-3®; (b) extracto miofibrilar-maíz; (c) ovoalbúmina- MEG-3®; y (c) ovoalbúmina-aceite de maíz.

6.4.11.1 Pruebas preliminares

Antes de preparar los sistemas modelo o/w y realizar la determinación de los productos de oxidación formados durante el almacenamiento de las emulsiones a 37 °C, fue necesario ajustar por separado la concentración inicial de hidroperóxidos en el aceite de pescado MEG-3® y en el aceite de maíz. Lo anterior se llevó a cabo exponiendo las muestras de aceite a luz fluorescente con una intensidad lumínica de 4300 lux por 5 min (aceite MEG-3®) y ~120 min (aceite de maíz). La concentración inicial de hidroperóxidos ajustada por tratamiento lumínico, en los aceites empleados por separado como fase dispersa se determinó haciendo uso de la adaptación del método FOX2.

6.4.11.2 Determinación de hidroperóxidos lipídicos

Los hidroperóxidos en emulsiones se determinaron de acuerdo a lo reportado por Alamed et al. (2006). Alícuotas de 0.3 mL de emulsión se mezclaron con 1.5 mL de isooctano/2-propanol (3:1 v/v) y se agitaron utilizando un vortex (10 s, 3 veces), posteriormente se centrifugaron a 1000g por 2 min para separar la fase orgánica. A continuación, 200 µL de la fase orgánica se adicionaron a 2.8 mL de metanol/1-butanol (2:1 v/v), seguido de la adición de 15 µL de solución de tiocianato de amonio 3.94 M y 15 µL de solución ferrosa (ésta se preparó al momento de las determinaciones, adicionando cantidades iguales de 0.132 M BaCl₂ y 0.144 M FeSO₄; la mezcla obtenida se homogenizó en vortex y se sometió a centrifugación a 1000g por 2 min, se descartó el precipitado y el sobrenadante se separó y almacenó en un frasco ámbar con tapa). Después de 20 min, se leyó la absorbencia a 510 nm. Las concentraciones de hidroperóxidos se determinaron a partir de una curva patrón de hidroperóxido de cumeno (CHP). Los análisis se realizaron por triplicado.

6.4.11.3 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La formación de productos secundarios de oxidación en emulsiones se monitoreó con el método TBARS, siguiendo la metodología descrita por Dimakou et al. (2007). Muestras de 0.3 mL de emulsión se colocaron en tubos de vidrio con tapa y se mezclaron con 0.7 mL de agua deionizada y 2 mL de solución de TBA (ésta se preparó mezclando 15 g de ácido tricloroacético, 0.375 g de ácido tiobarbitúrico, 1.76 mL 12 N HCl y 82.9 mL H₂O), a continuación se homogenizaron con la ayuda de un vortex y introdujeron en un baño de agua a ebullición por 15 min. Los tubos se enfriaron a temperatura ambiente por 10 min y después se centrifugaron a 2000g por 15 min. Finalmente, se midió el cambio en la absorbencia a 532 nm. La concentración de TBARS se calculó interpolando las lecturas de absorbencia en una curva patrón preparada con 1, 1, 3, 3-tetraetoxipropano (TEP). Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

CAPITULO 7

CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES
EMPLEADOS PARA FORMAR EMULSIONES

MODELO

Caracterización de materiales empleados para formar emulsiones modelo

El presente trabajo de tesis se centró en la formación y análisis de la estabilidad física y oxidativa de emulsiones modelo simples aceite en agua (o/w) denominadas emulsiones modelo cárnicas, debido a que se utilizó un extracto miofibrilar obtenido del músculo *Longissimus dorsi* de carne de cerdo como agente emulsificante y dos tipos de aceite, por separado, como fase dispersa de la emulsión: aceite de pescado MEG-3®, o bien, aceite de maíz. De manera paralela y con el objetivo de contrastar el comportamiento del extracto miofibrilar, se formularon emulsiones modelo o/w, utilizando ovoalbúmina grado II como agente emulsificante control y los aceites mencionados anteriormente por separado, como la fase dispersa.

Previo a la formación de las emulsiones y debido a que resultó importante conocer la naturaleza de los materiales utilizados para formular los sistemas modelo o/w evaluados, se llevó a cabo la caracterización de las proteínas utilizadas como emulsificantes obteniendo los perfiles electroforéticos SDS-PAGE y se determinó la composición de ácidos grasos de los aceites (MEG-3® o maíz) utilizados como fase dispersa de la emulsión.

7.1 Evaluación del perfil electroforético en condiciones desnaturalizantes de las proteínas empleadas como emulsificantes

Con el objetivo de evaluar la pureza y conocer los pesos moleculares de las proteínas, tanto del extracto miofibrilar obtenido de las muestras del músculo *Longissimus dorsi* de carne de cerdo, como de la solución de ovoalbúmina grado II, se realizaron electroforesis SDS-PAGE. Como referencia, se utilizó un marcador de pesos moleculares de BIO-RAD SDS-PAGE 161-0303 (Hercules, CA, USA).

7.1.1 Extracto miofibrilar

El gel obtenido para los extractos proteicos miofibrilares se muestra en la Figura 7.1.

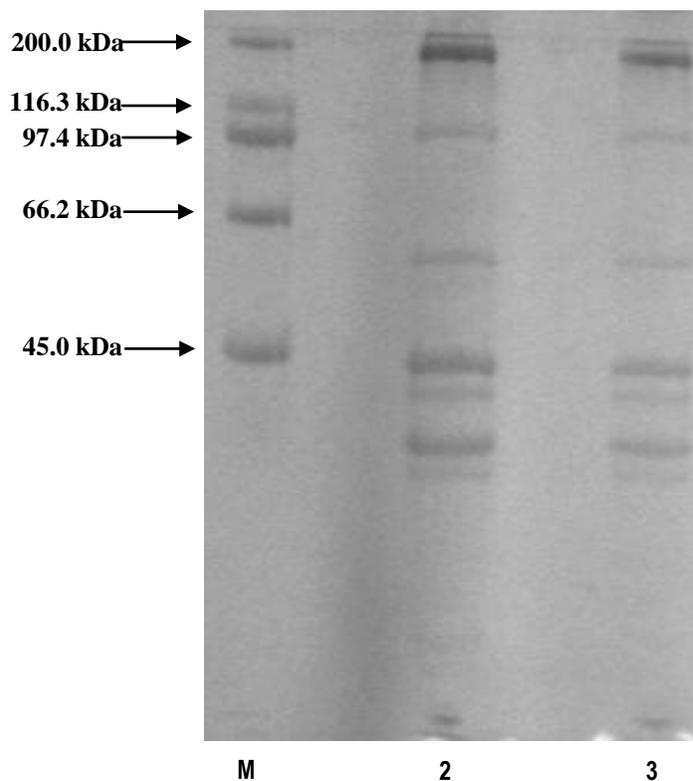


Figura 7.1. Gel de electroforesis SDS-PAGE del extracto proteico miofibrilar del músculo *Longissimus dorsi* de carne de cerdo. M: Marcador de pesos moleculares conocidos; 2: Extracto miofibrilar 3.87 ± 0.07 mg/mL de proteína; 3. Extracto miofibrilar 2.87 ± 0.25 mg/mL de proteína.

Los densitogramas para los extractos proteicos analizados permitieron observar claramente picos característicos correspondientes a las bandas de proteína que conformaron el perfil electroforético de las muestras analizadas, el cual se dividió en seis zonas para su análisis (Figura 7.2).

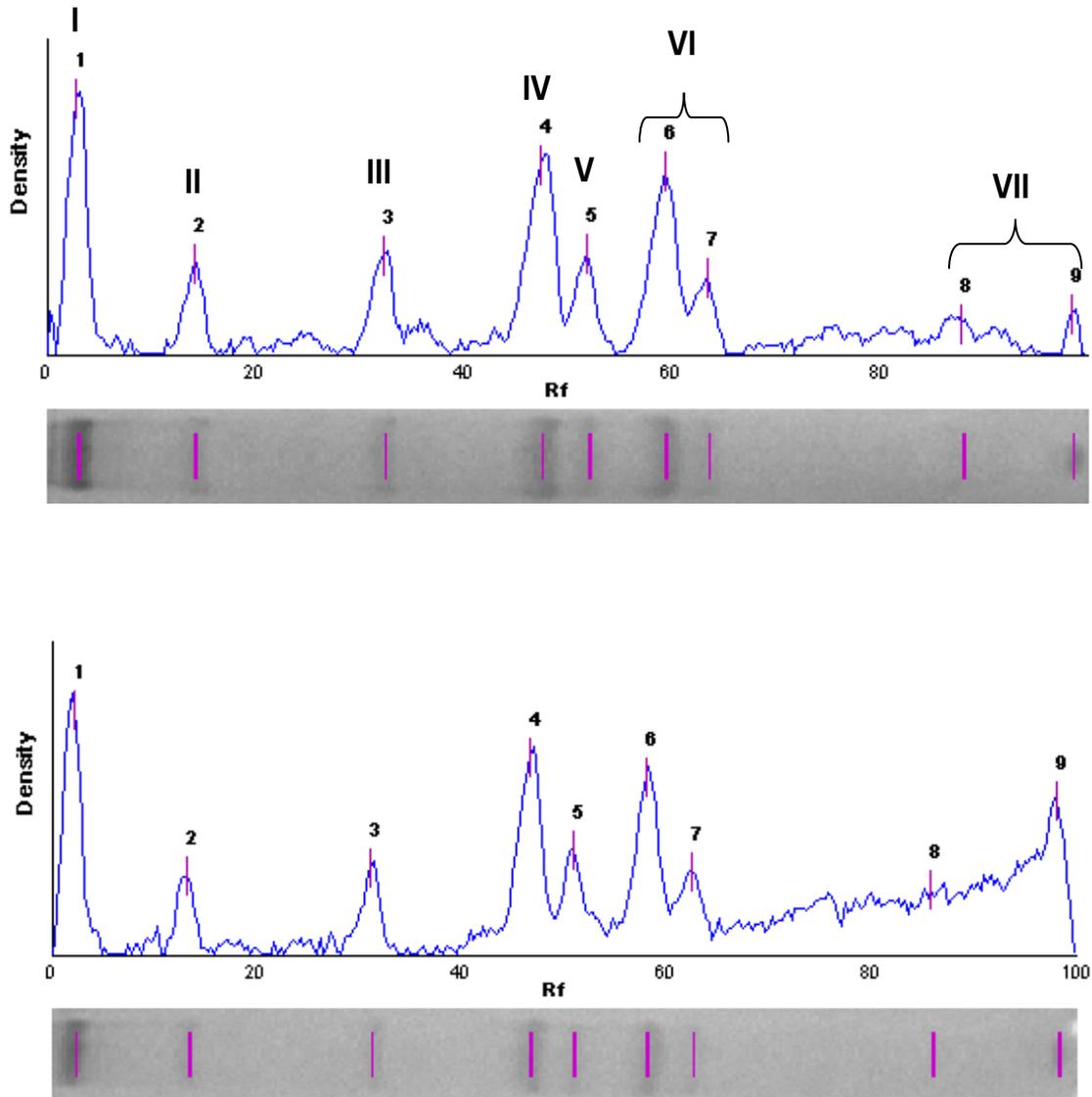


Figura 7.2. Perfil electroforético SDS-PAGE de extractos proteicos miofibrilares del músculo *Longissimus dorsi* de carne de cerdo: (A) 3.87 ± 0.07 y (B) 2.87 ± 0.25 mg/mL de proteína. I. Cadena pesada de miosina; II. α -Actinina; III. Posible vimentina; IV. Actina; V. Troponina T; VI. Tropomiosinas y VII. Troponina I y cadenas ligeras de miosina.

La zona I mostró la banda más intensa con un peso molecular cercano a 200 kDa. Se puede inferir que correspondió a la cadena pesada de miosina. Westphalen et al. (2006) identificaron miosina con un peso molecular de 209 kDa en las miofibrillas extraídas de carne de cerdo. Investigaciones

previas mencionaron que las bandas más abundantes en los perfiles electroforéticos de la fracción natural de actomiosina extraída de carne de cerdo, pollo y merluza, fueron las correspondientes a la cadena pesada de miosina y actina (Careche et al., 1998). En la zona II se identificó una banda con un peso molecular aproximado de 100 kDa, es posible que dicha banda corresponda a α -actinina, que suele poseer pesos moleculares de entre 95 y 100 kDa. Boles et al. (1992) mencionaron que el análisis por SDS-PAGE de la fracción miofibrilar aislada de muestras del músculo *Longissimus* de carne de cerdo permitió identificar de manera más fácil la banda de 100 kDa correspondiente a α -actinina.

Se obtuvo una banda con un peso molecular aproximado de 58 kDa en la zona III del densitograma. Se cree que esta banda es vimentina, tomando de referencia, lo reportado con anterioridad por Whipple y Koohmaraie (1991).

La zona IV permitió observar una banda intensa con un peso molecular cercano a 43.4 kDa, correspondiente a actina. Se ha publicado que la actina presentó un peso molecular de 43 kDa en la fracción miofibrilar aislada del músculo *Longissimus* de cerdo (Boles et al., 1992). Esta proteína además de la miosina, es de las más abundantes en la carne de diferentes especies (Careche et al., 1998). Justo después de la actina, en la zona V se logró separar una proteína cuyo peso molecular aproximado fue 39 kDa, la cual pudo identificarse como troponina T. García-Barrientos (2007) mencionó que la troponina T observada en el perfil electroforético SDS-PAGE de extractos miofibrilares de carne de cerdo presentó un peso molecular de 37 kDa, este valor es muy cercano al obtenido en nuestro análisis.

Las bandas obtenidas en la zona VI mostraron pesos moleculares cercanos a 34 y 31 kDa. Dichas bandas podrían revelar la presencia de tropomiosinas (García-Barrientos, 2007). Finalmente, en la zona VII se observó una banda de aproximadamente 20 kDa y una de peso molecular menor, cercana a los 16 kDa. Posiblemente estas bandas indiquen la existencia de troponina I (20-25 kDa) (Chou, 2002) y cadenas ligeras de miosina (25.18-16 kDa) (Skaara y Regenstein, 1990) en el extracto miofibrilar analizado.

7.1.2 Ovoalbúmina grado II

El gel de electroforesis desnaturizante correspondiente a una de solución de ovoalbúmina grado II, obtenida de Sigma (St. Louis, MO, USA) se muestra a continuación (Figura 7.3).

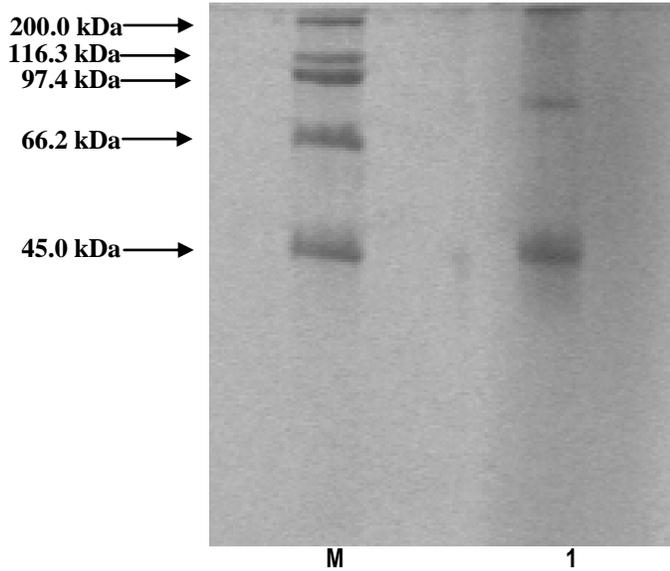


Figura 7.3. Gel SDS-PAGE de solución de ovoalbúmina grado II. M: marcador de pesos moleculares; 1: Solución de ovoalbúmina en concentración 2.3 ± 0.03 mg de proteína/mL.

El densitograma de la solución de ovoalbúmina permitió observar dos bandas con pesos moleculares aproximados de 80.7 y 44.4 kDa (Figura 7.4).

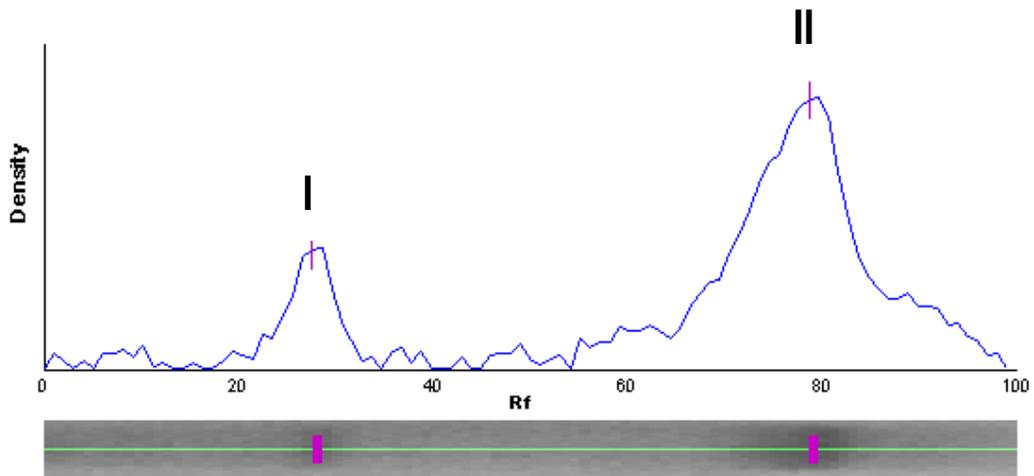


Figura 7.4. Perfil electroforético de solución de ovoalbúmina grado II: I. Proteína con peso molecular aproximado de 80.7 kDa; II. Ovoalbúmina.

Caracterización de materiales empleados para formar emulsiones modelo

La proteína con un peso molecular aproximado de 44.4 kDa corresponde a la ovoalbúmina, la cual posee un peso molecular de 45 kDa, tal y como se aprecia en el marcador de proteínas de peso molecular conocido. Por otro lado, es posible que la banda de 80.7 kDa corresponda a la proteína ovotransferrina, que suele presentar pesos moleculares de entre 78 y 80 kDa (Hayashi et al., 2008; Valenti et al., 1982). El resultado anterior demostró que la ovoalbúmina Sigma grado II no es un reactivo puro, sin embargo, la intensidad de las bandas demuestra que la proteína ovoalbúmina es la más abundante. La ovoalbúmina es la proteína mayoritaria en la clara de huevo y se usa comúnmente en la industria de los alimentos debido a su habilidad espumante y gelificante al someterse a calentamiento. Esta proteína está compuesta por 385 residuos (44 kDa), una cadena de carbohidrato, cero a dos grupos fosforil, cuatro grupos sulfhidrilo libres y un enlace disulfuro -S-S- (Galazca et al., 2000).

7.2 Perfil de ácidos grasos del aceite de pescado MEG-3®

Los ácidos grasos más abundantes en el aceite de pescado expresados como g de ácido/100 g de aceite, fueron: palmítico (15.8), EPA (9.8), DHA (9.6), oleico (9.6), palmitoleico (8.9) y esteárico (8.1) (Tabla 7.1).

El contenido total de ácidos grasos saturados (SFA, por su siglas en inglés) en el aceite MEG-3®, determinado por cromatografía de gases fue 31.2 g/100 g de aceite. Gámez-Meza et al. (1999) reportaron previamente un contenido total de SFA de (31.9%) en sardina del Golfo de California. Por otro lado, Turan et al. (2007) encontraron concentraciones totales de SFA en aceite de anchoa de 33.25 a 33.61%, siendo el ácido palmítico, el ácido graso más abundante (19.96-20.66%) en la fracción de SFA. Estos resultados sustentan a los obtenidos al analizar el perfil de ácidos grasos del aceite comercial MEG-3®, puesto que el ácido palmítico fue el que estuvo presente en mayor concentración.

Caracterización de materiales empleados para formar emulsiones modelo

Tabla 7.1. Perfil de ácidos grasos del aceite comercial MEG-3® analizado por cromatografía de gases (GC).

Ácido graso	g/100 g aceite
mirístico (14:0)	7.3 ± 0.1 ^{1,2}
palmítico (16:0)	15.8 ± 1.0
palmitoleico (16:1, <i>n</i> -7)	8.9 ± 0.6
esteárico (18:0)	8.1 ± 1.0
oleico (18:1, <i>n</i> -9)	9.6 ± 1.2
linoleico (18:2, <i>n</i> -6)	2.0 ± 0.2
EPA (20.5, <i>n</i> -3)	9.8 ± 1.1
DHA (22.6, <i>n</i> -3)	9.6 ± 0.7
SFA Total	31.2
MUFA Total	18.5
PUFA Total	21.4
<i>n</i> -3	19.4
<i>n</i> -6	2.0

¹ media ± σ^2

² n=2

SFA: ácidos grasos saturados

MUFA: ácidos grasos monoinsaturados

PUFA: ácidos grasos polinsaturados

La cantidad total de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA, por sus siglas en inglés) fue 18.5 g/100 g de aceite. Los ácidos grasos más abundantes en esta fracción fueron el ácido oleico y palmitoleico (9.6 y 8.9 g/100 g aceite, respectivamente). Turan et al. (2007), reportaron que el contenido de MUFA en aceite de anchoa se encontraba en el intervalo 20.23-21.62%, siendo el ácido oleico el que estuvo presente en mayor concentración (12.29-13.44%). En general, se ha reportado que la fracción de MUFA es más abundante que la PUFA (ácidos grasos polinsaturados, por sus siglas en inglés) en sardina, macarena y mezclas comerciales de aceites marinos (Kartal et al., 2003), sin embargo en las muestras de aceite MEG-3® analizadas la concentración de la fracción PUFA (21.4 g/100 g de aceite) fue mayor que la MUFA (18.5 g/100 g de aceite) (Tabla 7.1). Cabe destacar que el contenido total de PUFA en el aceite bajo estudio fue similar a resultados obtenidos y reportados previamente por otros autores, dicho contenido se encuentra en el intervalo

Caracterización de materiales empleados para formar emulsiones modelo

19.095-42.484% (Gámez-Meza et al., 1999; Kartal et al., 2003; Turan et al., 2007; Zlatanos y Laskaridis, 2007).

La concentración total de ácidos grasos *n-6* y *n-3* en el aceite analizado fue 2.0 g/100 g de aceite y 19.4 g/100 g de aceite, respectivamente. Zlatanos y Laskaridis (2007) obtuvieron un contenido total de ácidos grasos *n-6* de 2.72 g/100 g en aceite de sardina y 2.34 g/100 g en aceite de anchoa. Los ácidos grasos EPA (9.8 g/100 g aceite) y DHA (9.6 g/100 g aceite) en las muestras bajo estudio correspondieron al 91% del total de PUFA en el aceite; un contenido similar (86.5%) fue reportado por Gámez-Meza et al. (1999) en aceite de sardina del Golfo de California. Kartal et al. (2003) también encontraron en aceite de anchoa altas concentraciones de ácidos *n-3* y bajas concentraciones de *n-6* PUFA. El producto MEG-3® proporcionado por la compañía canadiense Ocean Nutrition Canada Limited™ (Halifax, NS, Canadá), es un aceite de pescado comercial concentrado y refinado, derivado principalmente de los peces sudamericanos de aguas frías: anchoa (*Engraulis ringens*) y sardina (*Sardinops sagax*). Por lo tanto, este aceite se caracteriza por contener altas concentraciones de ácidos grasos polinsaturados de cadena larga *n-3*, particularmente EPA y DHA (www.ocean-nutrition.com).

Las concentraciones de ácido EPA y DHA en sardina, anchoa y picarel obtenidas por otros autores fueron 10.67, 7.75, 9.26 g/100 g, y 20.8, 21.08, 18.44 g/100 g, respectivamente (Zlatanos y Laskaridis, 2007). El contenido obtenido en nuestros estudios para el ácido EPA (9.8 g/100 g aceite), es muy cercano a lo reportado por estos autores. En el caso del ácido DHA, la concentración obtenida en el aceite MEG-3® (9.6 g/100 g aceite) fue menor a lo reportado por los trabajos previos mencionados anteriormente. Sin embargo, las diferencias en las concentraciones de ácidos grasos *n-3* pueden deberse a factores ambientales y de temporada de pesca (Karaçalı et al., 2011), a las condiciones de manejo y almacenamiento del aceite, así como también a si las especies fueron salvajes o cultivadas (Kartal et al., 2003; Zlatanos y Laskaridis, 2007).

7.3 Perfil de ácidos grasos del aceite comercial de maíz

La composición de ácidos grasos, obtenida por GC-MS, del aceite comercial de maíz, se muestra en la Tabla 7.2. Los ácidos grasos más abundantes, expresados en g de ácido/100 g de aceite, fueron: ácido linoleico (56.6), oleico (39.4), palmítico (14.9), esteárico (2.2) y linoleico conjugado (2.2) (CLA, por sus siglas en inglés).

Caracterización de materiales empleados para formar emulsiones modelo

Tabla 7.2. Perfil de ácidos grasos del aceite comercial de maíz analizado por cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS).

Ácido graso	g/100 g de aceite
palmítico (16:0)	14.9 ± 0.03 ^{1,2}
esteárico (18:0)	2.2 ± 0.04
oleico (18:1, <i>n</i> -9)	39.4 ± 0.4
linoleico (18:2, <i>n</i> -6)	56.6 ± 0.9
linoleico conjugado (18:2, <i>n</i> -6, c9, t11 CLA)	2.2 ± 0.07
araquídico (C20:0)	0.9 ± 0.02
gondoico (C20:1, <i>n</i> -9)	0.7 ± 0.03
SFA Total	18
MUFA Total	40.1
PUFA Total	58.8
<i>n</i> -6	58.8
<i>n</i> -9	40.1

¹ media ± σ^2

² n=2

SFA: ácidos grasos saturados

MUFA: ácidos grasos monoinsaturados

PUFA: ácidos grasos polinsaturados

El contenido total de SFA fue 18 g/100 g, siendo el ácido palmítico, el ácido graso saturado más abundante (14.9 g/100 g). Trabajos previos señalaron que la concentración de ácido palmítico, en muestras de aceite de maíz comercial y en dos aceites de maíz de nueva generación, se encontró en el intervalo 10.56–12.29% (Moreau et al., 2009). En nuestro caso la concentración de ácido palmítico fue mayor, a lo reportado por estos autores. Sin embargo, tanto en el aceite de pescado MEG-3®, como en el aceite de maíz, el ácido palmítico fue el ácido graso saturado más abundante en la fracción SFA, al presentarse en concentraciones similares: 15.8 g y 14.9 g/100 g de aceite, respectivamente.

El aceite de maíz comercial analizado es una fuente rica de ácidos grasos mono y polinsaturados, puesto que presentó un contenido total de MUFA y PUFA de 40.1 y 58.8 g/100g, respectivamente.

Caracterización de materiales empleados para formar emulsiones modelo

La fracción MUFA estuvo representada en su totalidad por ácidos grasos *n-9*, mientras que la fracción PUFA estuvo compuesta por los ácidos grasos *n-6*. El ácido oleico (39.4 g/100 g) fue el que presentó la mayor concentración en el grupo MUFA. Goffman y Böhme (2001) reportaron que el ácido oleico es el segundo más abundante en muestras de aceite de maíz híbrido y señalan que suele encontrarse en un intervalo de concentración de 19.5-30.5%, lo mencionado por estos autores respalda los resultados obtenidos en el análisis por GC-MS de las muestras de aceite de maíz. Por otro lado, el ácido linoleico fue el más abundante en el aceite comercial de maíz analizado (56.6 g/100 g), este ácido en conjunto con el isómero *c9, t11* CLA (2.2 g/100 g), componen a la fracción PUFA. Moreau et al. (2009) reportaron que el ácido linoleico fue el ácido graso que presentó la concentración más alta en muestras de aceite de maíz, con contenidos de 54.55% en aceite de fibra y 57.26% en aceite comercial. La concentración de ácido linoleico en nuestras muestras concuerda con las obtenidas por estos autores. Resultó interesante encontrar CLA en el aceite comercial de maíz bajo estudio, sin embargo, Tokuşoğlu (2008) reportó concentraciones de 0.62% y 1.24% del isómero de CLA *c9, t11*, en aceite de maíz crudo y refinado, respectivamente. Además, señaló que con el proceso de refinado del aceite, la concentración del isómero de CLA aumentó 1.99 veces, comparada con el aceite crudo. La concentración del isómero *c9, t11* CLA (2.2 g/100 g) encontrada en el aceite de maíz comercial bajo análisis, fue cercana a la reportada en aceite de maíz refinado (1.24%). Jung et al. (2002) reportaron que la formación de CLA en aceites durante el proceso de hidrogenación está afectada por el tipo y concentración de los catalizadores, la presión de hidrógeno y las especies del aceite. La alteración en la cantidad de CLA puede ser utilizada como un indicador de la calidad del proceso de refinado, debido a la contribución de éste ácido a la fracción de PUFA (Tokuşoğlu, 2008).

Finalmente, se detectó la presencia de ácidos grasos de cadena larga (con 20 carbonos en su estructura química) en las muestras de aceite de maíz, sin embargo dichos compuestos se encontraron en concentraciones muy bajas (menores a 1 g/100 g de aceite). Los ácidos grasos de cadena larga identificados por GC-MS en las muestras de aceite de maíz correspondieron al ácido graso saturado denominado araquídico y al ácido gondoico, éste último es un ácido graso monoinsaturado de la familia *n-9*.

De manera general, el aceite de pescado MEG-3® mostró un perfil de ácidos grasos mucho más diverso, comparado con el aceite de maíz, puesto que en el aceite MEG-3® estuvieron presentes como parte de su composición ácidos grasos saturados, monoinsaturados *n-7* y *n-9*, así como polinsaturados *n-3* y *n-6*. En contraste, el aceite de maíz estuvo compuesto en su mayoría por ácidos grasos *n-6* y *n-9*, representados por el ácido linoleico y oleico, los cuales fueron los más

Caracterización de materiales empleados para formar emulsiones modelo

abundantes. Los lípidos marinos generalmente contienen un intervalo más amplio de ácidos grasos, comparados con su contraparte terrestre, incluyendo plantas y animales. Los aceites vegetales están constituidos normalmente por ácidos grasos saturados e insaturados con cadenas de 16 a 18 carbonos, mientras que los aceites marinos están compuestos principalmente de ácidos grasos que contienen de 14 a 22 carbonos (Narayan et al., 2006).

Conclusiones parciales

Los resultados presentados en este capítulo mostraron que el extracto miofibrilar utilizado como emulsificante para estabilizar emulsiones modelo cárnicas o/w, es una solución que contiene más de siete proteínas con pesos moleculares en el intervalo 16-200 kDa, las cuales se identificaron con claridad en el perfil electroforético SDS-PAGE, debido a la separación e intensidad de las bandas obtenidas. Por el contrario, la solución de ovoalbúmina grado II, empleada como emulsificante control, estuvo compuesta principalmente por dicha proteína, aún cuando se detectaron trazas de posible ovotransferrina. Lo anterior mostró que como se sabía, el extracto miofibrilar es una solución proteica más compleja, comparada con la solución de ovoalbúmina grado II, debido al tipo y número de proteínas presentes en solución.

El análisis por GC del perfil de ácidos grasos del aceite de pescado MEG-3® y del aceite de maíz, permitió observar que ambos aceites contienen como parte de su composición a los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico. Sin embargo, la concentración de estos ácidos grasos en cada uno de los aceites dependió de la naturaleza de los mismos. El aceite MEG-3® mostró un perfil de ácidos grasos más diverso que el aceite de maíz, además como parte de su composición presentó concentraciones altas de ácidos grasos polinsaturados de cadena larga *n-3*: EPA y DHA, los cuales son los más insaturados al poseer 5 y 6 dobles enlaces en su estructura química, respectivamente.

CAPITULO 8

ADAPTACIÓN DEL MÉTODO FOX2 PARA CUANTIFICAR HIDROPERÓXIDOS EN ACEITE

Adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite

En el capítulo anterior, se determinó la composición de los materiales que se utilizarán para formar emulsiones modelo simples o/w, las cuales son los sistemas bajo investigación en este trabajo de tesis. Previo a la formulación de las emulsiones y a la evaluación de su estabilidad oxidativa, resultó necesario determinar el nivel de oxidación del aceite de pescado MEG-3® y del aceite de maíz, los cuales al emplearse por separado constituirán la fase dispersa de la emulsión. Para evaluar el nivel de oxidación de los aceites bajo análisis, se cuantificó el contenido de hidroperóxidos presentes en muestras de aceite sometidas a distintas condiciones de almacenamiento. La cuantificación del contenido de hidroperóxidos en aceites se llevó a cabo realizando una adaptación de la versión II del método de oxidación ferrosa de naranja xilenol (FOX2), el cual es un ensayo analítico que ofrece la posibilidad de determinar el contenido total de hidroperóxidos de manera rápida y sencilla, así como también, evaluar la susceptibilidad de los aceites a la oxidación. La adaptación del método FOX2 se llevó a cabo evaluando el efecto de la concentración de aceite en el desempeño del método y la influencia del volumen de la alícuota de aceite solubilizado adicionada al ensayo en la determinación de hidroperóxidos. Estas pruebas permitirán establecer las condiciones analíticas adecuadas que garanticen la cuantificación precisa, sensible y reproducible de las concentraciones de hidroperóxidos en el aceite utilizado como fase dispersa, previo a la formación de la emulsión. El método FOX2 se adaptó por separado para los aceites: MEG-3® y maíz.

8.1 Aceite de pescado MEG-3®

8.1.1 Efecto de la concentración de aceite en el desempeño del método FOX2

La absorbancia medida a 560 nm para detectar la presencia de hidroperóxidos lipídicos en el aceite MEG-3® al utilizar el método FOX2 aumentó a medida que se incrementaba la cantidad de aceite en las muestras analizadas. Se observó una relación lineal entre el contenido de aceite y la absorbancia en los intervalos 0.75-10 mg y 10-80 mg en las muestras almacenadas bajo las condiciones T1, y entre 0.75 hasta 10 mg para las muestras mantenidas en las condiciones T2 (Figura 8.1).

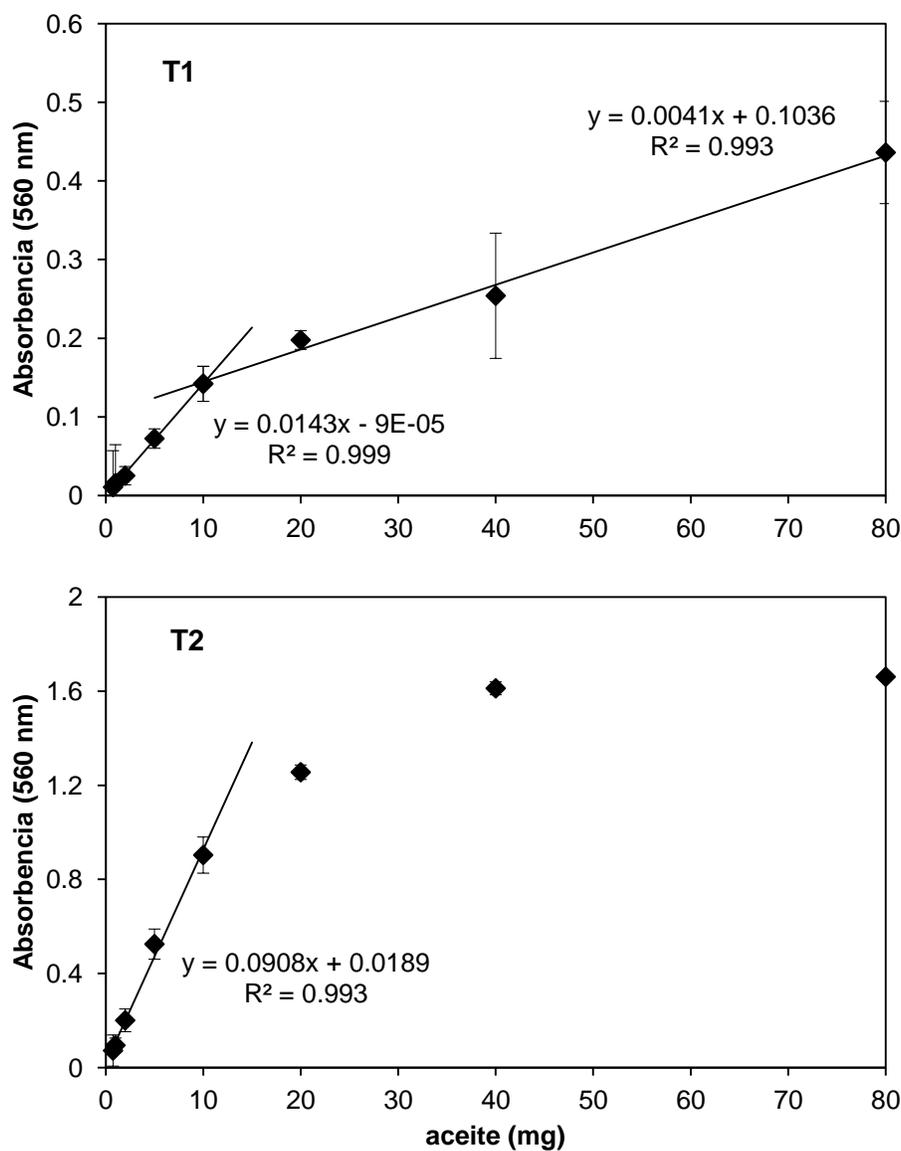


Figura 8.1. Efecto de la concentración de aceite de pescado MEG-3® en la respuesta lineal de absorbancia usando el método FOX2. (T1) -20 °C, 6 días, en ausencia de aire; (T2) 20 °C, 2 días, en contacto con aire.

Adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite

Martínez Téllez et al. (2005) encontraron una relación lineal entre la absorbencia medida a 560 nm y la cantidad de aceite de girasol ozonizado, al utilizar de 2 a 17 µg de aceite. Si bien, el aceite mantenido bajo las condiciones T1 mostró una relación proporcional entre la cantidad de aceite y la absorbencia, que se ajustó al modelo de una recta ($R^2=0.993$) al utilizar masas de aceite de 10 y hasta 80 mg, se observó que la absorbencia comenzó a desviarse del ajuste lineal inicial comprendido en el intervalo 0.75-10 mg de aceite, al emplear cantidades de aceite por arriba de los 10 mg tanto en las muestras T1, como en las T2, debido a que el aceite de pescado en exceso no se solubilizó por completo en el reactivo metanólico FOX2, el cual posee un radio metanol/agua 91/9 (v/v) en la mezcla de reacción (Eymard y Genot, 2003). Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Nourooz-Zadeh et al. (1995), quienes indican la pérdida del ajuste lineal en las mediciones de absorbencia en el ensayo FOX2 al utilizar contenidos de aceite de oliva por arriba de los 20 mg.

El aceite de pescado comercial MEG-3® utilizado en el ensayo, es rico en ácido palmítico (C16:0) y *n*-3 PUFA, particularmente EPA (C20:5) y DHA (C22:6), lo cual, le confiere propiedades hidrofóbicas y lo hace mucho más miscible en solventes de baja polaridad, al estar presente en concentraciones elevadas. Okuyama et al. (2008) mencionaron que los fosfolípidos que contienen DHA y ácido araquidónico presentan una estructura más compacta comparada con aquellos que poseen una cantidad menor de ácidos grasos insaturados, además, las membranas compuestas por fosfolípidos con ácidos grasos saturados como el ácido hexadecanoico (C16:0) y PUFA (DHA y probablemente EPA) pueden formar interfaces mucho más hidrofóbicas. Es por lo anterior que la miscibilidad del aceite en el reactivo FOX2 se reduce si la concentración de la muestra es muy alta, lo cual provoca que los gráficos de contenido de aceite contra absorbencia se desvíen del ajuste lineal.

Una vez que se encontraron los intervalos de respuesta lineal entre el contenido de aceite y la absorbencia medida a 560 nm de las muestras T1 y T2 en el ensayo FOX2, se tomó la decisión de utilizar 5 y 20 mg de aceite/mL de propan-1-ol para llevar a cabo la evaluación del efecto del volumen de la alícuota de aceite solubilizado en propan-1-ol, en la determinación de hidroperóxidos en las muestras de aceite de pescado.

8.1.2 Influencia del volumen de la alícuota de aceite solubilizado en propan-1-ol en la determinación de hidroperóxidos por el método FOX2

El propan-1-ol es un alcohol simple más hidrofóbico que el metanol y el etanol, pero es miscible en agua (Harpaz et al., 1994); su hidrofobicidad le permitió solubilizar y recuperar una mayor cantidad de fosfolípidos ricos en ácidos ω 3 EPA y DHA en aceite de sardina. Con base en lo anterior, se prepararon soluciones de aceite de pescado disuelto en propan-1-ol en dos concentraciones (5 y 20 mg de aceite/mL de propan-1-ol) y se evaluó el efecto del volumen de la alícuota de aceite solubilizado en la cuantificación de hidroperóxidos por el método FOX2 en las muestras sometidas a los tratamientos T1 (-20 °C, 6 días, en ausencia de aire) y T2 (20 °C, 2 días, en contacto con aire). Cabe mencionar que debido a que el reactivo FOX2 contiene metanol permite una buena recuperación de hidroperóxidos lipídicos, los cuales son más polares que los lípidos no oxidados (Bou et al., 2008).

Los resultados obtenidos mostraron que la absorbencia registrada a 560 nm aumentó proporcionalmente al incrementar el volumen de aceite solubilizado adicionado a la mezcla de reacción en el intervalo 25-150 μ L, ajustándose al modelo de una recta al utilizar soluciones en concentración 5 mg de aceite/mL de propan-1-ol, preparadas a partir de las muestras T1 ($R^2= 0.990$) y T2 ($R^2= 0.992$) (Figura 8.2a). Grau et al. (2000) encontraron una relación lineal entre el volumen de extracto de tejido de carne cruda o cocida de pollos alimentados con diferentes dietas y de muestras comerciales de carne cruda fresca, adicionado a la mezcla de reacción y la absorbencia detectada a 560 nm en el método FOX2, al utilizar alícuotas de extracto de carne en el intervalo 50-150 μ L dependiendo del tipo de muestra evaluada.

Adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite

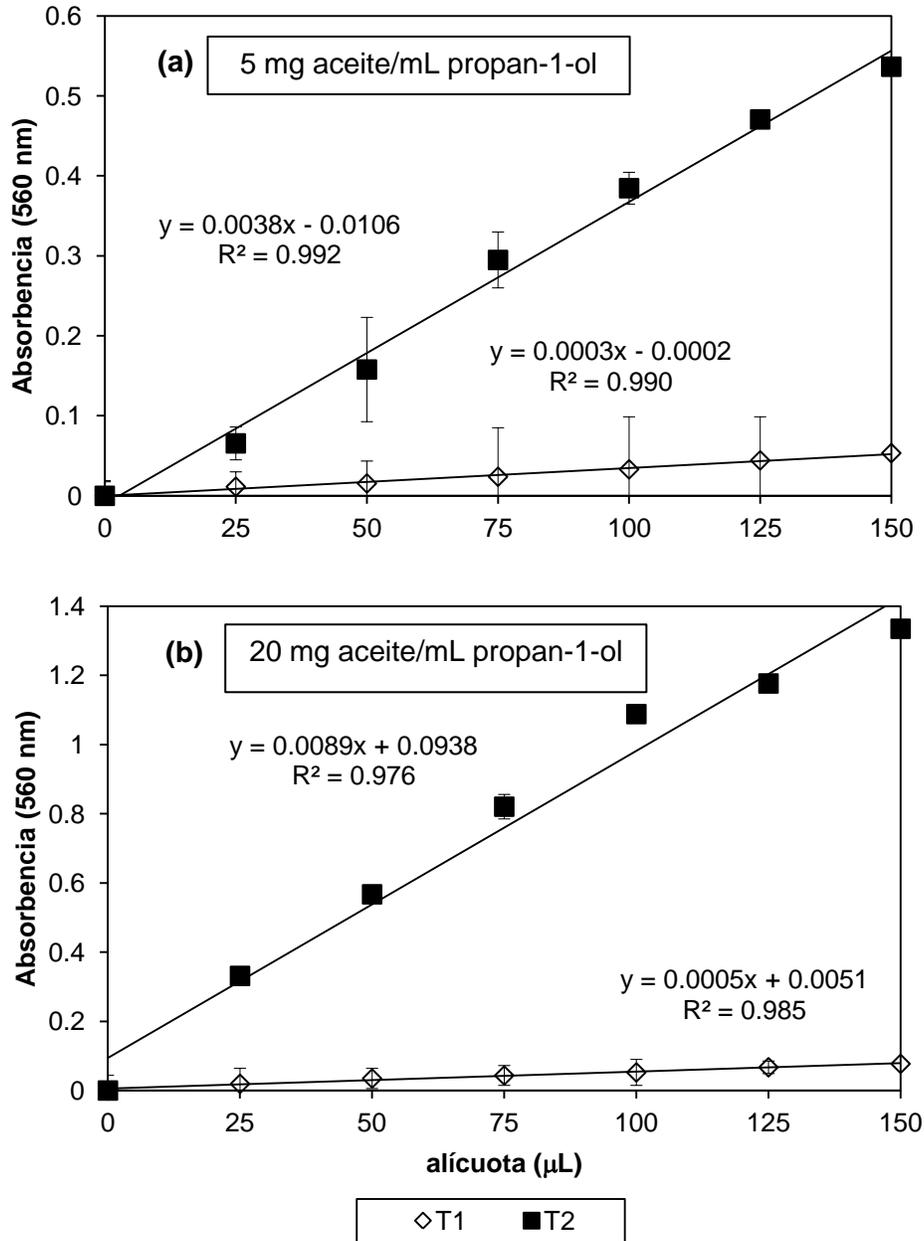


Figura 8.2. Efecto de la alícuota de aceite solubilizado en la respuesta lineal del análisis de hidroperóxidos en muestras de aceite de pescado MEG-3® mediante el método FOX2. (a) 5 mg aceite/mL propan-1-ol; (b) 20 mg de aceite/mL propan-1-ol.

Al analizar las soluciones en concentración 20 mg de aceite/mL de propan-1-ol obtenidas a partir de las muestras T1 y T2, se observó también proporcionalidad entre el volumen de aceite solubilizado adicionado al ensayo FOX2 y la absorbencia detectada (Figura 8.2b). Sin embargo los ajustes

Adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite

lineales para las muestras T1 ($R^2= 0.985$) y T2 ($R^2=0.976$) fueron más bajos comparados con los obtenidos al emplear soluciones en concentración 5 mg de aceite/mL de propan-1-ol.

Las concentraciones de hidroperóxidos, expresadas como mmol equivalentes de hidroperóxido de cumeno/kg aceite (mmol eq CHP/kg aceite) presentes en las muestras de aceite de pescado T1 y T2 fueron calculadas utilizando los valores de absorbencia obtenidos con cada volumen ensayado (Figura 8.3). El análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto del volumen de la alícuota de aceite solubilizado en la cuantificación de hidroperóxidos por el método FOX2, mostró diferencias significativas ($P=0.007$) en las concentraciones de hidroperóxidos presentes en las soluciones 5 mg de aceite/mL de propan-1-ol, preparadas a partir de las muestras almacenadas bajo las condiciones T1 y T2. La prueba de comparación múltiple de Fisher-LSD mostró que si las alícuotas de aceite solubilizado son menores a 100 μL y a 75 μL para las muestras T1 y T2, respectivamente, las concentraciones de hidroperóxidos se subestimaban. Este error analítico no ocurre al utilizar volúmenes mayores. Por lo tanto, el método FOX2 cuantifica adecuadamente la concentración de hidroperóxidos en aceite de pescado MEG-3® al utilizar alícuotas de una solución 5 mg aceite/mL propan-1-ol en volúmenes: 100, 125 y 150 μL ($P>0.05$) para las muestras almacenadas bajo las condiciones T1; y 75, 100 y 125 μL ($P>0.05$) para las muestras sometidas a las condiciones de almacenamiento T2 (Figura 8.3a).

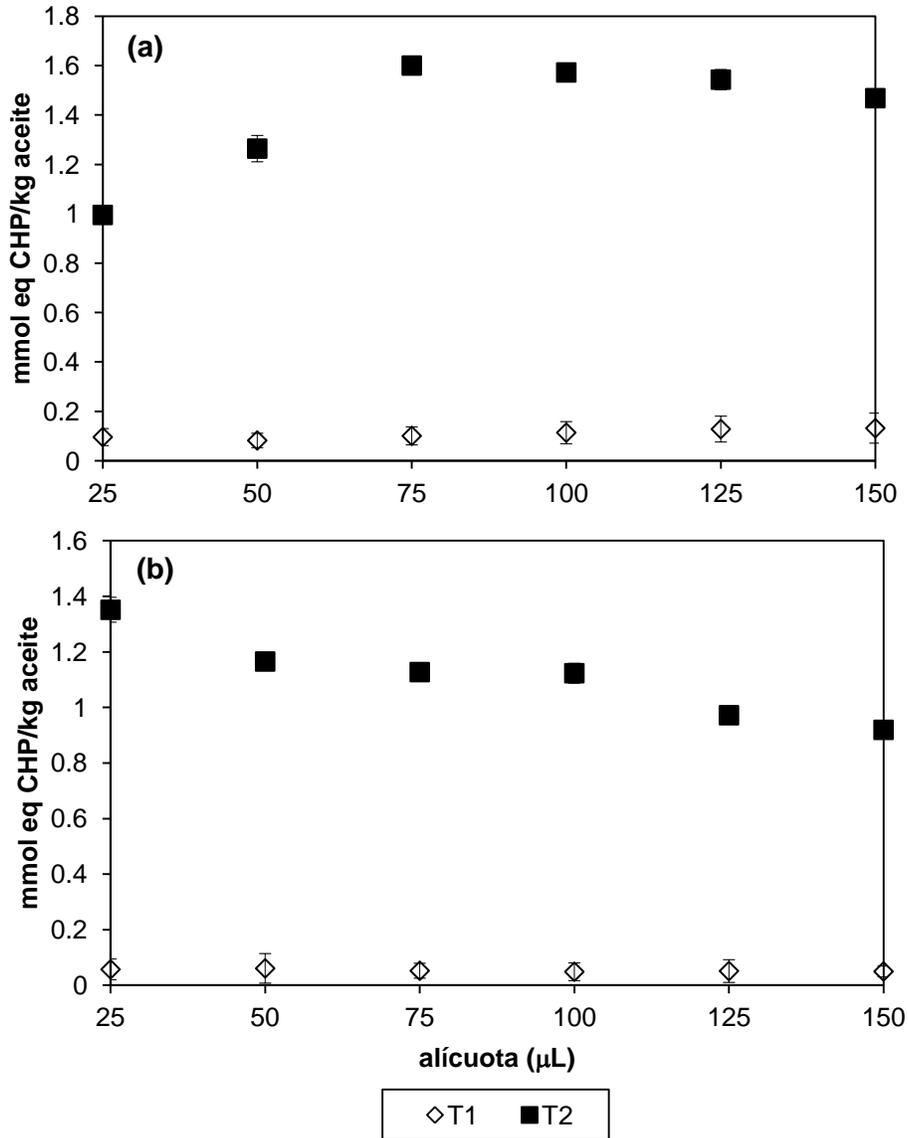


Figura 8.3. Efecto del volumen de la alícuota de aceite solubilizado en la concentración de hidroperóxidos (mmol eq CHP/kg aceite) en aceite de pescado MEG-3® determinados por el método FOX2. (a) 5 mg aceite/mL propan-1-ol; (b) 20 mg aceite/mL propan-1-ol.

Por otro lado, no se obtuvieron diferencias significativas ($P= 0.978$) en las concentraciones de hidroperóxidos por efecto del volumen de la alícuota de aceite solubilizado utilizado en el ensayo al emplear soluciones de aceite de pescado en concentración 20 mg aceite/mL propan-1-ol, preparadas a partir de las muestras T1. Sin embargo, en las soluciones preparadas a partir de las muestras T2, se obtuvieron diferencias significativas en las concentraciones de hidroperóxidos ($P<0.000$) al utilizar alícuotas de aceite solubilizado en el intervalo 25-150 μL de una solución 20 mg aceite/mL propan-1-ol (Figura 8.3b). La prueba de comparación múltiple de Fisher-LSD mostró diferencias

Adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite

significativas ($P < 0.05$) entre los volúmenes de aceite solubilizado: 25, 125 y 150 μL . Por lo tanto, al utilizar soluciones de aceite de pescado en concentración 20 mg aceite/mL propan-1-ol, los volúmenes de las alícuotas de aceite solubilizado que permitieron obtener concentraciones de hidroperóxidos reproducibles fueron: 25, 50, 75, 100, 125 y 150 μL ($P > 0.05$) en las muestras almacenadas bajo las condiciones T1; y 50, 75 y 100 μL ($P > 0.05$) para las muestras T2.

Al analizar los resultados se observó que las concentraciones de hidroperóxidos fueron más bajas al utilizar soluciones de 20 mg aceite/mL propan-1-ol (Figura 8.3b), comparadas con las obtenidas en soluciones 5 mg aceite/mL propan-1-ol (Figura 8.3a). Lo anterior se debió a que el exceso de aceite no se solubilizó por completo en el reactivo metanólico FOX2, por lo tanto, los hidroperóxidos no reaccionaron exhaustivamente, dando como resultado que la concentración de hidroperóxidos en las muestras se subestimara. Si bien, al utilizar volúmenes de alícuotas de aceite solubilizado en el intervalo 25-150 μL de soluciones 20 mg aceite/mL propan-1-ol, las absorbencias detectadas a 560 nm se ajustaron al modelo de una recta tanto para las muestras T1, como T2, resultó muy importante no sólo evaluar el efecto del volumen de aceite solubilizado adicionado a la mezcla de reacción, sino también, la influencia de la concentración de aceite en el desempeño del ensayo FOX2.

Eymard y Genot (2003) evaluaron el efecto del volumen de extracto metanólico de tejido de un pescado graso pelágico durante su procesamiento y almacenamiento, en la determinación de hidroperóxidos por el método FOX2 y encontraron que volúmenes de extracto menores a 100 μL subestiman la concentración de hidroperóxidos en muestras de carne fresca y almacenada 12 h a 17 °C. Nourooz-Zadeh et al. (1995) analizaron el efecto de la concentración de aceite de oliva en el desempeño del ensayo FOX2, sin embargo, no evaluaron el efecto del volumen de la alícuota de aceite solubilizado adicionado a la mezcla de reacción, lo cual, de acuerdo a nuestros resultados resulta muy importante, puesto que aun cuando se utilice una concentración de aceite que se solubilizase casi completamente en el reactivo metanólico FOX2, el volumen de aceite solubilizado adicionado a la mezcla de reacción que garantiza reproducibilidad y una correcta estimación de la concentración de hidroperóxidos no es el mismo en todos los casos, más aún si las muestras son frescas o si presentan un grado de oxidación mayor.

Con base en lo anterior, la adaptación del método FOX2 que permitió cuantificar de manera adecuada concentraciones de hidroperóxidos en aceite de pescado comercial MEG-3® consistió en utilizar soluciones de aceite solubilizado en propan-1-ol en concentración 5 mg de aceite/mL propan-1-ol y alícuotas de éstas soluciones adicionadas a la mezcla de reacción del ensayo en

Adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite

volúmenes: 100, 125 o 150 μL para las muestras sometidas a las condiciones T1, o bien, 75, 100 o 125 μL para las muestras T2.

El análisis de varianza de dos vías anidado para comprobar la reproducibilidad de la concentración de hidroperóxidos presentes en las muestras de aceite de pescado, determinada por la adaptación del método FOX2, tomó en cuenta las condiciones de almacenamiento de las muestras de aceite (T1 y T2), el volumen de la alícuota de aceite solubilizado que garantizaba una determinación adecuada de las concentraciones de hidroperóxidos y las réplicas. La varianza residual de la concentración de hidroperóxidos calculada a partir de los diferentes volúmenes de aceite solubilizado tomados de la solución en concentración 5 mg de aceite/mL propan-1-ol (preparada a partir de las muestras T1 o T2) y adicionada a la mezcla de reacción del ensayo, fue 0.0. Lo anterior quiere decir, que las cantidades de hidroperóxidos detectadas en las muestras T1 fueron muy similares cuando se utilizaron 100, 125 o 150 μL de aceite solubilizado. De igual manera, las concentraciones de hidroperóxidos en las muestras T2 fueron prácticamente las mismas al utilizar 75, 100 o 125 μL de aceite solubilizado adicionado a la mezcla de reacción. Por lo tanto, el intervalo válido de volumen de aceite solubilizado utilizado en la adaptación del método FOX2 estuvo bien definido. Además, la contribución en la variabilidad de la concentración de hidroperóxidos atribuida a las réplicas fue muy baja (0.003). Por último, las condiciones de almacenamiento de las muestras de aceite (T1 y T2) tuvieron un efecto significativo ($P= 0.000$) en la concentración de hidroperóxidos (Tabla 8.1).

Tabla 8.1. Contenido de hidroperóxidos en muestras de aceite de pescado MEG-3® determinado por el método FOX2. ¹ medias $\pm \sigma$, ² n= 3. T1 = aceite almacenado a -20 °C por 6 días, en ausencia de aire; T2 = aceite almacenado a 20 °C por 2 días en contacto con aire. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre las condiciones de almacenamiento del aceite de pescado ($P<0.05$).

Muestras de aceite	Hidroperóxidos (mmol eq CHP/kg aceite)
T1	0.13 ± 0.002 ^{1, 2, a}
T2	1.57 ± 0.030 ^b

8.1.3 Validación de la adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite de pescado MEG-3®

8.1.3.1 Comparación entre métodos analíticos

Una vez que se establecieron las condiciones analíticas para cuantificar hidroperóxidos de manera adecuada y reproducible en las muestras de aceite de pescado mediante la adaptación del método FOX2, se validó su respuesta comparándola con la obtenida al utilizar el Método Oficial VP 965.33 descrito por la AOAC (Firestone, 1995). Para ello, se determinaron las concentraciones de hidroperóxidos presentes en muestras de aceite sometidas a condiciones oxidantes, por ambos métodos. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de regresión y ANOVA.

Se obtuvo un modelo de ajuste de regresión de tipo $Y = a + bX$, que relacionó las respuestas de los dos métodos en la determinación de hidroperóxidos (Figura 8.4). El análisis estadístico mostró una correlación alta ($R = 0.981$) entre la adaptación del método FOX2 y el Método Oficial VP.

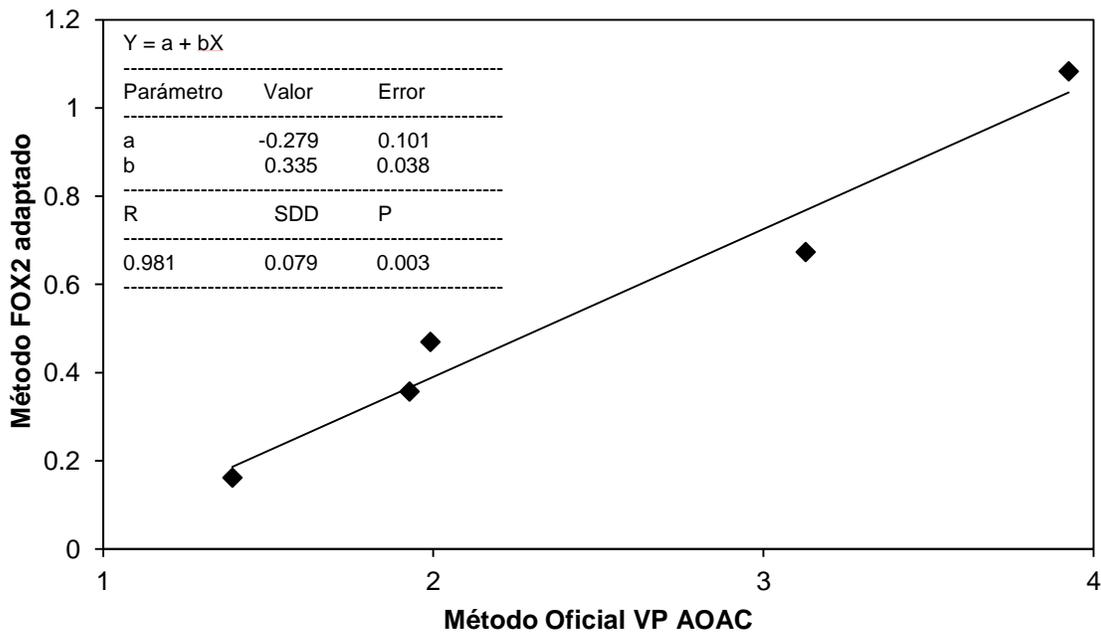


Figura 8.4. Relación entre el Método Oficial VP reportado por la AOAC y la adaptación del método FOX2 para determinar concentraciones de hidroperóxidos en aceite de pescado MEG-3®.

El valor P del ajuste de regresión ($P = 0.003$) reveló que existe una relación estadística significativa entre ambos métodos, cuando se utilizan para determinar concentraciones de hidroperóxidos en

Adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite

aceite de pescado MEG-3® (a un nivel de confianza de 99%). El valor de la desviación estándar de las diferencias o residuales (SDD) fue 0.079 meq peróxido/kg aceite (o bien, mmol eq CHP/kg aceite).

Talpur et al. (2010) realizaron estudios similares sobre la correlación entre métodos analíticos para cuantificar hidroperóxidos. Estos autores reportaron que existió una correlación alta ($R=0.995$) entre el método espectrofotométrico simplificado UV y el método oficial de titulación para cuantificar hidroperóxidos reportado por la AOCS, los cuales fueron utilizados para obtener el VP en muestras de aceite de canola previamente sometidas a oxidación térmica.

Si bien, la concentración de hidroperóxidos en muestras de aceite MEG-3® obtenidas al utilizar la adaptación del método FOX2 se expresaron como mmoles eq CHP/kg aceite, estos resultados pueden expresarse también como meq CHP/kg aceite, debido a que el hidroperóxido de cumeno oxida iones ferrosos a férricos en medio ácido y a temperatura ambiente (Bou et al., 2008).

En los análisis realizados no hubo diferencias significativas en el VP determinado por la Metodología Oficial AOAC ($P= 0.361$), o en la concentración de hidroperóxidos analizada por el método FOX2 adaptado ($P= 0.912$) por efecto de las réplicas. Por lo tanto, ambos métodos permiten obtener resultados reproducibles. Se observaron diferencias significativas en la concentración de hidroperóxidos por efecto del tratamiento oxidante aplicado a las muestras de aceite ($P<0.000$). La prueba LSD de Fisher para observar las diferencias entre los tratamientos mostró que el Método Oficial VP no fue capaz de detectar cambios pequeños en la concentración de hidroperóxidos por la oxidación del aceite, esta falta de sensibilidad no se presentó al utilizar el método FOX2 adaptado. Por consiguiente, se detectó un aumento significativo ($P<0.000$) en la concentración de hidroperóxidos a medida que el aceite se oxidaba cuando se aplicó el método FOX2. Los resultados obtenidos mostraron que la adaptación del método FOX2 realizada en el presente trabajo fue mucho más sensible para detectar concentraciones pequeñas de hidroperóxidos proporcionándonos además, información acerca de la susceptibilidad que presenta el aceite MEG-3® a la oxidación (Tabla 8.2).

Adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite

Tabla 8.2. Concentración de hidroperóxidos en muestras de aceite de pescado MEG-3® sometidas a condiciones oxidantes determinada por el Método Oficial VP de la AOAC y el método FOX2 adaptado. ¹ medias $\pm \sigma^2$, ² n= 3, h= horas; medias con letras diferentes (a-f) en la misma columna o fila indican diferencias significativas (P<0.05).

Condiciones de almacenamiento	VP (meq peróxido/kg de aceite)	FOX2 adaptado (meq CHP/kg de aceite)
-20 °C, 6 d	1.39 \pm 0.005 ^{1, 2, a}	0.16 \pm 0.011 ^b
20 °C, 12 h	1.93 \pm 0.115 ^b	0.36 \pm 0.011 ^c
20 °C, 18 h	1.99 \pm 0.006 ^b	0.47 \pm 0.017 ^d
20 °C, 24 h	3.13 \pm 0.119 ^c	0.67 \pm 0.019 ^e
20 °C, 30 h	3.92 \pm 0.119 ^d	1.08 \pm 0.022 ^f

Talpur et al. (2010) mencionaron que si bien, el método estándar de titulación de la AOAC es un método simple y reproducible, se ha probado que es relativamente poco sensible al determinar VP bajos en aceite de canola, comparado con el método UV para la determinación de hidroperóxidos.

En general, se observó que las concentraciones de hidroperóxidos obtenidas con el Método Oficial VP AOAC, expresadas como meq peróxido/kg aceite, fueron mucho más altas que las obtenidas con el método FOX2 adaptado. El Método Oficial VP está basado en un análisis iodométrico, las dos fuentes principales de error en ese tipo de ensayos, cuando se utilizan para determinar hidroperóxidos, son la absorción de yodo por los enlaces insaturados presentes en los lípidos y la liberación de yoduro de potasio promovida por el oxígeno presente en la solución titulable (Grau et al., 2000; Crowe y White, 2001). La velocidad de reacción aumenta con factores como la luz o la presencia de peróxido, lo que da como resultado detección de altas concentraciones de hidroperóxidos. Sustraer un blanco de los resultados obtenidos al analizar las muestras no cancela el error, puesto que el efecto del oxígeno es catalizado por los peróxidos (Crowe y White, 2001). Este error no se presenta en el método FOX2, puesto que dicho ensayo es prácticamente insensible al oxígeno (Bou et al., 2008).

8.2 Aceite de maíz

La adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos de manera precisa se realizó también para las muestras de aceite de maíz sometidas a los tratamientos descritos en el punto 6.4.6.1.2 del capítulo 6. Para estandarizar el método, se siguió el mismo procedimiento de análisis aplicado a las muestras de aceite de pescado MEG-3® y reportado anteriormente. Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

8.2.1 Efecto de la concentración de aceite en el desempeño del método FOX2

Al igual que en el caso del aceite de pescado MEG-3®, se observó que los valores de absorbencia aumentaban a medida que se incrementaba la concentración de aceite de maíz en la mezcla de reacción del ensayo (Figura 8.5). Los resultados obtenidos revelaron la existencia de una relación proporcional entre la cantidad de aceite de maíz y la absorbencia detectada a 560 nm que se ajustó al modelo de una recta en el intervalo 0.75-10.0 mg de aceite, para las muestras almacenadas bajo las condiciones T1 ($R^2 = 0.990$), T2 ($R^2 = 0.984$) y T3 ($R^2 = 0.996$).

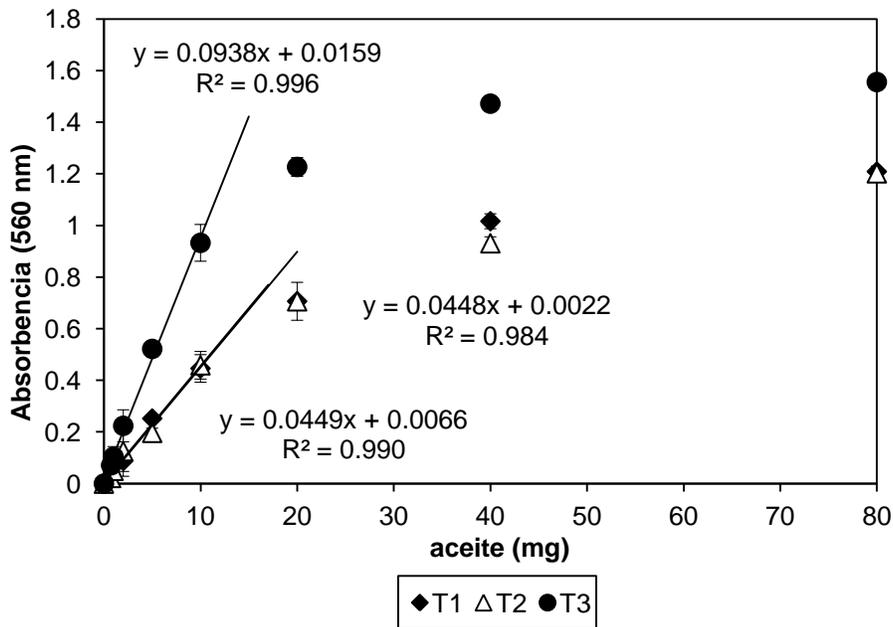


Figura 8.5. Efecto de la concentración de aceite de maíz en la respuesta lineal de absorbencia usando el método FOX2. (T1) al momento de abrir la botella de aceite; (T2) 20 °C, 2 días, en contacto con aire; (T3) 65 °C, 2 días, en contacto con aire.

Adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite

Los valores de absorbencia para todas las muestras evaluadas comenzaron a desviarse del ajuste lineal cuando se utilizaron masas de aceite por arriba de los 10 mg, sin importar las distintas condiciones a las que fueron almacenadas (T1, T2 y T3). Este fenómeno también se presentó al analizar las muestras de aceite de pescado MEG-3® y se debió a que el aceite en exceso no se solubiliza por completo en el reactivo metanólico FOX2. Nourooz-Zadeh et al. (1995) mencionaron que la respuesta del método FOX2 se ve afectada si están presentes grandes cantidades de aceite en el medio de reacción. Los resultados obtenidos nos indicaron que independientemente de la naturaleza y composición de ácidos grasos del aceite utilizado en los experimentos, la concentración de aceite que garantiza el desempeño adecuado del método FOX2 debe ser menor a 10 mg.

Con base en lo anterior, se decidió utilizar una concentración de 5 mg de aceite/mL de propan-1-ol, para continuar con las pruebas experimentales correspondientes a la evaluación del efecto del volumen de la alícuota de aceite solubilizado adicionada al ensayo en la determinación de hidroperóxidos en las muestras de aceite de maíz.

8.2.2 Influencia del volumen de la alícuota de aceite solubilizado en propan-1-ol en la determinación de hidroperóxidos por el método FOX2

Los resultados mostraron que la absorbencia detectada a 560 nm aumentó de manera proporcional a medida que se incrementó el volumen de la alícuota de aceite de maíz solubilizado en propan-1-ol adicionada a la mezcla de reacción, en el intervalo 25-150 μ L (Figura 8.6). El ajuste de los datos al modelo de una recta permitió obtener coeficientes de determinación altos para las muestras T1 ($R^2=0.981$), T2 ($R^2=0.978$) y T3 ($R^2=0.991$), lo cual indicó una buena correlación entre el volumen de aceite solubilizado utilizado en el ensayo y la absorbencia. Eymar y Genot (2003) encontraron que la absorbencia detectada a 560 nm aumentó prácticamente en forma lineal en función al volumen de extracto de pescado empleado en el método FOX2 y reportaron un coeficiente de correlación lineal de 0.9949.

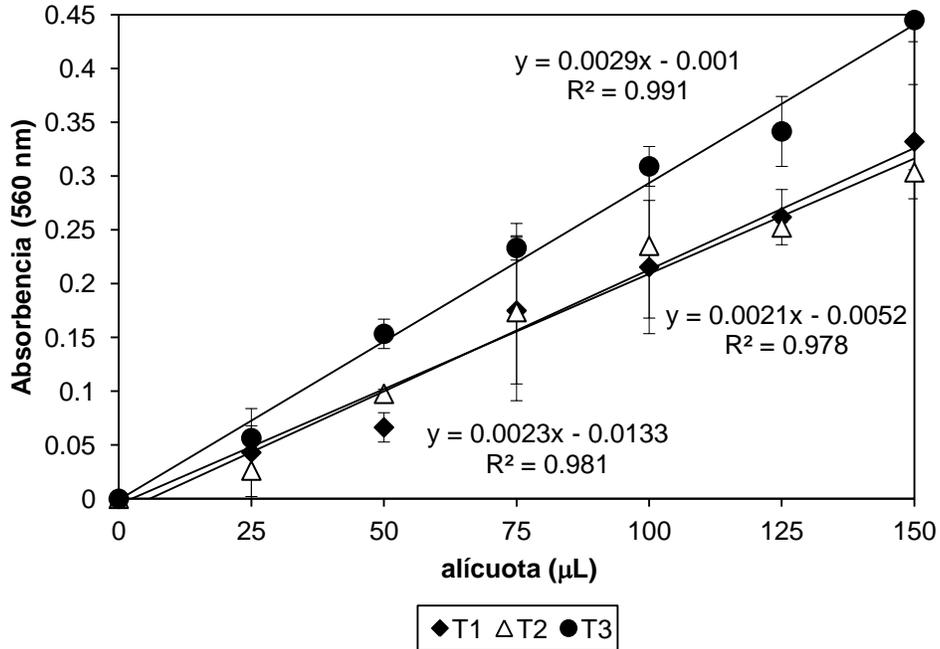


Figura 8.6. Efecto de la alícuota de aceite solubilizado en la respuesta lineal del análisis de hidroperóxidos en muestras de aceite de maíz mediante el método FOX2. Soluciones de aceite en concentración 5 mg aceite/mL propan-1-ol. (T1) al momento de abrir la botella de aceite; (T2) 20°C, 2 días, en contacto con aire; (T3) 65 °C, 2 días, en contacto con aire.

Las concentraciones de hidroperóxidos, expresadas como mmol eq CHP/kg de aceite, determinadas en las muestras de aceite de maíz denominadas T1, T2 y T3 (Figura 8.7), a partir de los valores de absorbancia obtenidos con cada uno de los volúmenes de la alícuota de aceite solubilizado en propan-1-ol adicionadas al ensayo FOX2, presentaron diferencias significativas ($P < 0.000$).

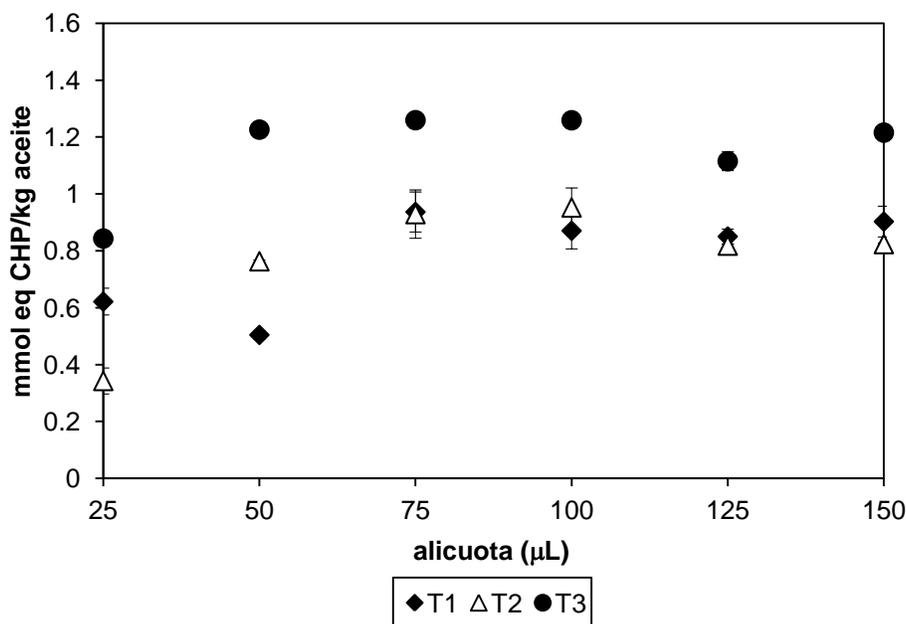


Figura 8.7. Efecto del volumen de la alícuota de aceite solubilizado en la concentración de hidroperóxidos (mmol eq CHP/kg aceite) en aceite de maíz determinados por el método FOX2. Soluciones de aceite en concentración 5 mg aceite/mL propan-1-ol. (T1) al momento de abrir la botella de aceite; (T2) 20 °C, 2 días, en contacto con aire; (T3) 65 °C, 2 días, en contacto con aire.

La prueba de comparación múltiple de Fisher-LSD reveló que las muestras de aceite analizadas al momento de abrir las botellas (T1) y después de ser almacenadas a 20 °C por 2 días en contacto con aire (T2) no presentaron diferencias significativas en la concentración de hidroperóxidos ($P > 0.05$). Lo anterior nos indica que el aceite de maíz es menos susceptible a la oxidación, comparado con el aceite de pescado MEG-3®, esta diferencia puede estar relacionada con el perfil de ácidos grasos que compone a cada uno de los aceites analizados y a los antioxidantes adicionados al aceite de maíz comercial. El aceite de pescado MEG-3® es un producto comercial que contiene ácidos grasos de cadena larga $n-3$ EPA y DHA. Los ácidos omega 3 ($n-3$) de cadena larga son los ácidos grasos más insaturados en la naturaleza, ya que contienen 5 y 6 dobles enlaces en sus estructuras químicas, lo cual los hace especialmente susceptibles a la oxidación (Kolanowski et al., 2007).

La concentración de hidroperóxidos en las muestras de aceite de maíz T3 fue significativamente mayor ($P < 0.05$) comparada con la concentración de hidroperóxidos presentes en las muestras T1 y T2, debido a que las muestras T3 se almacenaron a una temperatura más alta (65°C por 2 días en contacto con aire) comparadas con las muestras T2 (20°C por 2 días en contacto con aire). Dicho

Adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite

tratamiento favoreció que el aceite se oxidara más y por lo tanto, la concentración de hidroperóxidos en las muestras aumentó.

El ANOVA seguido de la prueba LSD de Fisher aplicados por separado a las muestras de aceite sometidas a los tratamientos T1, T2 y T3, para evaluar el efecto del volumen de la alícuota de aceite solubilizado en propan-1-ol adicionada al ensayo en la determinación de hidroperóxidos, mostró que al analizar las muestras T1 y T2 las concentraciones de hidroperóxidos se subestimaban al utilizar alícuotas menores a 75 μL y por arriba de 100 μL ; el mismo error analítico se presentó en el caso de las muestras T3, al emplear alícuotas menores a 50 μL y superiores a 100 μL . Por lo tanto, en las muestras almacenadas bajo las condiciones T1 y T2, los volúmenes de aceite de maíz solubilizado en propan-1-ol en concentración 5 mg de aceite/mL propan-1-ol, que garantizan una determinación adecuada de hidroperóxidos son 75 y 100 μL ($P>0.05$); mientras que para las muestras T3, las alícuotas que permiten obtener concentraciones de hidroperóxidos reproducibles son 50, 75 y 100 μL ($P>0.05$) (Figura 8.7).

El análisis estadístico ANOVA multifactor para comprobar la reproducibilidad de la concentración de hidroperóxidos presentes en las muestras de aceite de maíz, determinada por la adaptación del método FOX2, tomó en cuenta las condiciones de almacenamiento de las muestras de aceite (T1, T2 y T3), el volumen de la alícuota de aceite solubilizado que garantizaba la cuantificación correcta de las concentraciones de hidroperóxidos (75 y 100 μL) y las réplicas. Si bien, en los experimentos realizados con las muestras T3, al adicionar alícuotas de 50 μL de aceite solubilizado a la mezcla de reacción se obtuvieron concentraciones de hidroperóxidos reproducibles, resultó conveniente utilizar sólo las alícuotas de 75 y 100 μL para tener el mismo número de niveles en el factor volumen de la alícuota de aceite solubilizado y de esta manera poder realizar correctamente el análisis estadístico ya mencionado. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de hidroperóxidos por efecto del volumen de aceite de maíz solubilizado en propan-1-ol utilizado en el método FOX2, ni por las réplicas, con valores P de 0.623 y 0.990, respectivamente. Por último, las condiciones de almacenamiento del aceite de maíz (T1, T2 y T3) tuvieron un efecto significativo ($P<0.000$) en la concentración de hidroperóxidos (Tabla 8.3).

Adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite

Tabla 8.3. Contenido de hidroperóxidos en muestras de aceite de maíz determinado por el método FOX2. ¹ medias $\pm \sigma$, ² n= 3; T1= aceite analizado en el momento de abrir las botellas; T2= aceite almacenado a 20 °C por 2 días en contacto con aire; T3= aceite almacenado a 65 °C por 2 días en contacto con aire. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (P<0.05).

Muestras de aceite	Hidroperóxidos (mmol eq CHP/kg aceite)
T1	0.90 \pm 0.065 ^a
T2	0.94 \pm 0.066 ^a
T3	1.26 \pm 0.018 ^b

8.2.3 Validación de la adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite de maíz

8.2.3.1 Comparación entre métodos analíticos

De la misma manera que en el caso de las muestras de aceite de pescado MEG-3®. Una vez que se establecieron las condiciones analíticas para cuantificar hidroperóxidos de manera adecuada y reproducible en las muestras de aceite de maíz mediante la adaptación del método FOX2, se validó su respuesta comparándola con la obtenida al utilizar el Método Oficial VP 965.33 descrito por la AOAC (Firestone, 1995). Para llevar a cabo lo anterior, se determinaron las concentraciones de hidroperóxidos por ambos métodos, presentes en muestras de aceite sometidas a las condiciones oxidantes reportadas en el punto 6.4.7.1.2 del capítulo 6.

En la Figura 8.8, se muestra el gráfico del modelo de ajuste de regresión lineal de tipo $Y = a + bX$, que relaciona las respuestas de los dos métodos en la determinación de hidroperóxidos lipídicos. El análisis estadístico mostró que los resultados correspondientes a la concentración de hidroperóxidos obtenidos al aplicar la adaptación del método FOX2 y el Método Oficial VP, estuvieron altamente relacionados puesto que el coeficiente de correlación de la ecuación de regresión lineal fue $R = 0.994$.

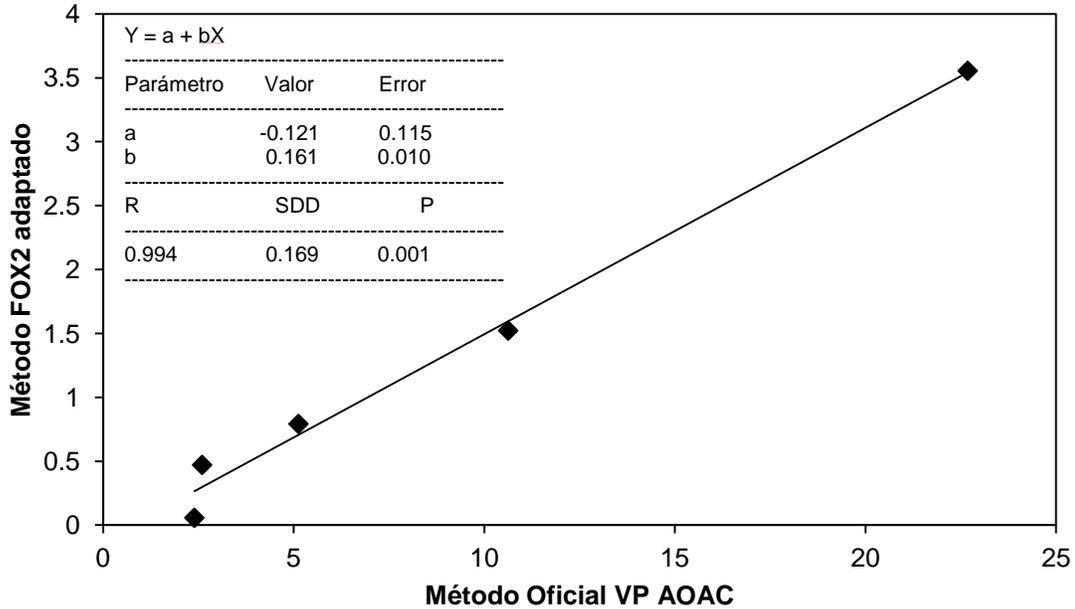


Figura 8.8. Relación entre el Método Oficial VP reportado por la AOAC y la adaptación del método FOX2 para determinar concentraciones de hidroperóxidos en aceite de maíz.

El valor P del ajuste de regresión lineal ($P= 0.001$) nos indicó la existencia de una relación estadística significativa entre los dos métodos utilizados para cuantificar hidroperóxidos en aceite de maíz. Por otro lado, el valor de la desviación estándar de las diferencias o residuales (SDD) fue 0.169 meq peróxido/kg de aceite (o bien, mmol eq CHP/kg aceite).

No se obtuvieron diferencias significativas en la concentración de hidroperóxidos analizada por el método FOX2, o en el VP calculado por la Metodología Oficial AOAC por efecto de las réplicas. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la concentración de hidroperóxidos determinada con ambos métodos, por efecto del tratamiento oxidante aplicado a las muestras de aceite ($P<0.000$), puesto que a medida que transcurría el tiempo de incubación se producía una mayor cantidad de hidroperóxidos. La prueba Tukey para observar las diferencias entre las condiciones de almacenamiento mostró que el Método Oficial VP no fue capaz de detectar cambios pequeños en la concentración de hidroperóxidos, esta carencia de sensibilidad no se presentó al utilizar el método FOX2 adaptado. Al igual que con los resultados obtenidos al analizar las muestras de aceite de pescado MEG-3®, la adaptación del método FOX2 permitió observar el aumento significativo ($P<0.000$) en la concentración de hidroperóxidos a medida que el aceite de maíz se autooxidaba (Tabla 8.4), lo cual comprobó que este método es mucho más sensible para

Adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite

detectar concentraciones pequeñas de hidroperóxidos e incluso nos proporcionó información acerca de la susceptibilidad a la oxidación que presentan los aceites analizados en el presente trabajo.

Tabla 8.4. Concentración de hidroperóxidos en muestras de aceite de maíz sometidas a condiciones oxidantes determinada por el Método Oficial VP de la AOAC y el método FOX2 adaptado. ¹ medias $\pm \sigma^2$, ² n= 3; h= horas; medias con letras diferentes (a-f) en la misma columna o fila indican diferencias significativas (P<0.05).

Condiciones de almacenamiento	PV (meq peróxido/kg de aceite)	FOX2 adaptado (meq CHP/kg de aceite)
20 °C, 0 h	2.39 \pm 0.011 ^{1, 2, a}	0.06 \pm 0.0002 ^b
20 °C, 72 h	2.59 \pm 0.007 ^a	0.47 \pm 0.018 ^c
85 °C , 18 h	5.12 \pm 0.114 ^b	0.79 \pm 0.017 ^d
85 °C, 24 h	10.62 \pm 0.134 ^c	1.52 \pm 0.034 ^e
85 °C, 36 h	22.68 \pm 0.095 ^d	3.56 \pm 0.148 ^f

Loovas (1992) reportó que el Método Oficial de la AOAC y el método de la American Oil Chemists' Society, los cuales determinan peróxidos por medio de titulaciones iodométricas, carecen de sensibilidad y requieren de grandes cantidades de lípidos en los análisis. Para mejorar las desventajas de los métodos oficiales se han desarrollado nuevas técnicas analíticas. El método clásico para la determinación de yodo liberado por titulación con tiosulfato, ha sido suplantado por su estimación como anion triyoduro.

El método FOX está considerado por muchos investigadores, como una técnica de análisis que puede reemplazar a la Metodología Oficial VP, ya que se requiere de una menor cantidad de muestra y utiliza un medio que es mucho menos tóxico, en comparación a los solventes empleados en el método VP (Yildiz et al., 2003).

Conclusiones parciales

La adaptación del método FOX2 realizada mostró que al utilizar soluciones de aceite en concentración 5 mg de aceite/mL de propan-1-ol y alícuotas de 100 μ L de dichas soluciones se garantiza la evaluación correcta, reproducible y sensible de la concentración de hidroperóxidos en muestras de aceite de diferente naturaleza y con distintos grados de oxidación. En adición, el método FOX2 adaptado permitió observar que el aceite de pescado MEG-3®, es más susceptible a la oxidación comparado con el aceite de maíz.

CAPITULO 9

OPTIMIZACIÓN DE LOS ÍNDICES DE ACTIVIDAD (EAI) Y ESTABILIDAD (ESI) DE EMULSIONES MODELO APLICANDO LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIES DE RESPUESTA

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

Existen diversas investigaciones publicadas sobre el efecto de la concentración de proteína empleada como emulsificante, contenido de aceite utilizado para formar la emulsión, pH, concentración de sales, entre otros factores, en las propiedades emulsificantes capacidad de emulsificación, índice de actividad (EAI) e índice de estabilidad (ESI) de la emulsión, en emulsiones modelo preparadas utilizando proteínas miofibrilares. Sin embargo, no se ha reportado hasta el momento un trabajo que utilice extracto miofibrilar como emulsificante para formular emulsiones utilizando un aceite rico en ácidos grasos polinsaturados de cadena larga *n-3* como el EPA y DHA. Tampoco hay investigaciones que analicen el efecto simultáneo de la concentración de proteína miofibrilar emulsificante y del porcentaje de aceite empleado como fase dispersa para formar emulsiones o/w en la respuesta óptima de los índices EAI y ESI. Se ha demostrado que la metodología de superficies de respuesta (MSR) permite la evaluación del efecto de múltiples parámetros en las variables dependientes de interés. Por lo tanto, se aplicó dicha metodología para analizar el efecto de la concentración de proteína utilizada como emulsificante y del porcentaje de aceite empleado como fase dispersa para formar emulsiones modelo o/w, en la respuesta de los índices EAI y ESI, y determinar la formulación óptima de la emulsión que permite obtener los valores más altos de los índices evaluados. La optimización por MSR se llevó a cabo por separado en las emulsiones modelo cárnicas, preparadas utilizando extracto proteico miofibrilar, y en las emulsiones modelo control formuladas con ovoalbúmina grado II, utilizando aceite de pescado MEG-3®, o bien, aceite de maíz, como fase dispersa de la emulsión modelo. Estos experimentos brindarán además, la información requerida para formular emulsiones, estabilizarlas y evaluar su oxidación.

9.1 Estudio preliminar

9.1.1 Evaluación del efecto de la concentración de proteína y del tipo y porcentaje de aceite en las propiedades emulsificantes EAI y ESI

Previo a la optimización de los índices EAI y ESI por MSR se prepararon emulsiones modelo cárnicas y emulsiones modelo control siguiendo la metodología descrita en el punto 6.4.8.3 del capítulo 6 y se evaluó el efecto de tres factores en la respuesta de EAI y ESI.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

El ANOVA del diseño factorial multinivel completo con tres réplicas, para evaluar el efecto de la concentración de proteína (1, 4.5, 8 mg/mL), del tipo de aceite (MEG-3® o maíz) y del porcentaje de aceite (15, 20 y 25%), en las propiedades emulsificantes EAI y ESI, en emulsiones modelo cárnicas preparadas con el extracto miofibrilar obtenido del músculo *Longissimus dorsi* de carne de cerdo, mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) en la respuesta de EAI (Tabla 9.1) y ESI (Tabla 9.2).

Tabla 9.1 ANOVA de los datos experimentales obtenidos para EAI en emulsiones modelo cárnicas.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	P
Tipo de aceite	1	558.73	558.73	313.65	< 0.001
Proteína	2	6330.58	3165.29	1776.90	< 0.001
Aceite	2	389.54	194.77	109.34	< 0.001
Proteína x Aceite	4	271.80	67.95	38.14	< 0.001
Tipo de aceite x Proteína	2	493.96	246.98	138.65	< 0.001
Tipo de aceite x Aceite	2	42.25	21.13	11.86	< 0.001
Tipo de aceite x Proteína x Aceite	4	180.52	45.13	25.34	< 0.001
Error	36	64.13	1.78		
Total	53	8331.51			

Tabla 9.2 ANOVA de los datos experimentales obtenidos para ESI en emulsiones modelo cárnicas.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	P
Tipo de aceite	1	2337.63	2337.63	122.03	< 0.001
Proteína	2	3200.21	1600.10	83.53	< 0.001
Aceite	2	2211.26	1105.63	57.72	< 0.001
Proteína x Aceite	4	1055.15	263.79	13.77	< 0.001
Tipo de aceite x Proteína	2	665.93	332.96	17.38	< 0.001
Tipo de aceite x Aceite	2	652.15	326.07	17.02	< 0.001
Tipo de aceite x Proteína x Aceite	4	2070.51	517.63	27.02	< 0.001
Error	36	689.63	19.16		
Total	53	12882.47			

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

Los resultados obtenidos nos permitieron identificar que los tres factores analizados son importantes, puesto que se observaron diferencias significativas en las propiedades emulsificantes EAI y ESI del extracto proteico miofibrilar por el efecto principal de cada factor y por las interacciones entre ellos. En el caso del EAI, la concentración de proteína y el tipo de aceite empleado como fase dispersa fueron los más significativos. Por otro lado, el tipo de aceite, la concentración de proteína y el porcentaje de aceite utilizados en la emulsión fueron los factores que tuvieron el efecto más significativo en el ESI ($P < 0.05$).

Las emulsiones modelo control, preparadas utilizando solución de proteína ovoalbúmina grado II como emulsificante, presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la respuesta de EAI y ESI, por el efecto principal de los factores evaluados y las interacciones (Tabla 9.3 y 9.4). El ANOVA de los datos obtenidos para EAI mostró que la concentración de ovoalbúmina y el tipo de aceite utilizado como fase dispersa (MEG-3® o maíz) de la emulsión fueron los efectos principales más significativos en la respuesta de ese índice, mientras que para el ESI, fueron mucho más significativos estadísticamente los factores tipo de aceite y el porcentaje de aceite empleado en la emulsión.

Tabla 9.3 ANOVA de los datos experimentales obtenidos para EAI en emulsiones modelo preparadas con ovoalbúmina grado II como emulsificante.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	P
Tipo de aceite	1	1427.76	1427.76	863.11	< 0.001
Proteína	2	9614.26	4807.13	2906.01	< 0.001
Aceite	2	301.48	150.74	91.13	< 0.001
Proteína x Aceite	4	315.22	78.80	47.64	< 0.001
Tipo de aceite x Proteína	2	1057.33	528.67	319.59	< 0.001
Tipo de aceite x Aceite	2	18.89	9.45	5.71	0.007
Tipo de aceite x Proteína x Aceite	4	16.64	4.16	2.51	0.058
Error	36	59.55	1.65		
Total	53	12811.13			

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

Tabla 9.4 ANOVA de los datos experimentales obtenidos para ESI en emulsiones modelo preparadas con ovoalbúmina grado II como emulsificante.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	P
Tipo de aceite	1	14785.7	14785.7	1053.55	< 0.001
Proteína	2	861.1	430.5	30.68	< 0.001
Aceite	2	2610.1	1305.1	92.99	< 0.001
Proteína x Aceite	4	281.8	70.5	5.02	0.003
Tipo de aceite x Proteína	2	732.9	366.4	26.11	< 0.001
Tipo de aceite x Aceite	2	596.7	298.4	21.26	< 0.001
Tipo de aceite x Proteína x Aceite	4	474.3	118.6	8.45	< 0.001
Error	36	505.2	14.0		
Total	53	20847.8			

Al analizar el efecto de las interacciones en las emulsiones modelo cárnicas y en las emulsiones control, se observó que prácticamente todas tuvieron un efecto significativo en la respuesta de EAI y ESI al presentar valores $P < 0.05$, excepto por la interacción entre los tres factores en los datos de EAI de emulsiones preparadas con ovoalbúmina que mostró un valor $P = 0.058$.

Las proteínas son emulsificantes importantes en las emulsiones alimenticias por las propiedades de superficie que poseen. La habilidad de una proteína para formar y hacer estable una emulsión depende de un balance adecuado entre su tamaño molecular, carga, hidrofobicidad de superficie y flexibilidad molecular (Turgeon et al., 1992). En general las propiedades emulsificantes de las proteínas se han discutido en términos de capacidad de emulsificación, actividad y estabilidad de la emulsión (Pearce y Kinsella, 1978). Estas propiedades han sido determinadas en emulsiones modelo para evaluar la efectividad de una proteína utilizada como emulsificante, sin embargo el análisis de los resultados obtenidos al evaluar el EAI y ESI en emulsiones preparadas con extracto miofibrilar, o bien, ovoalbúmina, mostró que la actividad y la estabilidad de la emulsión son dependientes no sólo del tipo y concentración de proteína utilizada como emulsificante, sino también del volumen de la fase de aceite empleada para preparar la emulsión y de la naturaleza del aceite mismo.

Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Wagner (2000), quién escribió que el índice de actividad (EAI) depende del volumen de la emulsión, del tipo de homogenizador empleado, la velocidad y duración de la homogenización, la concentración de proteína y la cantidad de aceite adicionado, por lo que debe tenerse cuidado en el control de las condiciones experimentales.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

Una vez concluido el estudio preliminar, se utilizó la metodología de superficies de respuesta para realizar una investigación más detallada del efecto simultáneo de la concentración de proteína emulsificante y del porcentaje de aceite utilizado en la emulsión en los resultados de EAI y ESI, y para determinar la formulación de la emulsión que permite obtener los valores óptimos de los índices evaluados en las emulsiones modelo o/w. Esta estrategia se llevó a cabo por separado para EAI y ESI en los sistemas modelo de emulsiones: extracto miofibrilar-MEG3®; extracto miofibrilar-maíz; ovoalbúmina- MEG-3®; y ovoalbúmina-aceite de maíz.

9.2 Optimización de EAI y ESI en emulsiones modelo cárnicas: extracto miofibrilar-MEG-3®

9.2.1 EAI

9.2.1.1 Análisis de superficies de respuesta

Se aplicó un diseño factorial completo 3^2 con 3 réplicas seguido de un ANOVA para evaluar los efectos principales tanto de la concentración de proteína presente en el extracto miofibrilar, como del porcentaje de aceite utilizado en la emulsión y de las interacciones entre estos dos factores en la respuesta del EAI. En adición, este primer análisis permitió observar si se presentaba un efecto cuadrático significativo de alguno de los factores evaluados en la variable dependiente EAI. Los niveles analizados para cada factor fueron: 1, 4.5 y 8 mg de proteína/mL y 15, 20 y 25% de aceite de pescado MEG-3®. La representación gráfica del ANOVA (Figura 9.1) permitió observar diferencias significativas en la respuesta del EAI ($P < 0.05$), por el efecto principal de los dos factores, por la interacción entre ellos y por el cuadrado de la concentración de proteína (AA).

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

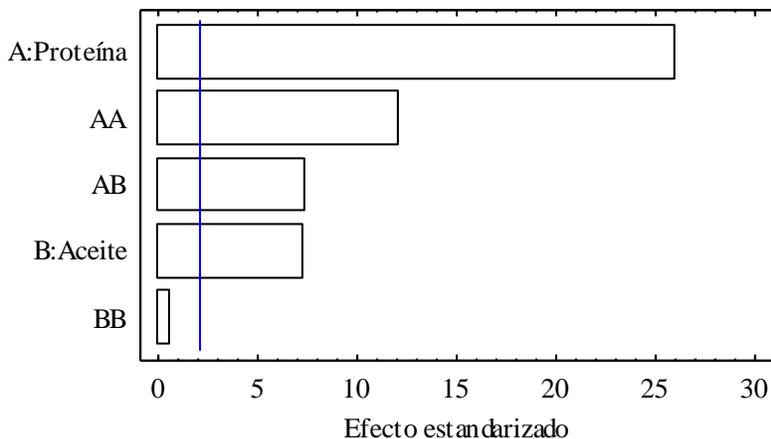


Figura 9.1. Diagrama de Pareto estandarizado de EAI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha=5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

El efecto significativo del cuadrado de la concentración de proteína (AA), nos indicó que era posible aplicar la metodología de superficies de respuesta (MRS) para generar un diseño central compuesto rotatable (DCC) y optimizar el EAI en función a la concentración de proteína miofibrilar y al porcentaje de aceite MEG-3®, utilizados para formar la emulsión. Previo a la aplicación del DCC y puesto que se desconocía la región de respuesta óptima del EAI en la emulsión modelo bajo análisis, se generó una gráfica tridimensional a partir de los datos experimentales obtenidos con el diseño factorial 3^2 y se observó que el valor más alto del índice EAI se obtuvo al formular emulsiones con 25% de aceite de pescado MEG-3® y una concentración de proteína miofibrilar en el intervalo 1-2 mg/mL (Figura 9.2). Por lo tanto, se decidió explorar dicha zona utilizando un DCC.

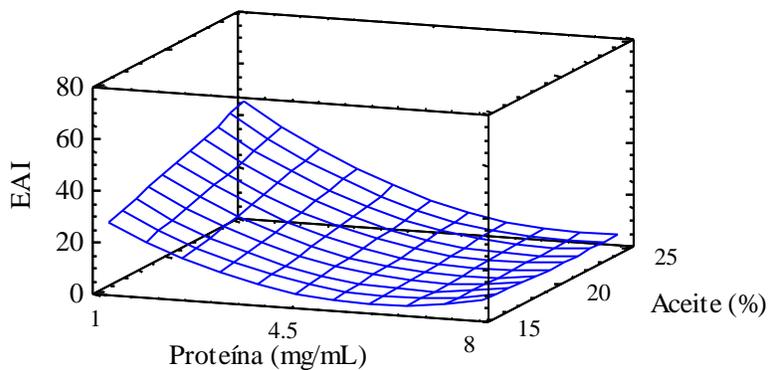


Figura 9.2. Superficie de respuesta generada a partir del diseño factorial 3^2 del índice de actividad de la emulsión (EAI, en m^2/g) en función de la concentración de proteína miofibrilar (mg/mL) y del porcentaje de aceite MEG-3® (%).

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

El DCC rotatable 2^2 con 4 puntos axiales, 4 centrales y 3 réplicas generado para explorar la región de posible respuesta óptima del EAI, minimizar el número de ensayos y el tiempo de optimización, estuvo conformado por un total de 36 experimentos, es decir, se prepararon 36 emulsiones siguiendo las combinaciones de los dos factores en 5 niveles. La concentración de proteína en el extracto miofibrilar y el porcentaje de aceite de pescado utilizado como fase dispersa de la emulsión, evaluados con el DCC se encontraron en el intervalo 1.38-5.62 mg/mL y 12.93-27.07%, respectivamente.

El diagrama de Pareto correspondiente al ANOVA de la región explorada con el DCC permitió observar diferencias significativas en el EAI ($P < 0.05$) por efecto de los dos factores investigados, su interacción y por el término cuadrático de la concentración de proteína (Figura 9.3).

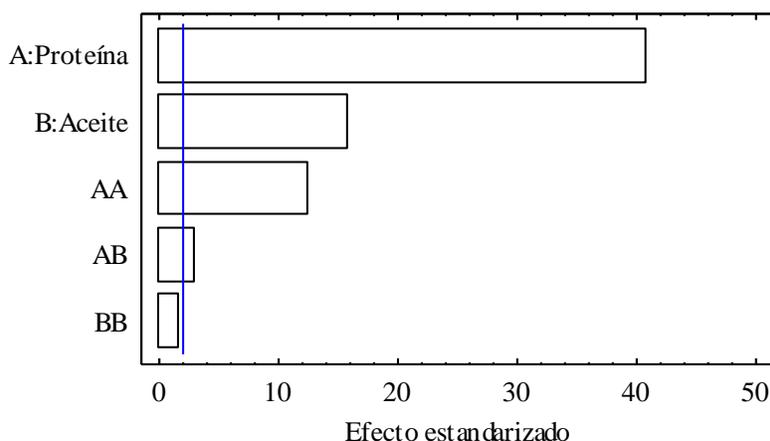


Figura 9.3. Diagrama de Pareto estandarizado de EAI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha = 5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

Aun cuando se obtuvieron diferencias significativas en la actividad de la emulsión por el porcentaje de aceite de pescado MEG-3® utilizado en la formulación de la emulsión, la concentración de proteína en el extracto miofibrilar presentó el efecto más significativo en la respuesta del EAI. Pearce y Kinsella (1978) reportaron que el EAI mide el área de la interfase estabilizada por unidad de masa de proteína (m^2/g) y relaciona la habilidad que presenta una proteína para cubrir la interfase.

La superficie de respuesta generada a partir de los datos experimentales del EAI, obtenidos con el DCC, mostró que este índice presentó un comportamiento de cresta o loma descendente, por el

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

efecto simultáneo de los factores analizados (Figura 9.4). Se observó que el EAI disminuyó a medida que aumentaba la concentración de proteína empleada como emulsificante, sin importar la cantidad de aceite de pescado MEG-3® utilizado como fase dispersa para formar la emulsión (12.93-27.07%). El valor de EAI más alto ($\sim 22.7 \text{ m}^2/\text{g}$) se obtuvo al formular emulsiones modelo con una concentración de proteína miofibrilar de 1.38 mg/mL y 20% de aceite MEG-3®.

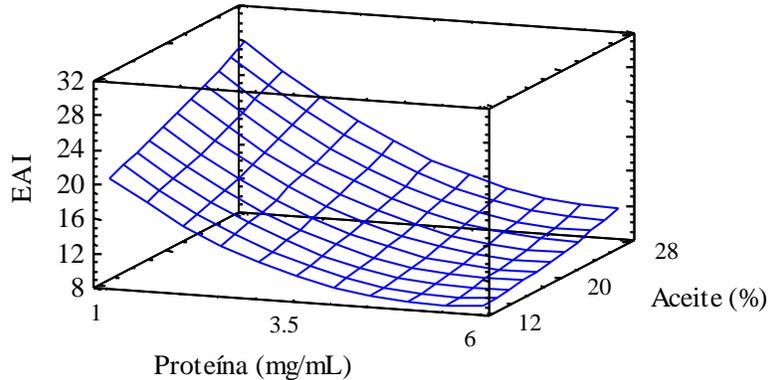


Figura 9.4. Superficie de respuesta generada a partir del DCC del índice de actividad de la emulsión (EAI, en m^2/g) en función de la concentración de proteína miofibrilar (mg/mL) y del porcentaje de aceite MEG3-® (%).

Las superficies de respuesta obtenidas por el ajuste de modelos de segundo orden suelen presentar patrones de comportamiento puros como: respuesta máxima, respuesta mínima y silla de montar. Sin embargo, no es raro encontrar variaciones de estos tipos de superficie de respuesta. Una de las variaciones más comunes, son precisamente los sistemas de cresta o loma (Montgomery, 2008).

El ajuste de regresión de la ecuación cuadrática con la cual se generó la superficie de respuesta, seguido de un análisis tipo ANOVA permitió obtener un modelo reducido a partir de los efectos significativos de los factores analizados: concentración de proteína en el extracto miofibrilar y porcentaje de aceite MEG-3®, en la respuesta de EAI. La Tabla 9.5 muestra los coeficientes de regresión estimados de las variables independientes, el R^2 , la falta de ajuste del modelo reducido y sus valores P.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

Tabla 9.5 Valores de los coeficientes de regresión, R^2 , falta de ajuste del modelo y valores p del modelo de superficie de respuesta reducido.

Variable independiente	Coefficiente de regresión	Nivel de significancia (valor P)
Constante	19.941	0.000
Lineal		
x_1	-6.042	0.000
x_2	0.530	0.000
Cuadrático		
x_1^2	0.624	0.000
Interacción		
x_1x_2	-0.057	0.017
R^2	97.1	
Regresión		0.000
Falta de ajuste		0.071

El modelo reducido obtenido por el ajuste de regresión polinomial de la ecuación cuadrática fue $EAI = 19.941 - 6.042x_1 + 0.530x_2 + 0.624x_1^2 - 0.057x_1x_2$, donde x_1 es la concentración de proteína en el extracto miofibrilar (mg/mL) y x_2 el porcentaje de aceite MEG-3® (%). El coeficiente de determinación del modelo fue alto ($R^2 > 97\%$) y el ANOVA mostró que el ajuste de la ecuación de superficie de respuesta de segundo orden para la variable dependiente EAI fue significativo ($P < 0.05$). Joglekar y May (1987) sugirieron que el R^2 debe ser al menos 0.8 (80%) para que el ajuste del modelo sea bueno. Por lo tanto, el R^2 obtenido con nuestros resultados indicó que la ecuación cuadrática del modelo reducido fue satisfactoria para describir la respuesta de la variable dependiente EAI en función a los dos factores principales utilizados para formular la emulsión modelo.

9.2.1.2 Optimización

La optimización de la respuesta del EAI en la emulsión modelo se realizó de forma numérica con ayuda de la función de optimización de los paquetes estadísticos Statgraphics Centurion XVI versión 16.0.07 (StatPoint Technolitics Inc., Warrenton, VA, USA) y Minitab® v.11 (State

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

College, PA, USA). Para ello, se utilizó el modelo cuadrático obtenido en el punto anterior y se calcularon los valores de la concentración de proteína en el extracto miofibrilar (mg/mL) y el porcentaje de aceite MEG-3® empleados para formular la emulsión modelo, que maximizaban la respuesta de EAI.

La composición de la emulsión modelo que permitió obtener el valor máximo de EAI fue: 1.38 mg/mL de proteína en el extracto miofibrilar y 27.07% de aceite de pescado MEG-3®. Con la combinación anterior, se obtuvo un valor óptimo del EAI de 25 m²/g.

9.2.1.3 Validación del modelo de superficie de respuesta reducido

La eficiencia del modelo cuadrático ajustado para llevar a cabo la optimización numérica se validó aplicando una prueba estadística *t*. Esta prueba permitió determinar las diferencias significativas ($P < 0.05$) en los valores de los índices EAI, al comparar los resultados obtenidos experimentalmente en las emulsiones modelo, con respecto a los predichos con la ecuación cuadrática. La cercanía entre los valores experimentales y predichos de EAI se comprobó al obtener residuales bajos (Tabla 9.6). Además, no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los resultados experimentales y los calculados con el modelo de segundo orden. Por lo tanto, los valores del EAI determinados en la emulsión modelo concordaron con los predichos. Esta observación verifica la eficiencia del modelo de segundo orden utilizado para predecir la respuesta del EAI en función de la concentración de proteína miofibrilar emulsificante y del porcentaje de aceite MEG-3® empleado como fase dispersa de la emulsión cárnica.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

Tabla 9.6. Comparación entre los valores experimentales y predichos obtenidos a partir del modelo reducido final.

Experimento	EAI (m ² /g) ^a		
	Y ₀	Y _i	Y ₀ -Y _i
1	16.056	16.486	-0.430
2	20.033	20.637	-0.604
3	12.211	12.924	-0.713
4	15.288	15.251	0.037
5	22.000	21.718	0.281
6	9.530	9.741	-0.211
7	13.260	12.924	0.337
8	11.753	10.596	1.156
9	12.678	12.924	-0.246
10	8.591	8.8765	-0.286
11	11.756	11.308	0.448
12	13.152	12.924	0.228
13	15.146	16.661	-1.516
14	20.420	20.812	-0.392
15	12.810	13.099	-0.289
16	16.526	15.426	1.100
17	23.870	21.894	1.973
18	9.297	9.916	-0.619
19	13.894	13.099	0.795
20	10.887	10.772	0.115
21	12.778	13.099	-0.321
22	9.333	9.0519	0.281
23	11.244	11.483	-0.239
24	12.213	13.099	-0.886
25	16.061	16.591	-0.530
26	19.668	20.742	-1.075
27	12.797	13.029	-0.232
28	15.858	15.356	0.502
29	22.375	21.824	0.552
30	9.845	9.846	-0.002
31	13.160	13.029	0.131
32	11.641	10.702	0.939
33	12.829	13.029	-0.200
34	9.083	8.982	0.101
35	11.705	11.413	0.293
36	12.550	13.029	-0.479

Y₀= valor experimental.

Y_i= valor predicho.

Y₀-Y_i= residuo

^a No existieron diferencias significativas (P>0.05) entre el valor experimental (Y₀) y el predicho (Y_i).

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

El valor experimental de EAI más alto en el DCC fue en promedio 22.7 m²/g, mientras que bajo las condiciones óptimas determinadas con el modelo cuadrático mostró un valor de 25 m²/g. Este resultado permitió observar que la optimización numérica de EAI logra aumentar la respuesta de dicha variable. Finalmente, se prepararon emulsiones modelo cárnicas utilizando la combinación de concentración de proteína en el extracto miofibrilar (1.38 mg/mL) y porcentaje de aceite de pescado MEG-3® (27.07%) obtenida con la ecuación de segundo orden y que maximizó la respuesta de EAI. Se obtuvo un EAI= 26.3 m²/g, el cual fue muy cercano al calculado con el modelo cuadrático reducido (EAI= 25 m²/g). No hubo diferencias significativas (P>0.05) entre el EAI determinado experimentalmente y el estimado matemáticamente con la función de optimización. En consecuencia, la ecuación de regresión ajustada fue adecuada y permitió optimizar el EAI al aplicar la metodología de superficies de respuesta.

9.2.2 ESI

9.2.2.1 Análisis de superficies de respuesta

Con el objetivo de ubicar la posible región de respuesta óptima del ESI en la emulsión modelo investigada y evaluar los efectos principales (lineales y cuadráticos), tanto de la concentración de proteína miofibrilar, como del porcentaje de aceite utilizado en la emulsión y de las interacciones entre estos dos factores en el índice de estabilidad de la emulsión, se utilizó un diseño factorial completo 3² con 3 réplicas para preparar emulsiones, determinar el ESI y generar una gráfica tridimensional a partir de los datos experimentales. Los niveles analizados para cada factor fueron: 1, 4.5 y 8 mg de proteína/mL y 15, 20 y 25% de aceite MEG-3®. La representación gráfica del ANOVA del diseño factorial (Figura 9.5) permitió observar diferencias significativas en los valores del ESI (P<0.05), por el efecto principal de los dos factores evaluados y la interacción entre ellos.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

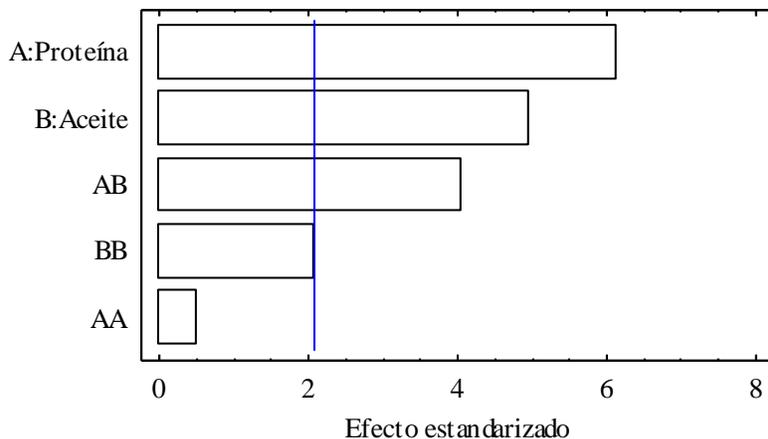


Figura 9.5. Diagrama de Pareto estandarizado de ESI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha=5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

Al analizar la gráfica tridimensional construida a partir de los datos experimentales del ESI obtenidos con el diseño factorial 3^2 , se observó que la respuesta del índice aumentaba al incrementar la concentración de proteína del extracto miofibrilar (hasta 8 mg/mL) y al utilizar porcentajes de aceite MEG-3® cercanos a 15% (Figura 9.6).

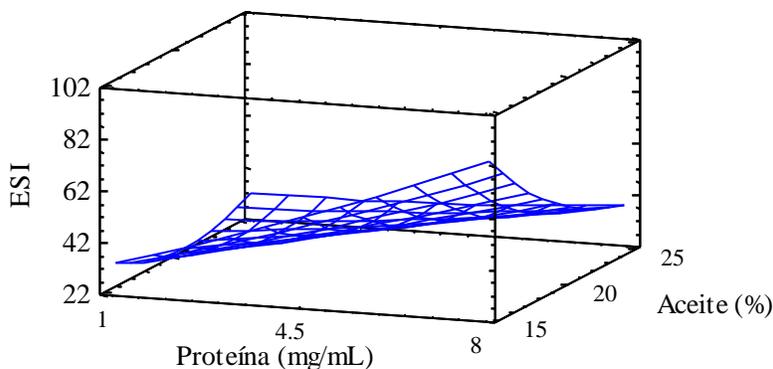


Figura 9.6. Superficie de respuesta generada a partir del diseño factorial 3^2 del índice de estabilidad de la emulsión (ESI, en min) en función de la concentración de proteína miofibrilar (mg/mL) y del porcentaje de aceite MEG-3® (%).

En vista de que no se obtuvieron diferencias significativas en la respuesta del ESI por el efecto cuadrático de alguno de los factores analizados con el diseño factorial, se siguió la metodología de máxima pendiente en ascenso descrita por Montgomery (2008). Es decir, se generó un nuevo diseño 3^2 tomando como punto de partida los niveles de las variables independientes del primer factorial en

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

los que se observaron los valores más altos del ESI. Esto se realizó para ubicar la posible región de respuesta óptima del índice, obtener un efecto cuadrático significativo de al menos uno de los factores evaluados y de esta manera, poder continuar con la optimización de la variable dependiente por MSR.

Los niveles de la concentración de proteína miofibrilar y del porcentaje de aceite MEG-3® analizados en el segundo diseño factorial fueron: 6, 9,12 mg/mL, y 10, 15, 20%, respectivamente. El diagrama de Pareto que representa el ANOVA del segundo diseño factorial permitió observar diferencias significativas ($P < 0.05$) en la respuesta del ESI por el efecto principal lineal (B) y cuadrático (BB) del porcentaje de aceite de pescado MEG-3®, utilizado como fase dispersa de la emulsión modelo (Figura 9.7).

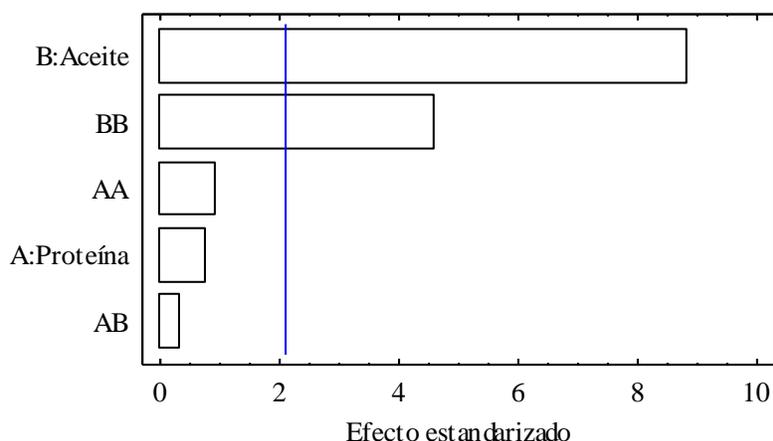


Figura 9.7. Diagrama de Pareto estandarizado de ESI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha = 5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

La grafica tridimensional del efecto de la concentración de proteína en el extracto miofibrilar y el porcentaje de aceite MEG-3® en la respuesta del ESI, construida con los resultados obtenidos del segundo factorial completo, nos permitió identificar que la posible región de respuesta óptima de la variable dependiente ESI se encontraba en la zona cercana a concentraciones de proteína en el intervalo 10-12 mg/mL y 10% de aceite MEG-3® (Figura 9.8).

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

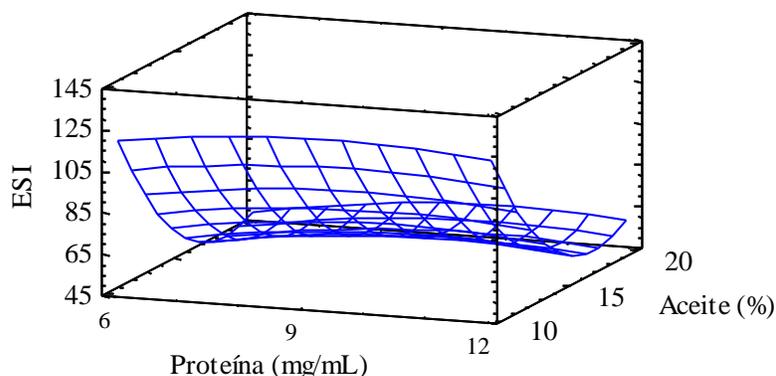


Figura 9.8. Superficie de respuesta generada a partir del segundo diseño factorial 3^2 del índice de estabilidad de la emulsión (ESI, en min) en función de la concentración de proteína miofibrilar (mg/mL) y del porcentaje de aceite MEG-3® (%).

El efecto cuadrático significativo del porcentaje de aceite de pescado utilizado como fase dispersa de la emulsión modelo (BB), nos indicó que era posible aplicar MRS para generar un diseño central compuesto rotatable (DCC) y optimizar el ESI, al evaluar el efecto simultáneo de las variables independientes en la respuesta del índice. La concentración de proteína en el extracto miofibrilar y el porcentaje de aceite de pescado utilizado como fase dispersa de la emulsión, evaluados con el DCC se encontraron en el intervalo 10.74-12.51 mg/mL y 9.29-10.71%, respectivamente.

La representación gráfica del ANOVA de la región explorada con el DCC permitió observar diferencias significativas en el ESI ($P < 0.05$) por el efecto lineal principal de la concentración de proteína (A), los términos cuadráticos de los dos factores investigados: concentración de proteína (AA) y porcentaje de aceite MEG-3® (BB), y la interacción (AB) (Figura 9.9).

El efecto más significativo en la respuesta del ESI fue la concentración de proteína miofibrilar. Esto indicó que el extracto miofibrilar utilizado como emulsificante le brindó estabilidad a la emulsión, retrasando la separación de las fases, sin importar la cantidad de aceite de pescado MEG-3® (%) utilizada como fase dispersa en la formulación de las emulsiones modelo. Si bien, el término lineal principal del porcentaje de aceite MEG-3® no afectó de manera significativa los valores experimentales del ESI, se observó que dicho factor participó en la obtención de curvatura en la respuesta del ESI, al contribuir de forma significativa con la interacción y con el término cuadrático.

Subagio (2005) señaló que el ESI mide la habilidad que tiene una proteína utilizada como emulsificante, para mantener estable una emulsión durante un periodo de tiempo, previniendo la floculación y coalescencia de los glóbulos de grasa.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

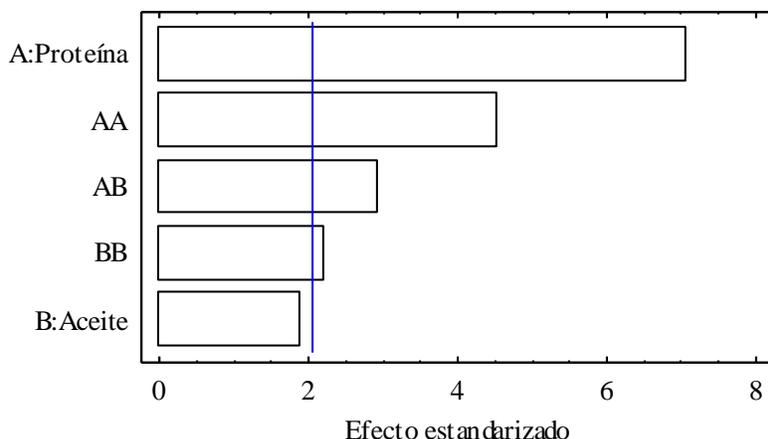


Figura 9.9. Diagrama de Pareto estandarizado de ESI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha=5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

La superficie de respuesta generada a partir de los datos experimentales obtenidos con el DCC mostró que el ESI presentó un comportamiento de silla de montar o minimax, por el efecto simultáneo de los factores analizados (Figura 9.10).

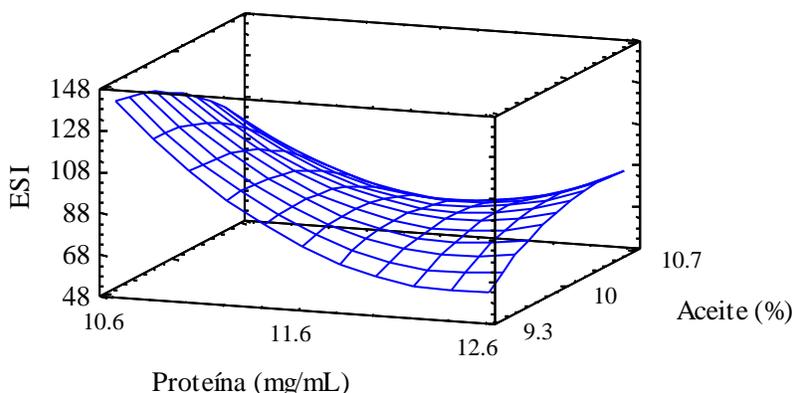


Figura 9.10. Superficie de respuesta generada a partir del DCC del índice de estabilidad de la emulsión (ESI, en min) en función de la concentración de proteína miofibrilar (mg/mL) y del porcentaje de aceite MEG-3® (%).

La silla de montar es uno de los patrones característicos de las superficies de respuesta de modelos cuadráticos. En este tipo de superficies la respuesta puede aumentar o disminuir a partir del centro de la región de exploración, según la dirección en que se aleja de ese punto (Kuehl, 2001). Al analizar la superficie de respuesta obtenida para el ESI, se observó que los valores del índice disminuían en el punto central del DCC, es decir al utilizar una concentración de proteína miofibrilar cercana a 11.6 mg/mL y un porcentaje de aceite de pescado de 10%. Sin embargo, por

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

debajo o arriba de ese porcentaje de aceite, la respuesta del ESI aumentaba; en el caso de la concentración de proteína, el índice de estabilidad de la emulsión fue mayor por debajo del punto central, sobre todo al emplear extracto miofibrilar en concentración 10.74 mg/mL. El valor más alto para el ESI en el DCC fue 125.1 min, este valor se obtuvo al utilizar una combinación de proteína y aceite de: 10.74 mg/L y 10%, respectivamente.

El efecto significativo de los términos cuadráticos de la concentración de proteína (AA) y del porcentaje de aceite (BB) en el ESI determinado en las emulsiones modelo, nos indicó que la superficie de respuesta del comportamiento de dicho índice en función a los factores analizados, podía ser caracterizada para estimar el valor óptimo de ESI, mediante el ajuste de regresión de un modelo de segundo orden. En la Tabla 9.6 se muestra el ANOVA del ajuste de regresión polinomial de la ecuación cuadrática con la cual se generó la superficie de respuesta, los coeficientes de regresión estimados de las variables independientes, el R^2 y la falta de ajuste del modelo de regresión.

Tabla 9.6 Valores de los coeficientes de regresión, R^2 , falta de ajuste del modelo y valores p del modelo de superficie de respuesta.

Variable independiente	Coefficiente de regresión	Nivel de significancia (valor P)
Constante	4707.070	0.000
Lineal		
x_1	-831.717	0.000
x_2	73.243	0.067
Cuadrático		
x_1^2	24.237	0.000
x_2^2	-18.379	0.035
Interacción		
x_1x_2	24.709	0.006
R^2	75.6	
Regresión		0.000
Falta de ajuste		0.062

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

El modelo obtenido por el ajuste de regresión de la ecuación cuadrática fue $ESI = 4707.07 - 831.717x_1 + 73.243x_2 + 24.237x_1^2 - 18.379x_2^2 + 0.057x_1x_2$, donde x_1 es la concentración de proteína en el extracto miofibrilar (mg/mL) y x_2 el porcentaje de aceite MEG-3® (%). Aunque el término lineal del porcentaje de aceite MEG-3® no fue significativo, se incluyó en el modelo cuadrático ajustado puesto que su término cuadrado y la interacción con el factor proteína si fueron significativos. Mirhosseini et al. (2008) mencionaron que además de los efectos cuadráticos, la presencia de efectos significativos de las interacciones entre las variables independientes en los modelos finales, confirmó una relación potencial no lineal entre los componentes de la emulsión y las variables respuesta. El coeficiente de determinación del modelo fue $R^2 = 75.6\%$. Si bien el valor del R^2 obtenido con nuestros resultados experimentales fue menor a 80%, el ANOVA mostró que la falta de ajuste de los datos a un modelo cuadrático no fue significativa ($P < 0.05$). En adición, el análisis de regresión polinomial reveló que el ajuste de la ecuación de segundo orden de la superficie de respuesta para la variable dependiente ESI fue significativo ($P < 0.05$). Lo anterior nos hizo pensar que aunque el R^2 del modelo no fue de al menos 80%, era muy probable que nos encontráramos en la región de respuesta óptima del ESI y por lo tanto, el modelo ajustado obtenido podía describir la respuesta de la variable dependiente ESI en función a la concentración de proteína miofibrilar y al porcentaje de aceite de pescado utilizados en la formulación de la emulsión modelo. Para afirmar o descartar lo escrito en las líneas anteriores, resultó necesario validar el modelo de superficie de respuesta obtenido. Antes de realizar la validación, se utilizó el modelo cuadrático para optimizar numéricamente el valor de ESI.

9.2.2.2 Optimización

La composición de la emulsión modelo que permitió obtener el valor óptimo de ESI, estimado numéricamente con el modelo cuadrático obtenido y con la función de optimización de los paquetes estadísticos, fue: 10.7 mg/mL de proteína en el extracto miofibrilar y 9.3 % de aceite de pescado MEG-3®. Con la combinación anterior, se obtuvo un valor máximo del ESI de 129.6 min.

9.2.2.3 Validación del modelo de superficie de respuesta

La eficiencia del modelo cuadrático ajustado para predecir la respuesta óptima de la variable ESI se validó aplicando una prueba estadística *t*. Esta prueba permitió determinar las diferencias significativas ($P < 0.05$) en los valores de los índices ESI, por comparación de los resultados

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

obtenidos experimentalmente en las emulsiones modelo, con respecto a los predichos con la ecuación cuadrática (Tabla 9.7). Los valores bajos de los residuos revelaron la cercanía entre los valores experimentales y predichos de ESI. Asimismo, se observó que los resultados de ESI experimentales y los estimados con el modelo de segundo orden no fueron significativamente diferentes, puesto que se obtuvo un valor P mayor a 0.05 en la prueba *t*. Este análisis verifica la eficiencia del modelo cuadrático utilizado para predecir la respuesta del ESI en función de la concentración de proteína miofibrilar emulsificante y del porcentaje de aceite MEG-3® empleado como fase dispersa de la emulsión cárnica, aún cuando el valor del coeficiente de determinación no fue tan alto.

El valor experimental de ESI más alto obtenido con el DCC fue en promedio 125.1 min, mientras que bajo las condiciones óptimas determinadas con el modelo cuadrático mostró un valor de 129.6 min. Este resultado permitió observar que la optimización numérica del ESI logra aumentar la respuesta de dicha variable. Al formular emulsiones modelo cárnicas utilizando la combinación de concentración de proteína en el extracto miofibrilar (10.7 mg/mL) y porcentaje de aceite de pescado MEG-3® (9.3%) obtenida con la ecuación de segundo orden y que maximizó la respuesta de ESI, se obtuvo un ESI= 128 min, el cual fue muy cercano al calculado con el modelo cuadrático reducido (ESI= 129.6 min). No hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) entre el ESI determinado experimentalmente y el estimado matemáticamente con la función de optimización. En consecuencia, la ecuación de regresión ajustada fue adecuada y permitió optimizar el ESI al aplicar la metodología de superficies de respuesta.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

Tabla 9.7. Comparación entre los valores experimentales y predichos obtenidos a partir del modelo final

Experimento	ESI (min) ^a		
	Y ₀	Y _i	Y ₀ -Y _i
1	68.578	77.143	-8.565
2	62.590	77.143	-14.553
3	128.000	114.737	13.263
4	79.239	77.143	2.096
5	94.136	106.477	-12.341
6	61.355	64.648	-3.293
7	67.183	62.938	4.245
8	81.342	77.421	3.921
9	81.861	72.969	8.893
10	81.778	77.143	4.635
11	82.476	72.998	9.478
12	76.162	83.941	-7.779
13	88.617	82.736	5.881
14	75.297	82.736	-7.439
15	112.417	120.330	-7.913
16	90.186	82.736	7.450
17	110.179	112.070	-1.891
18	67.066	70.241	-3.175
19	72.695	68.531	4.163
20	81.817	83.014	-1.197
21	80.747	78.562	2.185
22	90.856	82.736	8.120
23	64.316	78.591	-14.275
24	97.624	89.534	8.090
25	73.046	82.427	-9.382
26	86.152	82.427	3.725
27	135.205	120.021	15.184
28	88.666	82.427	6.239
29	104.080	111.761	-7.681
30	64.359	69.932	-5.573
31	68.528	68.223	0.306
32	86.555	82.705	3.849
33	85.570	78.253	7.317
34	84.221	82.427	1.794
35	77.885	78.282	-0.398
36	73.845	89.225	-15.380

Y₀= valor experimental.

Y_i= valor predicho.

Y₀-Y_i= residuo

^a No existieron diferencias significativas (P>0.05) entre el valor experimental (Y₀) y el predicho (Y_i).

9.3 Optimización de EAI y ESI en emulsiones modelo cárnicas: extracto miofibrilar-aceite de maíz

Los resultados presentados en el punto 9.1.1 revelaron que los índices de actividad y estabilidad de la emulsión (EAI y ESI, respectivamente) mostraban diferencias significativas en su respuesta, no sólo por la concentración de los componentes empleados para formar la emulsión, sino también por la naturaleza del aceite utilizado. Por lo tanto, se llevó a cabo la optimización del EAI y ESI en emulsiones modelo cárnicas formuladas utilizando extracto miofibrilar como agente emulsificante y aceite de maíz como fase dispersa, el cual posee una composición de ácidos grasos menos diversa, puesto que es un producto rico en ácidos grasos *n-6* y no contiene ácidos grasos polinsaturados de cadena larga *n-3* (EPA y DHA) en comparación con el aceite de pescado MEG-3®.

9.3.1 EAI

9.3.1.1 Análisis de superficies de respuesta

El ANOVA de un diseño factorial 3^2 para evaluar la influencia de la concentración de proteína miofibrilar (1, 4.5, 8 mg/mL) y el porcentaje de aceite de maíz (15, 20, 25%) en el EAI de las emulsiones modelo investigadas, permitió observar diferencias significativas ($P < 0.05$) en la variable dependiente EAI por el efecto lineal principal de los dos factores evaluados (A y B), por su interacción (AB) y por el término cuadrático de la concentración de proteína presente en el extracto miofibrilar (AA) (Figura 9.11).

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

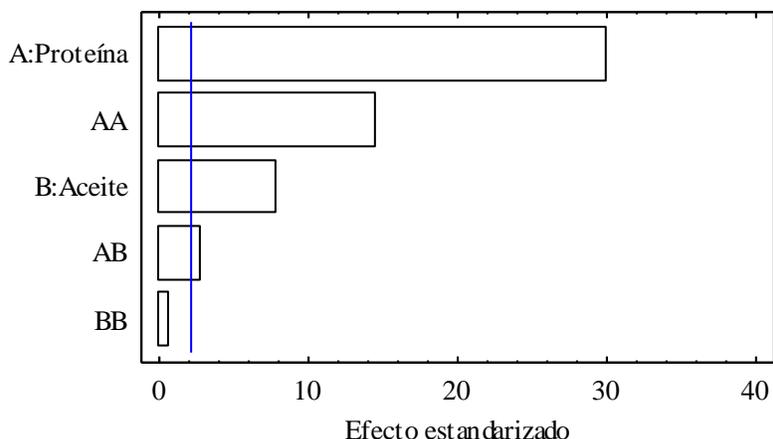


Figura 9.11. Diagrama de Pareto estandarizado de EAI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha=5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

La gráfica tridimensional del EAI construida a partir de los datos experimentales obtenidos con el diseño factorial, permitió identificar la región dónde el EAI mostró los valores más altos, la cual se localizó en el intervalo de concentración de proteína miofibrilar 1-3 mg/mL (Figura 9.12).

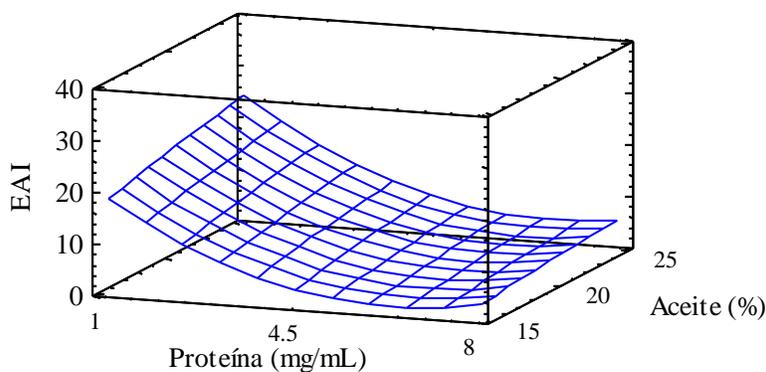


Figura 9.12. Superficie de respuesta generada a partir del diseño factorial 3^2 del índice de actividad de la emulsión (EAI, en m^2/g) en función de la concentración de proteína miofibrilar (mg/mL) y del porcentaje de aceite de maíz (%).

Una vez que se obtuvieron efectos significativos en la respuesta del EAI por el término cuadrático de la proteína y la interacción entre los factores evaluados, y que se identificaron los niveles de concentración de proteína y aceite de maíz con los que aumentaba el valor de la actividad de la emulsión, resultó posible utilizar la metodología de superficies de respuesta para aplicar un DCC,

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

ajustar un modelo de segundo orden, explicar el comportamiento del EAI en función de la concentración de proteína miofibrilar y del porcentaje de aceite de maíz y optimizar el EAI.

Los niveles de la concentración de proteína en el extracto miofibrilar y el porcentaje de aceite de maíz utilizado como fase dispersa de la emulsión, evaluados en el DCC fueron: 0.19-2.31 mg/mL y 12.93-27.07%, respectivamente. En la Figura 9.13 se aprecia el ANOVA del DCC, el cual permitió observar diferencias significativas en la respuesta de EAI ($P < 0.05$) por efecto de los dos factores investigados (A y B) y por el término cuadrático de la concentración de proteína (AA).

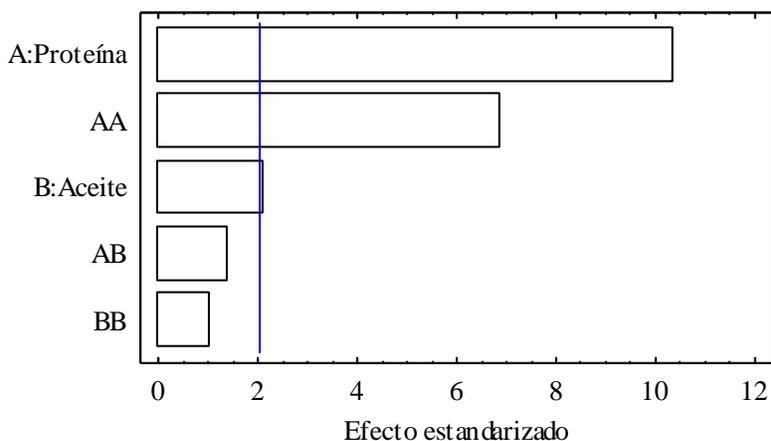


Figura 9.13. Diagrama de Pareto estandarizado de EAI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha = 5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

Tanto la concentración de proteína del extracto miofibrilar, como el porcentaje de aceite de maíz empleados para formar las emulsiones, intervienen significativamente en la respuesta del índice de actividad de la emulsión (EAI). Zhang et al. (2009) reportaron que el EAI fue dependiente de la concentración de proteína y de la fracción de aceite utilizada, en emulsiones preparadas con aislados de proteína de garbanzo y aceite de soya como fase dispersa. Sin embargo, al igual que en el caso de las emulsiones preparadas con aceite de pescado MEG-3®, los efectos más significativos en los valores obtenidos para el EAI en emulsiones modelo extracto miofibrilar-aceite de maíz, fueron los ejercidos por los términos lineal y cuadrático de la concentración de proteína.

La gráfica tridimensional de la superficie de respuesta del EAI en función a la concentración de proteína miofibrilar y al porcentaje de aceite de maíz, utilizado como fase dispersa, se comportó como una loma descendente (Figura 9.14). Se observó que independientemente del porcentaje de aceite de maíz utilizado para formular la emulsión, a medida que la concentración de proteína en el

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

extracto miofibrilar aumentaba, la respuesta del EAI disminuía. El valor de EAI más alto en las emulsiones modelo preparadas con las combinaciones del DCC se obtuvo al utilizar concentraciones de proteína miofibrilar y aceite de maíz de: 0.19 mg/L y 20%, respectivamente.

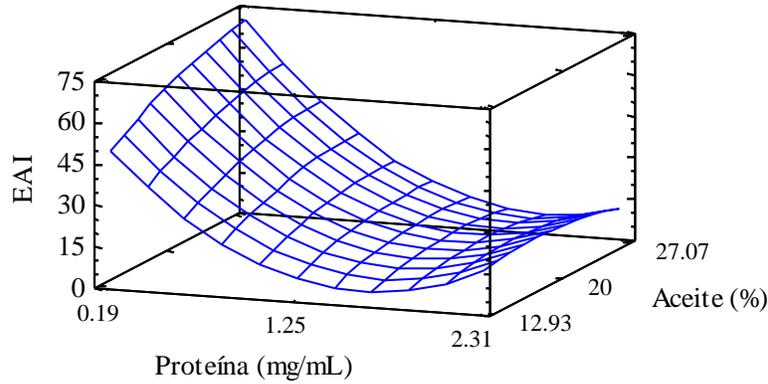


Figura 9.14. Superficie de respuesta generada a partir del DCC del índice de actividad de la emulsión (EAI, en m^2/g) en función de la concentración de proteína miofibrilar (mg/mL) y del porcentaje de aceite de maíz (%).

Sin importar el tipo de aceite utilizado como fase discontinua de la emulsión (MEG-3® o maíz), las superficies de respuesta del EAI presentaron el mismo patrón de comportamiento en las emulsiones modelo cárnicas formuladas con extracto miofibrilar como emulsificante.

En la Tabla 9.8 se muestran los coeficientes de regresión estimados de las variables independientes, el R^2 , la falta de ajuste del modelo reducido y sus valores P, los cuales se obtuvieron mediante un ajuste de regresión de la ecuación cuadrática con la cual se generó la superficie de respuesta, seguido de un ANOVA.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

Tabla 9.8. Valores de los coeficientes de regresión, R^2 , falta de ajuste del modelo y valores P del modelo de superficie de respuesta.

Variable independiente	Coefficiente de regresión	Nivel de significancia (valor P)
Constante	42.703	0.017
Lineal		
x_1	-60.818	0.000
x_2	1.7	0.044
Cuadrático		
x_1^2	22.228	0.000
Interacción		
x_1x_2	-0.828	0.175
R^2	84.2	
Regresión		0.000
Falta de ajuste		0.058

El análisis de regresión permitió obtener un modelo cuadrático reducido para describir la respuesta del EAI en función de los efectos significativos de los factores analizados. Dicho modelo fue $EAI = 42.703 - 60.818x_1 + 1.7x_2 + 22.228x_1^2 - 0.823x_1x_2$, donde x_1 es la concentración de proteína en el extracto miofibrilar (mg/mL) y x_2 el contenido de aceite de maíz en la emulsión (%). Aunque la interacción entre los dos factores no fue significativa, se incluyó en el modelo, puesto que los términos principales de ambas variables independientes (x_1 , x_2) fueron significativos ($P < 0.05$).

El ajuste de la ecuación de superficie de respuesta de segundo orden para la variable dependiente EAI fue significativo ($P < 0.05$) y se obtuvo un coeficiente de determinación aceptable ($R^2 > 80\%$).

9.3.1.2 Optimización

La optimización de la respuesta del EAI en la emulsión modelo se realizó de forma numérica utilizando el modelo cuadrático obtenido en el punto anterior y con ayuda de la función de optimización de los paquetes estadísticos. El modelo cuadrático reducido permitió calcular los valores de la concentración de proteína en el extracto miofibrilar (mg/mL) y el porcentaje de aceite de maíz, que al ser empleados para formular la emulsión modelo maximizaban la respuesta del EAI.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

El EAI óptimo con un valor de 73.8 m²/g, se consiguió al emplear una combinación de proteína miofibrilar y aceite de maíz en concentraciones: 0.19 mg/mL y 27.07%, respectivamente.

9.3.1.3 Validación del modelo de superficie de respuesta reducido

La prueba estadística *t* no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los valores del EAI determinados experimentalmente y los estimados con el modelo de segundo orden (Tabla 9.9). Los residuos expresados como la diferencia entre el valor observado y el predicho fueron bajos. Esto indicó que ambos valores eran cercanos y permitió verificar la eficiencia del modelo de segundo orden utilizado para predecir la respuesta del EAI en función de la concentración de proteína miofibrilar emulsificante y del porcentaje de aceite de maíz empleado como fase dispersa de la emulsión modelo cárnica.

Se prepararon emulsiones modelo cárnica utilizando la combinación de concentración de proteína en el extracto miofibrilar (0.19 mg/mL) y aceite de maíz (27.07 %), que permitió obtener el valor óptimo del EAI, al emplear el modelo cuadrático ajustado y la función de optimización de los paquetes estadísticos. El EAI determinado en las emulsiones mostró un valor de 76.1 m²/g, mientras que el EAI predicho matemáticamente fue 73.8 m²/g. Al comparar los valores del EAI, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$), puesto que las respuestas obtenidas fueron similares. Lo anterior confirmó que la ecuación de regresión ajustada fue adecuada y por lo tanto fue válida para optimizar el EAI.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

Tabla 9.9. Comparación entre los valores experimentales y predichos obtenidos a partir del modelo reducido final

Experimento	EAI (m ² /g) ^a		
	Y ₀	Y _i	Y ₀ -Y _i
1	22.315	37.145	-14.830
2	16.195	14.723	1.472
3	69.909	62.852	7.057
4	15.582	14.723	0.860
5	15.900	14.723	1.177
6	19.892	19.429	0.464
7	13.491	10.016	3.475
8	39.857	50.007	-10.150
9	15.412	14.723	0.689
10	14.584	11.100	3.483
11	10.946	10.652	0.294
12	11.988	16.607	-4.619
13	24.298	37.145	-12.847
14	17.618	14.723	2.8956
15	79.122	62.852	16.270
16	15.987	14.723	1.265
17	15.550	14.723	0.827
18	21.039	19.429	1.610
19	14.820	10.016	4.804
20	38.285	50.007	-11.722
21	17.885	14.723	3.163
22	13.060	11.100	1.957
23	11.225	10.652	0.573
24	12.728	16.607	-3.879
25	25.078	37.145	-12.066
26	14.587	14.723	-0.135
27	84.505	62.852	21.653
28	15.264	14.723	0.542
29	17.015	14.723	2.292
30	19.392	19.429	-0.037
31	13.373	10.016	3.357
32	38.924	50.007	-11.084
33	17.033	14.723	2.311
34	14.371	11.100	3.271
35	11.710	10.652	1.058
36	11.155	16.607	-5.451

Y₀= valor experimental.

Y_i= valor predicho.

Y₀-Y_i= residuo

^a No existieron diferencias significativas (P>0.05) entre el valor experimental (Y₀) y el predicho (Y_i).

9.3.2 ESI

9.3.2.1 Análisis de superficies de respuesta

Las emulsiones preparadas siguiendo las combinaciones de proteína miofibrilar y porcentaje de aceite de maíz del diseño factorial 3^2 , mostraron diferencias significativas en la respuesta del ESI ($P < 0.05$) por el efecto lineal principal de los dos factores evaluados (Figura 9.15).

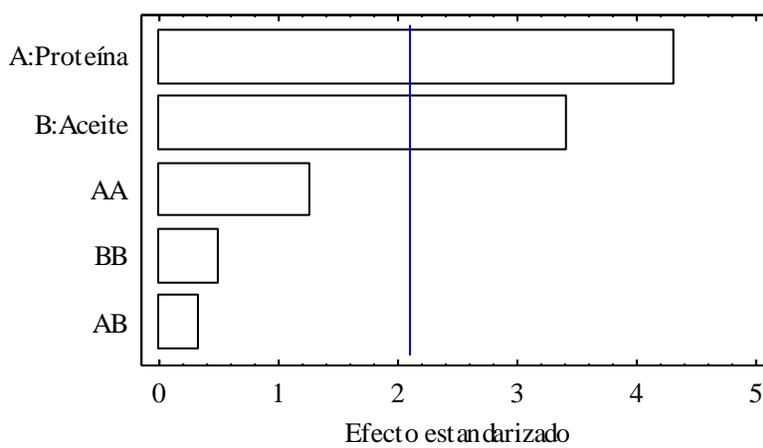


Figura 9.15. Diagrama de Pareto estandarizado de ESI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha = 5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

El análisis de la gráfica tridimensional, generada a partir de los datos experimentales del ESI obtenidos con el diseño factorial 3^2 , mostró que la respuesta del índice de estabilidad aumentaba a medida que se incrementaba la concentración de proteína en el extracto miofibrilar y al utilizar porcentajes de aceite de maíz en el intervalo: 15-20% (Figura 9.16).

La ausencia de efectos cuadráticos significativos de los factores analizados en la respuesta del ESI, hizo necesario generar un nuevo diseño factorial para explorar niveles adicionales de concentración de proteína miofibrilar y porcentaje de aceite de maíz, que permitieran obtener un efecto significativo en el ESI por el efecto del cuadrado de al menos uno de los factores evaluados y entonces, continuar con la optimización de la variable dependiente ESI por MSR.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

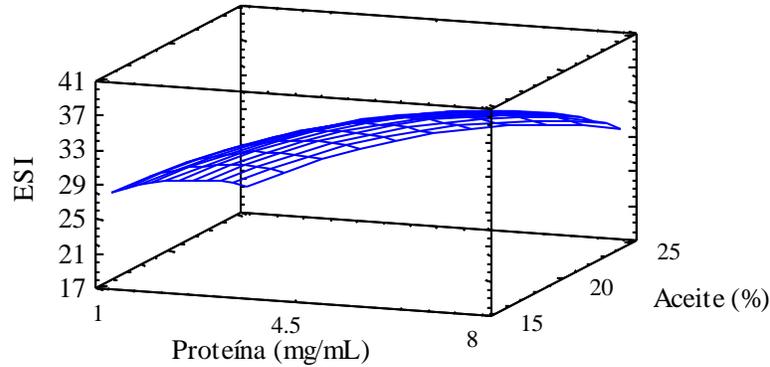


Figura 9.16. Superficie de respuesta generada a partir del diseño factorial 3^2 del índice de estabilidad de la emulsión (ESI, en min) en función de la concentración de proteína miofibrilar (mg/mL) y del porcentaje de aceite de maíz (%).

Al aplicar la metodología de máxima pendiente en ascenso se diseñó un factorial completo 3^2 tomando de base los niveles de concentración de proteína y porcentaje de aceite de maíz utilizados para formar la emulsión en el primer factorial analizado, que permitieron observar un aumento en el valor del ESI.

El ANOVA del segundo diseño factorial que evaluó el efecto combinado de la concentración de proteína en el extracto miofibrilar (4, 8, 12 mg/mL) y del porcentaje de aceite de maíz (10, 15, 20%) en la respuesta del ESI en las emulsiones modelo cárnicas, mostró que el término lineal principal de los dos factores investigados (A y B) y el término cuadrático de la concentración de proteína miofibrilar (AA) tuvieron un efecto significativo en el ESI (Figura 9.17).

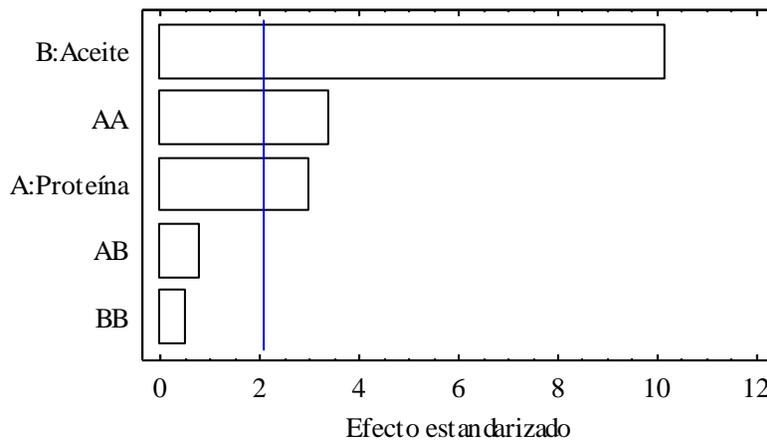


Figura 9.17. Diagrama de Pareto estandarizado de ESI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha = 5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

La grafica tridimensional de los datos del segundo factorial, nos permitió identificar que la posible región de respuesta óptima de la variable dependiente ESI se encontraba en la zona cercana a los niveles de concentración de proteína y porcentaje de aceite en los intervalos: 9-12 mg/mL y 10-11%, respectivamente (Figura 9.18).

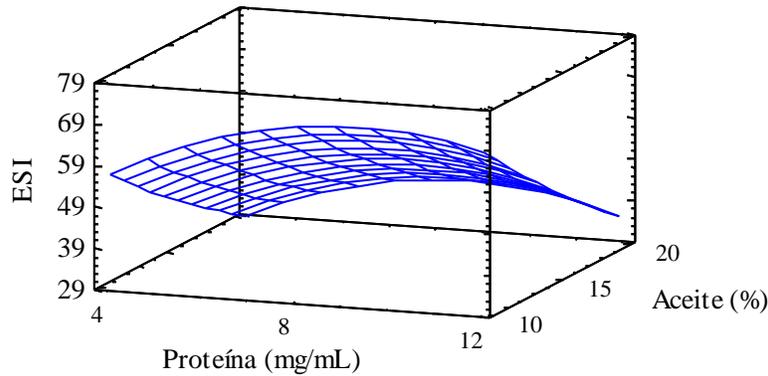


Figura 9.18. Superficie de respuesta generada a partir del segundo diseño factorial 3^2 del índice de estabilidad de la emulsión (ESI, en min) en función de la concentración de proteína miofibrilar (mg/mL) y del porcentaje de aceite de maíz (%).

Una vez que se obtuvo un efecto cuadrático significativo de la concentración de proteína en el extracto miofibrilar en la respuesta del ESI y que se ubicó la región de posible respuesta óptima del índice, se aplicó un DCC para explorar la zona de interés y optimizar el ESI. El diagrama de Pareto que representa el ANOVA del DCC (Figura 9.19) permitió observar diferencias significativas en el ESI ($P < 0.05$) por efecto de la concentración de proteína (A), del porcentaje de aceite (B) y del cuadrado de la concentración de proteína (AA). Aun cuando el efecto más significativo en la respuesta del ESI fue la concentración de proteína miofibrilar (término lineal y cuadrático), el porcentaje de aceite de maíz empleado como fase dispersa de las emulsiones modelo también influyó en el índice. Parece ser que en las emulsiones modelo cárnicas preparadas con aceite de maíz, la estabilidad de la emulsión no sólo está en función a la cantidad de proteína presente en el extracto miofibrilar y a su habilidad emulsificante, sino también a la cantidad de aceite que es necesario dispersar para formar los glóbulos de la emulsión o/w.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

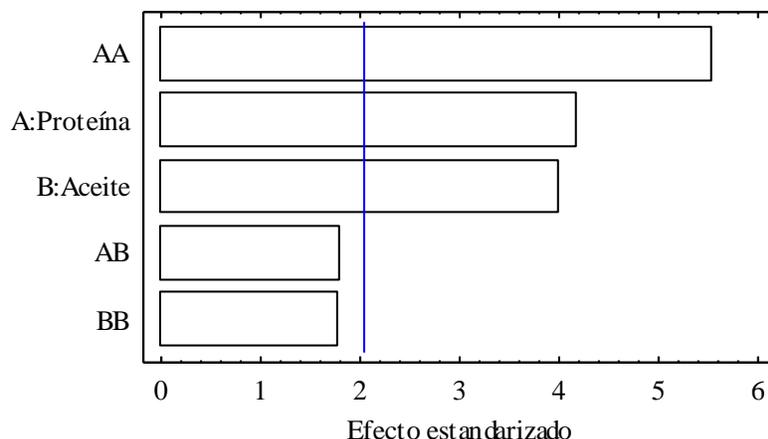


Figura 9.19. Diagrama de Pareto estandarizado de ESI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha=5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

En la figura 9.20 se muestra la superficie de respuesta del ESI en función a las variables independientes evaluadas, construida por ajuste de los datos experimentales obtenidos con el DCC a una ecuación cuadrática. El ESI presentó un comportamiento de silla de montar o minimax, por el efecto simultáneo de los factores analizados.

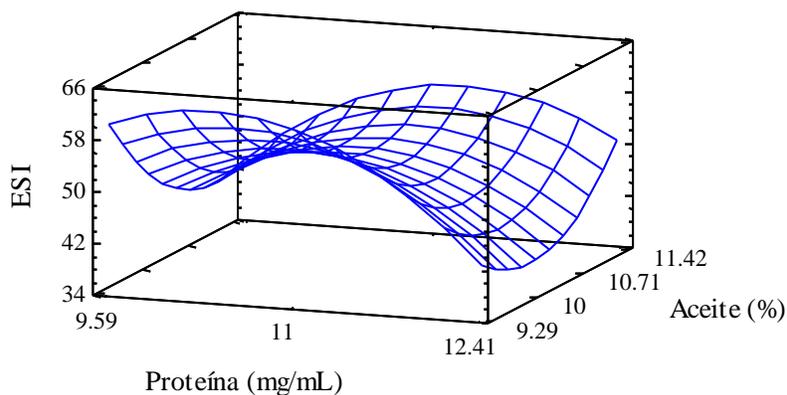


Figura 9.20. Superficie de respuesta generada a partir del DCC del índice de estabilidad de la emulsión (ESI, en min) en función de la concentración de proteína miofibrilar (mg/mL) y del porcentaje de aceite de maíz (%).

El análisis de la gráfica de superficie de respuesta obtenida para el ESI, mostró que los valores del índice disminuían al utilizar concentraciones de proteína miofibrilar que se alejaban de la zona

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

cercana al punto central del DCC (11 mg/mL). En contraste, el valor del ESI aumentaba a medida que el porcentaje de maíz empleado como fase dispersa de la emulsión, se movía por abajo o arriba del punto central correspondiente al contenido de aceite en la emulsión (10%). La respuesta más alta para el ESI en el DCC fue 61.7 min, este valor se obtuvo al utilizar una combinación de proteína y aceite de: 10 mg/L y 9.5%, respectivamente.

El ajuste de regresión de la ecuación cuadrática a partir de la cual se construyó la superficie de respuesta del ESI, seguido de un ANOVA permitió obtener un modelo de segundo orden para predecir el valor óptimo del índice. Este modelo se construyó a partir de los efectos significativos de las variables independientes, sin embargo algunos términos no significativos ($P > 0.05$) también se incluyeron, puesto que los efectos lineales o cuadráticos de las variables independientes permitieron obtener diferencias significativas en la respuesta del ESI (Tabla 9.10).

Tabla 9.10 Valores de los coeficientes de regresión, R^2 , falta de ajuste del modelo y valores P del modelo de superficie de respuesta.

Variable independiente	Coefficiente de regresión	Nivel de significancia (valor P)
Constante	644.321	0.181
Lineal		
x_1	65.595	0.001
x_2	-180.121	0.002
Cuadrático		
x_1^2	-5.000	0.000
x_2^2	6.421	0.086
Interacción		
x_1x_2	4.112	0.082
R^2	71.7	
Regresión		0.000
Falta de ajuste		0.076

El modelo de segundo orden para la variable dependiente obtenido por el ajuste de regresión fue $ESI = 644.321 + 65.595x_1 - 180.121x_2 - 5.0x_1^2 + 6.421x_2^2 + 4.112x_1x_2$, donde x_1 es la concentración de proteína en el extracto miofibrilar (mg/mL) y x_2 el porcentaje de aceite de maíz (%).

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

Al igual que en las emulsiones modelo cárnicas preparadas con extracto miofibrilar y aceite de pescado MEG-3®, el coeficiente de determinación (R^2) del modelo cuadrático ajustado para explicar el comportamiento del ESI en función del efecto combinado de la concentración de proteína miofibrilar y el porcentaje de aceite de maíz, resultó menor a 80% ($R^2= 71.7\%$). Sin embargo, el ANOVA mostró que el ajuste de regresión del modelo cuadrático de la variable dependiente ESI fue significativo ($P<0.05$) y la falta de ajuste de los datos experimentales a un modelo cuadrático no fue significativa ($P>0.05$), puesto que se obtuvo un valor $P= 0.076$. Por lo tanto, es probable que la región explorada con el DCC sea la de la respuesta óptima del EAI.

9.3.2.2 Optimización

El modelo cuadrático ajustado se utilizó para optimizar numéricamente el valor de ESI, haciendo uso de la función de optimización de los paquetes estadísticos. El ESI óptimo, con un valor de 63.3 min se consigue al formular emulsiones modelo con 10.4 mg/mL de proteína en el extracto miofibrilar y 9.3% de aceite de maíz como fase dispersa.

9.3.2.3 Validación del modelo de superficie de respuesta

Con el objetivo de confirmar si el modelo cuadrático ajustado mediante la metodología de superficies de respuesta es válido para predecir el valor óptimo de la variable dependiente ESI se realizó una prueba estadística t para observar si se presentaban diferencias significativas en los valores del ESI obtenidos experimentalmente con respecto a los estimados matemáticamente haciendo uso del modelo ajustado. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($P<0.05$) en los valores del ESI observados y predichos. Además, los residuos fueron bajos, lo cual reveló la cercanía entre los valores experimentales y estimados del ESI (Tabla 9.11). En base a lo anterior, este análisis valida la eficiencia del modelo cuadrático utilizado para predecir la respuesta del ESI en función de la concentración de proteína miofibrilar emulsificante y del porcentaje de aceite de maíz empleado como fase dispersa de la emulsión cárnica, aún cuando el valor del coeficiente de determinación resultó ser menor a 80%.

El valor del ESI más alto observado con el DCC fue en promedio 61.7 min, mientras que bajo las condiciones óptimas determinadas con el modelo cuadrático mostró un valor de 63.3 min. Este resultado permitió observar que la optimización numérica del ESI logra aumentar la respuesta de

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

dicha variable dependiente. Se prepararon emulsiones modelo cárnicas utilizando la combinación de concentración de proteína en el extracto miofibrilar (10.4 mg/mL) y porcentaje de aceite de maíz (9.3%) que permitieron maximizar la respuesta de ESI al emplear el modelo cuadrático ajustado. El ESI de las emulsiones mostró un valor de 64.5 min, el cual fue muy cercano al óptimo conseguido con el modelo cuadrático reducido (ESI= 63.3 min). No se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) entre el ESI determinado experimentalmente y el predicho matemáticamente con la función de optimización. En consecuencia, la ecuación de regresión ajustada fue adecuada y permitió optimizar el ESI en emulsiones modelo cárnicas: extracto miofibrilar-aceite de maíz, al aplicar la metodología de superficies de respuesta.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

Tabla 9.11. Comparación entre los valores experimentales y predichos obtenidos a partir del modelo final

Experimento	ESI (min) ^a		
	Y ₀	Y _i	Y ₀ -Y _i
1	49.087	53.545	-4.458
2	58.702	58.817	-0.114
3	57.957	61.333	-3.376
4	49.013	52.178	-3.165
5	56.225	53.545	2.680
6	47.096	48.231	-1.135
7	52.587	48.313	4.274
8	56.395	47.949	8.446
9	48.014	53.545	-5.532
10	44.087	45.588	-1.501
11	52.544	53.545	-1.001
12	40.592	38.760	1.832
13	57.282	53.545	3.737
14	61.862	58.817	3.046
15	60.779	61.333	-0.554
16	55.288	52.178	3.110
17	56.978	53.545	3.433
18	44.928	48.231	-3.303
19	43.889	48.313	-4.424
20	45.394	47.949	-2.555
21	53.884	53.545	0.338
22	44.479	45.588	-1.109
23	51.546	53.545	-2.000
24	35.784	38.760	-2.976
25	48.846	53.545	-4.700
26	64.583	58.817	5.766
27	54.732	61.333	-6.602
28	53.415	52.178	1.237
29	56.228	53.545	2.682
30	53.084	48.231	4.853
31	43.958	48.313	-4.356
32	50.993	47.949	3.044
33	55.041	53.545	1.495
34	48.852	45.588	3.264
35	56.871	53.545	3.326
36	35.061	38.760	-3.700

Y₀= valor experimental.

Y_i= valor predicho.

Y₀-Y_i= residuo

^a No existieron diferencias significativas (P>0.05) entre el valor experimental (Y₀) y el predicho (Y_i).

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

Zorba (2006) reportó que en emulsiones modelo preparadas a pH 6.6 utilizando proteínas miofibrilares de carne de res como emulsificante (5 mg/mL) y aceite de maíz como fase dispersa, la estabilidad de las emulsiones aumentó al incrementar el porcentaje de aceite de maíz adicionado a la emulsión. En nuestro análisis, realizado a pH 7 ocurrió lo contrario, puesto que la optimización por superficies de respuesta mostró que al disminuir la concentración de aceite de maíz (%) el ESI aumentó y con ello se logró retrasar la separación de las fases de la emulsión modelo cárnica.

9.4 Optimización de EAI y ESI en emulsiones modelo: ovoalbúmina-aceite MEG-3®

Después de obtener los valores óptimos de los índices EAI y ESI de las emulsiones modelo cárnica formuladas con extracto miofibrilar, se aplicó nuevamente la metodología de superficies de respuesta para optimizar ambos índices en las emulsiones modelo denominadas control, las cuales se identificaron con ese nombre, puesto que se prepararon utilizando solución de ovoalbúmina comercial grado II como agente emulsificante. Esta solución fue menos compleja en comparación con el extracto miofibrilar, además la ovoalbúmina es una proteína utilizada comúnmente en la industria de los alimentos por su habilidad espumante, gelificante al someterse a calentamiento (Galazka et al., 2000) y por su alta funcionalidad que le confiere propiedades emulsificantes (Mine et al., 1991). Por lo anterior, resultó interesante optimizar la respuesta del EAI y ESI en las emulsiones modelo control y contrastar su comportamiento con respecto a las emulsiones modelo cárnica.

9.4.1 EAI

9.4.1.1 Análisis de superficies de respuesta

Como primer paso se generó un diseño factorial completo 3^2 con 3 réplicas y se prepararon emulsiones siguiendo las combinaciones de concentración de ovoalbúmina (1, 4.5, 8 mg/mL) y porcentaje de aceite de pescado MEG-3® (15, 20, 25%) evaluadas en el diseño estadístico. Posteriormente, se realizó un ANOVA del diseño factorial para observar los efectos lineales, cuadráticos y de interacción de los dos factores analizados, en la respuesta del EAI. De manera particular, se buscó obtener al menos un efecto cuadrático significativo de alguno de los factores evaluados en la variable dependiente EAI, puesto que esto indicaba que era posible optimizar la

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

respuesta del índice por el ajuste de un modelo cuadrático de superficie de respuesta. La representación gráfica del ANOVA del diseño factorial (Figura 9.21) mostró diferencias significativas en la respuesta del EAI ($P < 0.05$), por el efecto de los términos lineales principales de los dos factores (A y B), por la interacción entre ellos (AB) y por el término cuadrático de concentración de proteína (AA). El efecto significativo del cuadrado de la concentración de proteína (AA), nos indicó que dicho factor provocaba una curvatura en la respuesta del EAI, por lo tanto resultaba posible aplicar la metodología de superficies de respuesta, generar un diseño DCC y optimizar el EAI en función a la concentración de ovoalbúmina y al porcentaje de aceite MEG3®, utilizados para formar la emulsión

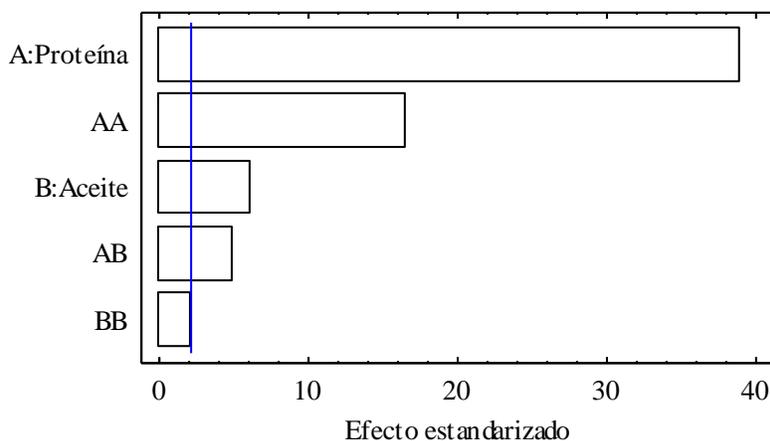


Figura 9.21. Diagrama de Pareto estandarizado de EAI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha = 5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

Antes de aplicar la MSR haciendo uso de un DCC y tomando en cuenta que se desconocía la región de respuesta óptima del EAI en la emulsión modelo bajo análisis, resultó necesario ubicar los niveles de los factores analizados en los que se observaba un aumento en la variable dependiente EAI, así que se generó una gráfica tridimensional a partir de los datos experimentales obtenidos con el diseño factorial 3^2 y se observó que el valor más alto del índice EAI se obtuvo al formular emulsiones con 25% de aceite de pescado MEG-3® y una concentración de proteína de 1 mg/mL (Figura 9.22). Por lo tanto, se decidió explorar dicha zona utilizando un DCC.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

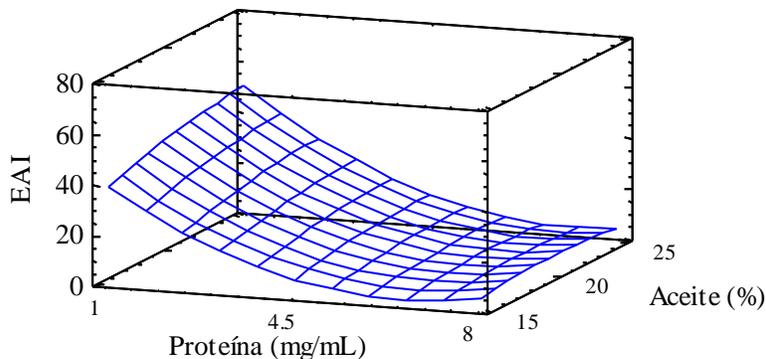


Figura 9.22. Superficie de respuesta generada a partir del diseño factorial 3^2 del índice de actividad de la emulsión (EAI, en m^2/g) en función de la concentración de ovoalbúmina (mg/mL) y del porcentaje de aceite MEG-3® (%).

La concentración de proteína en la solución de ovoalbúmina y el porcentaje de aceite de pescado utilizado como fase dispersa de la emulsión, evaluados con el DCC se encontraron en el intervalo 0.72-1.28 mg/mL y 17.93-32.07%, respectivamente. El ANOVA de la región explorada con el DCC permitió observar diferencias significativas en el EAI ($P < 0.05$) por efecto de los dos factores investigados (Figura 9.23).

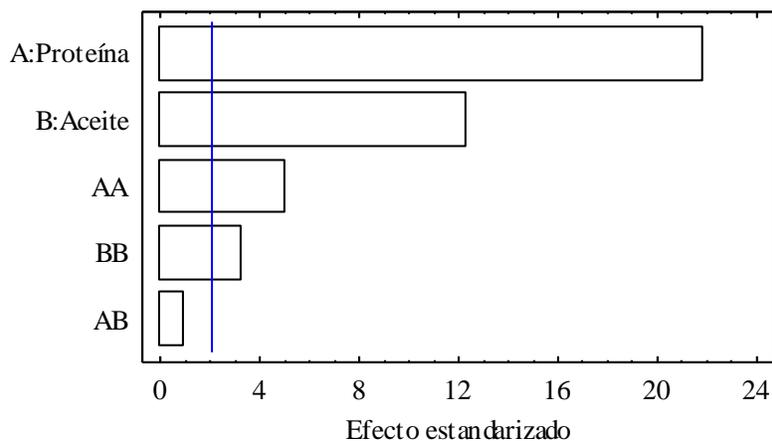


Figura 9.23. Diagrama de Pareto estandarizado de EAI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha = 5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

Los efectos más significativos en la respuesta del EAI en orden descendente fueron: los términos lineales principales de la concentración de proteína (A) y del porcentaje de aceite MEG-3® (A), el

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

término cuadrático de la concentración de ovoalbúmina (AA) y el cuadrado del porcentaje de aceite (BB). Estos resultados mostraron que la habilidad que presenta la ovoalbúmina para formar la interfase y estabilizarla no depende solamente de la concentración de proteína utilizada como emulsificante, sino también de la cantidad de aceite de pescado que debe ser dispersado para obtener la emulsión modelo. Aunque la interacción de los factores no fue significativa ($P > 0.05$) en la variable dependiente EAI, los dos términos cuadráticos de las variables independientes si lo fueron ($P < 0.05$), esto fue indicio de que la respuesta del EAI en función al efecto de la concentración de proteína y el porcentaje de aceite, podía ser caracterizada a partir del ajuste de un modelo de segundo orden.

La gráfica tridimensional generada a partir del ajuste de los datos experimentales del EAI obtenidos con el DCC a un modelo de superficie de respuesta, mostró que este índice presentó un comportamiento de cresta o loma descendente, por el efecto simultáneo de los factores analizados (Figura 9.24).

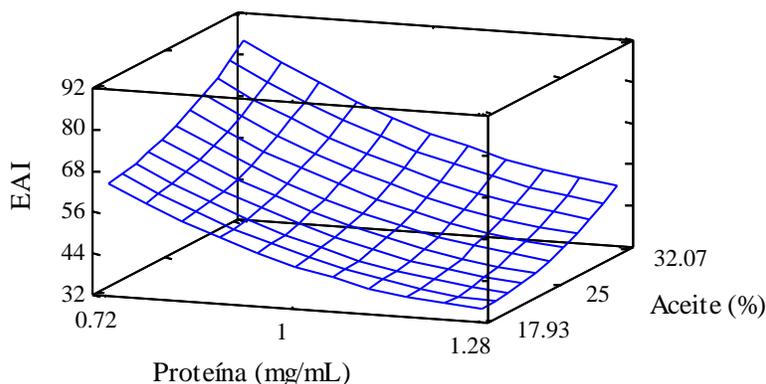


Figura 9.24. Superficie de respuesta generada a partir del DCC del índice de actividad de la emulsión (EAI, en m^2/g) en función de la concentración de ovoalbúmina (mg/mL) y del porcentaje de aceite MEG-3® (%).

Se observó que el EAI disminuyó al aumentar la concentración de proteína empleada como emulsificante y al reducir la cantidad de aceite de pescado utilizado como fase dispersa de la emulsión (%). De acuerdo con los datos experimentales obtenidos al utilizar el DCC, el EAI más alto ($\sim 72 m^2/g$) se obtuvo al formular emulsiones con una concentración de ovoalbúmina de 0.72 mg/mL y 25% de aceite MEG-3®.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

El ajuste de regresión polinomial de la ecuación cuadrática con la cual se generó la superficie de respuesta, seguido de un ANOVA permitió obtener un modelo reducido a partir de los efectos significativos de los factores analizados, en la respuesta del EAI. La Tabla 9.11 muestra los coeficientes de regresión estimados de las variables independientes, el R^2 , la falta de ajuste del modelo reducido y sus valores P.

Tabla 9.11 Valores de los coeficientes de regresión, R^2 , falta de ajuste del modelo y valores p del modelo de superficie de respuesta reducido.

Variable independiente	Coefficiente de regresión	Nivel de significancia (valor P)
Constante	193.407	0.000
Lineal		
x_1	-201.342	0.000
x_2	-2.524	0.000
Cuadrático		
x_1^2	72.562	0.000
x_2^2	0.076	0.002
R^2	95.5	
Regresión		0.000
Falta de ajuste		0.082

El modelo reducido obtenido por el ajuste de regresión polinomial de la ecuación cuadrática fue $EAI = 193.407 - 201.342x_1 - 2.52418x_2 + 72.562x_1^2 + 0.076x_2^2$, donde x_1 es la concentración de ovoalbúmina (mg/mL) y x_2 el porcentaje de aceite MEG-3® (%). El coeficiente de determinación del modelo fue satisfactorio ($R^2 > 95\%$) y el ANOVA mostró que el ajuste de la ecuación de superficie de respuesta de segundo orden para la variable dependiente EAI fue significativo ($P < 0.05$). Por lo tanto, el modelo reducido resultó adecuado para describir la respuesta de la variable dependiente EAI en función a los dos factores principales utilizados para formular la emulsión modelo.

9.4.1.2 Optimización

La optimización de la respuesta del EAI en la emulsión modelo se realizó de forma numérica. La composición de la emulsión modelo que permitió obtener el valor máximo de EAI, calculado con el modelo ajustado y la función de optimización de paquetes estadísticos, fue: 0.72 mg/mL de proteína ovoalbúmina y 32.07 % de aceite de pescado MEG-3®. Con la combinación anterior, se obtuvo un valor óptimo del EAI de 83.5 m²/g.

9.4.1.3 Validación del modelo de superficie de respuesta reducido

La prueba estadística *t* para validar el modelo cuadrático ajustado, el cual se utilizó para predecir la respuesta del EAI, no mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los resultados experimentales y los estimados con el modelo reducido de segundo orden. Los residuos fueron bajos ya que los valores experimentales y predichos de EAI fueron muy cercanos (Tabla 9.12).

Para concluir la validación del modelo de superficie de respuesta obtenido, se prepararon emulsiones utilizando la combinación de concentración de ovoalbúmina (0.72 mg/mL) y porcentaje de aceite de pescado MEG-3® (32.07 %), estimada con el modelo cuadrático reducido y que maximizó la respuesta de EAI. El valor del EAI en dichas emulsiones fue 85.2 m²/g y resultó muy cercano al calculado con el modelo (EAI= 83.5 m²/g). No hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) entre el EAI observado experimentalmente y el estimado matemáticamente con la función de optimización. En consecuencia, el modelo cuadrático reducido es válido para predecir y optimizar el EAI en función de la concentración de ovoalbúmina y del porcentaje de aceite MEG-3® empleados para formar la emulsión modelo.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

Tabla 9.12. Comparación entre los valores experimentales y predichos obtenidos a partir del modelo reducido final.

Experimento	EAI (m ² /g) ^a		
	Y ₀	Y _i	Y ₀ -Y _i
1	74.022	70.671	3.351
2	35.941	36.166	-0.225
3	43.809	43.772	0.037
4	52.521	48.965	3.555
5	46.932	48.965	-2.033
6	45.588	48.878	-3.290
7	41.528	48.965	-7.438
8	63.697	61.750	1.947
9	45.102	48.965	-3.863
10	58.194	58.653	-0.459
11	41.042	38.870	2.172
12	71.097	71.365	-0.268
13	71.017	70.671	0.346
14	36.503	36.166	0.337
15	44.814	43.772	1.042
16	48.646	48.965	-0.320
17	52.625	48.965	3.660
18	45.413	48.878	-3.465
19	48.517	48.965	-0.450
20	62.083	61.750	0.334
21	50.592	48.965	1.630
22	57.690	58.653	-0.963
23	41.214	38.870	2.344
24	69.238	71.365	-2.127
25	70.845	70.671	0.174
26	36.133	36.166	-0.033
27	44.067	43.772	0.295
28	50.267	48.965	1.301
29	48.345	48.965	-0.621
30	48.259	48.878	-0.619
31	50.592	48.965	1.630
32	65.575	61.750	3.826
33	51.919	48.965	2.953
34	55.862	58.653	-2.800
35	37.963	38.870	-0.907
36	70.307	71.365	-1.058

Y₀= valor experimental.

Y_i= valor predicho.

Y₀-Y_i= residuo

^a No existieron diferencias significativas (P>0.05) entre el valor experimental (Y₀) y el predicho (Y_i).

9.4.2 ESI

9.4.2.1 Análisis de superficies de respuesta

Las emulsiones preparadas siguiendo las combinaciones de concentración de ovoalbúmina (1, 4.5, 8 mg/mL) y porcentaje de aceite de pescado MEG-3® (15, 20, 25%) analizadas en un diseño factorial 3^2 , no mostraron diferencias significativas en la respuesta del ESI por el efecto cuadrático de alguno de los factores investigados, ni por la interacción entre ellos (Figura 9.25). Este primer ANOVA de los valores del ESI en los sistemas modelo o/w bajo investigación, permitió observar que el porcentaje de aceite de pescado y la concentración de ovoalbúmina en la fase continua de la emulsión afectan significativamente ($P < 0.05$) la estabilidad de la misma, tomando en cuenta que el ESI estimado a partir de determinaciones espectrofotométricas, es una aproximación sencilla del tiempo que tardan las fases de la emulsión en separarse.

La carencia de efectos cuadráticos y de interacción significativos de los factores evaluados, indicó que no existía curvatura en los datos experimentales del ESI, obtenidos al explorar los niveles de concentración de las variables independientes analizadas en el primer factorial. Esto impedía el ajuste de un modelo de superficie de respuesta de segundo orden para la variable dependiente ESI.

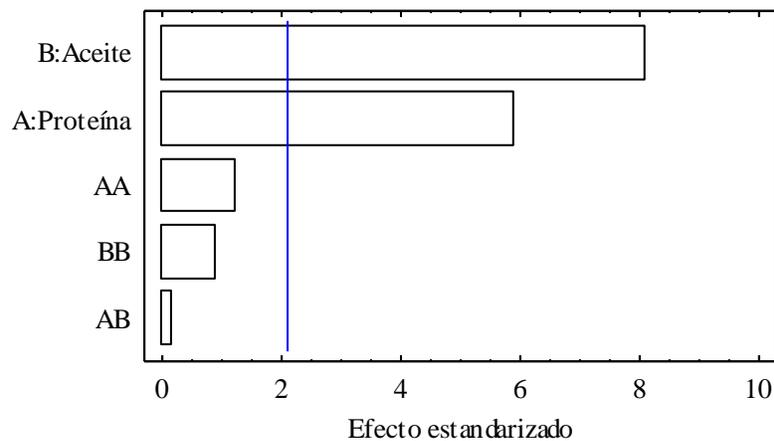


Figura 9.25. Diagrama de Pareto estandarizado de ESI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha = 5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

La gráfica tridimensional construida a partir de los resultados obtenidos con el diseño factorial presentó la forma de una lámina, lo cual confirmó que los valores del ESI en función a la concentración de ovoalbúmina emulsificante y al porcentaje de aceite MEG-3® (fase dispersa de la emulsión) no podían ajustarse a una ecuación cuadrática (Figura 9.26). Se observó que tanto la concentración de proteína como el porcentaje de aceite ejercieron un efecto negativo en el valor del ESI, es decir, el ESI disminuía al aumentar la concentración de los factores.

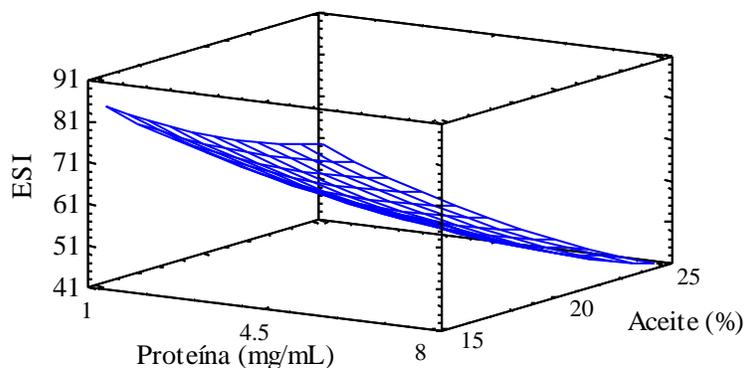


Figura 9.26. Superficie de respuesta generada a partir del diseño factorial 3^2 del índice de estabilidad de la emulsión (ESI, en min) en función de la concentración de ovoalbúmina (mg/mL) y del porcentaje de aceite MEG-3® (%).

Para poder continuar con la optimización por MSR, resultó necesario obtener un efecto significativo en la respuesta del ESI por el término cuadrático de al menos uno de los factores evaluados y de ser posible de la interacción entre ellos; por lo tanto, se generó un nuevo diseño 3^2 tomando como punto de partida los niveles de las variables independientes del primer factorial en los que se observaron los valores más altos del ESI (1 mg/mL de ovoalbúmina y 15% de aceite de pescado). Los niveles de la concentración de ovoalbúmina y del porcentaje de aceite MEG-3® analizados en el segundo diseño factorial fueron: 0.5, 1, 1.5 mg/mL y 10, 15, 20%, respectivamente. El ANOVA del diseño factorial reveló que el término lineal del porcentaje de aceite de pescado MEG-3® (B) y el término cuadrático de la concentración de ovoalbúmina (AA), tuvieron un efecto significativo en la respuesta del ESI (Figura 9.27).

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

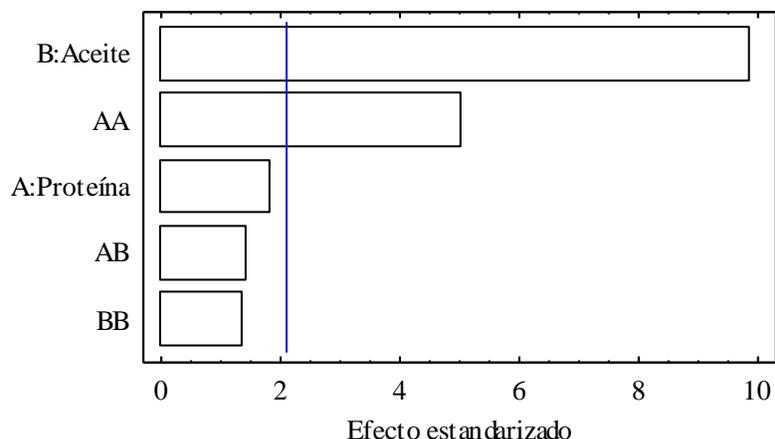


Figura 9.27. Diagrama de Pareto estandarizado de ESI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha = 5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

La grafica tridimensional del efecto de los factores analizados en la respuesta del ESI, construida con los resultados obtenidos del segundo factorial completo, nos permitió observar que los efectos significativos del porcentaje de aceite MEG-3® y del término cuadrático de la concentración de proteína emulsificante en la respuesta del ESI fueron de tipo negativo, es decir, al aumentar el valor de ambos términos, el ESI disminuía. Se propuso explorar con un DCC la zona cercana a 0.9 mg/mL de concentración de proteína y 10% de aceite MEG-3®, puesto que fue en la que se identificó el valor más alto de la respuesta del ESI (Figura 9.28).

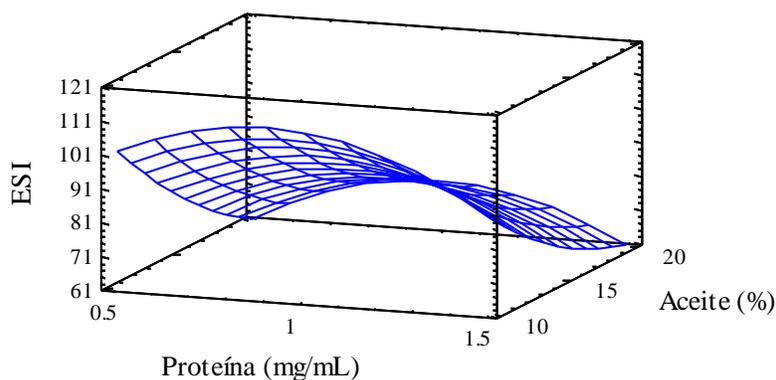


Figura 9.28. Superficie de respuesta generada a partir del segundo diseño factorial 3^2 del índice de estabilidad de la emulsión (ESI, en min) en función de la concentración de ovoalbúmina (mg/mL) y del porcentaje de aceite MEG-3® (%).

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

El efecto cuadrático significativo del porcentaje de la concentración de proteína utilizada como emulsificante para formar la emulsión modelo, nos indicó que era posible aplicar un DCC para optimizar el ESI por ajuste de un modelo cuadrático de superficie de respuesta. El DCC se generó, tomando como base que el valor más alto para el ESI se obtendría al utilizar solución de ovoalbúmina en concentración 0.9 mg/mL y 10% de aceite de pescado para formar la emulsión. Estos niveles se tomaron como punto central en el DCC y a partir de ellos, se generaron para cada factor, los niveles altos, bajos y axiales. La concentración de proteína en la solución de ovoalbúmina y el porcentaje de aceite de pescado utilizado como fase dispersa de la emulsión, evaluados con el diseño estadístico se encontraron en el intervalo 0.83-0.97 mg/mL y 9.29-10.71%, respectivamente.

El ANOVA de la región explorada con el DCC permitió observar diferencias significativas en el ESI ($P < 0.05$) por los efectos principales lineales y cuadráticos de los dos factores evaluados, así como de la interacción entre ellos (Figura 9.29).

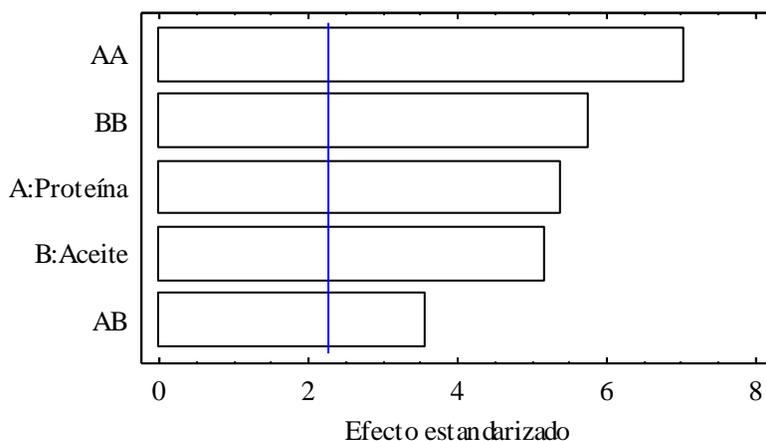


Figura 9.29. Diagrama de Pareto estandarizado de ESI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha = 5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

En este caso, tanto la concentración de ovoalbúmina, como el porcentaje de aceite de pescado utilizado para formular las emulsiones modelo, tuvieron un efecto significativo en la respuesta del ESI. Resultó interesante que la interacción entre los factores ejerciera un efecto significativo en los valores de la variable dependiente, puesto que indicó que el efecto de una de las variables independientes cambia en función al nivel de la otra (León y Montero, 2001). Por lo tanto, en las

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

emulsiones modelo formadas con solución de ovoalbúmina como emulsificante, la estabilidad de la emulsión determinada como el cambio en la absorbencia en función al tiempo (medida indirecta de la separación de que las fases), no sólo es dependiente de la concentración de proteína, sino también de la cantidad de aceite de pescado MEG-3® dispersado. Se observó que los términos cuadráticos de los dos factores investigados fueron los más significativos, lo cual indicó que participaron en la obtención de curvatura en la respuesta del ESI.

La superficie de respuesta generada a partir del ajuste de los datos experimentales obtenidos con el DCC a un modelo cuadrático, mostró que el ESI presentó un comportamiento de silla de montar o minimax, por el efecto simultáneo de los factores analizados (Figura 9.30).

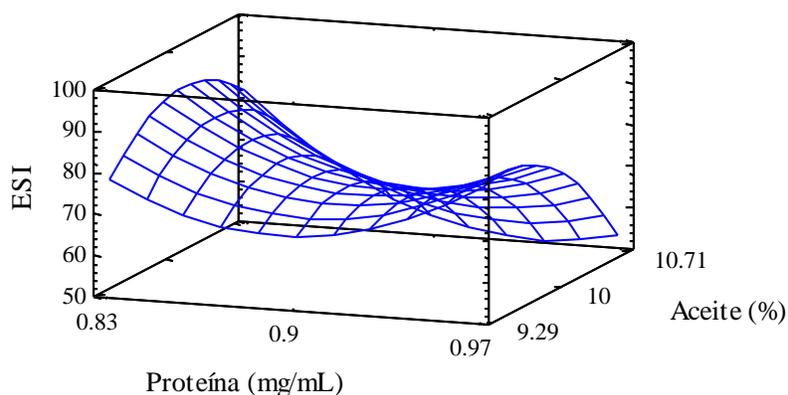


Figura 9.30. Superficie de respuesta generada a partir del DCC del índice de estabilidad de la emulsión (ESI, en min) en función de la concentración de ovoalbúmina (mg/mL) y del porcentaje de aceite MEG-3® (%).

La gráfica anterior, reveló que los valores del ESI aumentaron a medida que nos alejábamos del punto central del DCC, el cual correspondió a emulsiones preparadas con 0.9 mg/mL de ovoalbúmina y 10% de aceite de pescado. El valor experimental más alto para el ESI en el DCC fue 97 min, este valor se obtuvo al utilizar una combinación de proteína y aceite de: 0.83 mg/L y 10%, respectivamente.

El análisis de regresión del modelo de superficie de respuesta que describió el comportamiento del ESI en función a los factores analizados, permitió obtener los coeficientes de regresión estimados de las variables independientes, el R^2 y la falta de ajuste del modelo de regresión (Tabla 9.13).

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

Tabla 9.13 Valores de los coeficientes de regresión, R^2 , falta de ajuste del modelo y valores P del modelo de superficie de respuesta.

	Coeficiente de regresión	Nivel de significancia (valor P)
Constante	-1273.090	0.129
Lineal		
x_1	-3074.740	0.000
x_2	562.179	0.000
Cuadrático		
x_1^2	2579.110	0.000
x_2^2	-21.082	0.000
Interacción		
x_1x_2	-165.587	0.006
R^2	79.1	
Regresión		0.000
Falta de ajuste		0.171

El modelo obtenido por el ajuste de regresión de la ecuación cuadrática fue $ESI = -1273.09 - 3074.74x_1 + 562.179x_2 + 2579.11x_1^2 - 21.082x_2^2 - 165.587x_1x_2$, donde x_1 es la concentración de proteína en la solución de ovoalbúmina (mg/mL) y x_2 el porcentaje de aceite MEG-3® (%). El coeficiente de determinación del modelo fue $R^2 = 79.1\%$, aunque su valor no fue exactamente 80% (Turgeon et al., 1992), el resultado del coeficiente de correlación (R^2) obtenido durante el análisis, podría indicar que el ajuste del modelo es aceptable para nuestros datos experimentales. El ANOVA mostró que la falta de ajuste de los datos a un modelo cuadrático no fue significativa ($P > 0.05$). En adición, el análisis de regresión polinomial reveló que el ajuste de la ecuación de segundo orden de la superficie de respuesta para la variable dependiente ESI fue significativo ($P < 0.05$). Lo anterior nos hizo pensar que muy probablemente nos encontrábamos en la región de respuesta óptima del ESI y por lo tanto, el modelo cuadrático ajustado podía describir la respuesta de la variable dependiente ESI en función a la concentración de la solución de ovoalbúmina y al porcentaje de aceite de pescado MEG-3® utilizados en la formulación de la emulsión modelo. Para afirmar o descartar lo anterior resultó necesario validar el modelo de superficie de respuesta obtenido. Antes

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

de realizar la validación, se utilizó el modelo cuadrático para optimizar numéricamente el valor de ESI.

9.4.2.2 Optimización

El valor óptimo del ESI (91.3 min) estimado numéricamente con el modelo cuadrático ajustado y con la función de optimización de los paquetes estadísticos, se obtiene al formular emulsiones modelo con solución de ovoalbúmina en concentración 0.83 mg/mL y 10.1% de aceite de pescado MEG-3®.

9.4.2.3 Validación del modelo de superficie de respuesta

La prueba estadística *t*, utilizada para comprobar la eficiencia del modelo cuadrático ajustado en la predicción de la respuesta óptima de la variable ESI, no mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) en los valores del ESI, por comparación de los resultados obtenidos experimentalmente en las emulsiones modelo, con respecto a los predichos con la ecuación cuadrática (Tabla 9.14).

La respuesta del ESI observada y la obtenida con el ajuste del modelo cuadrático fueron muy cercanas, puesto que los residuos ($Y_0 - Y_i$) tuvieron valores bajos (Tabla 9.14). El análisis estadístico verificó la eficiencia del modelo cuadrático utilizado para predecir la respuesta del ESI en función de la concentración de la ovoalbúmina (agente emulsificante) y del porcentaje de aceite MEG-3® (fase dispersa) de la emulsión modelo control. Sin embargo, para concluir la validación del modelo cuadrático ajustado que permitió optimizar el ESI se prepararon emulsiones con la combinación de concentración de ovoalbúmina (0.83 mg/mL) y porcentaje de aceite de pescado MEG-3® (10.1%) obtenida con la ecuación de segundo orden y que maximizó la respuesta del ESI. El valor del índice de estabilidad de la emulsión obtenido experimentalmente bajo las condiciones anteriores fue 97 min, por lo que resultó ligeramente mayor al estimado matemáticamente (91.3 min). Este resultado comprobó que la ecuación cuadrática ajustada al aplicar la metodología de superficies de respuesta, es válida para optimizar el ESI, al menos bajo las condiciones de este trabajo y en las emulsiones modelo investigadas.

Los valores óptimos del ESI en las emulsiones que se prepararon con aceite de pescado MEG-3® fueron 2.85 veces más altos que los obtenidos al emplear aceite de maíz en la emulsión.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

Tabla 9.14. Comparación entre los valores experimentales y predichos obtenidos a partir del modelo final

Experimento	ESI (min) ^a		
	Y ₀	Y _i	Y ₀ -Y _i
1	66.339	71.876	-5.537
2	70.435	77.363	-6.928
3	58.635	60.261	-1.627
4	64.066	67.334	-3.268
5	81.941	78.534	3.408
6	75.315	77.024	-1.708
7	72.653	77.567	-4.913
8	91.010	86.353	4.657
9	75.661	71.876	3.785
10	76.334	71.876	4.458
11	75.069	71.876	3.193
12	61.051	55.337	5.713
13	70.376	73.040	-2.664
14	77.766	78.527	-0.761
15	59.896	61.425	-1.530
16	64.909	68.498	-3.589
17	79.698	75.041	4.657
18	80.000	78.188	1.812
19	78.657	78.731	-0.073
20	98.062	92.174	5.887
21	73.167	73.040	0.127
22	71.016	73.040	-2.025
23	77.662	73.040	4.621
24	59.846	56.501	3.345
25	73.931	71.250	2.681
26	66.555	76.737	-10.182
27	61.196	59.635	1.561
28	74.366	66.708	7.658
29	74.176	77.908	-3.732
30	82.097	76.398	5.699
31	71.455	76.941	-5.485
32	98.615	90.384	8.231
33	72.163	71.250	0.912
34	67.130	71.250	-4.120
35	65.820	71.250	-5.430
36	56.919	54.711	2.208

Y₀= valor experimental.

Y_i= valor predicho.

Y₀-Y_i= residuo

^a No existieron diferencias significativas (P>0.05) entre el valor experimental (Y₀) y el predicho (Y_i).

9.5 Optimización de EAI y ESI en emulsiones modelo: ovoalbúmina-aceite de maíz

Además de observar las diferencias en los valores de EAI y ESI por el tipo de proteína utilizada como emulsificante, resultó interesante analizar el comportamiento de estos índices en función a la naturaleza del aceite empleado como fase dispersa de la emulsión modelo o/w, puesto que como se ha demostrado en los puntos anteriores, la concentración de aceite y su perfil de ácidos grasos interviene en la forma e intensidad en la que el aceite interactúa (evaluadas indirectamente con ambos índices) con las moléculas de proteína al formarse los glóbulos de la emulsión. Los resultados obtenidos en este punto nos permitieron concluir con la optimización por superficies de respuesta de las variables dependientes EAI y ESI en los cuatro modelos de emulsiones bajo investigación.

9.5.1 EAI

9.5.1.1 Análisis de superficies de respuesta

El ANOVA de un diseño factorial 3^2 para evaluar la influencia de la concentración de proteína en la solución de ovoalbúmina (1, 4.5, 8 mg/mL) y el porcentaje de aceite de maíz (15, 20, 25%) en el EAI de las emulsiones modelo investigadas, permitió observar diferencias significativas ($P < 0.05$) en la variable dependiente EAI por el efecto lineal principal de los dos factores evaluados (A y B), por su interacción (AB) y por el término cuadrático de la concentración de proteína presente en la solución de ovoalbúmina grado II (AA) (Figura 9.31).

El efecto más significativo en los valores del EAI de las emulsiones modelo analizadas fue la concentración de ovoalbúmina en la fase continua del sistema, lo cual era de esperarse, puesto que el EAI brinda información acerca de la capacidad que presenta una proteína para generar una interfase y formar glóbulos de aceite en emulsiones o/w. Valores altos de EAI indican que las proteínas empleadas como emulsificantes presentan propiedades de superficie importantes.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

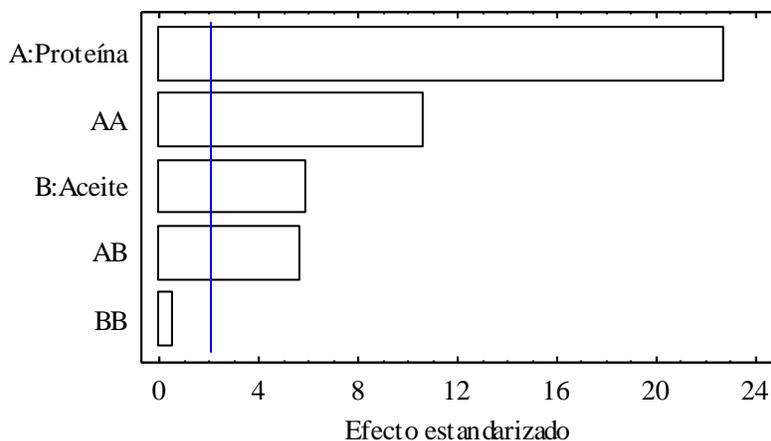


Figura 9.31. Diagrama de Pareto estandarizado de EAI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha=5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

Los efectos significativos del cuadrado de la concentración de proteína (AA) y de la interacción proteína*aceite (AB), nos indicaron que era posible ajustar un modelo de segundo orden para explicar el comportamiento del EAI en función a la concentración de ovoalbúmina y porcentaje de aceite de maíz utilizados para formar la emulsión modelo, con ayuda de una superficie de respuesta. La gráfica tridimensional del EAI generada a partir de los datos experimentales obtenidos con el diseño factorial, permitió identificar una región de exploración para optimizar la variable dependiente EAI, la cual se eligió porque mostró los valores más altos del EAI en las emulsiones analizadas y se localizó en la zona correspondiente a una concentración de proteína de 1 mg/mL y un porcentaje de aceite de maíz de 25% (Figura 9.32).

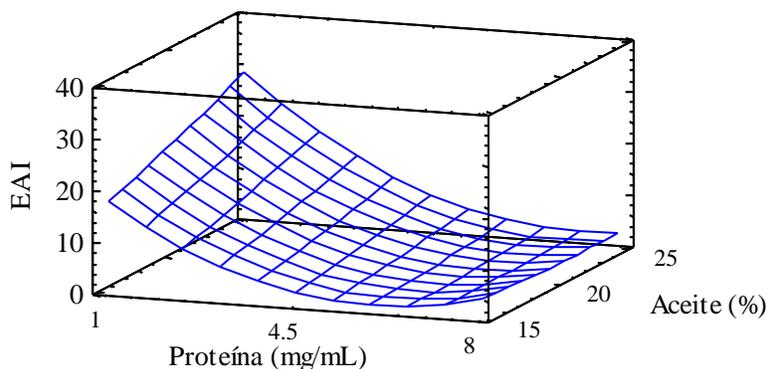


Figura 9.32. Superficie de respuesta generada a partir del diseño factorial 3^2 del índice de actividad de la emulsión (EAI, en m^2/g) en función de la concentración ovoalbúmina (mg/mL) y del porcentaje de aceite de maíz (%).

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

Se utilizó un DCC rotatable para explorar la región del factorial 3^2 que mostró un aumento en el valor del EAI en las emulsiones analizadas por el efecto simultáneo de los factores evaluados. Los niveles de la concentración de ovoalbúmina y el porcentaje de aceite de maíz utilizado como fase dispersa de la emulsión, evaluados con ayuda del diseño estadístico se encontraron en el intervalo: 0.72-1.28 mg/mL y 17.93-32.07%, respectivamente.

En la Figura 9.33 se aprecia el ANOVA del DCC, los efectos más significativos ($P < 0.05$) en la respuesta del EAI fueron en orden descendente: el término lineal principal de la concentración de ovoalbúmina (A), del porcentaje de aceite de maíz (B) y el cuadrado de la concentración de proteína (AA).

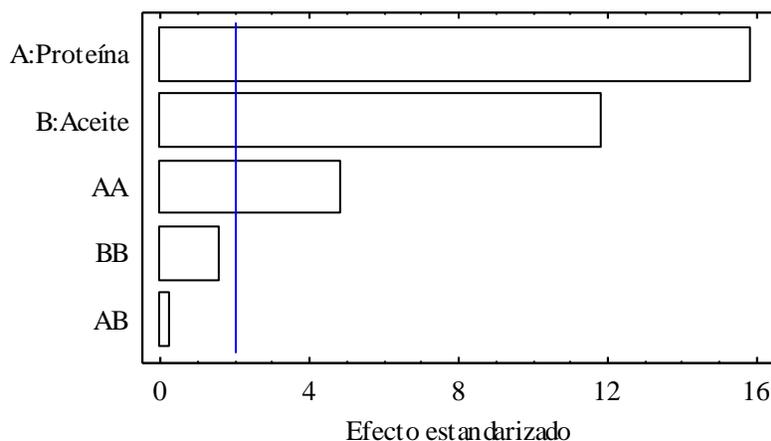


Figura 9.33. Diagrama de Pareto estandarizado de EAI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha = 5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

Se observó que las diferencias significativas en el EAI de las emulsiones modelo control ovoalbúmina-aceite de maíz obtenidos con el DCC, fueron provocadas principalmente por los efectos de la concentración de proteína emulsificante y del porcentaje de aceite de maíz empleados para formar las emulsiones modelo. En contraste, en el caso de las emulsiones modelo cárnicas preparadas con extracto miofibrilar como emulsificante el ANOVA del DCC para optimizar el EAI mostró que, si bien el porcentaje de aceite de maíz utilizado como fase dispersa de la emulsión tuvo un efecto significativo en la respuesta de la variable dependiente EAI, fueron el término lineal y cuadrático de la concentración de proteína en el extracto miofibrilar, los que presentaron el efecto más fuerte en los valores del EAI. El extracto miofibrilar es una solución que contiene más de siete

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

proteínas con pesos moleculares en el intervalo 16-200 kDa, mientras que la solución de ovoalbúmina grado II, empleada como emulsificante control, estuvo compuesta principalmente por dicha proteína, aún cuando se detectaron trazas de posible ovotransferrina. Por lo tanto, en las emulsiones modelo o/w simples preparadas con aceite de maíz como fase dispersa, entre más compleja y heterogénea sea la composición de la solución proteica empleada para formar la emulsión modelo, la respuesta del EAI se verá influenciada de manera más significativa por la concentración de proteína utilizada como emulsificante.

La superficie de respuesta generada a partir del ajuste de los datos experimentales del DCC reveló que el comportamiento del EAI en función de las dos variables independientes analizadas fue del tipo loma descendente. Se observó que la concentración de ovoalbúmina tuvo un efecto negativo en los valores del EAI, mientras que el porcentaje de aceite de maíz y el término cuadrático de la concentración de ovoalbúmina tuvieron un efecto positivo, es decir, a medida que la concentración de proteína en la solución de ovoalbúmina aumentaba, la respuesta del EAI disminuía, por el contrario al utilizar una mayor cantidad de aceite de maíz como fase dispersa de la emulsión, el EAI mostraba un valor mayor. Además, el cuadrado de la concentración de proteína contribuyó positivamente en la curvatura de la respuesta del EAI (Figura 9.34).

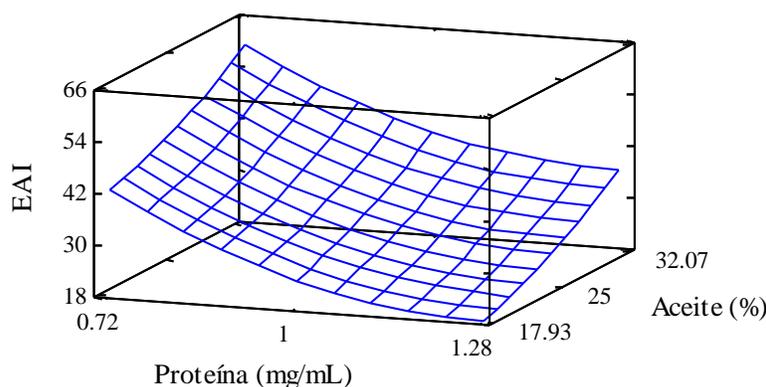


Figura 9.34. Superficie de respuesta generada a partir del DCC del índice de actividad de la emulsión (EAI, en m^2/g) en función de la concentración de ovoalbúmina (mg/mL) y del porcentaje de aceite de maíz (%).

El valor más alto para el EAI determinado experimentalmente con el DCC fue 51.3 min, este valor se obtuvo al utilizar una combinación de proteína y aceite de: 0.72 mg/L y 25%, respectivamente.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

De la misma manera que en el caso de las emulsiones modelo cárnicas, los resultados obtenidos en las emulsiones modelo control preparadas con ovoalbúmina como emulsificante, mostraron que sin importar el tipo de aceite utilizado como fase dispersa de la emulsión (MEG-3® o maíz), las superficies de respuesta del EAI presentaron el mismo patrón de comportamiento.

En la Tabla 9.15 se muestran los coeficientes de regresión estimados de las variables independientes, el R^2 , la falta de ajuste del modelo reducido y sus valores P, los cuales se obtuvieron mediante un ajuste de regresión de la ecuación cuadrática con la cual se generó la superficie de respuesta, seguido de un ANOVA.

Tabla 9.15 Valores de los coeficientes de regresión, R^2 , falta de ajuste del modelo y valores p del modelo de superficie de respuesta.

Variable independiente	Coefficiente de regresión	Nivel de significancia (valor p)
Constante	110.834	0.000
Lineal		
x_1	-177.737	0.000
x_2	1.265	0.000
Cuadrático		
x_1^2	67.763	0.000
R^2	92.7	
Regresión		0.000
Falta de ajuste		0.224

El modelo cuadrático reducido para explicar el EAI, construido a partir de los efectos significativos ($P < 0.05$) de las variables independientes evaluadas fue $EAI = 110.834 - 177.737x_1 + 1.265x_2 + 67.763x_1^2$ ($R^2 = 92.7\%$), donde x_1 es la concentración de proteína en la solución de ovoalbúmina (mg/mL) y x_2 el porcentaje de aceite de maíz (%). El coeficiente de determinación de la ecuación cuadrática anterior fue satisfactorio ($R^2 > 80\%$). Asimismo, el análisis de regresión del modelo reducido fue significativo ($P < 0.05$) y no se presentó falta de ajuste ($P > 0.05$).

9.5.1.2 Optimización

El EAI óptimo con un valor de 58.8 m²/g, se consiguió al formular emulsiones modelo con una combinación de solución de ovoalbúmina y aceite de maíz en concentraciones: 0.72 mg/mL y 32.07%, respectivamente. Los datos anteriores, se obtuvieron con ayuda del modelo cuadrático reducido y la función de optimización de los paquetes estadísticos.

9.5.1.3 Validación del modelo de superficie de respuesta reducido

La prueba estadística *t* no mostró diferencias significativas ($P>0.05$) entre los valores del EAI determinados experimentalmente y los estimados con el modelo cuadrático reducido (Tabla 9.16). Los residuos expresados como la diferencia entre el valor observado (experimental) y el predicho (estimado) fueron bajos. Esto indicó que ambos valores eran cercanos y permitió verificar la eficiencia del modelo matemático utilizado para predecir la respuesta del EAI en función de la concentración de ovoalbúmina y del porcentaje de aceite de maíz empleados para formular las emulsiones modelo.

Se prepararon emulsiones modelo control utilizando la combinación de concentración de proteína en la solución de ovoalbúmina (0.72 mg/mL) y contenido de aceite de maíz (32.07%), que permitió obtener el valor óptimo del EAI con el modelo cuadrático reducido. Las determinaciones experimentales mostraron que el valor del EAI en las emulsiones fue 59.4 m²/g, mientras que el EAI predicho matemáticamente fue 58.8 m²/g. Al comparar los valores del EAI, no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$), puesto que las respuestas obtenidas fueron similares. Lo anterior confirmó que la ecuación de regresión ajustada fue adecuada y por lo tanto resulta válida para optimizar el EAI en las emulsiones modelo control: ovoalbúmina-aceite de maíz.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

Tabla 9.16. Comparación entre los valores experimentales y predichos obtenidos a partir del modelo reducido final

Experimento	EAI (m ² /g) ^a		
	Y ₀	Y _i	Y ₀ -Y _i
1	52.117	49.835	2.282
2	21.557	20.421	1.136
3	26.529	23.533	2.996
4	30.326	32.475	-2.149
5	29.036	32.475	-3.439
6	36.404	33.067	3.337
7	26.936	32.475	-5.539
8	40.826	41.418	-0.592
9	30.774	32.475	-1.701
10	38.561	37.305	1.256
11	24.880	25.957	-1.078
12	47.656	49.951	-2.295
13	51.612	49.835	1.777
14	19.197	20.421	-1.224
15	24.357	23.533	0.824
16	37.579	32.475	5.104
17	34.121	32.475	1.646
18	32.121	33.067	-0.945
19	29.128	32.475	-3.347
20	44.603	41.418	3.185
21	29.804	32.475	-2.671
22	31.925	37.305	-5.380
23	24.363	25.957	-1.595
24	48.388	49.951	-1.563
25	50.071	49.835	0.235
26	20.233	20.421	-0.188
27	26.916	23.533	3.383
28	30.873	32.475	-1.603
29	36.823	32.475	4.348
30	33.849	33.067	0.782
31	31.100	32.475	-1.376
32	42.704	41.418	1.287
33	33.980	32.475	1.505
34	37.496	37.305	0.191
35	26.196	25.957	0.239
36	51.127	49.951	1.176

Y₀= valor experimental.

Y_i= valor predicho.

Y₀-Y_i= residuo

^a No existieron diferencias significativas (P>0.05) entre el valor experimental (Y₀) y el predicho (Y_i).

9.5.2 ESI

9.5.2.1 Análisis de superficies de respuesta

Al igual que en el caso del EAI, la región de respuesta óptima del ESI en la emulsión modelo bajo análisis era desconocida, por lo tanto, se generaron diseños factoriales 3^2 para observar si se presentaba curvatura en la variable dependiente ESI, por el efecto combinado de la concentración de ovoalbúmina (1, 4.5, 8 mg/mL) y del porcentaje de aceite de maíz (15, 20, 25%) utilizados para preparar las emulsiones modelo. El ANOVA del diseño factorial permitió obtener diferencias significativas en la respuesta del ESI ($P < 0.05$) por el efecto lineal principal del porcentaje de aceite de maíz (B) y de la interacción entre los dos factores (AB) (Figura 9.35).

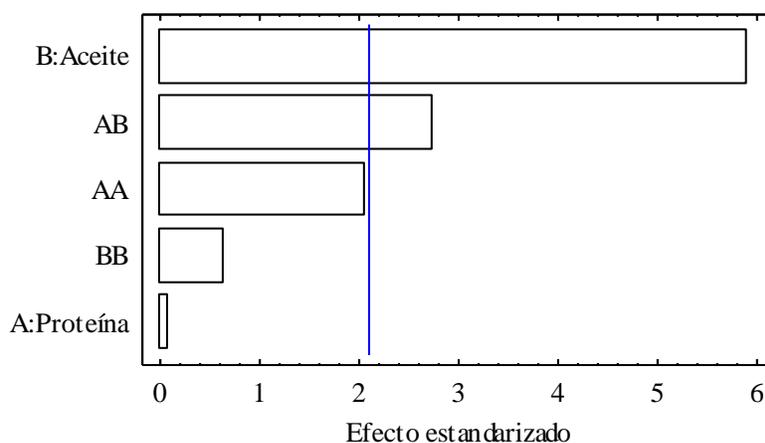


Figura 9.35. Diagrama de Pareto estandarizado de ESI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha = 5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

El efecto más significativo en el ESI de las emulsiones modelo investigadas fue el porcentaje de aceite de maíz utilizado como fase dispersa, en contraste el término lineal principal de la concentración de ovoalbúmina en el intervalo 1-8 mg/mL, no permitió observar diferencias significativas en el tiempo que las emulsiones se mantenían estables. Sin embargo la interacción significativa de los valores reveló que al aumentar el porcentaje de aceite de maíz, la concentración de ovoalbúmina empleada como emulsificante no era capaz de evitar que la emulsión comenzara a perder estabilidad y por tanto, el ESI disminuía. Aun cuando los valores del ESI fueron significativamente diferentes por el efecto de la interacción entre los factores, la ausencia de

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

términos cuadráticos significativos (AA o BB) indicó que el ESI en los niveles explorados con el diseño factorial, no podía optimizarse utilizando un modelo de superficie de respuesta de segundo orden. El análisis de la gráfica tridimensional construida a partir de los datos experimentales del ESI obtenidos con el diseño factorial 3^2 , nos permitió observar el comportamiento del ESI en función a las dos variables independientes investigadas e identificar los niveles de cada variable, con los cuales aumentaba la respuesta del ESI. En este caso, los valores más altos para el ESI en la emulsión modelo se consiguieron al utilizar ovoalbúmina en concentración 1 mg/mL y 15 % de aceite de maíz (Figura 9.36).

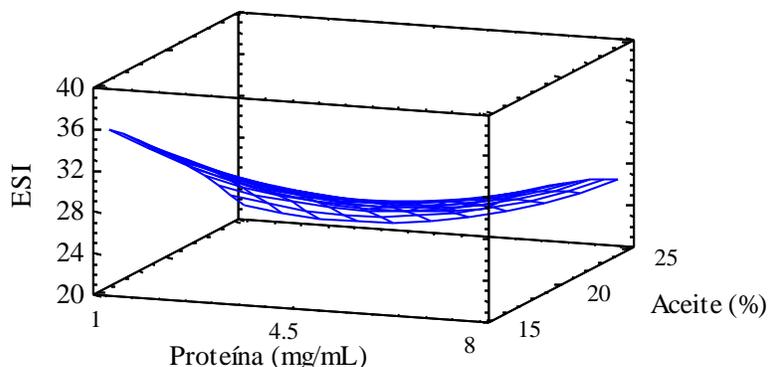


Figura 9.36. Superficie de respuesta generada a partir del diseño factorial 3^2 del índice de estabilidad de la emulsión (ESI, en min) en función de la concentración de ovoalbúmina (mg/mL) y del porcentaje de aceite de maíz (%).

Los niveles de los factores mencionados anteriormente, se tomaron como punto de partida para generar un nuevo diseño factorial 3^2 completo, el cual permitió explorar la zona en la que el ESI fue mayor e identificar si se presentaban diferencias significativas en la variable respuesta ESI por el efecto cuadrático de al menos uno de los factores evaluados. Lo anterior resultaba necesario para continuar con la optimización de la variable dependiente ESI por MSR.

Los niveles de la concentración de proteína en la solución de ovoalbúmina y del porcentaje de aceite de maíz analizados en el segundo diseño factorial a partir del cual se prepararon las emulsiones modelo fueron: 0.5, 1, 1.5 mg/mL, y 10, 15, 20%, respectivamente. La representación gráfica del ANOVA del segundo diseño factorial permitió observar diferencias significativas ($P < 0.05$) en la respuesta del ESI por el efecto del término lineal principal (B) y cuadrático (BB) del porcentaje de aceite de maíz, y por la interacción entre los dos factores evaluados (AB) (Figura

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

9.37). Aunque el efecto lineal de la concentración de proteína aumentó, no fue significativo ($P>0.05$).

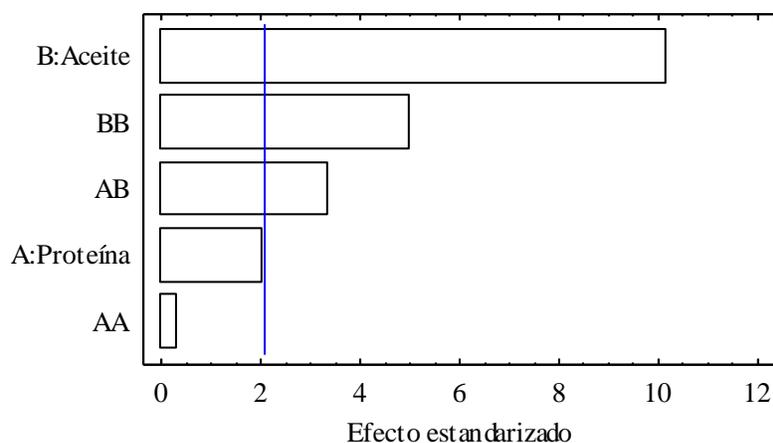


Figura 9.37. Diagrama de Pareto estandarizado de ESI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha=5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

Nuevamente se observó que el porcentaje de aceite de maíz utilizado como fase dispersa de la emulsión fue la variable independiente que tuvo el efecto más significativo en el ESI. Esto pudo apreciarse de manera más clara en la gráfica tridimensional generada a partir de los datos experimentales obtenidos con el diseño factorial, puesto que al aumentar el porcentaje de aceite de maíz utilizado para formar los glóbulos de la emulsión, el ESI disminuía sin importar la concentración de proteína en la solución de ovoalbúmina (Figura 9.38). Las emulsiones modelo que mostraron el ESI más alto fueron las preparadas con solución de ovoalbúmina 1.5 mg/mL y 10% de aceite de maíz.

Considerando que el término cuadrático del porcentaje de aceite de maíz (BB) y la interacción de los factores (AB) tuvieron un efecto significativo en la respuesta del ESI, decidimos continuar con la MSR mediante la aplicación de un DCC para optimizar el índice de estabilidad en las emulsiones investigadas. El DCC se generó tomando como punto central la combinación de los dos factores evaluados que permitió obtener el valor más alto del ESI en el segundo diseño factorial. Los niveles de la concentración de proteína y del porcentaje de aceite evaluados en el DCC se encontraron en el intervalo 1.22-1.78 mg/mL y 9.29-10.71%, respectivamente.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

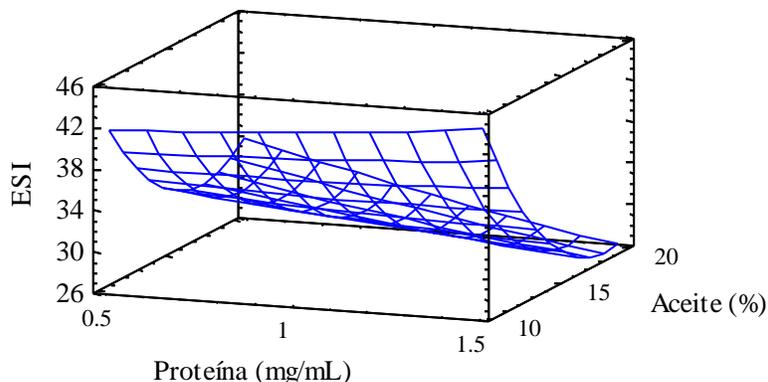


Figura 9.38. Superficie de respuesta generada a partir del segundo diseño factorial 3^2 del índice de estabilidad de la emulsión (ESI, en min) en función de la concentración de ovoalbúmina (mg/mL) y del porcentaje de aceite de maíz (%).

En la figura 9.39 se muestra el diagrama de Pareto que representa de manera gráfica el ANOVA del DCC. Los términos que ejercieron un efecto significativo ($P < 0.05$) en el ESI fueron el cuadrado del porcentaje de aceite de maíz (BB) y la interacción entre la concentración de ovoalbúmina y el porcentaje de aceite (AB) utilizados para formar la emulsión modelo control.

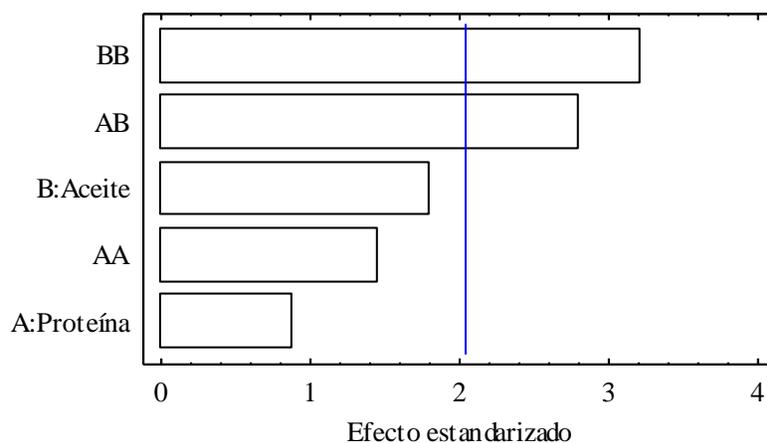


Figura 9.39. Diagrama de Pareto estandarizado de ESI. La línea vertical indica el nivel de significancia con $\alpha = 5\%$. Los términos que rebasan la línea son significativos.

Los niveles de los factores explorados en el DCC no permitieron obtener diferencias significativas ($P > 0.05$) en el ESI por efecto de los términos lineales principales de la concentración de ovoalbúmina (A) y del porcentaje de aceite (B), lo cual resultó particular, puesto que al hacer uso

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

del diseño central compuesto (DCC) además de obtener un efecto cuadrático significativo de alguno de los factores bajo análisis en la respuesta del ESI, se esperaba también aumentar la significancia de los términos principales lineales y de interacción, sobre todo teniendo en cuenta que el ANOVA del segundo diseño factorial 3^2 aplicado previamente, permitió observar diferencias significativas ($P < 0.05$) en la respuesta del ESI por el efecto del término lineal principal del porcentaje de aceite de maíz (B), e incluso la concentración de ovoalbúmina estuvo muy cerca de ser significativa, puesto que el valor P sólo fue ligeramente mayor a 0.05 ($P = 0.058$).

El ajuste de los datos experimentales del ESI obtenidos con el DCC a un modelo de segundo orden para generar una superficie de respuesta que permitiera estimar los valores óptimos de concentración de ovoalbúmina y porcentaje de aceite de maíz con los que se obtendría el ESI máximo en las emulsiones modelo se muestra en la figura 9.40.

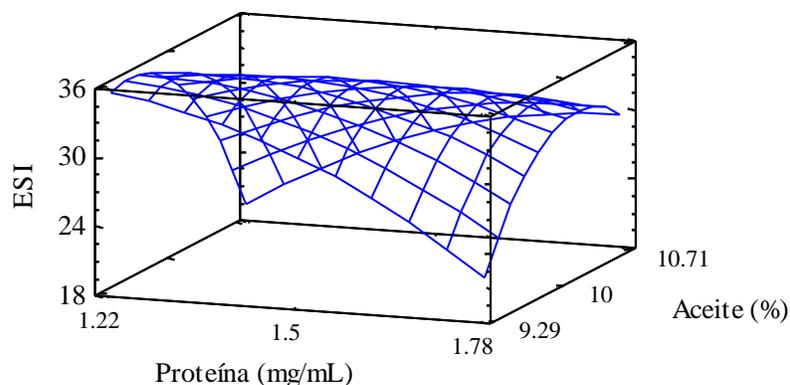


Figura 9.40. Superficie de respuesta generada a partir del DCC del índice de estabilidad de la emulsión (ESI, en min) en función de la concentración de ovoalbúmina (mg/mL) y del porcentaje de aceite de maíz (%).

El modelo cuadrático de superficie de respuesta del ESI en función de la concentración de ovoalbúmina y del porcentaje de aceite de maíz utilizados para preparar las emulsiones, mostró un coeficiente de determinación muy bajo ($R^2 = 45.25\%$), en adición el R^2 ajustado fue 36.11%. Aún cuando la gráfica de la superficie (Figura 9.40) presentó curvatura por los efectos significativos de la interacción entre los factores y el término cuadrático del porcentaje de aceite de maíz utilizado como fase dispersa de las emulsiones, el valor del R^2 ajustado indicó que sólo el 36.11% de los datos experimentales del ESI se ajustaba al modelo de segundo orden empleado para generar la superficie de respuesta. Estos resultados indicaron que la optimización del ESI en las emulsiones

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

modelo ovoalbúmina-aceite de maíz, no podría realizarse haciendo uso de la ecuación cuadrática obtenida del ajuste de los resultados a una superficie de respuesta. Por lo tanto, una vez que se estableció que la concentración de proteína no tuvo un efecto significativo en la variable dependiente ESI en ninguno de los diseños estadísticos reportados anteriormente, se decidió fijar la concentración de la solución de ovoalbúmina en 1.5 mg/mL y sólo evaluar el efecto del porcentaje de aceite de maíz en el índice de estabilidad de la emulsión (ESI).

9.5.2.2 Optimización y validación de un modelo lineal

En la Figura 9.41 se observa un modelo de ajuste de regresión de tipo $Y = a + bX$, que relacionó el porcentaje de aceite de maíz (%) utilizado como fase dispersa de la emulsión, con la variable respuesta ESI. Los porcentajes de aceite evaluados se encontraron en el intervalo 9-18% y las emulsiones modelo control o/w, se prepararon utilizando como fase continua solución de ovoalbúmina.

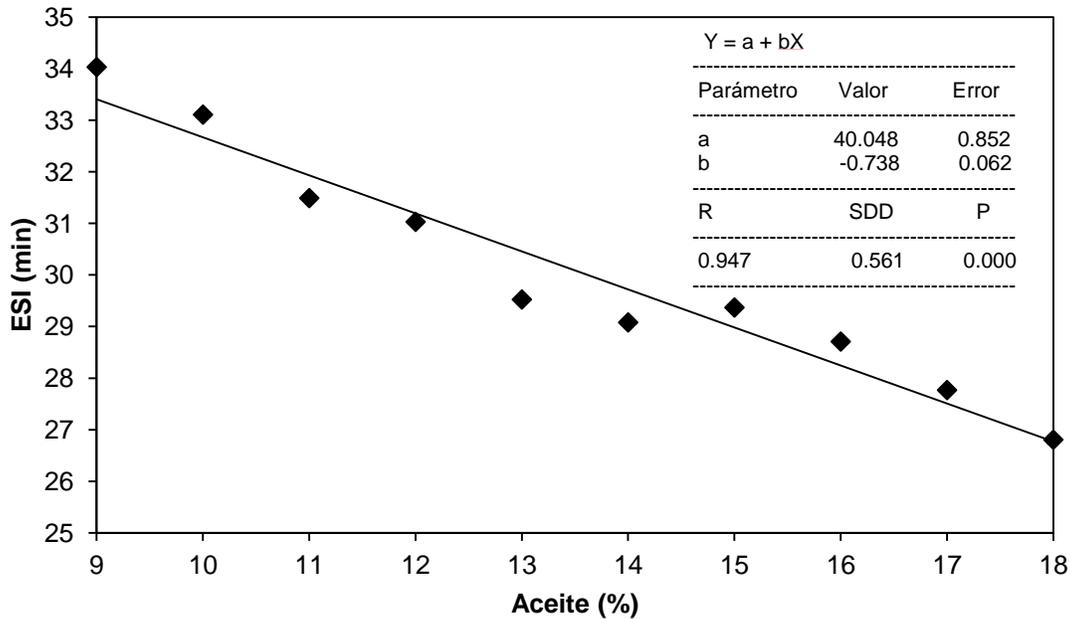


Figura 9.41. Relación entre el porcentaje de aceite de maíz (%) y el ESI en emulsiones modelo control preparadas utilizando solución de ovoalbúmina (1.5 mg/mL) como emulsificante.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

El análisis estadístico mostró una correlación alta ($R= 0.947$) entre el porcentaje de aceite de maíz utilizado en la emulsión y el ESI. El valor P del ajuste de regresión ($P= 0.000$) reveló que el modelo ajustado fue significativo y por lo tanto era capaz de describir la respuesta del ESI en función al porcentaje de aceite de maíz utilizado en la formulación de la emulsión modelo. Este análisis mostró que en la emulsión control o/w preparada con ovoalbúmina y aceite de maíz, el ESI es dependiente del porcentaje de aceite y se ajusta mejor a un modelo lineal que a uno cuadrático. El valor más alto para el ESI (34 min) se obtuvo al preparar emulsiones con contenido de aceite de maíz de 9% y solución de ovoalbúmina en concentración 1.5 mg/mL. Este valor es ligeramente mayor al predicho con el modelo lineal ($ESI= 33.4$ min), lo cual resultó satisfactorio.

En la Tabla 9.17 se muestra un resumen de la optimización por superficies de respuesta de los índices de actividad (EAI) y estabilidad (ESI) de las emulsiones modelo investigadas.

Tabla 9.17. Combinaciones de concentración de proteína emulsificante y porcentaje de aceite como fase dispersa que optimizan la respuesta del EAI en emulsiones modelo o/w.

Emulsión modelo	Proteína (mg/mL)	Aceite (%)	EAI estimado ^a (m ² /g)	EAI observado ^a (m ² /g)
Extracto miofibrilar-aceite MEG-3®	1.38	27.07	25.0	26.3
Extracto miofibrilar-aceite de maíz	0.19	27.07	73.8	76.1
Ovoalbúmina-aceite MEG-3®	0.72	32.07	83.5	85.2
Ovoalbúmina-aceite de maíz	0.72	32.07	58.8	59.4

^a No existieron diferencias significativas ($P>0.05$) entre el valor óptimo predicho con el modelo y el observado experimentalmente.

Las emulsiones modelo cárnicas formuladas con extracto proteico miofibrilar como emulsificante, requirieron de 27.07% de aceite de pescado MEG-3® o aceite de maíz para obtener el valor óptimo del EAI. Sin embargo se observó que el EAI fue mayor en las emulsiones modelo cárnicas preparadas con aceite de maíz como fase dispersa ($EAI= 76.1$ m²/g), incluso utilizando una menor concentración de proteína miofibrilar en el extracto emulsificante en comparación con las formuladas con aceite MEG-3® ($EAI= 26.3$ m²/g). La concentración de NaCl 0.6 M en el amortiguador con el que se extrajeron las proteínas miofibrilares utilizadas como emulsificante para preparar las emulsiones modelo pudo provocar que el EAI fuera menor en las emulsiones en las que

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

se utilizó aceite MEG-3® como fase dispersa. Zhang et al. (2009) concluyeron que el NaCl jugó un papel importante en las propiedades de la emulsión mediante dos mecanismos, en primer lugar el NaCl reduce la repulsión electrostática, en segundo lugar los niveles altos de sal alteran las interacciones hidrofóbicas entre los grupos no polares, esto podría explicar por qué el EAI resultó más bajo en las emulsiones preparadas con aceite de pescado. Por otro lado, los resultados del EAI en las emulsiones preparadas con aceite de maíz indicaron que dicho aceite se dispersó más rápido y con mayor facilidad en las emulsiones preparadas con el extracto miofibrilar, por lo tanto el área formada por gramo de proteína para cubrir los glóbulos de aceite de maíz y generar la interfase fue mayor. Dagorn-Scaviner et al. (1987) reportaron que el EAI estima la habilidad y en cierta medida la rapidez de una proteína para dispersar el aceite y formar el recubrimiento del área interfacial para evitar la coalescencia inmediata de los glóbulos de la emulsión.

Feng y Xiong (2002) obtuvieron valores de $EAI = 8.81 \text{ m}^2/\text{g}$ en emulsiones formuladas a pH 6 con extracto miofibrilar de carne de cerdo solubilizado en NaCl 0.6 M y aceite de maíz en concentraciones: 10 mg/mL y 20%, respectivamente. Por otro lado, en emulsiones preparadas a pH 7.5 con 25% de aceite de maíz y proteínas miofibrilares en concentración 3 mg/mL extraídas de carpa con NaCl 0.5 M, se observó un $EAI = 1.53 \text{ m}^2/\text{g}$ (Sato et al., 2003). Al comparar los resultados del EAI de estos autores con los obtenidos en nuestra investigación, en la que el extracto miofibrilar del músculo *Longissimus dorsi* de carne de cerdo se obtuvo con amortiguador de fosfatos y NaCl 0.6 M a pH 7, observamos que la optimización por superficies de respuesta nos permitió conseguir valores de EAI más altos al utilizar aceite de maíz o aceite de pescado MEG-3® por separado como fase dispersa de la emulsión, además requerimos de una menor concentración de proteína miofibrilar emulsificante en el extracto para maximizar el EAI.

En el caso de las emulsiones control, preparadas con solución de ovoalbúmina como emulsificante, se observó que sin importar la naturaleza del aceite utilizado como fase dispersa de la emulsión modelo el EAI óptimo se consiguió con la misma combinación de concentración de proteína y porcentaje de aceite: 0.72 mg/mL y 32.07%, respectivamente. No obstante, el EAI ($85.2 \text{ m}^2/\text{g}$) fue mayor al emplear aceite de pescado MEG-3®, esto podría indicar que la ovoalbúmina parcialmente desnaturalizada por el proceso de homogenización durante la formación de la emulsión expone residuos que interactúan de manera más favorable con los ácidos grasos presentes en el aceite MEG-3® incluyendo a los polinsaturados de cadena larga EPA y DHA, lo cual le permite cubrir de manera más eficiente la interfase de los glóbulos de aceite.

El trabajo previo desarrollado por Mine et al. (1991) mostró que en emulsiones modelo preparadas con ovoalbúmina como emulsificante y aceite de soya como fase dispersa, el EAI fue de apenas

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

0.142 m²/g, al emplear una concentración de proteína de 0.1% y un contenido de aceite de 25% (combinación cercana a la obtenida por optimización en nuestra investigación). El valor más alto conseguido por estos autores fue EAI= 1.1 m²/g en emulsiones formuladas con 5% de proteína y 50% de aceite de maíz, dicho resultado fue mucho más bajo en comparación con el obtenido en la presente investigación (EAI= 58.8 m²/g).

Las diferentes combinaciones de concentración de proteína y porcentaje de aceite requeridas para optimizar el EAI en las emulsiones modelo cárnicas y control por medio de la metodología de superficies de respuesta, estuvieron relacionadas con la naturaleza distinta del aceite utilizado como fase dispersa y con las diferencias en las propiedades moleculares de las proteínas empleadas como emulsificantes para formar las emulsiones modelo. Por un lado, el extracto miofibrilar con el que se prepararon las emulsiones modelo cárnicas es una mezcla de proteínas en solución con pesos moleculares en el intervalo 16-200 kDa, mientras que la solución de ovoalbúmina grado II aunque tiene trazas de posible ovotransferrina (~87 kDa), está compuesta prácticamente en su totalidad por ovoalbúmina, la cual presenta un peso molecular de 45 kDa. Damoradan (1997) mencionó que las proteínas o péptidos al presentar distintas propiedades moleculares muestran diferencias importantes en las cinéticas de adsorción en la interfase aceite-agua, puesto que durante el proceso de emulsificación la adsorción competitiva y el desplazamiento de una proteína por otra pueden ocurrir dependiendo de la naturaleza de la proteína y del ambiente. Por lo tanto, cuando se utiliza una mezcla de proteínas como emulsificante el contenido de proteína en la interfase no refleja exactamente la cantidad de proteína presente en la solución, más bien las proteínas tienden a optimizar la composición de la película de la interfase hasta lograr la mejor estabilidad dinámica térmica (Bos y van Vliet, 2001).

En las Tabla 9.18 se muestra un resumen de los índices de estabilidad de la emulsión (ESI) óptimos de las emulsiones modelo analizadas, obtenidos aplicando la metodología de superficies de respuesta.

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

Tabla 9.18. Combinaciones de concentración de proteína emulsificante y porcentaje de aceite como fase dispersa que optimizan la respuesta del ESI en emulsiones modelo o/w.

Emulsión modelo	Proteína (mg/mL)	Aceite (%)	ESI estimado ^a (min)	ESI observado ^a (min)
Extracto miofibrilar-aceite MEG-3®	10.7	9.3	129.6	128.0
Extracto miofibrilar-aceite de maíz	10.4	9.3	63.3	64.5
Ovoalbúmina-aceite MEG-3®	0.8	10.1	91.3	97.0
Ovoalbúmina-aceite de maíz	1.5	9.0	33.4	34.0

^a No existieron diferencias significativas ($P>0.05$) entre el valor óptimo predicho con el modelo y el observado experimentalmente.

En comparación con los resultados obtenidos para optimizar el EAI en las emulsiones modelo, se observó que para conseguir los ESI óptimos y retrasar el tiempo de separación de las fases de la emulsión, fue necesario utilizar una mayor concentración de proteína miofibrilar u ovoalbúmina y una menor cantidad de aceite de pescado MEG-3® o maíz para formular las emulsiones modelo cárnicas y control, respectivamente. Posiblemente al aumentar la concentración de proteína emulsificante en las emulsiones modelo, se logró que las proteínas se extendieran por la interfase aceite-agua y se orientaran favorablemente en el área interfacial no cubierta, lo cual pudo haber facilitado la formación de la película de proteína alrededor de los glóbulos de aceite, aumentando así la estabilidad de la emulsión.

En las emulsiones modelo cárnicas preparadas con extracto de proteínas miofibrilares como emulsificante, se detectó que sin importar el aceite utilizado como fase dispersa de la emulsión modelo (MEG-3® o maíz), el ESI óptimo se consiguió prácticamente con la misma combinación de concentración de proteína y porcentaje de aceite: 10.4-10.7 mg/mL y 9.3%, respectivamente. Sin embargo, el ESI fue mayor al emplear aceite de pescado MEG-3® (128 min) en comparación con las emulsiones preparadas con aceite de maíz como fase dispersa (ESI= 64.5 min). Si bien, el EAI óptimo fue mayor en las emulsiones cárnicas preparadas con aceite de maíz, se ha observado que las proteínas que presentan una actividad de superficie alta con un determinado aceite y por tanto una habilidad emulsificante mayor, no siempre producen emulsiones más estables (Qi et al., 1997). Investigaciones previas en emulsiones preparadas con aislado de proteína de soya y aceite de soya, sugieren que aun cuando el aislado de proteína de soya no forma inmediatamente la emulsión (valor del EAI bajo), la estabilidad del sistema después de su formación es relativamente alta (ESI mayor)

Optimización de los índices (EAI) y (ESI) de emulsiones modelo aplicando la metodología de superficies de respuesta

puesto que la obtención de una película de proteína estable formada en la interfase de la emulsión es dependiente de las interacciones de las proteínas en las fase oleosa y acuosa (Onsaard et al., 2010).

Los resultados de la optimización del ESI indicaron que posiblemente las interacciones entre las proteínas miofibrilares presentes en el extracto y los ácidos grasos del aceite de pescado MEG-3® fueron más intensas, lo cual provocó que la emulsión modelo tardara más tiempo en separarse. Las interacciones interfaciales de las proteínas incluyen puentes de hidrógeno, asociaciones hidrofóbicas y electrostáticas, las cuales varían fuertemente en función al ambiente (Bos y van Vliet, 2001) en el que se producen.

Sato et al. (2003) reportaron un ESI cercano a los 45 min, en emulsiones preparadas a pH 7.5 con 25% de aceite de maíz y proteínas miofibrilares (3 mg/mL) extraídas de carpa con NaCl 0.5 M. Comparado con nuestros resultados, el ESI óptimo (64.5 min) en la emulsión modelo cárnica formulada con proteínas miofibrilares de carne de cerdo y aceite de maíz fue 43% mayor.

En el caso de las emulsiones control, preparadas con solución de ovoalbúmina como emulsificante, se observó que incluso concentraciones bajas de proteína permitieron obtener emulsiones con índices de estabilidad de la emulsión (ESI) de más de 30 minutos. Los porcentajes de aceite de pescado MEG-3® (10.1%) o bien, aceite de maíz (9%) empleados por separado para preparar las emulsiones y obtener el ESI óptimo fueron muy cercanos a los que permitieron optimizar este índice en las emulsiones modelo cárnicas (9.3%). No obstante, el ESI óptimo de las emulsiones modelo control formuladas con aceite MEG-3® (97 min) fue 2.85 veces mayor en comparación con el obtenido con aceite de maíz (34 min).

Mine et al. (1991) prepararon emulsiones o/w con soluciones de ovoalbúmina como emulsificante y aceite de soya como fase dispersa. Estos autores señalaron que el ESI aumentó a medida que se incrementó la concentración de proteína y el porcentaje de aceite empleados para formar la emulsión. Reportaron que al utilizar una combinación de 0.1% de proteína y 12.5% de aceite (porcentajes cercanos al de nuestro modelo bajo estudio) el ESI de la emulsión es de menos de 15 min. En nuestro caso, el ESI es casi 2.3 veces mayor, incluso utilizando concentraciones de proteína y aceite de maíz menores. Las diferencias en el valor del ESI pueden estar relacionadas no sólo con la concentración y naturaleza de los dos compuestos principales utilizados para formar la emulsión (proteína y aceite), sino con diversos factores incluyendo el pH, tamaño del glóbulo, carga neta, tensión interfacial, viscosidad y conformación de la proteína (Hung et al., 1991).

Conclusiones parciales

Las propiedades de la emulsión: índice de actividad (EAI) e índice de estabilidad (ESI) de las emulsiones modelo carnicas: extracto miofibrilar-MEG-3®, extracto miofibrilar-aceite de maíz, y de la emulsión modelo control: ovoalbúmina-MEG-3®, fueron dependientes no sólo de las concentraciones de proteína utilizada, sino también del tipo y porcentaje de aceite empleado como fase dispersa para formar la emulsión. En el caso particular de la emulsión modelo control preparada con ovoalbúmina y aceite de maíz, el EAI también fue dependiente de la concentración de proteína y de la cantidad de aceite utilizadas para preparar la emulsión, sin embargo el ESI sólo se vio afectado de manera significativa por el porcentaje de aceite de maíz empleado en la formulación de la emulsión.

La metodología de superficies de respuesta permitió optimizar por separado el EAI y el ESI de las emulsiones modelo investigadas mediante la estimación de las combinaciones de concentración de proteína emulsificante y porcentaje de aceite utilizado como fase dispersa, que maximizaban la respuesta de los índices. Si bien, la optimización del EAI permitió determinar la habilidad y la rapidez con la que una proteína forma la interfase de los glóbulos de aceite de la emulsión, un valor alto de este índice no necesariamente garantiza la estabilidad de las emulsiones. Por lo tanto, se decidió utilizar la combinación de proteína y porcentaje de aceite con la que se obtuvo la respuesta óptima máxima del ESI (128 min) para formular las cuatro emulsiones modelo bajo análisis y evaluar su oxidación. Dicha combinación correspondió a la emulsión modelo cárnica preparada con extracto miofibrilar emulsificante y aceite de pescado MEG-3® en concentraciones: 10.7 mg/mL y 9.3%, respectivamente.

CAPITULO 10

ESTABILIZACIÓN DE EMULSIONES MODELO

POR SONICACIÓN

Uno de los requisitos para evaluar la oxidación de las emulsiones es que estos sistemas deben ser estables durante el periodo de tiempo en el que se realicen los análisis (Decker et al., 2005), por lo tanto, antes de cuantificar los productos de oxidación formados en las emulsiones modelo bajo investigación, resultó necesario aumentar su estabilidad. Si bien, la estabilidad de una emulsión es dependiente de muchos parámetros, el tamaño de los glóbulos de la fase dispersa es crucial (Mosavian y Hassani, 2010). Con base en lo anterior, se realizaron experimentos para evaluar el efecto de la amplitud de ultrasonido en el tamaño de los glóbulos de la emulsión y en consecuencia en su estabilidad física al almacenarse a 37 °C.

10.1 Evaluación del efecto de la amplitud de ultrasonido en el tamaño de los glóbulos de la emulsión

Se prepararon emulsiones modelo cárnicas y emulsiones modelo control, utilizando la combinación de concentración de proteína y porcentaje de aceite con la que se obtuvo la respuesta óptima máxima del ESI al aplicar la metodología de superficies de respuesta, reportada en el capítulo anterior. Dicha combinación correspondió a una solución de proteína en concentración 10.7 mg/mL y 9.3% de aceite. Las emulsiones modelo gruesas se formaron por homogenización a alta velocidad de las fases: continua (solución proteica) y dispersa (aceite), posteriormente dichas emulsiones se sonicaron aplicando distintos porcentajes de amplitud de ultrasonido para reducir el tamaño de los glóbulos de aceite en la emulsión.

En la Figura 10.1 se muestra el tamaño de partícula de la emulsión, expresado como diámetro medio del volumen equivalente ($d_{4,3}$, μm), en emulsiones modelo gruesas y sometidas a sonicación a distintos porcentajes de amplitud de ultrasonido.

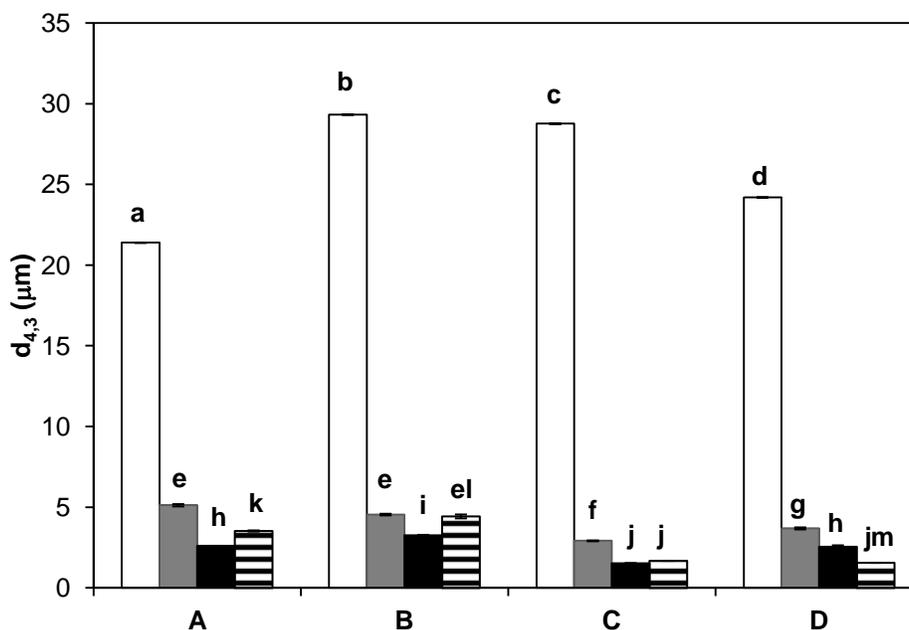


Figura 10.1. Tamaño promedio de los glóbulos en la emulsión modelo ($d_{4,3}$, en μm): (A) extracto miofibrilar-MEG3®, (B) extracto miofibrilar-aceite de maíz, (C) ovoalbúmina-MEG-3®, (D) ovoalbúmina-aceite de maíz. Emulsión modelo sin sonicación (□) y sonicada a una amplitud de ultrasonido: 30% (■), 50% (●) y 70% (▨). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) en los valores $d_{4,3}$ (μm).

El análisis estadístico permitió observar diferencias significativas ($P < 0.05$) en el $d_{4,3}$ (μm) por efecto del porcentaje de amplitud de ultrasonido utilizado, así como por el tipo de emulsión modelo o/w investigado y sometido a sonicación.

La aplicación de ultrasonido en amplitudes 30, 50 o 70% permitió disminuir de manera significativa ($P < 0.05$) el tamaño de partícula de los sistemas modelo analizados, puesto que el diámetro medio del volumen de los glóbulos ($d_{4,3}$, μm) en las emulsiones sonicadas presentó valores entre 1.53 y 5.13 μm , mientras que las emulsiones gruesas obtenidas por homogenización a alta velocidad y en ausencia de sonicación mostraron un tamaño de partícula promedio ($d_{4,3}$, μm) en el intervalo 21.29-29.33 μm (Figura 10.1). Lad y Murthy (2012) reportaron que el poder de ultrasonido redujo de manera significativa el tamaño de los glóbulos en emulsiones preparadas con proteínas de leche de coco y aceite de girasol. Estos autores reportan que el tamaño de los glóbulos ($d_{4,3}$, μm) en emulsiones sonicadas en un baño de ultrasonido fue 18.1 μm , y 5.9 μm al utilizar un sonótrodo, en contraste las emulsiones en ausencia de ultrasonido tuvieron un tamaño de partícula de 22.3 μm .

Nuestros resultados fueron muy similares, particularmente en el caso de las emulsiones modelo que no recibieron sonicación y en las emulsiones a las que se les suministro ultrasonido mediante un sonótrodo.

La reducción del tamaño promedio de los glóbulos en las emulsiones que recibieron un tratamiento de sonicación se debe a que en un sistema ultrasónico la fuerza de cizalla es proporcionada de manera predominante por el proceso de cavitación acústica, la cual consiste en la formación, aumento y colapso subsecuente de microburbujas provocado por las fluctuaciones de presión de la onda acústica. El colapso entre microburbujas causa niveles extremos de turbulencia altamente localizada, es decir, una implosión a escala microscópica. La homogenización ultrasónica se encuentra basada en la acumulación de muchos miles de estas implosiones miniatura (Leong et al., 2009).

El efecto de la aplicación de ultrasonido en amplitudes 30, 50 o 70%, en el tamaño de los glóbulos en las emulsiones modelo también se midió en términos del diámetro medio de la superficie $d_{3,2}$ (μm). De la misma manera que al medir el $d_{4,3}$, el análisis de varianza de dos vías permitió observar diferencias significativas ($P < 0.05$) en el $d_{3,2}$ (μm) por efecto del porcentaje de amplitud de ultrasonido utilizado, así como por el tipo de emulsión modelo o/w estudiada y sometida a sonicación (Figura 10.2).

Al analizar los resultados del efecto de la amplitud de ultrasonido (%) en el diámetro medio $d_{3,2}$ (μm) de los glóbulos en las emulsiones, observamos que existió una relación inversa entre el tamaño de partícula de la emulsión y el porcentaje de amplitud de ultrasonido suministrado. Este comportamiento se apreció de manera más clara en los sistemas modelo control preparados con ovoalbúmina (Figura 10.2). En el caso de las emulsiones modelo cárnicas, el tamaño de los glóbulos disminuyó al aumentar la amplitud de ultrasonido de 30 a 50%, sin embargo, al incrementar la amplitud hasta 70 %, el tamaño de los glóbulos aumentó (Figura 10.1 y 10.2). Se ha reportado que intensidades de ultrasonido altas pueden provocar la separación de la emulsión. Juliano et al. (2011) reportaron que la aplicación de ultrasonido conduce a la aparición de cremado en emulsiones preparadas a partir de leche y en leche bronca. El cremado se ve favorecido cuando el tamaño de partícula de las emulsiones aumenta como resultado de la floculación y coalescencia, pues ambos fenómenos conducen a un aumento en el diámetro hidrodinámico.

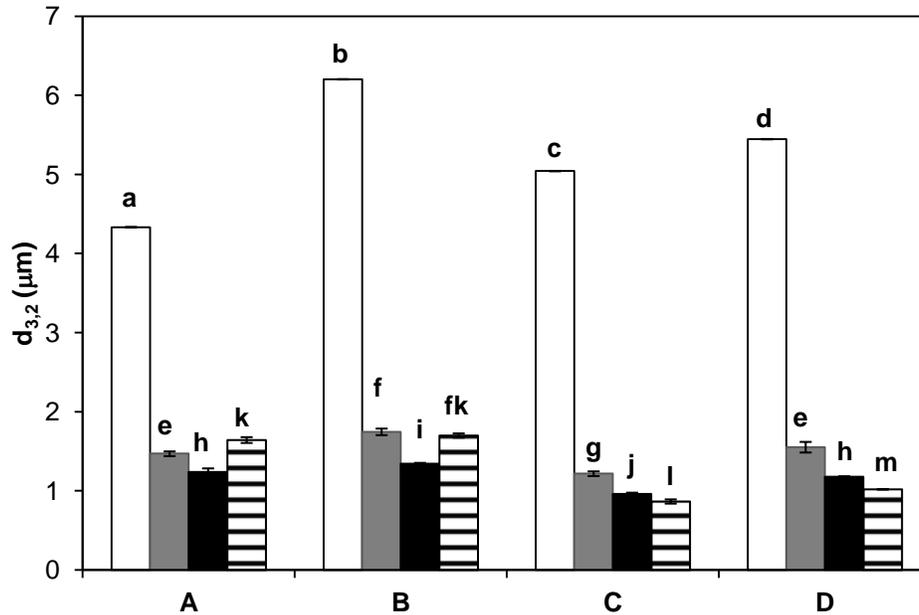


Figura 10.2 Tamaño promedio de los glóbulos en la emulsión modelo ($d_{3,2}$ en μm): (A) extracto miofibrilar-MEG3®, (B) extracto miofibrilar-aceite de maíz, (C) ovoalbúmina-MEG-3®, (D) ovoalbúmina-aceite de maíz. Emulsión modelo sin sonicar (□) y sonicada a una amplitud de ultrasonido: 30% (■), 50% (■) y 70% (▨). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) en los valores $d_{3,2}$ (μm).

El efecto del porcentaje de amplitud de ultrasonido en los valores $d_{3,2}$ (μm) de los glóbulos en la emulsión modelo mostró una tendencia muy similar a la obtenida al medir el $d_{4,3}$ (μm). Sin embargo, la determinación del $d_{3,2}$ (μm) permitió observar una disminución significativa ($P < 0.05$) en el tamaño de partícula de la emulsión modelo control: ovoalbúmina-aceite MEG-3®, al aumentar el porcentaje de amplitud de ultrasonido suministrado a la emulsión en el intervalo 30-70%. Se ha observado que un incremento en el poder de ultrasonido resulta en la formación de glóbulos más pequeños. La formación de glóbulos de menor tamaño por efecto de una amplitud de ultrasonido alta se atribuye a las ondas vigorosas de presión transmitidas a través del ultrasonido, el cual es propagado por el movimiento vibratorio de las moléculas que conforman la fase líquida de la emulsión. Por lo tanto, las moléculas de proteína experimentan compresión y estiramiento de sus estructuras de manera alternada. Esto provoca el desplegamiento de la proteína, lo cual resulta ser el factor con mayor responsabilidad en el aumento de la actividad de superficie de proteínas tratadas con energía acústica (Lad y Murthy, 2012).

Muchos de los trabajos previos que evalúan la oxidación de emulsiones aceite en agua reportan el tamaño medio de los glóbulos en términos del $d_{3,2}$ (μm), por lo tanto, decidimos investigar la estabilidad de las emulsiones modelo sonicadas determinando los cambios en el diámetro de Sauter ($d_{3,2}$, μm) de los sistemas modelo.

10.2 Estabilidad de emulsiones modelo sonicadas

Una vez que se determinó el efecto del porcentaje de amplitud de ultrasonido en la distribución del tamaño de partícula de las emulsiones modelo, se evaluó su estabilidad física al almacenarlas a 37°C , es decir, se estableció el tiempo de separación de las fases mediante la determinación periódica del $d_{3,2}$ (μm). Las mediciones del $d_{3,2}$ se efectuaron justo después de formar la emulsión (0 h) y en intervalos de 24 h. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10.1.

De manera general, se observó que las emulsiones modelo cárnicas almacenadas a 37°C y sonicadas con una amplitud de ultrasonido de 50%, fueron más estables en comparación con las tratadas con 30 y 70%. Específicamente, las emulsiones modelo cárnicas preparadas con aceite de pescado MEG-3® mantuvieron su estabilidad física por un tiempo considerable puesto que no se observó separación de fases ni cambios significativos ($P>0.05$) en los valores $d_{3,2}$ (μm) durante 120 h (5 días). Esto pudo deberse a que dichas emulsiones presentaron un tamaño de partícula significativamente menor ($P<0.05$), a diferencia de las emulsiones que emplearon aceite de maíz como fase dispersa. Además, es probable que el tipo e intensidad de interacciones que se presentaron entre las proteínas miofibrilares empleadas como emulsificantes, y los ácidos grasos presentes en el aceite de pescado MEG-3® hayan sido más fuertes, lo cual favoreció que los glóbulos en la emulsión mantuvieran su integridad, retardando así, la separación de las fases del sistema modelo.

Por otro lado, sin importar el tipo de aceite utilizado como fase discontinua (MEG-3® o maíz) y la amplitud de ultrasonido a la que fueron sonicadas (50 o 70%), las emulsiones modelo control preparadas con ovoalbúmina fueron estables ya que no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) en el $d_{3,2}$ (μm) a lo largo del periodo de evaluación (120 h, o bien, 5 días). Si bien, el tamaño de los glóbulos en las emulsiones control fue menor (0.87-1.18 μm) en comparación con el observado en las emulsiones modelo cárnicas (1.45-1.80 μm), los valores $d_{3,2}$ (μm) de los sistemas modelo: extracto miofibrilar-MEG-3®, ovoalbúmina- MEG-3® y ovoalbúmina-aceite de maíz, resultaron cercanos al sonicar las emulsiones con 50% de amplitud de ultrasonido. Tomando en

cuenta lo anterior, se decidió fijar dicho porcentaje para reducir el tamaño de partícula de los sistemas modelo y aumentar su estabilidad.

Tabla 10.1. Diámetro promedio de la superficie de los glóbulos $d_{3,2}$ (μm) en emulsiones cárnicas modelo y control almacenadas a 37 °C.

Emulsión modelo	Tiempo de almacenamiento (h)	Amplitud de ultrasonido (%)		
		30	50	70
		$d_{3,2}$ (μm)		
Extracto miofibrilar-MEG-3®	0	1.47 ^{af}	1.24 ^{ag}	1.64 ^{ah}
	24	-	1.18 ^{ag}	1.62 ^{ah}
	48	-	1.19 ^{ag}	1.62 ^{ah}
	72	-	1.18 ^{ag}	1.72 ^{ah}
	96	-	1.20 ^{ag}	-
	120	-	1.19 ^{ag}	-
Extracto miofibrilar- aceite de maíz	0	1.75 ^{bf}	1.34 ^{bg}	1.70 ^{af}
	24	1.74 ^{bf}	1.39 ^{bg}	1.80 ^{af}
	48	1.45 ^{bf}	1.52 ^{cg}	-
	72	-	-	-
	96	-	-	-
	120	-	-	-
Ovoalbúmina- MEG-3®	0	1.22 ^{cf}	0.96 ^{dg}	0.87 ^{bh}
	24	1.65 ^{df}	0.98 ^{dg}	0.88 ^{bh}
	48	0.96 ^{cf}	0.95 ^{df}	0.89 ^{bh}
	72	-	0.94 ^{dg}	0.83 ^{bh}
	96	-	0.95 ^{dg}	0.89 ^{bh}
	120	-	0.94 ^{dg}	0.81 ^{bh}
Ovoalbúmina-aceite de maíz	0	1.55 ^{af}	1.18 ^{eg}	1.02 ^{ch}
	24	-	1.17 ^{eg}	1.08 ^{ch}
	48	-	1.17 ^{eg}	1.03 ^{ch}
	72	-	1.17 ^{eg}	1.05 ^{ch}
	96	-	1.15 ^{eg}	1.02 ^{ch}
	120	-	1.15 ^{eg}	1.04 ^{ch}

Los valores promedio en la misma columna con superíndices diferentes (a-e) son significativamente diferentes ($P < 0.05$). Superíndices diferentes (f-h) de los valores promedio en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Durante el proceso de emulsificación por ultrasonificación el aumento de la actividad de superficie y de la agregación de la proteína puede incrementar la adsorción y la unión irreversible de las moléculas proteicas a la superficie del glóbulo, mejorando de manera eficiente la capacidad emulsificante y la estabilidad (Xu y Yao, 2009). Lad y Murthy (2012) reportaron que la reorientación de las proteínas al aplicar ultrasonido les proporciona una mayor capacidad para estabilizar emulsiones.

Las emulsiones modelo cárnicas preparadas con extracto miofibrilar como emulsificante y aceite de maíz como fase dispersa se mantuvieron estables sólo por 48 h (2 días) al sonicarse utilizando 30 o 50% de amplitud (intensidad) de ultrasonido. Aún cuando el tamaño de los glóbulos en la emulsión fue pequeño (1.34-1.75 μm) se observó que incluso a partir de 24 horas de almacenamiento a 37 °C, se presentaban cambios físicos en la emulsión y por tanto, en el valor del $d_{3,2}$ (μm). Con base en lo anterior, se decidió probar dos porcentajes de amplitud de ultrasonido adicionales: 40 y 60%, para observar el efecto del ultrasonido de alta potencia en la estabilidad de las emulsiones modelo formuladas con aceite de maíz. Nuevamente las emulsiones se mantuvieron a 37 °C y se evaluó el cambio en el $d_{3,2}$ (μm) en función al tiempo.

Se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la distribución del tamaño de partícula ($d_{3,2}$) en las emulsiones modelo extracto miofibrilar-aceite de maíz, sonicadas con 40% de amplitud a medida que transcurría el tiempo de almacenamiento. Los diámetros medios $d_{3,2}$ (μm), determinados en las emulsiones a las 0, 24 y 48 h fueron: 1.62, 1.51 y 1.49 μm , respectivamente. Al aplicar 40% de amplitud de ultrasonido el tamaño de los glóbulos en la emulsión se redujo, en comparación con el obtenido en las emulsiones a las que se les suministro ultrasonido a una amplitud de 30%. Sin embargo, los sistemas modelo sólo mantuvieron su estabilidad física por 48 h, por lo tanto se descartó este tratamiento para reducir el tamaño de los glóbulos y aumentar la estabilidad de las emulsiones modelo. Por otro lado, la evaluación de un porcentaje de amplitud de ultrasonido del 60% para reducir el tamaño de partícula de las emulsiones modelo preparadas con proteína miofibrilar y aceite de maíz como fase dispersa, permitió lograr glóbulos con diámetros promedio ($d_{3,2}$)= 1.41, 1.40, 1.38 y 1.41 μm , en emulsiones almacenadas a 37 °C durante 0, 24, 48 y 72 h, respectivamente. El ANOVA de los resultados obtenidos indicó que no se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en los valores del $d_{3,2}$ (μm) de las emulsiones modelo analizadas a lo largo de 72 h.

Las emulsiones modelo cárnicas extracto miofibrilar-aceite de maíz resultaron ser las menos estables entre los sistemas investigados. Aún cuando la aplicación de ultrasonido de alta potencia

permitió reducir el tamaño de los glóbulos en la emulsión, la separación de las fases se presentaba después de 24 y 48 h al utilizar amplitudes de ultrasonido de 70 y 30 o 50%, respectivamente. La estabilidad máxima de estas emulsiones a una temperatura de almacenamiento de 37 °C fue de 72 h y se logró al sonicar los sistemas modelo con una amplitud de ultrasonido de 60%. Gülseren et al. (2007) publicaron que el aumento en el tamaño de partícula y la disminución de grupos sulfhídrico en una solución de albúmina bovina sérica después de ultrasonificación, pudo ser atribuida a la formación de agregados de proteína.

Conclusiones parciales

Con los resultados presentados en este capítulo fue posible seleccionar los porcentajes de amplitud de ultrasonido que disminuyeron significativamente el tamaño promedio de los glóbulos en la emulsión y que aumentaron la estabilidad de los sistemas modelo almacenados a 37 °C. El proceso de sonicación suministrando 50% de amplitud de ultrasonido permitió estabilizar por 120 h (5 días) las emulsiones modelo: extracto miofibrilar-MEG-3®, ovoalbúmina- MEG-3® y ovoalbúmina-aceite de maíz. Por otro lado, la estabilización hasta por 72 h de las emulsiones extracto miofibrilar-aceite de maíz requirió de la aplicación de un porcentaje de amplitud de ultrasonido del 60%. Si bien, la cavitación acústica permitió obtener un tamaño promedio de los glóbulos pequeño en las emulsiones modelo cárnicas preparadas con aceite de maíz como fase dispersa, se observó que la separación de las fases en función al tiempo en ese sistema, no sólo fue dependiente del tamaño de partícula, sino posiblemente también del tipo e intensidad de interacciones que ocurren entre las proteínas miofibrilares adsorbidas en el glóbulo y los ácidos grasos contenidos en el aceite de maíz.

CAPITULO 11
OXIDACIÓN DE EMULSIONES MODELO

Si bien, existe una gran cantidad de investigaciones publicadas que han analizado el potencial de las proteínas miofibrilares para formar y estabilizar emulsiones aceite en agua (o/w), estos trabajos sólo han empleado aceite vegetales como fase dispersa para formular las emulsiones y no han evaluado la estabilidad oxidativa de estos sistemas. Más aún no existen reportes concretos hasta el momento, sobre la estabilidad física y la susceptibilidad a la oxidación de sistemas o/w formulados empleando proteínas miofibrilares como agente emulsificante y aceites marinos ricos en ácidos polinsaturados de cadena larga *n-3* (EPA y DHA) como fase dispersa, los cuales se caracterizan por oxidarse rápidamente. Por lo tanto, en este capítulo se estudió el efecto de la naturaleza del aceite empleado como fase dispersa y de la solución proteica empleada como emulsificante en la estabilidad oxidativa de emulsiones modelo incubadas a 37 °C, mediante un muestreo periódico para cuantificar los productos primarios y secundarios de oxidación generados en las emulsiones bajo investigación.

11.1 Estandarización del nivel de oxidación de las muestras de aceite

Con el objetivo de evaluar de manera más precisa la estabilidad oxidativa de las emulsiones modelo investigadas en este trabajo y tomando en cuenta que la naturaleza de los aceites empleados como fase dispersa para formar las emulsiones era distinta, antes de preparar los sistemas modelo o/w y realizar la determinación de los productos de oxidación formados durante el almacenamiento de las emulsiones a 37 °C, fue necesario ajustar por separado la concentración inicial de hidroperóxidos en el aceite de pescado MEG-3® y en el aceite de maíz. Lo anterior se llevó a cabo exponiendo las muestras de aceite a luz fluorescente con una intensidad lumínica de 4300 lux por 5 min (aceite MEG-3®) y ~120 min (aceite de maíz). La concentración inicial de hidroperóxidos ajustada por tratamiento lumínico, en los aceites empleados por separado como fase dispersa y determinada haciendo uso de la adaptación del método FOX2 desarrollada en este trabajo de tesis (capítulo 8) fue: 0.81 ± 0.008 mmol eq CHP/kg aceite.

11.2 Estabilidad oxidativa de emulsiones modelo

Los productos primarios de la oxidación de los lípidos en los alimentos que se caracterizan por ser emulsiones pueden medirse determinando hidroperóxidos, valor peróxido o dienos conjugados, mientras que los productos secundarios de oxidación se cuantifican por cromatografía de gases, valor anisidina o sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés) (Decker et al, 2005; Kellerby et al, 2006). El efecto de la naturaleza de la solución de proteína (emulsificante) y del aceite (fase dispersa) empleados para formular emulsiones o/w, en la estabilidad oxidativa de los sistemas modelo bajo análisis, se evaluó cuantificando la concentración de hidroperóxidos y TBARS. La determinación de los productos primarios y secundarios de oxidación formados en las emulsiones modelo almacenadas a 37 °C se realizó mediante un muestreo periódico en intervalos de 24 h.

Nuestros resultados mostraron que la estabilidad oxidativa de las emulsiones modelo (o/w) investigadas fue dependiente del tiempo de incubación (Figura 11.1). Se observó que la concentración de hidroperóxidos y TBARS (productos de oxidación primarios y secundarios, respectivamente) aumentó de manera significativa ($P < 0.05$) después de 24 h de incubación a 37 °C en todas las emulsiones modelo analizadas.

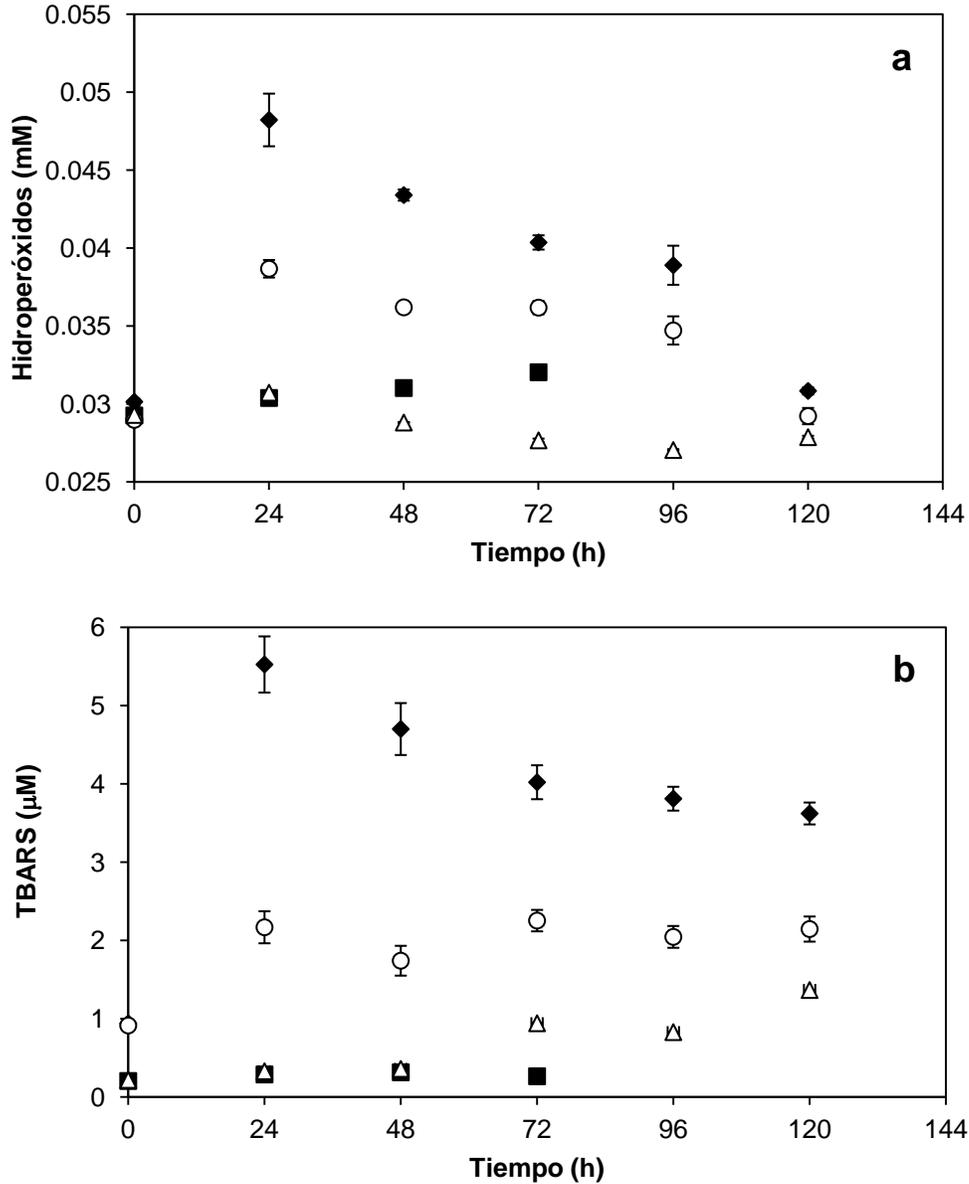


Figura 11.1. Concentración de hidroperóxidos (a) y TBARS (b) en emulsiones modelo almacenadas a 37 °C: extracto miofibrilar-MEG-3® (◆), extracto miofibrilar-aceite de maíz (■), ovoalbúmina-MEG-3® (○) y ovoalbúmina-aceite de maíz (△). Las condiciones para formular y preparar las emulsiones fueron: solución de proteína emulsificante en concentración 10.7 mg/mL; 9.3% de aceite como fase dispersa; homogenización de las fases a 15000 rpm por 2 min; sonicación de las emulsiones aplicando amplitud de ultrasonido 50% (◆○△) o 60% (■).

11.2.1 Efecto del tipo de aceite usado como fase dispersa en la estabilidad oxidativa de emulsiones modelo

La susceptibilidad a la oxidación en orden ascendente de las emulsiones modelo almacenadas a 37 °C tomando en cuenta la formación de hidroperóxidos y TBARS fue: ovoalbúmina-aceite de maíz, extracto miofibrilar-aceite de maíz, ovoalbúmina-MEG-3® y extracto miofibrilar-MEG-3®.

La estabilidad oxidativa de los sistemas modelo preparados con aceite de pescado MEG-3® como fase dispersa fue significativamente menor ($P < 0.05$) comparada con la que presentaron las emulsiones formuladas con aceite de maíz, sin importar la solución de proteína empleada como emulsificante para estabilizar la emulsión (extracto miofibrilar o bien, ovoalbúmina grado II). El aceite MEG-3® contiene ácidos polinsaturados de cadena larga *n-3* EPA y DHA, una de las desventajas que presentan estos ácidos grasos es su baja estabilidad oxidativa. Los ácidos omega 3 (*n-3*) de cadena larga son los ácidos grasos más insaturados en la naturaleza, ya que contienen 5 y 6 dobles enlaces, lo cual los hace especialmente susceptibles a la oxidación. Ésta inicia con la producción de compuestos intermedios inestables como los radicales libres e hidroperóxidos, los cuales son los productos primarios de la oxidación de los lípidos en cadena por radicales libres (Punta et al., 2005). La reacción posterior de los hidroperóxidos con el oxígeno lleva a la formación de peróxidos cíclicos (Pierini y Punta, 2006), aldehídos, cetonas y alcoholes, los cuales son responsables de olores y sabores desagradables (Ladikos y Lougovois, 1990). Varios de estos compuestos de bajo peso molecular reaccionan con el ácido 2-tiobarbitúrico produciendo cromógenos denominados sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) que pueden ser determinadas después de una extracción ácida (Decker et al., 2005). Por otro lado, el aceite comercial de maíz empleado en este trabajo para la formación de emulsiones o/w, contiene principalmente ácido linoleico y oleico, con 2 y 1 dobles ligaduras respectivamente (sección 7.3), además se le ha adicionado *terbutil hidroquinona* (TBHQ) en concentración 0.005%, el cual es un antioxidante sintético muy potente que retrasa la oxidación del producto por tiempos prolongados (Mora-Gutierrez et al., 2010). En comparación con el aceite de maíz, al aceite de pescado MEG-3® no se le han adicionado antioxidantes sintéticos; análisis detallados de la composición de ese aceite marino señalan que contiene tocoferoles (derivados de la vitamina E) de manera natural, sin embargo, aun cuando los tocoferoles ejercen el papel de antioxidante en el aceite MEG-3® y ayudan a retrasar su oxidación, parece que resultan menos potentes que el antioxidante sintético adicionado al aceite de maíz comercial. Lo anterior explicaría en parte las diferencias en las concentraciones de hidroperóxidos y TBARS obtenidas en las emulsiones modelo analizadas, tomando en cuenta la naturaleza del aceite empleado como fase dispersa para formar la emulsión.

11.2.2 Influencia de la naturaleza de la solución proteica emulsificante en la estabilidad oxidativa de emulsiones modelo

Si bien, las emulsiones preparadas con extracto miofibrilar o bien, solución de ovoalbúmina grado II en concentración 10.7 mg/mL y 9.3% de aceite de maíz no presentaron diferencias significativas ($P>0.05$) en la concentración de hidroperóxidos y TBARS después de ser formadas (0 h) y durante 24-48 h de incubación a 37 °C, transcurridas 72 h de almacenamiento la concentración de hidroperóxidos aumentó de manera significativa en las emulsiones modelo cárnicas (formuladas con extracto miofibrilar).

De manera general, los resultados obtenidos mostraron que la oxidación fue mayor en las emulsiones modelo preparadas con extracto miofibrilar como emulsificante (cárnicas), en comparación con los sistemas estabilizados con solución de ovoalbúmina grado II (control) al emplear aceite de pescado MEG-3® o aceite de maíz por separado, como la fase dispersa de la emulsión. Esto pudo estar relacionado con la complejidad de la solución de proteína miofibrilar, ya que era un extracto crudo obtenido del músculo de cerdo *Longissimus dorsi*, por lo tanto pudo contener iones metálicos, principalmente férricos, los cuales aceleran la oxidación de los lípidos en las emulsiones (Waraho et al., 2011).

La oxidación de las emulsiones modelo formuladas con aceite de maíz aumentó a medida que transcurría el tiempo de incubación, esta tendencia era la esperada y ha sido reportada por varios autores que han investigado la estabilidad oxidativa de emulsiones modelo o/w, preparadas con distintas proteínas o surfactantes no iónicos empleados como emulsificantes y ácido linoleico o aceite de salmón como fase dispersa (Ries et al., 2010; Alamed et al., 2006). En contraste, las emulsiones modelo cárnicas y control formadas con aceite de pescado MEG-3® se oxidaron más y mostraron una concentración máxima de hidroperóxidos y TBARS después de 24 h de almacenamiento a 37 °C, sin embargo a medida que transcurría el tiempo, la cantidad de productos primarios y secundarios de oxidación disminuyó significativamente ($P<0.05$) hasta alcanzar valores muy cercanos a los registrados al inicio de la evaluación de la estabilidad oxidativa de las emulsiones modelo, es decir, después de haber sido preparadas. Este comportamiento resultó interesante.

La disminución en la formación de hidroperóxidos y TBARS en las emulsiones modelo o/w, formuladas con aceite MEG-3® y estabilizadas con extracto proteico miofibrilar, o bien solución de ovoalbúmina grado II, pudo estar relacionada con la proteína no adsorbida presente en la fase continua de la emulsión. Reis et al. (2010) encontraron que además de la barrera física de la capa

interfacial de proteína y del efecto antioxidante de éstas biomoléculas en la interfase de los glóbulos, la proteína no adsorbida localizada en la fase continua de la emulsión jugó un papel importante en la estabilidad oxidativa de emulsiones preparadas con ácido linoleico y altas concentraciones de proteínas del suero de leche o caseinato de sodio como emulsificante. Estos autores sugirieron que el mecanismo antioxidante de la proteína en la región interfacial, como la unión de iones metálicos de la fase lipídica y la neutralización de radicales libres pudo involucrar un proceso dinámico de intercambio con las moléculas de proteína de la fase continua.

La concentración de la solución proteica emulsificante: extracto proteico miofibrilar o bien, ovoalbúmina, para estabilizar las emulsiones modelo preparadas con aceite de pescado MEG-3® fue alta (10.7 mg/mL). En las emulsiones o/w, sólo una cantidad limitada de proteína puede ser adsorbida para formar la interfase de los glóbulos de la emulsión, el resto permanece como exceso en la fase continua. El extracto miofibrilar caracterizado por SDS-PAGE (sección 7.1.1) resultó ser una solución proteica compleja que contiene más de siete proteínas con pesos moleculares en el intervalo 16-200 kDa identificadas como: miosina pesada, α -actinina, vimentina, actina, troponina T, tropomiosinas, troponina I y cadenas ligeras de miosina, García-Barrientos (2007) reportó que en emulsiones modelo aceite en agua, preparadas con proteínas miofibrilares extraídas de carne de cerdo, la miosina pesada y la actina fueron las bandas más intensas en el perfil electroforético de las proteínas adsorbidas al glóbulo de la emulsión, mientras que en el perfil de la fase continua (proteínas no adsorbidas) estas proteínas no se detectaron. Lo anterior comprueba que la miosina y actina son las proteínas miofibrilares involucradas de manera más importante en la estabilización de emulsiones (O'Neill et al., 1990), puesto que son las que forman la interfase del glóbulo de la emulsión y se encuentran adsorbidas en esa región, por lo tanto, el resto de las proteínas miofibrilares se encuentra en la fase continua de la emulsión o/w. La solución de ovoalbúmina grado II estuvo compuesta principalmente por esa proteína, la cual es la más abundante en la clara de huevo y ha sido ampliamente utilizada en la industria de los alimentos por sus propiedades emulsificantes (Mine et al., 1991), sin embargo al evaluar su pureza por SDS-PAGE, se encontraron trazas de posible ovotransferrina, esta proteína en conjunto con el exceso de ovoalbúmina no adsorbida, pudo estar presente en la fase continua de las emulsiones modelo control y tener un efecto en la concentración de los productos de oxidación determinados en las emulsiones modelo durante el tiempo de incubación a 37 °C.

En relación a lo anterior, existe la posibilidad de que en las emulsiones modelo cárnicas y control preparadas con aceite MEG-3®, se presentara un mecanismo antioxidante que involucró la remoción de iones metálicos de la fase lipídica por unión a las moléculas de proteína de la interfase. Posteriormente algunas de estas biomoléculas adsorbidas pudieron participar en un proceso de intercambio dinámico de los iones con las proteínas en exceso que no fueron adsorbidas y que se encontraron presentes en la fase continua de la emulsión (Ries et al., 2010), lo cual pudo contribuir a neutralizar los hidroperóxidos lipídicos formados y a evitar la formación de más productos primarios y secundarios de oxidación en nuestras emulsiones modelo. Cho et al. (2003) respaldaron la idea de la transferencia de iones entre las fases de la emulsión, pues observaron un agotamiento mayor de los iones férricos en la fase lipídica de emulsiones o/w, al incrementar la concentración de quelantes como EDTA, citrato y tripolifosfato de sodio en la fase continua. En consecuencia la oxidación lipídica de la emulsión se inhibió.

Las proteínas pueden quelar iones metálicos adicionados externamente, ya que los iones pueden ser atraídos a la superficie de los glóbulos, así como también a las proteínas contenidas en la fase continua. La proporción de proteínas cargadas negativamente en la fase continua aumenta a medida que se adiciona más proteína al sistema, mientras que la carga negativa de los glóbulos se mantiene al mismo nivel. Por lo tanto, la remoción de iones cargados positivamente de la superficie de los glóbulos y su transferencia a la fase continua parece ocurrir más fácilmente cuando se usan concentraciones altas de proteína como emulsificante, puesto que también se tendrá una mayor cantidad de proteína en la fase continua (Reis et al., 2010).

Mora-Gutierrez et al. (2010) reportaron que las diferencias en la estabilidad oxidativa de emulsiones aceite en agua preparadas con aceite de alga y estabilizadas con caseínas bovina o caprina, pudieron estar relacionadas con los contrastes que presentan las proteínas en la habilidad para quelar iones metálicos lejos del glóbulo de aceite en la emulsión, diferencias en el contenido de aminoácidos con poder antioxidante que neutralizan radicales libres y/o la sensibilidad de esos aminoácidos antioxidantes para contrarrestar los radicales que inducen la oxidación. En adición, las distinciones entre la estabilidad oxidativa de emulsiones preparadas con diferentes proteínas como emulsificantes podría deberse a las distintas formas en que las proteínas impactan el grosor y empaquetamiento de los glóbulos en la interfase.

Finalmente, la oxidación de las emulsiones control, preparadas con ovoalbúmina y aceite de pescado MEG-3® fue significativamente menor ($P < 0.05$) durante un periodo de incubación en el intervalo 24-96 h a una temperatura de 37 °C, en comparación con las emulsiones cárnicas formuladas con extracto proteico miofibrilar y el mismo tipo de aceite. Ambos sistemas modelo se

prepararon empleando una concentración alta de proteína (10.7 mg/mL) obtenida por optimización mediante la metodología de superficies de respuesta, sin embargo, la homogenización a alta velocidad, seguida de un tratamiento de sonicación permitió obtener un tamaño promedio de los glóbulos menor en las emulsiones modelo control ($d_{3,2} = 0.95 \mu\text{m}$), en contraste con el sistema modelo cárnico ($d_{3,2} = 1.20 \mu\text{m}$). Ries et al. (2010) publicaron que en general, las emulsiones que tuvieron un tamaño de glóbulo pequeño y que fueron preparadas con una alta concentración de proteína, mostraron una mayor estabilidad oxidativa. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por estos autores.

CAPITULO 12

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La presente investigación aportó por primera vez, conocimiento acerca de las propiedades de la emulsión: índice de estabilidad (ESI), índice de actividad (EAI), y de la estabilidad física y oxidativa de emulsiones cárnicas modelo (o/w), denominadas así, puesto que fueron preparadas con un extracto crudo de proteínas miofibrilares obtenido de lomo de cerdo y el aceite de pescado comercial MEG-3®, el cual se caracteriza por contener altas concentraciones de ácidos grasos polinsaturados de cadena larga EPA y DHA. Se encontró que los índices EAI, ESI y la oxidación de emulsiones modelo o/w, estuvieron influenciados por la naturaleza y las diferencias entre los compuestos utilizados para formar las emulsiones, es decir, la solución de proteína empleada como emulsificante (extracto miofibrilar u ovoalbúmina grado II) y el aceite utilizado como fase dispersa (MEG-3® o maíz) de los sistemas modelo o/w.

El perfil electroforético SDS-PAGE del extracto miofibrilar utilizado como emulsificante para estabilizar emulsiones modelo cárnicas o/w, mostró que esta solución es una mezcla proteica compleja que contiene proteínas con pesos moleculares en el intervalo 16-200 kDa, identificadas como posible: cadena pesada de miosina, α -actinina, vimentina, actina, troponina T, tropomiosinas, troponina I y cadenas ligeras de miosina.

La proteína comercial ovoalbúmina grado II, obtenida de Sigma no se encuentra completamente pura, ya que si bien el perfil electroforético SDS-PAGE permitió observar que la ovoalbúmina (~44.4 kDa) fue la proteína más abundante, este producto contiene también trazas de otra proteína de la clara de huevo (12-38%), la cual se identificó como posible ovotransferrina (~80.7 kDa).

El análisis por CG del aceite de pescado MEG-3® permitió comprobar que este producto contiene altas concentraciones de ácidos EPA y DHA. Se determinó que los ácidos grasos más abundantes en el aceite de pescado expresados como g de ácido/100 g de aceite, fueron: palmítico (15.8), EPA (9.8), DHA (9.6), oleico (9.6), palmitoleico (8.9) y esteárico (8.1).

En contraste, la composición de ácidos grasos del aceite comercial de maíz mostró que los ácidos grasos más abundantes, expresados en g de ácido/100 g de aceite, fueron: ácido linoleico (56.6), oleico (39.4), palmítico (14.9), esteárico (2.2) y linoleico conjugado (2.2) (CLA, por sus siglas en inglés).

Aún cuando los dos aceites usados para el desarrollo de este trabajo, contienen como parte de su composición a los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico, se observó que la concentración de estos ácidos grasos en cada uno de los aceites fue función de la naturaleza de los mismos.

La adaptación del método FOX2 realizada mostró que esta técnica analítica además de garantizar la evaluación correcta, reproducible y sensible de la concentración de hidroperóxidos en muestras de aceite de diferente naturaleza y con distintos grados de oxidación, permitió observar que el aceite de pescado MEG-3®, fue más susceptible a la oxidación respecto a la resistencia del aceite de maíz.

La metodología de superficies de respuesta (MSR) permitió optimizar por separado las propiedades de la emulsión: índice de actividad (EAI) e índice de estabilidad (ESI), en las cuatro emulsiones modelo o/w, bajo investigación.

El EAI y ESI en los sistemas modelo: extracto miofibrilar-MEG-3®, extracto miofibrilar-aceite de maíz y ovoalbúmina-MEG-3®, fueron dependientes no sólo de la concentración de proteína usada como emulsificante, sino también del tipo y porcentaje de aceite empleado como fase dispersa para formar la emulsión.

En el caso particular de la emulsión modelo control preparada con ovoalbúmina y aceite de maíz, el EAI también fue dependiente de la concentración de proteína y de la cantidad de aceite usados para preparar la emulsión, sin embargo el ESI sólo se vio afectado de manera significativa por el porcentaje de aceite de maíz empleado en la formulación de la emulsión.

Si bien, la optimización del EAI permitió determinar la habilidad y la rapidez con la que una proteína forma la interfase de los glóbulos de aceite de la emulsión, un valor alto de este índice no necesariamente garantiza la estabilidad de las emulsiones. Por lo tanto, se sugirió utilizar la combinación de proteína y porcentaje de aceite con la que se obtuvo la respuesta óptima máxima del ESI (128 min) para formular las cuatro emulsiones modelo bajo análisis y continuar con los experimentos para evaluar la estabilidad física y oxidativa de los sistemas (o/w), en función al tiempo de incubación a 37 °C.

La cavitación acústica permitió disminuir de manera significativa el tamaño promedio de los glóbulos en las emulsiones cárnicas modelo y control denominadas gruesas, es decir, aquellas que se forman por homogenización a alta velocidad de las fases continua y dispersa.

Si bien, la cavitación acústica permitió obtener un tamaño promedio de los glóbulos pequeño al emplear porcentajes de amplitud de ultrasonido en el intervalo: 30-70%, en las emulsiones modelo investigadas, se observó que la separación de las fases en esos sistemas en función al tiempo, no sólo fue dependiente del tamaño de partícula de la emulsión, sino posiblemente también del grado de desnaturalización de la proteína para cubrir el aceite y formar la interfase, y el subsecuente tipo e

intensidad de interacciones que ocurren entre las proteínas adsorbidas en el glóbulo y los ácidos grasos contenidos en la fase dispersa.

La aplicación de cavitación acústica a una amplitud de ultrasonido del 50%, permitió estabilizar por 120 h (5 días) las emulsiones modelo incubadas a 37 °C: extracto miofibrilar-MEG-3®, ovoalbúmina- MEG-3® y ovoalbúmina-aceite de maíz. Por otro lado, la estabilización hasta por 72 h de las emulsiones extracto miofibrilar-aceite de maíz almacenadas a 37 °C, requirió de la aplicación de un porcentaje de amplitud de ultrasonido del 60%.

La estabilidad oxidativa de las emulsiones modelo (o/w) investigadas fue dependiente del tiempo de incubación a 37 °C.

La concentración de hidroperóxidos y TBARS (productos de oxidación primarios y secundarios, respectivamente) aumentó de manera significativa ($P<0.05$) después de 24 h de incubación a 37 °C en todas las emulsiones modelo analizadas, sin importar la naturaleza de la solución proteica emulsificante o el tipo de aceite usado como fase dispersa.

La estabilidad oxidativa de los sistemas modelo preparados con aceite de pescado MEG-3® como fase dispersa fue significativamente menor ($P<0.05$) comparada con la que presentaron las emulsiones formuladas con aceite de maíz, como consecuencia de la presencia de concentraciones altas de ácidos grasos EPA y DHA en el aceite de pescado, los cuales se oxidan fácilmente.

De manera general, la oxidación fue mayor en las emulsiones modelo preparadas con extracto miofibrilar como emulsificante (cárnicas), en comparación con los sistemas estabilizados con solución de ovoalbúmina grado II (control) al emplear aceite de pescado MEG-3® o aceite de maíz por separado, como la fase dispersa de la emulsión. Esto pudo haber sido provocado por la acción de iones metálicos, principalmente férricos, que aceleran la oxidación de los lípidos en las emulsiones, los cuales pudieron estar presentes de manera importante en la solución proteica miofibrilar, puesto que esta solución se caracterizó por ser un extracto crudo obtenido del músculo de cerdo *Longissimus dorsi*.

La estabilidad oxidativa de las emulsiones cárnicas modelo o control, preparadas usando aceite de pescado MEG-3® como fase dispersa mostró un comportamiento interesante. Si bien, estos sistemas (o/w) se oxidaron más y mostraron una concentración máxima de hidroperóxidos y TBARS después de 24 h de almacenamiento a 37 °C, a medida que transcurría el tiempo la cantidad de productos primarios y secundarios de oxidación disminuyó significativamente ($P<0.05$). Puede decirse que al utilizar solución de proteína (miofibrilar u ovoalbúmina) en concentración 10.7

mg/mL, se favorece la ocurrencia de un mecanismo antioxidante dinámico que involucra el transporte de iones metálicos y neutralización de radicales libres, por parte de las proteínas adsorbidas en la interfase del glóbulo y las no adsorbidas (al estar en exceso) presentes en la fase continua.

Aun cuando el desarrollo de esta tesis permitió obtener resultados interesantes acerca de la oxidación de emulsiones simples (o/w), formuladas con aceite de pescado con altas concentraciones de ácidos EPA y DHA resulta necesario estabilizar las emulsiones por un tiempo mayor a 120 h (5 días), para evitar la separación de las fases y seguir evaluando la estabilidad oxidativa de los sistemas modelo por un tiempo mayor.

Resultaría interesante determinar la presencia y concentración de iones metálicos en el extracto crudo y de esta manera comprobar que estuvieron involucrados en la aceleración de la oxidación de las emulsiones cárnicas modelo.

Aunque la habilidad de las proteínas miofibrilares extraídas del músculo de cerdo *Longissimus dorsi* (lomo) para formar y estabilizar emulsiones ha sido documentada, se sugiere formar emulsiones modelo utilizando extractos miofibrilares de otros músculos de cerdo y de otras especies animales para comparar su respuesta con el extracto proteico miofibrilar obtenido de lomo de cerdo, el cual se empleó en esta tesis para formular las emulsiones cárnicas modelo.

Se podría aplicar la metodología de superficies de respuesta para investigar el efecto de la adición de otros compuestos naturales como: polisacáridos, péptidos, etcétera, en el aumento de la estabilidad física de las emulsiones cárnicas.

Aunque el índice de estabilidad de la emulsión (ESI) es una medida rápida que brinda información sobre el tiempo que tardan las fases en comenzar a separarse, es aconsejable medir la estabilidad de las emulsiones o/w, en términos del tamaño promedio de los glóbulos de la emulsión. Esto puede realizarse en términos del diámetro $d_{4,3}$ y $d_{3,2}$, ambos reportados en μm .

CAPITULO 13
REFERENCIAS

- Ahn JH, Kim YP, Lee YM, Seo EM, Lee KW, Kim HS. (2008). Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. *Food Chemistry* 107: 98-105.
- Alamed J, McClements DJ, Decker EA. (2006). Influence of heat processing and calcium ions on the ability of EDTA to inhibit lipid oxidation in oil-in-water emulsions containing omega-3 fatty acids. *Food Chemistry* 95: 585-590.
- Álvarez D, Castillo M, Payne FA, Garrido MD, Bañón S y Xiong YL. (2007). Prediction of meat emulsion stability using reflection photometry. *Journal of Food Engineering* 82: 310-315.
- Badui Dergal S (1990). *Química de los alimentos*. Segunda edición. Alhambra Mexicana. D.F., México.
- Basu S, Kandhari A y Negi AS. (2004). Creaming rate of amyl alcohol-in-water emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology* 25: 823-826.
- Bauch A, Lindtner O, Mensink GBM y Niemann B. (2006). Dietary intake and sources of long-chain n-3 PUFAs in German adults. *European Journal of Clinical Nutrition* 60: 810-812.
- Bentley G. (2007) The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Nutrition Bulletin* 32: 82-84.
- Boles JA, Parrish Jr. FC, Huiatt TW, Robson RM. (1992). Effect of porcine stress syndrome on the solubility and degradation of myofibrillar/cytoskeletal proteins. *Journal of Animal Science* 70: 454-464.
- Bos MA, van Vliet T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Advances in Colloid and Interface Science* 91: 437-471.
- Bou R, Codony R, Tres A, Decker EA, Guardiola F. (2008). Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by ferrous oxidation-xylenol orange method: A review of the factor that influence the method's performance. *Analytical Biochemistry* 337:1-15.
- Cameron DR, Weber ME, Idziak ES, Neufeld RJ, Cooper DG. (1991). Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: Correction of the formula for emulsifying activity index. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 655-659.

- Careche M, Cofrades S, Carballo J, Jiménez Colmenero F. (1998). Emulsifying and gelation properties during freezing and frozen storage of hake, pork, and chicken actomyosins as affected by addition of formaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 813-819.
- Cho YJ, Alamed J, McClements DJ, Decker EA. (2003). Ability of chelators to alter the physical location and prooxidant activity of iron in oil-in-water emulsions. *Journal of Food Science* 68: 1952–1957.
- Chou R-GR. (2002). *Post mortem* changes in porcine longissimus muscle incubated with 0.1 M calcium lactate. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 40-44.
- Chua SC, Tan CP, Mirhosseini H, Lai OM, Long K, Baharin BS. (2009). Optimization of ultrasound extraction condition of phospholipids from palm-pressed fiber. *Journal of Food Engineering* 92: 403-409.
- CRA (Corn Refiners Association). (2006). *Corn Oil*. Quinta edición. Washington D.C., USA: Corn Refiners Association.
- Crowe TD, White PJ. (2001). Adaptation of the AOCS Official Method for measuring hydroperoxides from small-scale oil samples. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78: 1267-1269.
- Dagorn-Scaviner C, Gueguen J, Lefebvre J. (1987). Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorption behaviors. *Journal of Food Science* 52: 335- 341.
- Damodaran S. (1997). Function properties. En: *Food proteins: Properties and characterization*. Editores, Nakai S, Modler HW. VHC, New York.
- Decker EA, Warner K, Richards MP, Shahidi F. (2005). Measuring antioxidant activity effectiveness in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4303-4310.
- DeLong JM, Prange RK, Hodges DM, Forney CF, Bishop MC, Quilliam M. (2002). Using a modified ferrous oxidation-xylenol orange (FOX) assay for detection of lipid hydroperoxides in plant tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 248-254.
- Dimakou CP, Kiokias SN, Tsaprouni IV, Oreopoulou V. (2007). Effect of processing and storage parameters on the oxidative deterioration of oil-in-water emulsions. *Food Biophysics* 2:38-45.

- Dupont J, White PJ, Carpenter MP, Schaefer EJ, Meydani SN, Elson CE, Woods M, Gorbach SL. (1990). Food uses and health effects of corn oil. *Journal of the American College of Nutrition* 9: 438-470.
- Eymard S, Genot C. (2003). A modified xylenol orange method to evaluate formation of lipid hydroperoxides during storage and processing of small pelagic fish. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105: 497-501.
- Feiner G. (2006). *Meat products handbook: Practical science and technology*. Abington Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.
- Feng J, Xiong YL. (2003). Interaction and functionality of mixed myofibrillar and enzyme hydrolyzed soy proteins. *Journal of Food Science* 68: 803-809.
- Firestone D. (1995). *Fats and Oils*. En: *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16a edición. Editor, Cunniff P. Arlington, Virginia.
- Fomuso LB, Corredig M, Akoh CC. (2002). Effect of emulsifiers on oxidation properties of fish oil-based structured lipids emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2957-2961.
- Frankel EN, Satué-Gracia T, Meyer AS, German JB. (2002). Oxidative stability of fish and algae oils containing long-chain polyunsaturated fatty acids in bulk and in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2094-2099.
- Friberg SE. (2007). Some emulsion features. *Journal of Dispersion Science and Technology* 28:1299-1308.
- Galazka VB, Dickinson E, Ledward DA. (2000). Emulsifying properties of ovalbumin in mixtures with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high pressure treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1219-1229.
- Gómez-Meza N, Higuera-Ciápura I, Calderon de la Barca AM, Vázquez-Moreno L, Noriega-Rodríguez J, Angulo-Guerrero O. (1999). Seasonal variation in the fatty acid composition and quality of sardine oil from *Sardinops sagax caeruleus* of the Gulf of California. *Lipids* 34: 639-642.

- García-Barrientos R. (2007). Efecto de enzimas proteolíticas endógenas y una bacteriana en la formación de emulsiones modelo a partir de músculo estriado de cazón (*Rhizopriondon terraenovae*) y cerdo. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México.
- Giacometti J, Tomljanovic AB, Milin C, Cuk M, Radosevic Stasic B. (2012). Olive and corn oil enriched diets changed the phospholipid fatty acid composition in mice liver after one-third hepatectomy. *Food and Nutrition Sciences* 3: 240-248.
- Givens DI, Gibbs RA. (2006). Very long chain *n*-3 polyunsaturated fatty acids in the food chain in the UK and the potential of animal-derived foods to increase intake. *Nutrition Bulletin* 31: 104-110.
- Goffman FD, Böhme T. (2001). Relationship between fatty acid profile and vitamin E content in maize hybrids (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4990-4994.
- Gordon A, Barbut S. (1992). Mechanisms of meat batter stabilization: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32: 299-332.
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. (1948). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry* 177: 751-766.
- Grau A, Codony R, Rafecas M, Barroeta AC y Guardiola F. (2000). Lipid hydroperoxide determination in dark chicken meat through a ferrous oxidation-xylenol orange method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 4136-4143.
- Gülseren I, Güzey D, Bruce BD, Weiss J. (2007). Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrasonics Sonochemistry* 14: 173-183.
- Harpaz S, Eshel A, Lindner P. (1994). Effect of 1-propanol on the activity of intestinal proteolytic enzymes of the European Sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 49-52.
- Harris WS. (2007). *n*-3 Fatty acid fortification: opportunities and obstacles. *British Journal of Nutrition* 97: 593-595.
- Hauman BF. (1985). Corn oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 62: 1524-1531.

- Hayashi Y, Li C-P, Enomoto H, Ibrahim HR, Sugimoto Y, Aoki T (2008). Improvement of functional properties of ovotransferrin by phosphorylation through dry-heating in the presence of pyrophosphate. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 21: 596-602.
- Hornstra G (2002). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and health benefits. Roche Vitamins Europe NutriScience. Maastricht, Países Bajos.
- Hu M, McClements DJ, Decker EA. (2003). Impact of whey protein emulsifiers on the oxidative stability of salmon oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 1435-1439.
- Hung SC, Zayas JF. (1991). Emulsifying capacity and emulsion stability of milk proteins and corn germ protein flour. *Journal of Food Science* 56: 1216-1223.
- Jafari SM, Assadpoor E, He Y, Bhandari BR. (2008). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids* 22: 1191-1202.
- Joglekar AM, May AT. (1987). Product excellence through design of experiments. *Cereal Foods World* 32: 857-868.
- Juliano P, Kutter A, Cheng LJ, Swiergon P, Mawson R, Augustin MA. (2011). Enhanced creaming of milk fat globules in milk emulsions by the application of ultrasound and detection by means of optical methods. *Ultrasonics Sonochemistry* 18: 963-973.
- Jung MO, Ju JW, Choi DS, Yoon SH, Jung MY. (2002). CLA formation in oils during hydrogenation process as affected by catalyst types, catalyst contents, hydrogen pressure, and oil species. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79: 501-510.
- Karaca AC, Nickerson MT, Low NH. (2011). Lentil and chickpea protein-stabilized emulsions: optimization of emulsion formulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 13203-13211.
- Karaçalı M, Bulut S, Konuk M, Solak K. (2011). Seasonal variations in fatty acid composition of different tissues of mirror carp, *Cyprinus carpio*, in Orenler Dam Lake, Afyonkarahisar, Turkey. *International Journal of Food Properties* 14: 1007-1017.
- Kartal M, Kurucu S, Aslan S, Özbay Ö, Ceyhan T, Sayar E, Cevheroğlu Ş. (2003). Comparison of ω -3 fatty acids by GC-MS in frequently consumed fish and fish oil preparations on the Turkish market. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences* 28:201-205.

- Kellerby SS, Gu YS, McClements DJ, Decker EA. (2006). Lipid oxidation in a Menhaden oil-in-water emulsion stabilized by sodium caseinate cross-linked with transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 10222-10227.
- Kim HJ, Choi SJ, Shin WS, Moon TW. (2003). Emulsifying properties of bovine serum albumin-galactomannan conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 1049-1056.
- Kolanowski W, Jaworska D, Weißbrodt. (2007). Review: Importance of instrumental and sensory analysis in the assessment of oxidative deterioration of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid-rich foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 181-191.
- Koocheki A, Taherian AR, Razavi SMA, Bostan A. (2009). Response surface methodology for optimization of extraction yield, viscosity, hue and emulsion stability of mucilage extracted from *Lepidium perfoliatum* seeds. *Food Hydrocolloids* 23: 2369-2379.
- Kuehl RO. (2003). *Diseño de experimentos: Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación*. Segunda edición. Ciudad de México: Thomson Learning.
- Lad VN, Murthy ZVP. (2012). Enhancing the stability of oil-in-water emulsions emulsified by coconut milk protein with the application of acoustic cavitation. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 51: 4222-4229.
- Ladikos D, Lougovois V. (1990). Lipid oxidation in muscle foods: a review. *Food Chemistry* 33: 295-314.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage t4. *Nature* 227: 680-685.
- León OG, Montero I. (2001). Cómo explicar el concepto de interacción sin estadística: análisis gráfico de todos los casos posibles en un diseño 2 x 2. *Psicothema* 13: 159-165
- Leong TSH, Wooster TJ, Kentish SE, Ashokkumar M. (2009). Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry* 16: 721-727.
- Li CT. (2006). Myofibrillar protein extracts from spent hen meat to improve whole muscle processed meats. *Meat Science* 72:581-583.
- Loovas E. (1992). A sensitive spectrophotometric method for lipid hydroperoxide determination. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 69: 777-783.

- Lorimer JP, Mason TJ. (1987). Sonochemistry part 1. The physical aspects. *Chemical Society Reviews* 16: 239-274.
- Martínez Téllez G, Hernández Tápanez R, Díaz Gómez M. (2005). Determinación de hidroperóxidos totales en aceite de girasol ozonizado mediante el método de oxidación ferrosa en xilenol naranja. *Grasas y aceites* 56: 147-152.
- McClements DJ. (2007). Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47:611–649.
- Mine Y, Noutomi T, Haga N. (1991). Emulsifying and structural properties of ovalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 443-446.
- Mirhosseini H, Tan CP, Hamid NSA, Yusof S. (2008). Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil on flavor release from diluted orange beverage emulsion. *Food Chemistry* 107: 161-1172.
- Montgomery DC. (2008). *Diseño y análisis de experimentos. Segunda edición.* Ciudad de México: Limusa Wiley.
- Mora-Gutiérrez A, Attaie R, Farrell HM Jr. (2010). Lipid oxidation in algae oil-in-water emulsions stabilized by bovine and caprine caseins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 5131-5139.
- Moreau RA, Lampi AM, Hicks KB. (2009). Fatty acid, phytosterol, and polyamine conjugate profiles of edible oils extracted from corn germ, corn fiber, and corn kernels. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 86: 1209-1214.
- Mosavian MTH, Hassani A. (2010). Making oil-in-water emulsions by ultrasound and stability evaluation using Taguchi method. *Journal of Dispersion Science and Technology* 31: 293-298.
- Mu TH, Tan SS, Chen JW, Xue YL. (2009). Effect of pH and NaCl/CaCl₂ on the solubility and emulsifying properties of sweet potato protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 337-342.
- Narayan B, Miyashita K, Hosakawa M. (2006). Physiological effects of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) a review. *Food Reviews International* 22: 291-307.

- Nawar WW. (2000). Lípidos. En: Química de los alimentos. Segunda edición. Editorial ACRIBIA, S. A., Zaragoza, España.
- Ngapo T, Wilkinson B, Chong R, Haisman D. (1992). Gelation of bovine myofibrillar protein induced by 1,5-gluconolactone. En: 38th International Congress of Meat Science and Technology, Clermont-Ferrand, Francia. pp. 1095-1098.
- Nielsen NS, Petersen A, Meyer AS, Timm-Heinrich M y Jacobsen C. (2004). Effects of lactoferrin, phytic acid, and EDTA on oxidation in two food emulsions enriched with long-chain polyunsaturated fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 7690-7699.
- Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Birlouez-Aragon I, Wolff SP. (1995). Measurement of hydroperoxides in edible oils using the ferrous oxidation in xylenol orange assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 17-21.
- O'Neill E, Morrissey PA, Mulvihill DM. (1990). The surface-active properties of muscle proteins. *Food Chemistry* 35:1-12.
- Okuyama H, Orikasa Y, Nishida T. (2008). Significance of antioxidative functions of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in marine microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 570-574.
- Onsaard E, Pomsamud P, Audtum P. (2010). Functional properties of sesame protein concentrates from sesame meal. *Asian Journal of Food and Agro-Industry* 3: 420-431.
- Palazolo GG, Sorgentini DA, Wagner JR. (2004). Emulsifying properties and surface behavior of native and denatured whey soy proteins in comparison with other proteins. Creaming stability of oil-in-water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 81: 625-632.
- Patist A, Bates D. (2008). Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9:147-154.
- Pearce NK, Kinsella JE. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of turbidimetric technique. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 26: 716-723.
- Petursson S, Decker EA, McClements DJ. (2004). Stabilization of oil-in-water emulsions by cod protein extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:3996-4001.

- Pierini M, Punta C. (2006). New developments in peroxidation of polyunsaturated fatty acids. *Letters in Organic Chemistry* 3:91-97.
- Pour-El A. (1981). Protein functionality: classification, definition and methodology. En: Protein functionality. Cherry (Ed). ACS Symposium Series 147. Nueva York.
- Punta C, Rector CL, Porter NA. (2005). Peroxidation of polyunsaturated fatty acid methyl esters catalyzed by n-methyl benzohydroxamic acid: a new and convenient method for selective synthesis of hydroperoxides and alcohols. *Chemical Research in Toxicology* 18: 349-356.
- Qi M, Hettiarachchy NS, Kalapathy U. (1997). Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. *Journal of Food Science* 62: 1110-1115.
- Refsgaard HHF, Tsai L, Stadtman ER. (2000). Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 611-616.
- Ries D, Ye A, Haisman D, Singh H. (2010). Antioxidant properties of caseins and whey proteins in model oil-in-water emulsions. *International Dairy Journal* 20: 72-78.
- Sato R, Katayama S, Sawabe T, Saeki H. (2003). Stability and emulsion-forming ability of water-soluble fish myofibrillar protein prepared by conjugation with alginate oligosaccharide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4376-4381
- Schut J. (1976). Meat emulsions. En: Food emulsions. Editor Friberg S. Marcel Dekker Inc. Nueva York.
- Skaara T, Regenstein JM. (1990). The structure and properties of myofibrillar proteins in beef, poultry and fish. *Journal of Muscle Food* 1:269-291.
- Stanner S. (2000). n-3 fatty acids and health. *Nutrition Bulletin* 25: 81-84.
- Subagio A. (2006). Characterization of hyacinth bean (*Lablab purpureus* (L.) sweet) seeds from Indonesia and their protein isolate. *Food Chemistry* 95: 65-70.
- Talpur MY, Sherazi STH, Mahesar SA, Bhutto AA. (2010). A simplified UV spectrometric method for determination of peroxide value in thermally oxidized canola oil. *Talanta* 80: 1823-1826.

- Tang CH, Ten Z, Wang XS, Yang XQ. (2006). Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa L.*) protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8945-8950.
- Tokuşoğlu Ö. (2008). Conjugated linoleic acid (CLA). Cis 9, trans 11 and trans 10, cis 12 isomer detection in crude and refined corn oils by capillary GC. *Grasas y Aceites* 59: 146-151.
- Turan H, Kaya Y, Erkoyuncu I. (2007). Protein and lipid content and fatty acid composition of anchovy meal produced in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 31: 113-117.
- Turgeon SL, Gauthier SF, Mollé D, Léonil J. (1992). Interfacial properties of tryptic peptides of β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 669-675.
- Valenti P, Antonini G, Rossi Fanelli MR, Orsi N, Antonini E. (1982). Antibacterial activity of matrix-bound ovotransferrin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 21: 840-841.
- Vosburgh R. (2008). The DHA debate. *Supermarket News* 4: 20.
- Wagner JR. (2000). Propiedades superficiales. En: *Caracterización Funcional y Estructural de Proteínas*. Editorial Ceudeba, Buenos Aires.
- Waraho T, McClements DJ, Decker EA. (2011). Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends in Food Science & Technology* 22: 3-13.
- Warude D, Kalpana J. (2006). Polyunsaturated fatty acids: Biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology* 26: 83-93.
- Westphalen AD, Briggs JL, Lonergan SM. (2006). Influence of muscle type on rheological properties of porcine myofibrillar protein during heat-induced gelation. *Meat Science* 72: 697-703.
- Whipple G, Koohmaraie M. (1991). Degradation of myofibrillar proteins by extractable lysosomal enzymes and m-calpain, and the effects of zinc chloride. *Journal of Animal Science* 69: 4449-4460.
- Winkler-Moser JK, Breyer L. (2011). Composition and oxidative stability of crude oil extracts of corn germ and distillers grains. *Industrial Crops and Products* 33: 572-578.
- www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/grn000138.pdf (Enero de 2013).

www.ocean-nutrition.com (Octubre de 2008).

Xu K, Yao P. (2009). Stable oil-in-water emulsions prepared from soy protein-dextran conjugates. *Langmuir* 25: 9714-9720.

Yildiz G, Wehling RL, Cuppett SL. (2003). Comparison of four analytical methods for the determination of peroxide value in oxidized soybean oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80: 103-107.

Zhang T, Jiang B, Mu W, Wang Z. (2009) Emulsifying properties of chickpea protein isolates: influence of pH and NaCl. *Food Hydrocolloids* 23: 146-152.

Zlatanov S, Laskaridis K. (2007). Seasonal variation in the fatty acid composition of three Mediterranean fish-sardine (*Sardina pilchardus*), anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and picarel (*Spicara smaris*). *Food Chemistry* 103: 725-728.

Zorba O. (2006). The effects of the amount of emulsified oil on the emulsion stability and viscosity of myofibrillar proteins. *Food Hydrocolloids* 20:698-702.

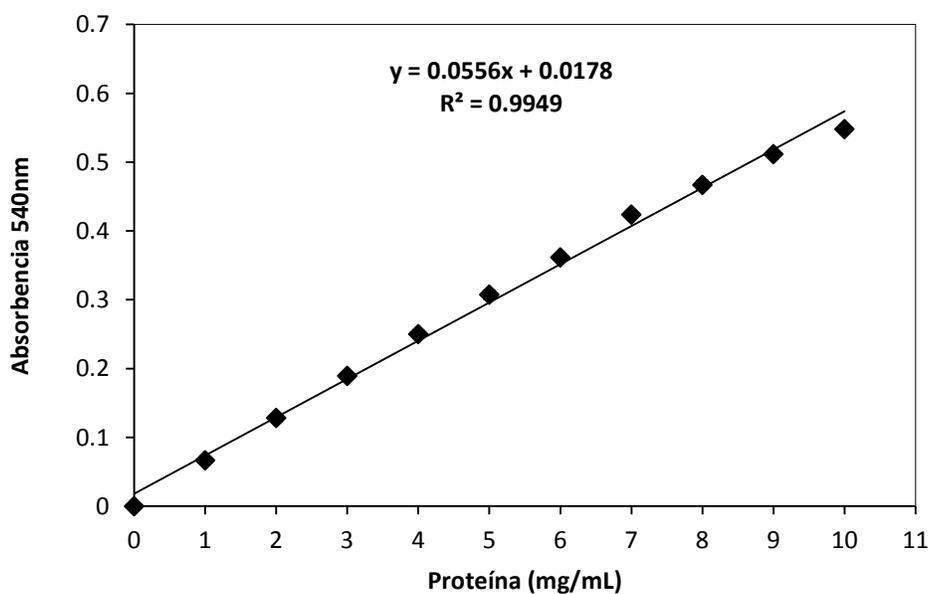
CAPITULO 14

ANEXOS

Anexo I. Curva patrón para la determinación de proteína por el método de Biuret (Gornall et al., 1949).

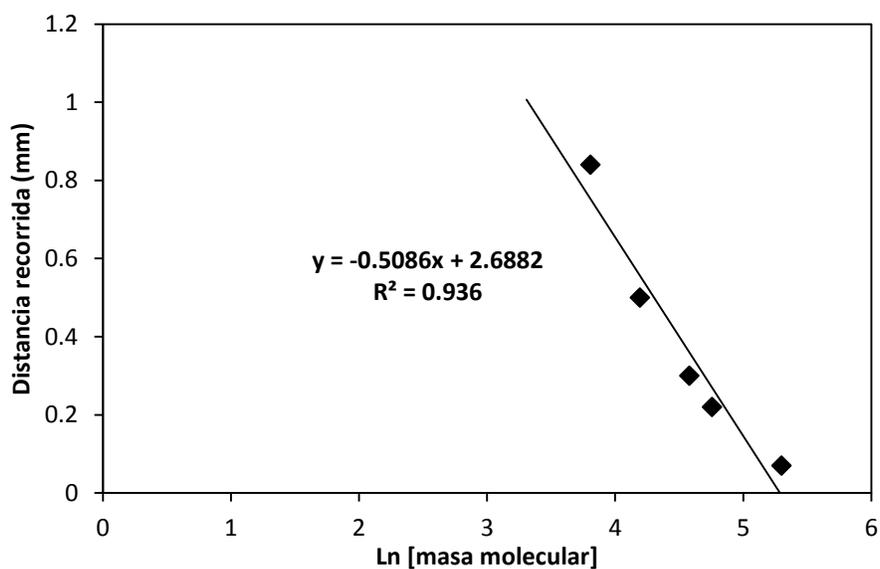
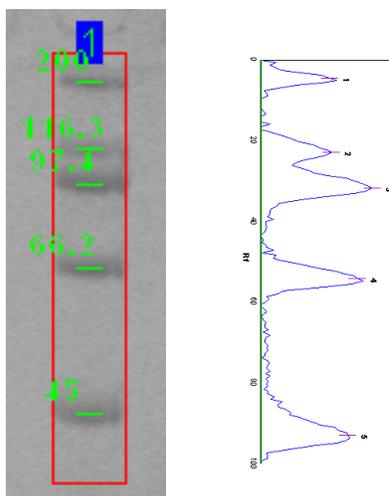
La cantidad de proteína miofibrilar o bien ovoalbúmina, se cuantificó por espectrofotometría de luz visible midiendo la absorbencia de soluciones de proteína a una longitud de onda $\lambda = 540$ nm, contra un blanco. Los datos obtenidos se interpolaron en una curva patrón de ovoalbúmina en un intervalo de concentración de 0- 10 mg/mL.

Ovoalbúmina mg/mL	Absorbencia 540 nm			Promedio	Desviación estándar
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
1	0.0670	0.0657	0.0675	0.0667	0.0009
2	0.1282	0.1258	0.1309	0.1283	0.0026
3	0.1863	0.1898	0.1922	0.1894	0.0030
4	0.2456	0.2484	0.2565	0.2502	0.0057
5	0.3016	0.3065	0.3144	0.3075	0.0065
6	0.3607	0.3577	0.3665	0.3616	0.0045
7	0.4252	0.4195	0.4269	0.4239	0.0039
8	0.4651	0.4620	0.4740	0.4670	0.0062
9	0.5091	0.5097	0.5164	0.5117	0.0041
10	0.5487	0.5449	0.5506	0.5481	0.0029



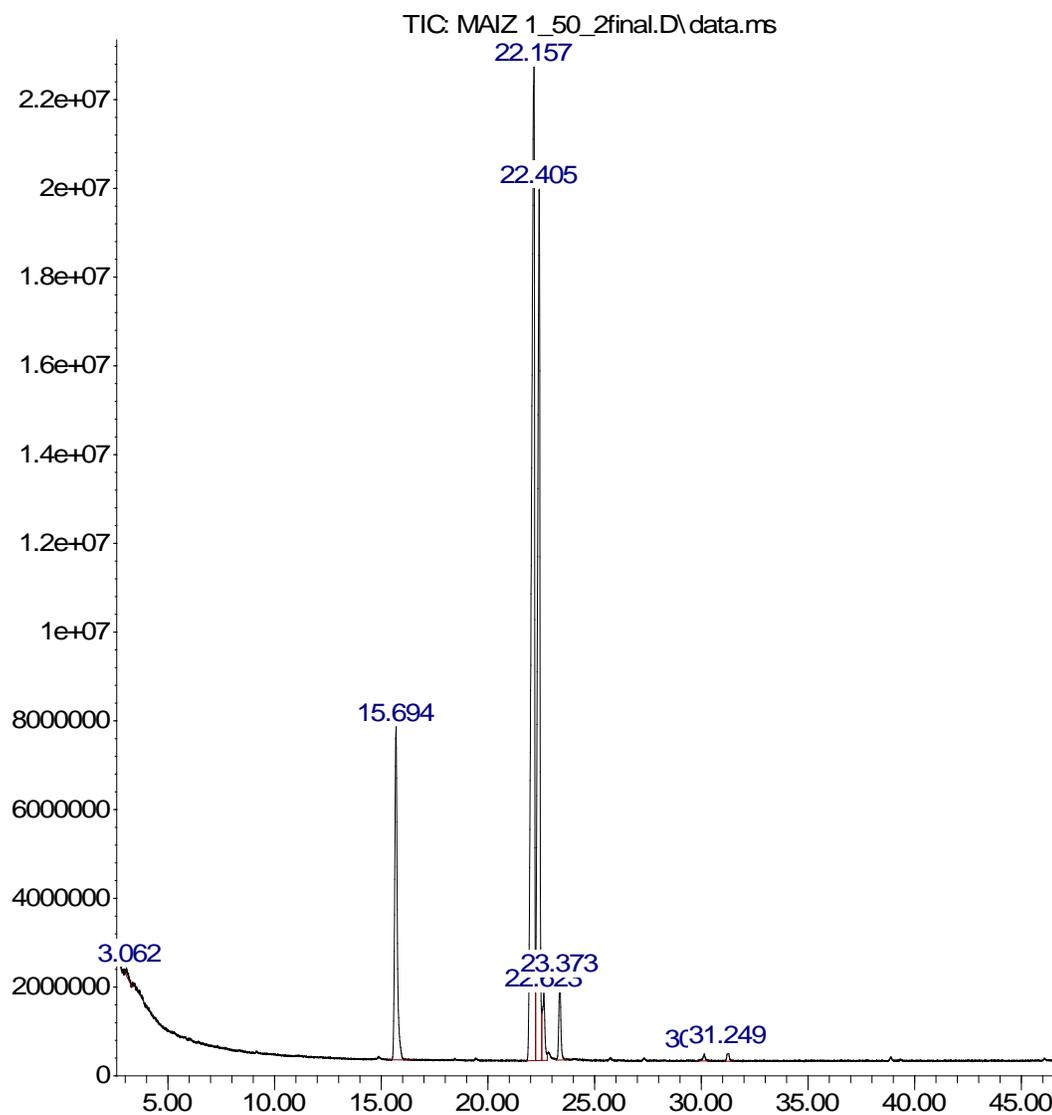
Anexo II. Curva patrón para estimar masas moleculares de proteínas separadas por electroforesis SDS-PAGE.

El marcador de proteínas de pesos moleculares conocidos contenía: miosina (200 kDa), β -galactosidasa (116.25 kDa), fosforilasa b (97.4 kDa), albúmina bovina (66.2 kDa), ovoalbumina (45 kDa).



Anexo IV. Cromatograma del perfil de ácidos grasos de aceite de maíz obtenido por CG-MS.

Abundance

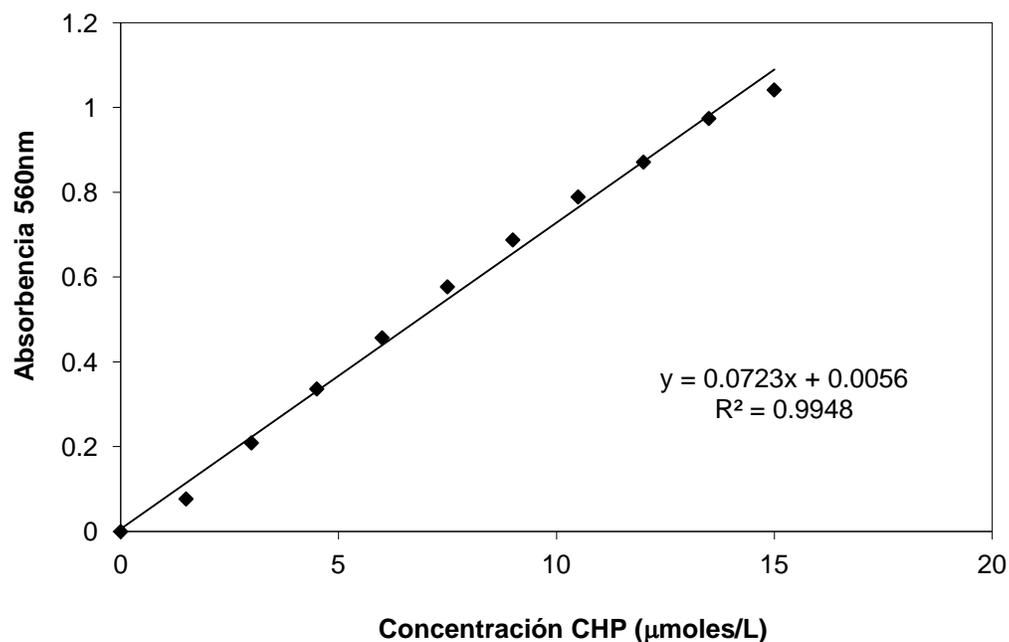


Time-->

Anexo V. Curva patrón para cuantificar hidroperóxidos durante la adaptación del método FOX2.

La adaptación del método FOX2 para cuantificar hidroperóxidos en aceite de pescado MEG3-® y en aceite de maíz requirió de la preparación de una curva patrón de hidroperóxido de cumeno (CHP), usado como estándar, en un intervalo de concentración 0-15 μM .

Hidroperóxido de cumeno (CHP) $\mu\text{moles/L}$	Absorbencia 560 nm			Promedio	Desviación estándar
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
0.0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
1.5	0.0704	0.0830	0.0776	0.0770	0.0063
3.0	0.2116	0.2098	0.2062	0.2092	0.0027
4.5	0.3379	0.3304	0.3413	0.3365	0.0056
6.0	0.4507	0.4560	0.4644	0.4570	0.0069
7.5	0.5842	0.5758	0.5720	0.5773	0.0062
9.0	0.6890	0.6792	0.6959	0.6880	0.0084
10.5	0.8044	0.7763	0.7876	0.7894	0.0141
12.0	0.8881	0.8728	0.8538	0.8716	0.0172
13.5	0.9725	0.9715	0.9791	0.9744	0.0041
15.0	1.0301	1.0496	1.0457	1.0418	0.0103



Anexo VI. Ejemplo de los datos del DCC para la optimización de EAI por MSR en emulsiones modelo cárnicas preparadas con aceite de maíz como fase dispersa.

DISEÑO CENTRAL COMPUESTO				Datos para calcular EAI					
Orden	Bloque	Proteína (mg/mL)	Aceite (%)	Abs (500 nm)	Proteína (g/m ³)	Fracción de aceite Φ	Factor de dilución FD	Ancho de celda (m)	EAI (m ² /g)
						0.25	100	0.01	
1	1	2	25	0.4749	2000	0.25			14.583
2	1	1.25	20	0.3516	1250	0.2			16.195
3	1	2	15	0.4040	2000	0.15			10.946
4	1	0.5	15	0.2059	500	0.15			22.315
5	1	1.25	20	0.3383	1250	0.2			15.582
6	1	0.19	20	0.2299	189	0.2			69.909
7	1	2.31	20	0.4811	2311	0.2			11.988
8	1	1.25	27.07	0.3937	1250	0.2707			19.892
9	1	1.25	20	0.3452	1250	0.2			15.900
10	1	1.25	12.93	0.3188	1250	0.1293			13.491
11	1	1.25	20	0.3346	1250	0.2			15.412
12	1	0.5	25	0.3245	500	0.25			39.857
13	2	2	25	0.4253	2000	0.25			13.060
14	2	1.25	20	0.3883	1250	0.2			17.885
15	2	2	15	0.4143	2000	0.15			11.225
16	2	0.5	15	0.2242	500	0.15			24.298
17	2	1.25	20	0.3825	1250	0.2			17.618

18	2	0.19	20	0.2602	189	0.2		79.122
19	2	2.31	20	0.5108	2311	0.2		12.728
20	2	1.25	27.07	0.4164	1250	0.2707		21.040
21	2	1.25	20	0.3471	1250	0.2		15.987
22	2	1.25	12.93	0.3502	1250	0.1293		14.820
23	2	1.25	20	0.3376	1250	0.2		15.550
24	2	0.5	25	0.3117	500	0.25		38.285
25	3	2	25	0.4680	2000	0.25		14.371
26	3	1.25	20	0.3698	1250	0.2		17.033
27	3	2	15	0.4322	2000	0.15		11.710
28	3	0.5	15	0.2314	500	0.15		25.078
29	3	1.25	20	0.3167	1250	0.2		14.587
30	3	0.19	20	0.2779	189	0.2		84.505
31	3	2.31	20	0.4477	2311	0.2		11.155
32	3	1.25	27.07	0.3838	1250	0.2707		19.392
33	3	1.25	20	0.3314	1250	0.2		15.264
34	3	1.25	12.93	0.3160	1250	0.1293		13.373
35	3	1.25	20	0.3694	1250	0.2		17.015
36	3	0.5	25	0.3169	500	0.25		38.924

Los valores de EAI se calcularon con la expresión: $EAI (m^2 / g) = \frac{2T}{(1-\Phi)C}$

Donde Φ es la fracción de aceite y C es la concentración de proteína (g/m^3). La turbidez, T , se calculó con la ecuación $(2.303 \times A \times FD) / L$, donde A corresponde a la absorbencia detectada a 500 nm, FD al factor de dilución (100) y L al ancho de celda (0.01 m).

Los valores calculados de EAI se procesaron con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI versión 16.0.07, para obtener una superficie de respuesta, ajustar un modelo en función a los factores evaluados (concentración de proteína y aceite) y optimizar el EAI.

Anexo VII. Ejemplo de la optimización de EAI por MSR en emulsiones modelo cárnicas preparadas con aceite de maíz como fase dispersa, con ayuda de Statgraphics Centurion XVI.

Analyze Experiment – EAI

Analysis Summary

File name: C:\Documents and Settings\Proprietario\Mis documentos\Doctorado Violeta\Tecnicas
pCentral composite design: 2² + star

Estimated effects for EAI

```
-----
average      = 14.7225  +/- 1.73069
A:PROTEINA   = -32.7003 +/- 3.1598
B:ACEITE     = 6.65541  +/- 3.15979
AA           = 25.0068  +/- 3.46139
AB           = -6.20723 +/- 4.46863
-----
```

Standard errors are based on total error with 31 d.f.

Analysis of Variance for EAI

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:PROTEINA	6415.85	1	6415.85	107.10	0.0000
B:ACEITE	265.768	1	265.768	4.44	0.0434
AA	3126.71	1	3126.71	52.19	0.0000
AB	115.589	1	115.589	1.93	0.1747
Total error	1857.08	31	59.9059		

Total (corr.)	11781.0	35			

R-squared = 84.2366 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 82.2026 percent

Regression coeffs. for EAI

```
-----
constant     = 42.7029
A:PROTEINA   = -60.8183
B:ACEITE     = 1.70008
AA           = 22.2283
AB           = -0.827631
-----
```

The StatAdvisor

This pane displays the regression equation which has been fitted to the data. The equation of the fitted model is

$$\text{EAI} = 42.7029 - 60.8183 \cdot \text{PROTEINA} + 1.70008 \cdot \text{ACEITE} + 22.2283 \cdot \text{PROTEINA}^2 - 0.827631 \cdot \text{PROTEINA} \cdot \text{ACEITE}$$

Optimize Response

Goal: maximize EAI

Optimum value = 73.7653

Factor	Low	High	Optimum
PROTEINA	0.18934	2.31066	0.18934
ACEITE	12.9289	27.0711	27.0711

Estimation Results for EAI

Row	Observed Value	Fitted Value	Lower 95.0% CL for Mean	Upper 95.0% CL for Mean
1	22.3147	37.1447	30.0852	44.2043
2	16.1947	14.7225	11.1927	18.2523
3	69.9086	62.8519	55.7924	69.9115
4	15.5821	14.7225	11.1927	18.2523
5	15.8999	14.7225	11.1927	18.2523
6	19.8921	19.4286	13.6645	25.1927
7	13.4914	10.0164	4.25229	15.7805
8	39.8573	50.0074	42.9478	57.0669
9	15.4117	14.7225	11.1927	18.2523
10	14.5826	11.0999	4.04034	18.1594
11	10.946	10.6517	3.59216	17.7113
12	11.9876	16.6068	9.54721	23.6663
13	24.298	37.1447	30.0852	44.2043
14	17.618	14.7225	11.1927	18.2523
15	79.1223	62.8519	55.7924	69.9115
16	15.9874	14.7225	11.1927	18.2523
17	15.5499	14.7225	11.1927	18.2523
18	21.039	19.4286	13.6645	25.1927
19	14.8203	10.0164	4.25229	15.7805
20	38.2851	50.0074	42.9478	57.0669
21	17.8851	14.7225	11.1927	18.2523
22	13.0595	11.0999	4.04034	18.1594
23	11.2251	10.6517	3.59216	17.7113
24	12.7277	16.6068	9.54721	23.6663
25	25.0783	37.1447	30.0852	44.2043
26	14.5872	14.7225	11.1927	18.2523
27	84.5046	62.8519	55.7924	69.9115
28	15.2643	14.7225	11.1927	18.2523
29	17.0146	14.7225	11.1927	18.2523
30	19.3918	19.4286	13.6645	25.1927
31	13.3729	10.0164	4.25229	15.7805
32	38.9238	50.0074	42.9478	57.0669
33	17.033	14.7225	11.1927	18.2523
34	14.3707	11.0999	4.04034	18.1594
35	11.7101	10.6517	3.59216	17.7113
36	11.1554	16.6068	9.54721	23.6663

The StatAdvisor

This table contains information about values of EAI generated using the fitted model. The table includes:

- (1) the observed value of EAI (if any)
- (2) the predicted value of EAI using the fitted model
- (3) 95.0% confidence limits for the mean response

Each item corresponds to the values of the experimental factors in a specific row of your data file.

Anexo VIII. Análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del tipo de emulsión y del porcentaje de amplitud de ultrasonido en el diámetro promedio de los glóbulos de aceite ($d_{3,2}$ en μm) en los sistemas o/w. Ejemplo de los datos obtenidos con ayuda del programa estadístico Minitab® v.11 (State College, PA, USA).

Estadística Tabulada: % Amplitud, emulsión modelo

Rows: % Amplitud Columns: Emulsión modelo

	Miofibrilar Maíz	Miofibrilar MEG-3®	ovoalbúmina maíz	ovoalbúmina MEG-3®	All
0	6.2033	4.3333	5.4467	5.0433	5.2567
30	1.7467	1.4700	1.5527	1.2174	1.4967
50	1.3433	1.2400	1.1800	0.9600	1.1808
70	1.7000	1.6433	1.0200	0.8667	1.3075
All	2.7483	2.1717	2.2998	2.0219	2.3104

Cell Contents --
d32: Mean

ANOVA: d3,2 versus emulsión modelo, % amplitud

Factor	Type	Levels	Values
Emulsión	fixed	4	miofibrilar-maíz miofibrilar-MEG3® ovoalbúmina-maíz ovoalbúmina-MEG3®
%Amplitud	fixed	4	0 30 50 70

Analysis of Variance for d32

Source	DF	SS	MS	F	P
Emulsión	3	3.533	1.178	11.18	0.000
%Amplitud	3	139.492	46.497	441.48	0.000
Error	41	4.318	0.105		
Total	47	147.343			

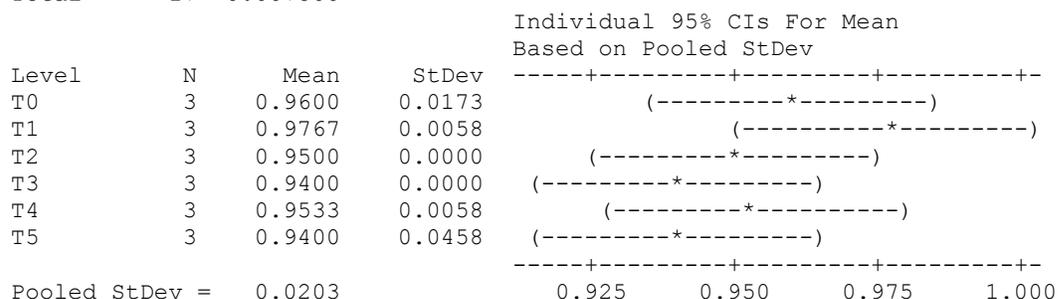
Anexo IX. Análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiple de Tukey, para determinar diferencias significativas ($P < 0.05$) en el diámetro promedio ($d_{3,2}$ en μm) de los glóbulos de aceite en emulsiones modelo almacenadas a 37 °C. Ejemplo para los sistemas ovoalbúmina-MEG-3® sonicados con una amplitud de ultrasonido de 50%. Los datos se analizaron con ayuda del programa estadístico Minitab® v.11 (State College, PA, USA).

One-way ANOVA: d[3,2] versus T (tiempo)

T0: después de formar la emulsión; T1: 24 h; T2: 48 h; T3: 72 h; T4: 96 h; T5: 120 h a 37°C

Analysis of Variance for D[3,2]

Source	DF	SS	MS	F	P
T (tiempo)	5	0.002867	0.000573	1.39	0.294
Error	12	0.004933	0.000411		
Total	17	0.007800			



Tukey's pairwise comparisons

Family error rate = 0.0500
Individual error rate = 0.00569

Critical value = 4.75

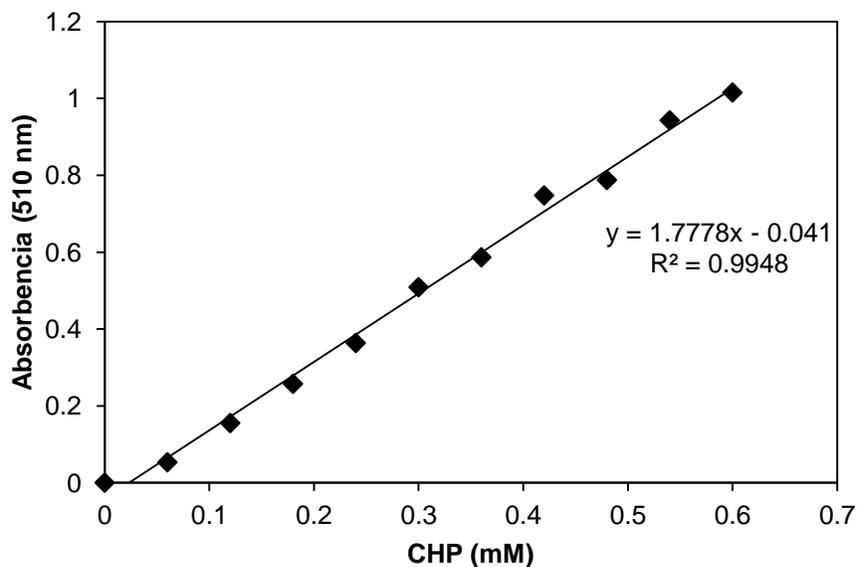
Intervals for (column level mean) - (row level mean)

	T0	T1	T2	T3	T4
T1	-0.07227 0.03894				
T2	-0.04560 0.06560	-0.02894 0.08227			
T3	-0.03560 0.07560	-0.01894 0.09227	-0.04560 0.06560		
T4	-0.04894 0.06227	-0.03227 0.07894	-0.05894 0.05227	-0.06894 0.04227	
T5	-0.03560 0.07560	-0.01894 0.09227	-0.04560 0.06560	-0.05560 0.05560	-0.04227 0.06894

Anexo X. Curva patrón para determinar productos primarios de oxidación (hidroperóxidos) en emulsiones modelo o/w.

Método espectrofotométrico basado en la reacción de tiocianato de amonio con solución de iones de hierro (obtenida de la mezcla de 0.132 M BaCl y 0.144 M FeSO₄). La cuantificación de hidroperóxidos se realiza interpolando los datos de absorbencia detectados a una longitud de onda $\lambda = 510$ nm, en una curva patrón de hidroperóxido de cumeno en un intervalo de concentración 0-0.6 mM.

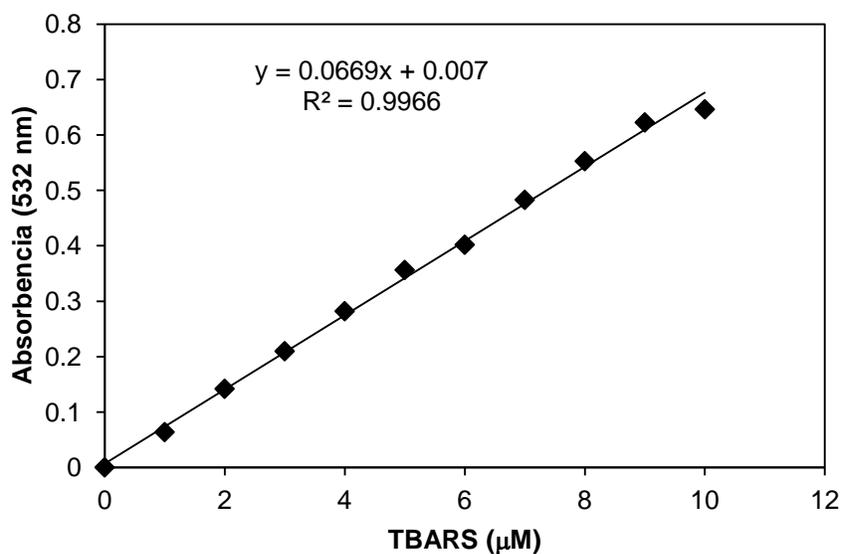
Hidroperóxido de cumeno (CHP) mM	Absorbencia 510 nm		Promedio	Desviación estándar
	Ensayo 1	Ensayo 2		
0.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.06	0.0550	0.0512	0.0531	0.0027
0.12	0.1669	0.1432	0.1551	0.0168
0.18	0.2722	0.2421	0.2572	0.0213
0.24	0.3652	0.3615	0.3634	0.0026
0.30	0.4996	0.5173	0.5085	0.0125
0.36	0.5723	0.6006	0.5865	0.0200
0.42	0.718	0.7764	0.7472	0.0413
0.48	0.7581	0.8167	0.7874	0.0414
0.54	0.8878	0.9973	0.9426	0.0774
0.60	0.9580	1.0722	1.0151	0.0808



Anexo XI. Curva patrón para determinar productos secundarios de oxidación (TBARS) en emulsiones modelo o/w.

La cantidad de TBARS en las emulsiones modelo se cuantificó por espectrofotometría de luz visible midiendo la absorbencia a una longitud de onda $\lambda = 532$ nm, contra un blanco. Los datos obtenidos se interpolaron en una curva patrón de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) en un intervalo de concentración 0- 10 μM .

TEP μM	Absorbencia 532 nm		Promedio	Desviación estándar
	Ensayo 1	Ensayo 2		
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
1	0.0653	0.0620	0.0637	0.0023
2	0.1324	0.1512	0.1418	0.0133
3	0.1975	0.2217	0.2096	0.0171
4	0.2693	0.2942	0.2818	0.0176
5	0.3618	0.3505	0.3562	0.0080
6	0.4033	0.4001	0.4017	0.0023
7	0.4928	0.4726	0.4827	0.0143
8	0.5678	0.5372	0.5525	0.0216
9	0.6489	0.5959	0.6224	0.0375
10	0.6855	0.6067	0.6461	0.0557



Anexo XII. Publicación en revista internacional indexada.

660719


AGREEMENT IN RELATION TO COPYRIGHT IN AN ARTICLE FOR A TAYLOR & FRANCIS/ROUTLEDGE JOURNAL

In order to ensure both the widest dissemination and protection of material published in our Journal, we ask Authors to transfer to the Publisher, Taylor & Francis, the rights of copyright in the Articles they contribute. This enables Taylor & Francis to ensure protection against infringement. The transfer of copyright must be clearly stated in writing.

PLEASE PROVIDE US WITH THE FOLLOWING INFORMATION, REVIEW OUR POLICIES, AND CONFIRM YOUR ACCEPTANCE OF THE TERMS OF THE ATTACHED ARTICLE PUBLISHING AGREEMENT BY SIGNING THIS FORM AS INDICATED BELOW.

Article (the "Article") entitled: EFFECT OF SAMPLE SOLUBILIZED ALIQUOT VOLUME AND CONCENTRATION ON HYDROPEROXIDE DETECTION IN PUFA-RICH FISH OIL Author(s): Violeta Ugalde-Benitez, Arturo Rojo-Dominguez, María Eugenia Jaramillo-Flores, Isabel Legarreta To be published in the journal (the "Journal"): International Journal of Food Properties (1094-2912)

ASSIGNMENT OF PUBLISHING RIGHTS

I hereby assign to Taylor & Francis the copyright in the above specified manuscript (government authors not transferring copyright hereby assign a non-exclusive licence to publish) and any accompanying tables, illustrations, data and any other supplementary information intended for publication in all forms and all media (whether known at this time or developed at any time in the future) throughout the world, in all languages, for the full term of copyright, to take effect if and when the article is accepted for publication. If I am one of several co-authors, I hereby confirm that I am authorized by my co-authors to grant this Licence as their agent on their behalf. For the avoidance of doubt, this assignment includes the rights to supply the article in electronic and online forms and systems.

I confirm that I have read and accept the full terms of the Journal's article publishing agreement attached to this form including my author warranties, and have reviewed the Journal's policies on Author Rights.

Signed: Isabel Guerrero Legarreta Name Printed: ISABEL GUERRERO-LEGARRETA
 Title and Company (if employer representative): _____ Date: JANUARY 23, 2012

Please return only this page completed and physically signed. You may submit by fax, postal mail, email, or upload to CATS.