

## **Estudio de emulsiones Pickering para la microencapsulación de aceites esenciales cítricos y su estabilización por liofilización**

*Rasia, Mercedes C.; Castagnini, Juan M.; Pereyra, Florencia; Capodoglio, Daniel L.; Gerard, Jorge A.; San Miguel, Silvina; Pagani, Carlos I.*

AUTORES: Facultad de Ciencias de la Alimentación. Universidad Nacional de Entre Ríos. (Concordia, Entre Ríos, Argentina).  
CONTACTO: [rasiam@fcal.uner.edu.ar](mailto:rasiam@fcal.uner.edu.ar)

### **Resumen**

El proyecto consistió en estudiar las propiedades físicas de emulsiones Pickering preparadas a partir de almidón de arroz químicamente modificado y aceite esencial de mandarina verde. Para realizar este estudio primero se obtuvieron los materiales y se caracterizaron. Se utilizó almidón de arroz de dos variedades, YERUA y GURI, que fue químicamente modificado con anhídrido octenil succínico. Se caracterizó tanto el almidón nativo como el almidón modificado para evaluar las diferencias entre las variedades. Se determinó la estabilidad de las emulsiones preparadas con diferentes concentraciones de almidón (50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600 mg/mL de aceite) para la misma relación de fases dispersa: continua (1:2). Las emulsiones que presentaron mejor estabilidad fueron las preparadas con el almidón modificado YERUA, desde 400 mg/mL. Luego del tratamiento térmico la emulsión de 600 mg/mL de esta misma variedad fue la única que se mantuvo estable durante el ciclo de congelación-descongelación, por lo que fue seleccionada para el ensayo de liofilización. A pesar de la estabilidad que presentó la emulsión, el porcentaje de recuperación de aceite fue muy bajo y pudo deberse a que la matriz encapsulante no encierra efectivamente al aceite esencial, el cual se volatiliza durante el proceso de liofilización.

**Palabras clave:** microencapsulación, emulsiones Pickering, liofilización, almidón de arroz, aceite esencial de cítricos

## Objetivos propuestos y cumplidos

### *Objetivo general*

El objetivo de este trabajo es preparar microcápsulas de aceite esencial de mandarina mediante liofilización, utilizando como agente encapsulante un almidón de arroz químicamente modificado con anhídrido octenil succínico.

### *Objetivos específicos*

- Estudiar la estabilidad en el tiempo de las emulsiones formadas con aceite esencial de mandarina y almidón modificado de arroz.
- Evaluar la influencia de diferentes relaciones aceite/almidón en la estabilidad de las emulsiones.
- Evaluar el efecto de una gelatinización parcial de los gránulos de almidón sobre la estabilidad de la emulsión.
- Estudiar la estabilidad de las emulsiones durante el ciclo de congelación previo al secado.
- Estudiar el proceso de liofilización de las emulsiones.
- Estudiar la estabilidad en el tiempo del producto seco obtenido de la liofilización.

De los objetivos propuestos se han cumplido todos salvo el estudio de la estabilidad del producto deshidratado. En los resultados obtenidos se explica la razón por la cual no se llegó a terminar esta actividad.

## Marco teórico

La microencapsulación permite la protección de un gran número de materiales bioactivos de interés para la industria de alimentos (Borgogna et al., 2010). Una característica común de los componentes a proteger es que estos son objeto de una rápida e indeseable degradación durante el procesamiento, almacenamiento y/o transporte del alimento (de Vos et al., 2010). Particularmente, la aplicación de la microencapsulación ha sido muy bien aceptada en la industria de sabores y aromas ya que la mayoría de los componentes asociados son volátiles y químicamente inestables en presencia de oxígeno, luz, agua y calor (Kaushik y Roos, 2007).

Los aceites esenciales son productos en los que se hallan concentrados sabores y aromas característicos, constituidos por mezclas complejas de hidrocarburos, compuestos oxigenados y residuos volátiles (Montti et al., 2013). Son compuestos muy inestables ante la acción de factores externos, por lo que la encapsulación es un proceso muy utilizado para aumentar su estabilidad y mejorar sus posibilidades de comercialización. Debido a su característica lipídica, para encapsularlos es necesario formar emulsiones con los compuestos de la matriz encapsulante.

La estabilización de las gotas en una emulsión se logra generalmente por la adición de surfactantes o emulsificantes, los cuales actúan por disminución de la tensión interfacial, por impedimento estérico y/o mediante repulsión electrostática entre las gotas. Para estabilizar emulsiones en la industria de alimentos se utilizan proteínas y algunos polisacáridos, especialmente goma arábiga, celulosa y almidones modificados (Rayner et al., 2012). Las emulsiones también pueden ser estabilizadas por partículas sólidas y son conocidas como emulsiones Pickering. En estas emulsiones las gotas de la fase dispersa son cubiertas por una capa de partículas sólidas que se adsorben en la interfase aceite-agua y reciben este nombre debido al primer investigador que las estudió (Pickering, 1907).

Esta capa gruesa de partículas previene la floculación de las gotas y la coalescencia por impedimento estérico (Dickinson, 2010). Según estudios previos (Yusoff y Murray, 2011; Marefati et al., 2013, 2015) estas emulsiones resultan muy estables contra la coalescencia y la maduración de Ostwald. La alta resistencia que tienen permite la elaboración de emulsiones altamente concentradas y estables, incluso cuando las gotas de la fase dispersa son grandes.

Los gránulos de almidón son utilizados para formar este tipo de emulsiones, principalmente los almidones que son modificados con anhídrido octenil succínico (OSA). Esta modificación le confiere a los almidones (naturalmente hidrofílicos) propiedades hidrofóbicas, aumentando su afinidad por la interfase aceite-agua. Además, las emulsiones pueden ser tratadas térmicamente para gelatinizar parcialmente la superficie de los gránulos que se encuentran en la interfase y mejora aún más su estabilidad (Timgren *et al.*, 2011; Marefati *et al.*, 2013).

Las emulsiones se pueden deshidratar para aumentar su estabilidad durante el almacenamiento y el transporte. Sin embargo, la deshidratación puede alterar las propiedades interfaciales y provocar la ruptura de la emulsión. La liofilización es un proceso donde el agua presente en el producto es cristalizada a bajas temperaturas (congelación) y luego es sublimada, donde pasa del estado de congelación a vapor directamente, por disminución de la presión que rodea al producto. Comparado con otros métodos de secado, la liofilización causa menos daño a las estructuras sensibles y así resulta muy útil para la conservación de alimentos sensibles al calor.

## Marco metodológico

### Materiales

Se utilizaron las variedades de arroz YERUA PA y GURI INTA CL cultivadas en la zona de Concordia (Entre Ríos, Argentina). El aceite esencial de mandarina verde fue provisto por Litoral Citrus S.A. (Concordia, Argentina). La caracterización del aceite esencial fue realizada por cromatografía gaseosa en donde se determinaron los principales componentes.

### Almidón de arroz

El almidón de arroz se extrajo a partir de la separación alcalina de las proteínas presentes en el arroz, utilizando el método propuesto en Cardoso *et al.* (2006) con algunas modificaciones. Para la modificación química del almidón de arroz se siguió el método utilizado en Song *et al.* (2006), el cual se basa en una patente de Caldwell y Wurzburg (1953). Este método es una esterificación entre el almidón y el ácido en un medio alcalino controlado.

La caracterización del almidón nativo y modificado se realizó por microscopía electrónica de barrido, en donde se observó la morfología de los gránulos de almidón. Además, se determinó la distribución de tamaño de partícula por difracción láser, se determinó la temperatura de gelatinización por calorimetría diferencial de barrido y se midieron las propiedades de pastificación con un analizador rápido de viscosidad.

Los resultados de tamaño de partícula fueron expresados como la distribución del tamaño de las partículas en volumen ( $D_{4,3}$ ) y la media del tamaño de la distribución de partículas en superficie ( $D_{3,2}$ ). El primero representa el diámetro de una esfera de volumen equivalente, y el segundo representa el diámetro de una esfera de superficie equivalente.

Se analizaron los perfiles térmicos de cada muestra y los resultados se presentaron con las temperaturas características del pico por gelatinización: temperatura de comienzo ( $T_o$ , *onset*), temperatura del pico ( $T_p$ , *peak*), temperatura de conclusión ( $T_c$ ), cambio entálpico ( $\Delta H$ ) y rango de temperatura ( $DT = T_c - T_o$ ).

Las propiedades de pastificación de los almidones fueron presentados con los parámetros extraídos de las curvas de viscosidad en el tiempo: Peak viscosity (es la máxima viscosidad alcanzada durante la pastificación), Holding viscosity (es la viscosidad alcanzada al final de la fase de mantenimiento de la temperatura), y Final viscosity (es la viscosidad final alcanzada luego del enfriamiento).

### Estudio y caracterización de las emulsiones Pickering

Las emulsiones fueron preparadas utilizando como fase continua se utilizó un buffer de fosfatos y como fase dispersa, aceite esencial de mandarina verde. El almidón modificado se agregó en ocho niveles de concentración: 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 y 600 mg de almidón por mL de aceite. La estabilidad de las emulsiones fue determinada por un método de observación en probetas graduadas y mediante retrodispersión de la luz. Además se determinó la distribución de tamaño de partícula durante el tiempo de almacenamiento. La microestructura de las emulsiones fue observada por microscopía óptica.

Para las emulsiones de 400 y 600 mg, después de la emulsificación, se realizó la gelatinización de los gránulos de almidón por calentamiento de las emulsiones un baño de agua a 70°C.

Se realizó la evaluación de la estabilidad de las emulsiones de 400 y 600 mg, tratadas térmicamente y sin tratar, durante el ciclo de congelación-descongelación.

La emulsión de 600 mg/mL tratada térmicamente resultó ser la que tuvo mejor estabilidad al ciclo de congelación por lo que fue seleccionada para hacer el ensayo de liofilización. Por último, se determinó el contenido de aceite encapsulado por hidrodestilación con un equipo Clevenger.

Todos los datos experimentales fueron tratados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido por un test de comparación de medias.

### Síntesis de resultados

#### Aceite esencial de mandarina verde

El aceite esencial de mandarina verde fue provisto por la empresa local Litoral Citrus S.A. (Concordia, Argentina). En la Tabla 1 se pueden observar los compuestos importantes en la composición de este aceite esencial. Algunos investigadores (Frizzo et al., 2004; Dugo et al., 2011) analizaron la composición del aceite esencial de mandarina obtenido durante toda una temporada de producción de fruta, es decir, desde la fruta inmadura hasta la fruta madura. Estos investigadores encontraron que el aceite esencial de mandarina verde, es decir inmadura, presenta un bajo contenido de D-limoneno, aproximadamente entre 60 y 70%, comparado con el aceite de la fruta madura que varía entre 80 y 90%. Este bajo contenido de D-limoneno está acompañado por un alto contenido de otro monoterpeno hidrocarbonado, el  $\gamma$ -terpineno. Los principales componentes después del D-limoneno y  $\gamma$ -terpineno son  $\alpha$ -pineno, sabineno, mirceno y linalol (Frizzo et al., 2004; Dugo et al., 2011; Silvestre et al., 2016). Además este aceite se caracteriza por un alto contenido de compuestos oxigenados volátiles responsables del aroma como aldehídos, alcoholes y cetonas.

**TABLA 1.** Caracterización del aceite esencial de mandarina verde

NOMBRE	RT	% ÁREA
$\alpha$ -pinene	10,26	2,21
$\beta$ -pinene	12,38	1,74
Myrcene	12,76	1,93
p-cymene	15,02	0,84
d-limonene	16,08	66,21
$\gamma$ -terpinene	17,82	21,21
Linalol	19,76	0,26
Decanal	4,62	0,16
n-methyl antranilate	32,91	0,77
a-sinensal	44,44	0,41

## Almidón de arroz y almidón químicamente modificado

Se utilizaron las variedades de arroz YERUA PA y GURI INTA CL cultivadas en la zona de Concordia (Entre Ríos, Argentina) y provistas por Dos Hermanos S.A. (Concordia, Argentina). La variedad GURI INTA CL es de grano largo fino y se caracteriza por tener alto contenido en amilosa y baja temperatura de gelatinización. La variedad YERUA PA es de grano largo ancho y tiene baja amilosa y temperatura alta de gelatinización. El almidón de arroz de las dos variedades seleccionadas fue modificado químicamente con anhídrido octenil succínico y caracterizado. Se determinaron sus propiedades térmicas mediante calorimetría diferencial de barrido y sus propiedades de pastificación mediante un analizador rápido de viscosidad (RVA). Además se observó la microestructura mediante microscopía electrónica de barrido y se determinó el tamaño de partícula por difracción láser.

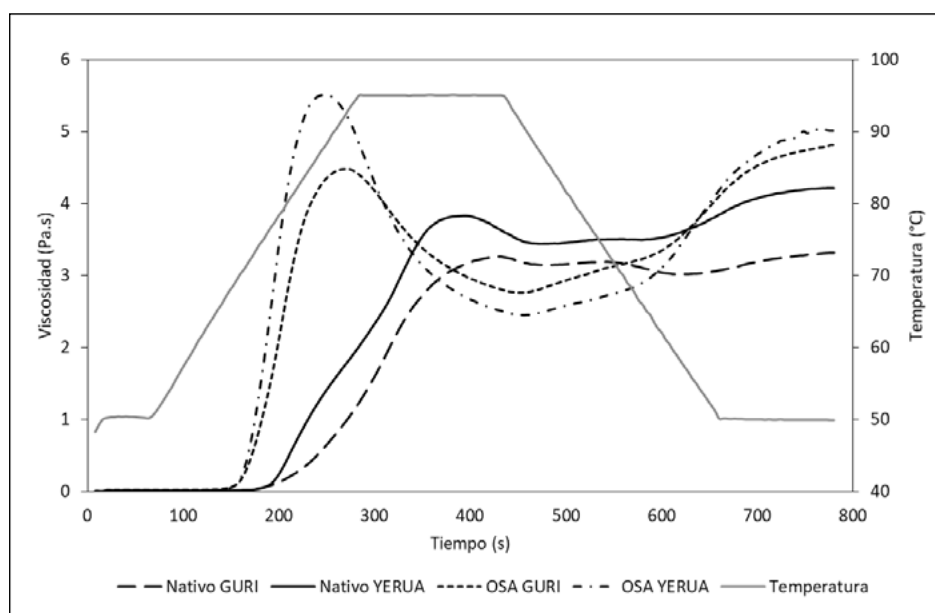
El almidón es un polímero semicristalino sensible a la presencia de agua. Cuando el agua está presente en exceso la hidratación de las partes amorfas del almidón ocurre conjuntamente con la fusión de las partes cristalinas. Esto da como resultado un pico endotérmico en el termograma obtenido por DSC. En la Tabla 2 se muestran los parámetros térmicos de la gelatinización: temperatura de comienzo ( $T_o$ , onset), temperatura del pico ( $T_p$ , peak), temperatura de conclusión ( $T_c$ ), cambio entálpico ( $\Delta H$ ) y rango de temperatura ( $DT = T_c - T_o$ ).  $T_o$  osciló entre 58,8°C para la variedad YERUA modificada y entre 62,3°C para la variedad GURI sin modificar. A pesar de presentar diferencias en el contenido de amilosa (22,5% para la variedad YERUA y 32,4% para la variedad GURI), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre las variedades de almidones nativos para todos los parámetros estudiados. En los almidones modificados,  $T_o$  y  $\Delta H$  presentan diferencias significativas con respecto a los almidones nativos. La introducción de un grupo voluminoso como el OSA supone una interrupción en la estructura del almidón, disminuyendo así la resistencia a la transición térmica. Como se ve en los resultados, la temperatura de gelatinización disminuye con la modificación química con OSA. Por la misma razón,  $\Delta H$  también disminuye. Esto quiere decir que requiere menos energía para cambiar su estructura (Shih y Daigle, 2003).

**TABLA 2.** Datos de las propiedades térmicas de los almidones nativos y modificados. Letras distintas por columnas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ )

	$T_o$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$DT$ (°C)
NATIVO GURI	62,3 ± 0,1 <sup>c</sup>	67,4 ± 0,4 <sup>c</sup>	74,6 ± 0,8 <sup>a</sup>	9,6 ± 0,4 <sup>BC</sup>	12,3 ± 0,8 <sup>a</sup>
OSA GURI	60,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	65,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	74,2 ± 0,5 <sup>a</sup>	8,6 ± 0,8 <sup>AB</sup>	13,7 ± 0,5 <sup>b</sup>
NATIVO YERUA	62,2 ± 0,1 <sup>c</sup>	67,2 ± 0,2 <sup>c</sup>	74,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	10,2 ± 0,6 <sup>c</sup>	12,6 ± 0,5 <sup>a</sup>
OSA YERUA	58,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	64,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	73,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	7,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	14,8 ± 0,0 <sup>b</sup>

En la Figura 1 se presentan los perfiles obtenidos con el RVA para los almidones nativos y modificados de las dos variedades de arroz seleccionadas para este estudio. En las curvas del RVA puede observarse que la viscosidad de los almidones modificados es mayor que la de los almidones nativos. Los parámetros estudiados de las curvas fueron: Peak viscosity (es la máxima viscosidad alcanzada durante la pastificación), Holding viscosity (es la viscosidad alcanzada al final de la fase de mantenimiento de la temperatura), y Final viscosity (es la viscosidad final alcanzada luego del enfriamiento). Se puede observar una diferencia significativa entre los almidones nativos para los valores de viscosidad del pico, 3,27 Pa.s para la variedad GURI y 3,86 Pa.s para la variedad YERUA. Esta diferencia también se mantuvo para los

respectivos almidones modificados, siendo muy superior la viscosidad del pico para el almidón YERUA modificado (5,45 Pa.s) con respecto a la variedad GURI modificado (4,49 Pa.s). Puede observarse que la incorporación de un grupo voluminoso como el OSA mejoró la capacidad de pastificación del almidón, y los almidones modificados tendieron a gelatinizar más fácilmente y a temperaturas más bajas (OSA GURI 68,5°C, OSA YERUA 69,0°C) que sus respectivos almidones nativos (GURI 77,1°C, YERUA 75,9°C). Los almidones nativos tuvieron un crecimiento menor en la curva de RVA, un tiempo de pico mayor (GURI 418 s, YERUA 394 s) que los modificados (OSA GURI 270 s, OSA YERUA 250 s) y una temperatura del pico mayor, lo cual refleja su estructura ordenada y resistente a la gelatinización. Esto está de acuerdo con lo que obtuvieron otros autores (Shih y Daigle, 2003; Song et al., 2006, 2014).



**FIGURA 1.** Perfil de las propiedades de pastificación de los almidones nativos y modificados

Se observó mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) la microestructura de los gránulos de almidón, nativos y modificados. Se presentan en la Figura 2 las microfotografías tomadas. Ambas variedades presentaron una forma poligonal con los bordes bien definidos y superficies suaves. En las imágenes b) y d) correspondientes a los almidones modificados se observan las superficies de los gránulos ligeramente rugosas y con los bordes menos definidos que los nativos.

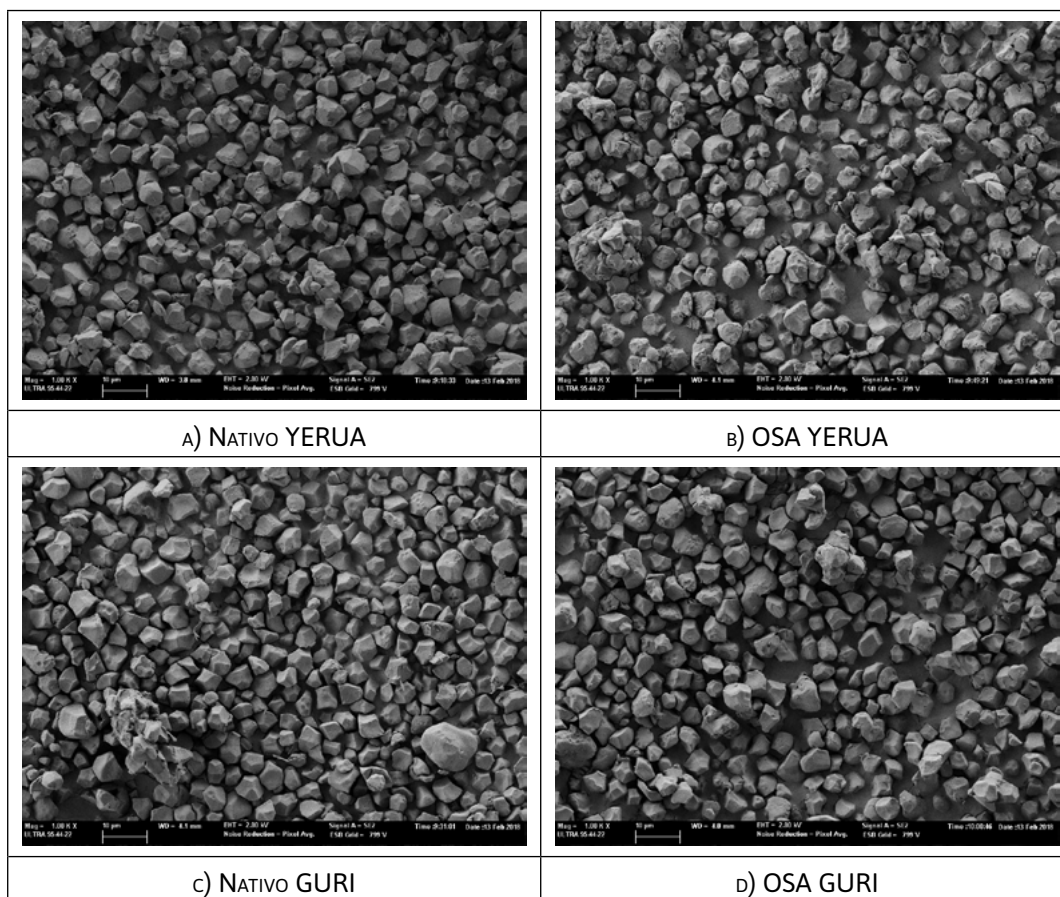
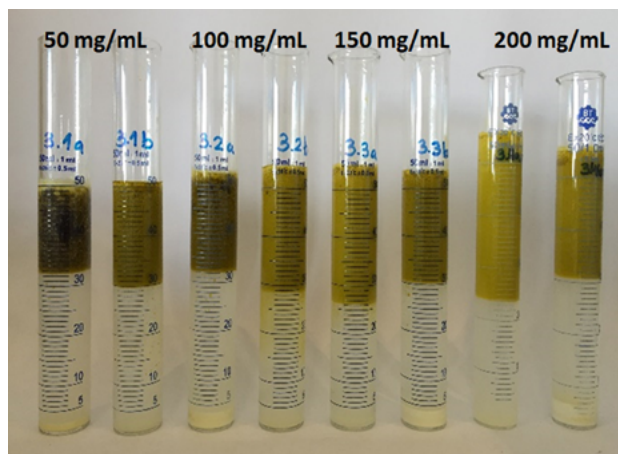


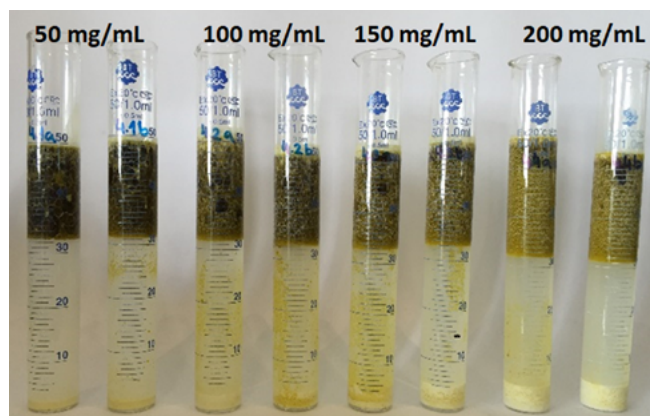
FIGURA 2. Microfotografías por FESEM de los gránulos de almidón

### Caracterización de las emulsiones Pickering

Las emulsiones Pickering fueron preparadas con los gránulos de los almidones nativos y los almidones modificados tomando como referencia trabajos de otros autores (Timgren *et al.*, 2013; Bello-Pérez *et al.*, 2015). En las Figuras 3 y 4, se muestran las emulsiones preparadas con los almidones nativos luego de 1 h. Se puede observar que los almidones nativos resultaron ineficientes para estabilizar las emulsiones, lo que puede deberse a su escasa hidrofobicidad. Si bien para la variedad YERUA se observa un cierto grado de emulsificación (para las concentraciones de 150 y 200 mg/mL), en los demás casos estudiados, las emulsiones se separaron en dos fases inmediatamente después de formadas. Se puede observar claramente que en la parte superior se separó el aceite esencial y en el fondo del tubo, el almidón precipitó. Además se observó que la separación de las fases en las emulsiones más concentradas de la variedad YERUA aumentó con el tiempo de almacenamiento.



**FIGURA 3.** Emulsiones preparadas con almidón nativo de arroz variedad YERUA



**FIGURA 4.** Emulsiones preparadas con almidón nativo de arroz variedad GURI

Es interesante mencionar que Bello-Pérez et al. (2015) y Timgren et al. (2013) estudiaron la capacidad emulsificante de distintos almidones y utilizaron el colorante Solvent Red 26 (de color rojo) para evaluar la interacción de las gotas de aceite en las emulsiones. Las gotas estables no tuvieron intercambio de colorante y por lo tanto, los autores observaron que la fase emulsionada permaneció blanca o con un color levemente rosa. Un aumento en el color rojo indicó que las gotas fueron menos estables. En nuestro caso, se podría usar el característico color verde oscuro del aceite esencial de mandarina verde como indicador cualitativo de la estabilidad de la emulsión. Las gotas estabilizadas se observan de color verde claro, mientras que un aumento en el color verde oscuro indica una escasa adsorción del almidón a la interfase.

En las Figuras 5 y 6, se pueden observar las emulsiones obtenidas con los almidones modificados para las concentraciones de 50, 100, 150 y 200 mg/mL, luego de 1 h y con 7 días de almacenamiento.

Se puede observar que el aumento en la concentración de almidón modificado de 50 a 200 mg/mL aumentó el volumen de cremado (en la parte superior del tubo, de color verde). Esto puede deberse a que aumenta la viscosidad de la fase acuosa y aumentan las fuerzas atractivas entre las partículas de almidón modificado y las gotas del aceite en la emulsión (Song et al., 2015). Asimismo, Jia et al. (2015) y Song et al. (2015) han reportado que la adsorción de las partículas a la superficie de las gotas de aceite en la emulsión aumenta la densidad efectiva, minimizando así la diferencia de densidades entre la fase dispersa y la fase continua.



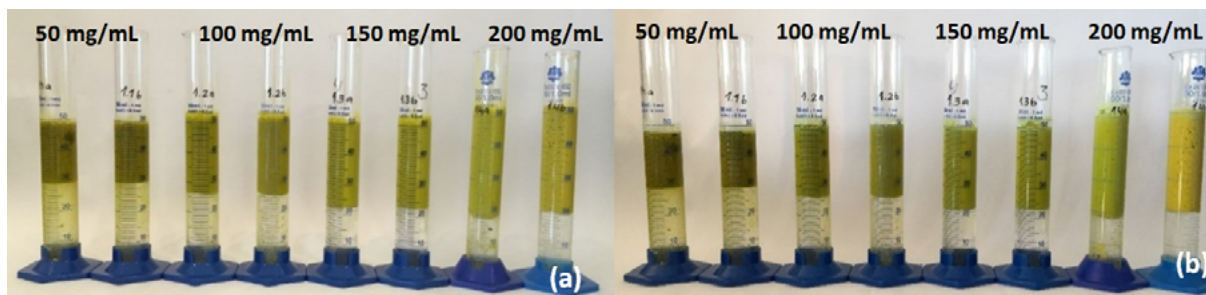


FIGURA 5. Emulsiones preparadas con almidón modificado de arroz variedad YERUA. (a) 1 h, (b) 7 días

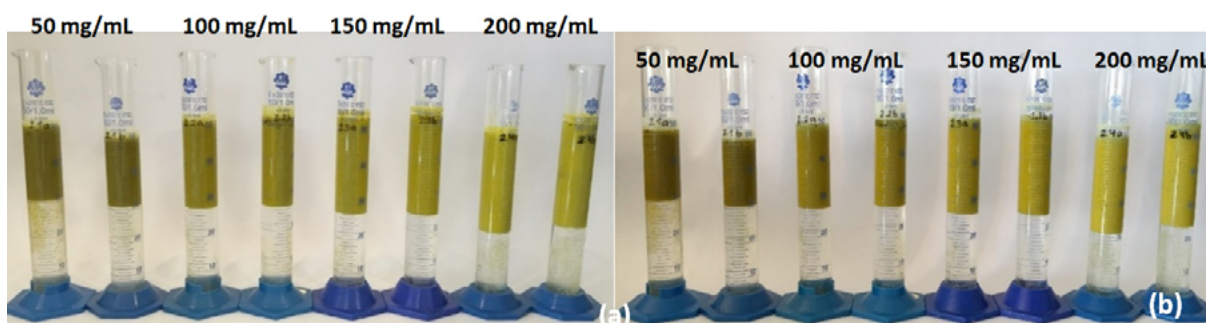


FIGURA 6. Emulsiones preparadas con almidón modificado de arroz variedad GURI. (a) 1 h, (b) 7 días

La eficiencia en la encapsulación de los aromas y aceites esenciales depende en gran medida de la estabilidad de la emulsión inicial, es decir, mejor estabilidad resultará en una mayor eficiencia (Jafari et al., 2008). La separación gravitacional es uno de los mecanismos de inestabilidad más comúnmente encontrados en la industria. Por otro lado, mediante esta metodología los científicos pueden establecer el grado de cremado o sedimentación que ha ocurrido en un producto a un determinado tiempo (McClements, 2007). Con el propósito de evaluar la estabilidad de las emulsiones formadas con los almidones de arroz modificados químicamente, se determinó la capacidad emulsificante de los gránulos de almidón modificado por medio el índice de emulsificación (IE).

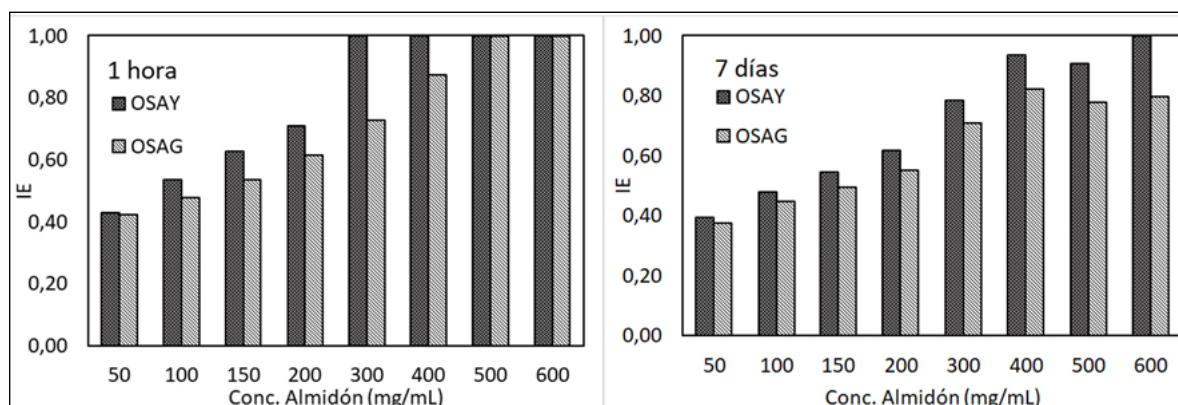
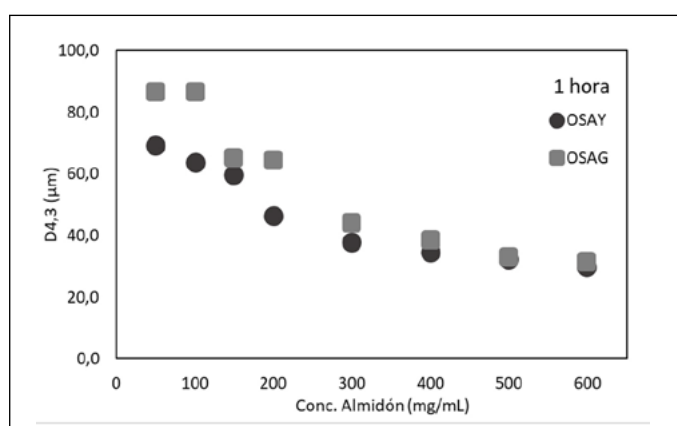


FIGURA 7. Efecto de la concentración de almidón en la estabilidad de las emulsiones

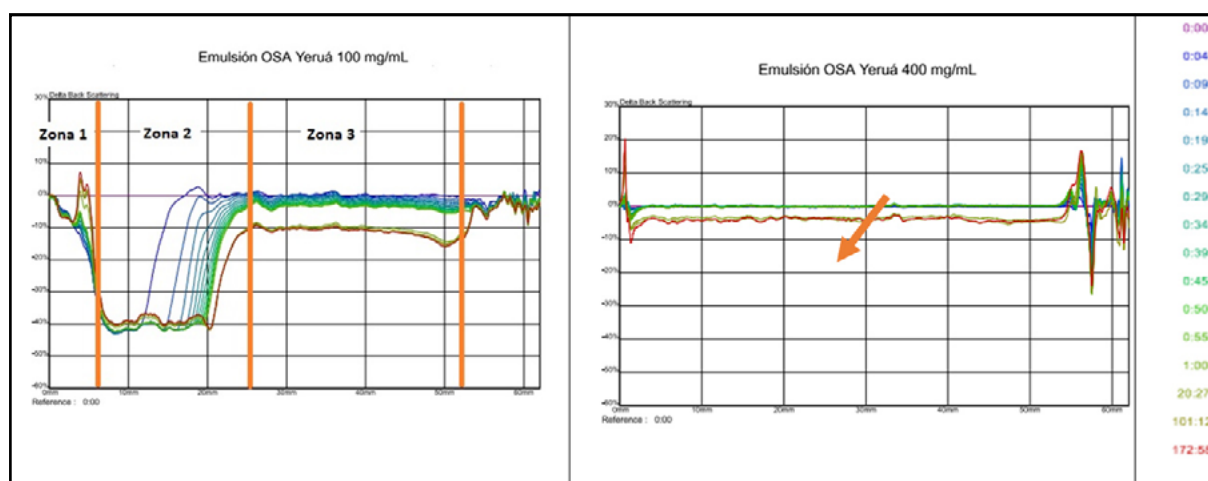
En la Figura 7 se presentan los resultados de IE obtenidos para todas las concentraciones de los almidones modificados a los días 1 y 7. El IE fue afectado significativamente por todos los factores estudiados: variedad de arroz, concentración de almidón y tiempo de almacenamiento. El IE aumentó con la concentración de almidón modificado, obteniéndose el mayor valor ( $1,00 \pm 0,01$ ) a partir de la concentración de 300 mg/mL de la variedad modificada YERUA y el menor valor ( $0,42 \pm 0,01$ ) para la concentración de 50 mg/mL de la variedad GURI, a 1 h a partir de su preparación. Para todas las concentraciones, se observó que el IE se mantuvo constante a partir de 1 día de almacenamiento. Esto indica que para los posteriores usos es conveniente dejar las emulsiones en almacenamiento durante 1 día para lograr una emulsión estabilizada. Además, se observó que para la concentración de 600 mg/mL de la variedad YERUA, el IE se mantuvo sin cambios hasta el día 7. Cabe destacar que las emulsiones preparadas con almidón modificado de la variedad YERUA presentaron valores mayores de IE que las correspondientes emulsiones preparadas con el almidón modificado de la variedad GURI.



**FIGURA 8.** Relación entre el tamaño de la gota y la concentración de almidón

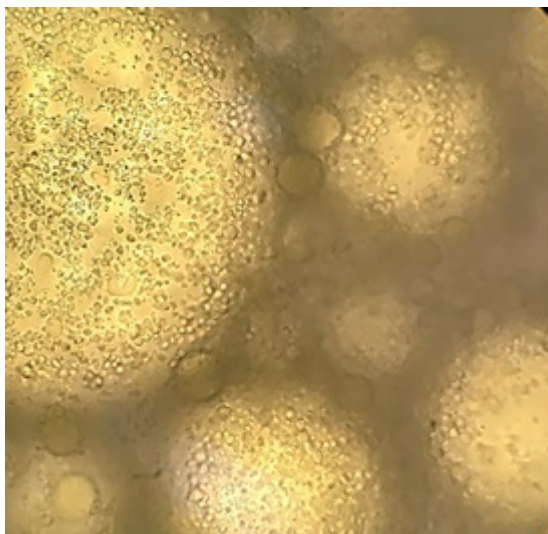
El diámetro D4,3 fue afectado significativamente ( $p < 0,05$ ) por todos los factores estudiados (tipo de almidón modificado, concentración de almidón, tiempo de almacenamiento). El D4,3 disminuyó con el aumento en la concentración de almidón. Rayner et al. (2012) observaron un límite de concentración de almidón por encima del cual el tamaño de la gota se mantuvo constante. En la Figura 8 se puede observar que a partir de la concentración de 400 mg/mL no hay diferencias entre los tamaños de las gotas entre concentraciones y entre variedades. Asimismo, se observó que las curvas de distribución de tamaño para la variedad YERUA fueron del tipo unimodal, mientras que para la variedad GURI resultaron levemente bimodales para las concentraciones más bajas (50 y 100 mg/mL). Cuando se utilizó la variedad YERUA, se obtuvieron emulsiones con tamaños más pequeños, donde el rango de tamaño de partículas (D4,3) estuvo entre  $29,9 \pm 0,7 \mu\text{m}$  para una concentración de 600 mg/mL y  $69,1 \pm 13,9 \mu\text{m}$  para una concentración de 50 mg/mL, a 1 h desde su preparación. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos para el IE, en donde las emulsiones para YERUA resultaron más estables que las correspondientes a la variedad GURI. También en concordancia con los resultados para el IE se puede observar que los tamaños se mantuvieron constantes durante el tiempo de almacenamiento para las emulsiones más concentradas del almidón modificado de la variedad YERUA. El valor de D3,2 no fue afectado por el tipo de almidón. Al igual que el D4,3, el D3,2 disminuyó con el aumento de la concentración de almidón modificado. En general, el D3,2 se mantuvo constante con el tiempo cuando se usó la variedad YERUA.

Se evaluó la estabilidad de las emulsiones por retrodispersión de luz. Las emulsiones Pickering se consideran estables ante la coalescencia y la maduración de Ostwald. Sin embargo, los procesos de inestabilidad que pueden darse en este tipo de emulsiones son la separación gravitacional (cremado y sedimentación), la floculación y la inversión de fases (Tavernier et al., 2016). En la Figura 9 se presentan los perfiles obtenidos de DeltaBS de algunas de las emulsiones elaboradas. Para las concentraciones de almidón 50, 100, 150, 200 y 300 mg/mL para las dos variedades (OSA YERUA y OSA GURI) los perfiles presentaron tres zonas: la zona 1, se corresponde con el almidón que no participó en la formación de la emulsión y precipitó en el fondo del tubo; la zona 2, se corresponde con la fase continua (buffer) que clarificó debido al cremado de la emulsión; y la zona 3, corresponde a la emulsión que cremó y se ubicó en la parte superior del tubo. Además, en la zona de cremado ocurrió la floculación de las gotas con el tiempo de almacenamiento, lo que se observa por la disminución en el valor de DeltaBS con el tiempo. Para el almidón modificado de la variedad GURI, la concentración de 400 mg/mL también presentó las tres zonas. Para el almidón modificado de la variedad YERUA a partir de la concentración 400 mg/mL, no se observó la separación gravitacional por cremado. Sin embargo, se puede observar que ocurrió floculación de las gotas. Estos resultados están de acuerdo con lo que obtuvieron otros autores. En las emulsiones realizadas por Bello-Pérez et al. (2015), donde utilizaron almidón químicamente modificado de banana, estos investigadores observaron la separación gravitacional de las gotas de la emulsión y diferenciaron una zona de cremado en la parte superior del tubo. Además, el almidón que no participó en la emulsión sedimentó en el fondo del tubo.



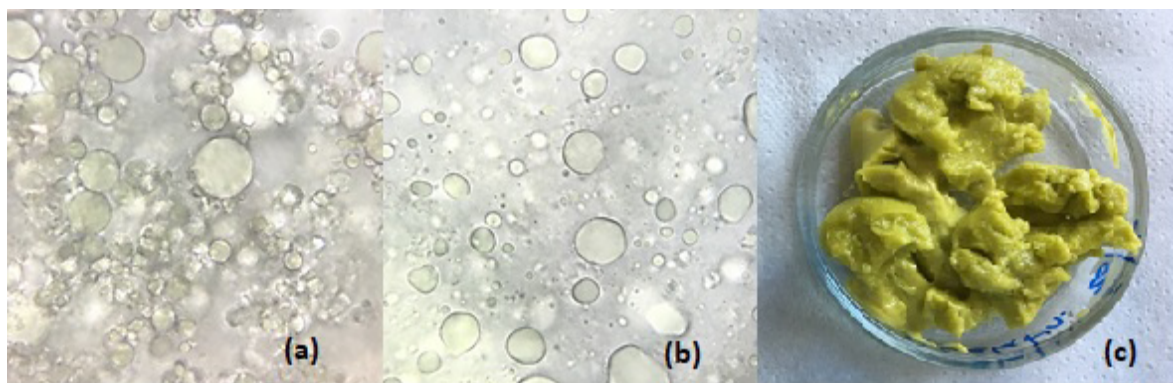
**FIGURA 9.** Perfiles de DeltaBS de las emulsiones para la variedad OSA Yeruá

Se realizó la observación por microscopía óptica de la microestructura de las emulsiones Pickering, lo que permitió identificar la ubicación de los gránulos de almidón en la emulsión. En la Figura 10 se pueden observar las gotas esféricas de aceite esencial y los gránulos de almidón cubriendo la superficie de las gotas. Durante el proceso de emulsificación, los gránulos de almidón se orientaron alrededor de las gotas de aceite esencial formando una capa empaquetada en la interfase aceite-agua (Marefati et al., 2013).



**FIGURA 10.** Microestructura de emulsión Pickering (microscopía óptica, 100x)

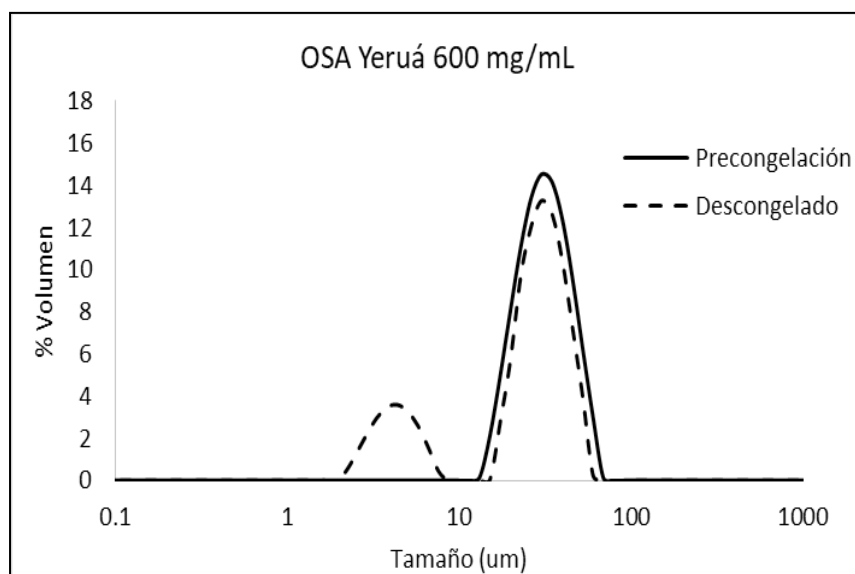
Según estudios previos (Timgren *et al.*, 2011; Marefati *et al.*, 2013) las propiedades de las emulsiones estabilizadas por gránulos de almidón pueden ser mejoradas por un calentamiento *in situ*. Los gránulos de almidón en medio acuoso cuando son calentados gelatinizan. Como se vio antes, las temperaturas de gelatinización ( $T_p$ ) de los almidones modificados fueron 67,2 y 64,5°C para las variedades YERUA y GURI, respectivamente. Las emulsiones fueron calentadas en un baño de agua a 70°C. En la Figura 11 (a) se puede ver la estructura de las emulsiones sin gelatinizar, en donde todavía se ven los gránulos de almidón intactos. En la Figura 11 (b) se observa la emulsión gelatinizada, donde la estructura granular desapareció y las gotas están rodeadas por el almidón gelatinizado.



**FIGURA 11.** Microestructura de emulsión Pickering de 600 mg/mL con almidón modificado OSA Yeruá: (a) sin gelatinizar (40x), (b) gelatinizada (40x), (c) emulsión gelatinizada

Las emulsiones que presentaron mejor estabilidad en el tiempo fueron congeladas y descongeladas. Se evaluó el efecto de la congelación sobre las emulsiones de 400 y 600 mg/mL para el almidón modificado de las dos variedades, YERUA y GURI. Además se estudiaron las emulsiones luego del tratamiento térmico. Para todos los casos sin tratamiento térmico, luego de la descongelación las emulsiones

presentaron una evidente separación de fases. A pesar de la separación del aceite esencial como se evidenció en la parte superior del tubo, para la variedad YERUA se mantuvo un volumen de emulsión sin rotura evidente para el cual se pudo determinar el tamaño de partícula. En cambio para la variedad GURI, hubo una clara separación entre las fases y se pudo observar la precipitación del almidón en el fondo del tubo.



**FIGURA 12.** Distribución de tamaño de partícula previo a la congelación (línea continua) y luego de la descongelación (línea punteada).

La determinación de tamaño de partícula sólo se pudo efectuar para las emulsiones de la variedad YERUA. En la Tabla 3 y en la Figura 12 se puede observar los resultados de la distribución de tamaño de partícula para las emulsiones de 400 y 600 mg/mL del almidón modificado de la variedad YERUA, antes y después de la congelación. En la Tabla 7 se presentan los valores de  $D_{4,3}$  y  $span$  obtenidos para estas emulsiones antes y después de la congelación. Los valores  $D_{4,3}$  no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para antes y después de la congelación, lo que podría interpretarse como que no hubo cambios en el tamaño de partícula. Sin embargo, el valor  $span$  aumentó luego de la descongelación y en la Figura 12 puede verse que después de la congelación la distribución de tamaño de partícula presentó dos picos. Por la desestabilización de las emulsiones quedaron gránulos de almidón libres y forman el pico más pequeño que aparece en la Figura 16. Otros autores (Marefati et al., 2013) han observado el mismo fenómeno.

El aceite esencial de mandarina verde no se congela a  $-18^{\circ}\text{C}$ , por lo que al congelar las emulsiones, la fase continua comienza a cristalizar y se pueden presentar varios mecanismos de desestabilización. La formación de hielo en la fase continua aumenta la interacción gota-gota y deja disponible menos agua para hidratar las partículas emulsificantes en la interfase. Esto también resulta en un aumento de la concentración de solutos en la fase acuosa no congelada, causando un cambio en la fuerza iónica y en el pH. Adicionalmente, debido a la expansión volumétrica del agua al congelarse, los cristales de hielo pueden penetrar en las gotas de aceite y romper la capa interfacial, permitiendo el contacto aceite-aceite. Las gotas cubiertas por una película gruesa han sido mejores protectoras contra la penetración por cristales y la coalescencia parcial (Marefati et al., 2013). Cuando los gránulos de almidón son gelatinizados, forman una capa densa alrededor de la gota que evita que sucedan los mecanismos

de desestabilización antes mencionados. Las emulsiones gelatinizadas para la variedad YERUA no presentaron separación de fases luego de la descongelación. Aunque en las emulsiones para la variedad GURI se observó la presencia de aceite en la parte superior del tubo, la emulsión gelatinizada mantuvo su integridad.

**TABLA 3.** Efecto de la congelación en la distribución de tamaño de partícula de las emulsiones de almidón modificado de la variedad YERUA. Letras distintas por columnas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ )

Concentración	Estado	$D_{4,3}$ (mm)	Span
400 mg/mL	Precongelación	$37,62 \pm 2,26^a$	$0,92 \pm 0,01^a$
	Descongelado	$29,24 \pm 2,29^a$	$1,32 \pm 0,15^b$
600 mg/mL	Precongelación	$32,62 \pm 2,41^a$	$0,99 \pm 0,09^a$
	Descongelado	$31,04 \pm 0,85^a$	$1,33 \pm 0,02^b$

La emulsión gelatinizada de la variedad YERUA de 600 mg/mL resultó ser la más estable a la congelación, por lo que fue seleccionada para hacer el ensayo de liofilización. La emulsión fue liofilizada y del polvo resultante se determinó el aceite encapsulado. Del aceite total incorporado en la emulsión solamente se recuperó el 10%. A pesar de que las emulsiones resultaron estables a la congelación, el porcentaje de recuperación fue muy bajo. Esto pudo deberse a que la matriz encapsulante no encierra efectivamente al aceite esencial, el cual se volatiliza durante el proceso de liofilización. Para profundizar en este aspecto es necesario estudiar una matriz que incorpore, además del almidón químicamente modificado de arroz, otro componente que ayude a mejorar la retención del aceite encapsulado.

## Conclusiones

Con este trabajo se pudo demostrar la capacidad emulsificante de los almidones de arroz modificados químicamente. Las emulsiones Pickering estabilizadas con partículas de almidón modificado tienen aplicación potencial para la protección de ingredientes lábiles como los aceites esenciales. Las mejores condiciones de estabilidad se obtuvieron con la variedad de arroz YERUA. La emulsión de concentración de 600 mg/mL de la variedad YERUA resultó ser la más estable, la cual se mantuvo sin cambios durante todo el tiempo de almacenamiento. A pesar de resultar estables las demás emulsiones, sufrieron una rotura de la emulsión ante el proceso de congelación. Para superar este inconveniente, la gelatinización de las emulsiones resultó ser un buen método. Sin embargo, el aceite recuperado luego de la liofilización fue muy bajo. Esto pudo deberse a que la matriz encapsulante no encierra efectivamente al aceite esencial, el cual se volatiliza durante el proceso de liofilización. Para profundizar en este aspecto es necesario estudiar una matriz que incorpore, además del almidón químicamente modificado de arroz, otro componente que ayude a mejorar la retención del aceite encapsulado.

## Indicadores de producción

Con los resultados obtenidos del presente proyecto la Directora redactará su tesis doctoral, y además se utilizarán para redactar un artículo científico con el fin de publicar los resultados en una revista de nivel internacional.

Se presentaron tres trabajos a Congresos Internacionales:

RASIA, M.C., CASTAGNINI, J.M., CAPODOGLIO, D.L., TISOCCO, O.D., ZORRILLA, S.E. Caracterización de la estabilidad de emulsiones preparadas con partículas de almidón de arroz químicamente modificado. Argentina. CORDOBA. 2016. Libro. Artículo Completo y Resumen. Congreso. VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2016. Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba.

PEREYRA, F., CAMBRA, M., RASIA, M., CASTAGNINI, J.M. 2018. Obtención y caracterización de almidón químicamente modificado de arroz. XXVI Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM; 17, 18 y 19 de Octubre de 2018 en Mendoza, Universidad Nacional de Cuyo. Trabajo aceptado en la Universidad.

RASIA, M.C., PEREYRA, F., CASTAGNINI, J.M., ZORRILLA, S.E. 2018. Estimación de las propiedades de transporte durante la liofilización de emulsiones. VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2018); 1, 2 y 3 de octubre de 2018 en Córdoba. Trabajo aceptado.

A partir de la puesta a punto de las técnicas utilizadas en el proyecto, se desarrollaron servicios a terceros para empresas y productores de la región.

- Servicios a empresas de la región: Determinación de tamaño de partícula por difracción láser de harinas de arroz.

- Servicios a empresas de la región: Estudio de la reducción del tamaño de partícula con homogeneizador de alta presión y evaluación del tamaño de partícula por difracción láser.

- Servicio a grupo de investigación externo: Estudio reológico de pulpa y jugo de berries. Ensayos de flujo a distintas temperaturas.

- Servicio a grupo de investigación interno: Caracterización de emulsiones formadoras de películas: determinación de tamaño de partícula por difracción láser, estudio de la estabilidad de emulsiones por difracción múltiple de luz.

## Bibliografía

BELLO-PEREZ, L.A., BELLO-FLORES, C.A., NUÑEZ-SANTIAGO, M.C., CORONEL-AGUILERA, C.P., ALVAREZ-RAMIREZ, J. (2015). Effect of the degree of substitution of octenyl succinic anhydride-banana starch on emulsion stability, *Carbohydrate Polymers*, 132:17-24.

BORGOGNA, M., BELLICH, B., ZORZIN, L., LAPASIN, R., CESARO, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system, *Food Chemistry*, 122(2):416-423.

CALDWELL, C.G., WURZBURG, O.B. (1953). Polysaccharide derivatives of substituted dicarboxylic acids. Patente. United States.

CARDOSO, M.B., SAMIOS, D., SILVEIRA, N.P. (2006). Study of protein detection and ultrastructure of brazilian rice starch during alkaline extraction, *Starch - Stärke*, 58(7):345-352.

DE VOS, P., FAAS, M.M., SPASOJEVIC, M., SIKKEMA, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components, *International Dairy Journal*, 20:292-302.

DICKINSON, E. (2010). Food emulsions and foams: Stabilization by particles, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15(1-2):40-49.

DUGO, P., BONACCORSI, I., RAGONESE, C., RUSSO, M., DONATO, P., SANTI, L. et al. (2011). Analytical characterization of mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) essential oil, *Flavour and Fragrance Journal*, 26(1):34-46.

FRIZZO, C.D., LORENZO, D., DELLACASSA, E. (2004). Composition and seasonal variation of the essential oils from two mandarin cultivars of southern Brazil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10):3036-3041.

- JAFARI, S.M., ASSADPOOR, E., HE, Y., BHANDARI, B. (2008). Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying, *Drying Technology*, 26(7):816–835.
- JIA, X., XU, R., SHEN, W., XIE, M., ABID, M., JABBAR, S. et al. (2015). Stabilizing oil-in-water emulsion with amorphous cellulose, *Food Hydrocolloids*, 43:275–282.
- KAUSHIK, V., ROOS, Y.H. (2007). Limonene encapsulation in freeze-drying of gum arabic-sucrose-gelatin systems, *LWT - Food Science and Technology*, 40(8):1381–1391.
- MAREFATI, A., RAYNER, M., TIMGREN, A., DEJMEK, P., SJÖÖ, M. (2013). Freezing and freeze-drying of Pickering emulsions stabilized by starch granules, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 436:512-520.
- MAREFATI, A., SJÖÖ, M., TIMGREN, A., DEJMEK, P., RAYNER, M. (2015). Fabrication of encapsulated oil powders from starch granule stabilized W/O/W Pickering emulsions by freeze-drying, *Food Hydrocolloids*, 51:261-271.
- MCCLEMENTS, D.J. (2007). Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(7):611-649.
- MONTTI, M.I., VISCIGLIO, S.B., RAVIOL, F.H., SUBOVICH, G.E., MUNITZ, M.S. (2013). Incidencia de la carga inicial de pesticidas en fruta sobre los niveles residuales en aceites esenciales cítricos, *Ciencia, Docencia y Tecnología*, XXIV(47):187–218.
- PICKERING, S.U. (1907). Emulsions, *Journal of the Chemical Society*, 91:2001-2021.
- RAYNER, M., TIMGREN, A., SJÖÖ, M., DEJMEK, P. (2012). Quinoa starch granules: A candidate for stabilizing food-grade Pickering emulsions, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(9):1841–1847.
- SHIH, F.F., DAIGLE, K.W. (2003). Gelatinization and pasting properties of rice starch modified with 2-octen-1-ylsuccinic anhydride, *Nahrung - Food*, 47(1):64–67.
- SILVESTRE, W.P., AGOSTINI, F., MUNIZ, L.A., PAULETTI, G.F. (2016). Fractionating of green mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore) essential oil by vacuum fractional distillation, *Journal of Food Engineering*, 178:90–94.
- SONG, X., HE, G., RUAN, H., CHEN, Q. (2006). Preparation and properties of octenyl succinic anhydride modified Early Indica rice starch, *Starch - Stärke*, 58:109-117.
- SONG, X., PEI, Y., ZHU, W., FU, D., REN, H. (2014). Particle-stabilizers modified from indica rice starches differing in amylose content, *Food Chemistry*, 153:74-80.
- SONG, X., PEI, Y., QIAO, M., MA, F., REN, H., ZHAO, Q. (2015). Preparation and characterizations of Pickering emulsions stabilized by hydrophobic starch particles, *Food hydrocolloids*, 45:256-263.
- TAVERNIER, I., WIJAYA, W., VAN DER MEEREN, P., DEWETTINCK, K., PATEL, A.R. (2016). Food-grade particles for emulsion stabilization, *Trends in Food Science & Technology*, 50:159-174.
- TIMGREN, A., RAYNER, M., SJÖÖ, M., DEJMEK, P. (2011). Starch particles for food based Pickering emulsions, *Procedia Food Science*, 1:95-103.
- TIMGREN, A., DEJMEK, P., MARKU, D., SJÖÖ, M. (2013). Emulsion stabilizing capacity of intact starch granules modified by heat treatment or octenyl succinic anhydride, *Food science & nutrition*, 1(2):157-171.
- YUSOFF, A., MURRAY, B.S. (2011). Modified starch granules as particle-stabilizers of oil-in-water emulsions, *Food Hydrocolloids*, 25(1):42-55.



**PID 8087**

**Denominación del Proyecto**

Estudio de emulsiones Pickering para la microencapsulación de aceites esenciales cítricos y su estabilización por liofilización

**Directora del proyecto**

RASIA, Mercedes Carolina

**Codirector**

CASTAGNINI, Juan Manuel

**Unidad Ejecutora**

Facultad de Ciencias de la Alimentación

**Dependencia**

Universidad Nacional de Entre Ríos

**Área:**

Laboratorio de Físicoquímica

**Cátedras participantes:**

Matemática III, Matemática IV, Físicoquímica

**Contacto**

[rasiam@fcal.uner.edu.ar](mailto:rasiam@fcal.uner.edu.ar)

**Integrantes del Proyecto**

CAPODOGLIO, Daniel L.; GERARD, Jorge A.; SAN MIGUEL, Silvina; PAGANI, Carlos I.

**Becarios**

PEREYRA, Florencia (Beca de Formación); CAMBRA, Misael Naum (Beca EVC-CIN)

**Fechas de iniciación y de finalización efectivas**

17/08/2016 y 16/08/2018

Aprobación del Informe Final por Resolución CS N° 367/18 (13/12/2018)

[<<< VOLVER AL INICIO](#)