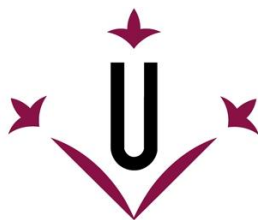


ESTABILITAT DIGESTIVA DEL LICOPÈ INCORPORAT A NANOEMULSIONS ALIMENTÀRIES



Universitat de Lleida

Ariadna Gasa Falcon
Grau Nutrició Humana i Dietètica
Universitat de Lleida

Tutora: **Isabel Odriozola Serrano**

Lleida, Juliol de 2013

ÍNDEX

	Pàg.
1. RESUM	5
2. INTRODUCCIÓ	7
2.1 Licopè	7
2.2 Oli refinat de blat de moro	9
2.3 Pectina	11
2.4 Nanotecnologia	12
2.5 Nous aliments enriquits amb components bioactius	14
3. HIPÒTESIS I PLANTEJAMENT DEL PROBLEMA	18
4. OBJECTIUS	19
4.1 Objectiu general	19
4.2 Objectius específics	19
5. PLA DE TREBALL	20
6. MATERIAL I MÈTODES	21
6.1 Materials	21
6.2 Mètodes	21
6.2.1 Preparació de les nanoemulsions	21
6.2.1.1 Preparació de l'oli enriquït	21
6.2.1.2 Preparació de les emulsions	22
6.2.1.3 Formació de les nanoemulsions	23
6.2.2 Caracterització de la nanoemulsió inicial	24
6.2.2.1 Tamany de partícula	24
6.2.2.2 Potencial zeta	25
6.2.2.3 Viscositat	25
6.2.2.4 Color	26

6.2.2.5	Estabilitat	27
6.2.3	Digestió <i>in vitro</i>	27
6.2.4	Contingut en licopè	29
6.2.5	Determinació de la bioaccessibilitat	30
6.2.6	Anàlisis estadístic	30
7.	RESTULTATS I DISCUSSIÓ	31
7.1	Tamany de partícula	31
7.2	Índex de polidispersió	35
7.3	Potencial zeta	37
7.4	Viscositat	38
7.5	Color	40
7.5.1	Lluminositat	40
7.5.2	To	41
7.6	Estabilitat	43
7.7	Àcids grassos lliures	45
7.8	Bioaccessibilitat del licopè	46
8.	CONCLUSIONS	49
9.	BIBLIOGRAFIA	51
10.	ANNEXES	58

1. RESUM

Avui en dia la nanotecnologia té moltes aplicacions en la indústria alimentària, fet que podria aportar noves oportunitats en la mateixa. Tot i que les nanoemulsions contenen partícules amb un tamany de partícula d'entre 50 i 500 nanòmetres, la seva elevada àrea d'interfase implica unes característiques que podrien afavorir i presentar molts avantatges pel que fa a la bioaccessibilitat d'alguns compostos beneficiosos per a la salut. A més a més, també milloren moltes propietats físico-químiques de les emulsions (color, aspecte, viscositat etc), punt important per la fabricació de nous productes alimentaris atractius al consumidor.

En els últims anys, els compostos bioactius s'han estudiat més en profunditat encara que hi ha informació la qual es desconeix. Es defineixen com substàncies no nutritives que es troben en concentracions molt baixes en els aliments i que poden tenir un impacte significatiu sobre la salut humana. El licopè, és un dels carotenoids més estudiats i es troba en el tomàquet i productes derivats. La seva bioaccessibilitat, és a dir, la quantitat de component bioactiu potencialment absorbible pel nostre cos, depèn de molts factors. S'ha demostrat que aquest carotenoid té activitat antioxidant, que pot ser beneficiós per prevenir malalties cardiovasculars i degeneratives entre d'altres. Per aquest motiu, seria molt important per la nostra salut incorporar en la nostra dieta diària aliments que continguin aquest compost bioactiu.

Amb aquest treball es pretén obtenir nanoemulsions alimentaries amb un oli enriquit amb licopè, incorporat en una fase aquosa biopolimèrica de pectina. Es volen determinar les propietats físico-químiques de les nanoemulsions, així com estudiar la bioaccessibilitat del licopè incorporat. A més a més, es vol comparar les propietats físico-químiques i bioaccessibilitat del component bioactiu amb emulsions preparades sense l'aplicació de tècniques nanomètriques.

Es van preparar 5 nanoemulsions amb diferents concentracions de pectina i una emulsió convencional sense pectina formades per oli de blat de moro enriquit amb licopè. De totes elles es van determinar diferents paràmetres (tamany de partícula, potencial zeta, viscositat, estabilitat i color). Es va realitzar la digestió *in vitro* i a partir

de l'emulsió digerida es van determinar els àcids grassos lliures i la biodisponibilitat del licopè. Els resultats van ser analitzats amb el programa estadístic Statgraphics Plus v.5.1, mitjançant l'anàlisi de la variança (ANOVA). El test que es va utilitzar per establir diferències significatives entre les mitjanes va ser el de la mínima diferència significativa amb un nivell de significació del 95%.

Es va observar que les nanoemulsions presenten millores en les propietats físico-químiques enfront les emulsions convencionals: en primer lloc, el tamany de partícula de l'emulsió convencional és molt més elevat que el de les nanoemulsions i a més a més, aquestes últimes són més homogènies. En segon lloc, les nanoemulsions presenten una major lluminositat que les emulsions convencionals. També s'observa que la viscositat és menor en el cas de la nanoemulsió sense pectina i que l'estabilitat augmenta a mesura que s'afegeix pectina a la mostra. La bioaccessibilitat és molt similar entre l'emulsió convencional i la nanoemulsió sense pectina. De fet, els resultats obtinguts per la bioaccessibilitat no concorden amb altres estudis previs que trobem en la literatura, i per això seria necessari el plantejament d'un nou estudi on es variarien paràmetres com la concentració d'oli enriquit i surfactant ja que una de les hipòtesis es que aquest últim podria fer disminuir la bioaccessibilitat del licopè.

Com a conclusió, es pot observar que en general les propietats físico-químiques de les nanoemulsions milloren. És a dir, que la nanotecnologia és un camp que podria presentar avantatges en el sector alimentari per la fabricació i/o millora de productes alimentaris.

2. INTRODUCCIÓ

2.1 LICOPÈ

El licopè és un carotenoid responsable de la coloració vermella del tomàquet (*Lycopersicon esculentum*) i dels seus productes derivats (salsa de tomàquet, ketchup etc.). Es tracta d'un compost bioactiu, és a dir, una substància no nutritiva que es troba en molt baixes concentracions en els aliments, que intervé en el metabolisme secundari dels vegetals i que pot tenir un impacte significatiu sobre la salut humana (Kris-Etherton et al., 2002).

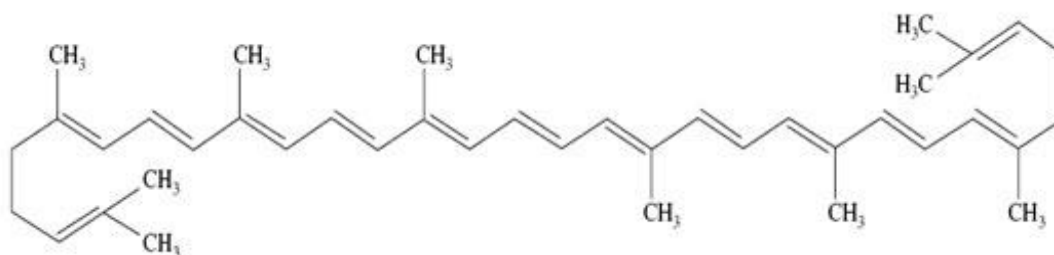


Figura 1. Estructura del licopè

Els carotenoids són pigments solubles en greixos que es dissolen en solvents grassos com l'acetona, l'alcohol, l'èter etílic i el tetrahidrofur i cloroform. En les plantes i animals es troben en forma de cristalls, en solució en medi lípid, en dispersió col·loïdal o en combinació amb proteïnes en fase aquosa, donant carotenoproteïnes (colors verds, blaus, púrpura i grisos). La proteïna de la carotenoproteïna es desnatura durant la cocció alliberant al carotenoid i apareixen la coloració taronja-vermella.

La facilitat amb la que incorporem els carotenoids a l'organisme depèn de diferents factors, com és el tipus i la quantitat de carotenoides ingerits, la composició i l'estructura de la matriu alimentaria i les condicions de processat utilitzades (Castenmiller i West, 1998; Reboul et al., 2006). A més a més, molts estudis han

demostrat que la quantitat total ingerida de lípids, juntament amb la de carotenoids, influeix en l'absorció d'aquests últims. Per tant, la bioaccessibilitat dels carotenoids s'incrementa a mesura que augmenta el contingut de greix en la nostra dieta (Dimitrov et al., 1988; Jayarajan, Prince et al., 1991). També hi ha evidències de que la naturalesa de les molècules de triglicèrids presents als aliments influeixen en la bioaccessibilitat dels carotenoids (Borel et al., 1998; Huo et al., 2007). Trobem estudis recents que han suggerit que com més curta és la cadena d'àcids grassos a les molècules de triglicèrids, més baixa és la bioaccessibilitat dels carotenoids (Huo et al., 2007).

Segon Parker et al. (1999), l'absorció del licopè en humans és del 10-30% de l'ingerit. No obstant, també existeixen factors individuals que influeixen en l'absorció d'aquest com l'edat, massa i composició corporal, nivells lipídics sanguinis, fumar, consumir alcohol i la presència d'altres carotenoids en els aliments.

Un cop el consumim, el licopè es incorporat dins de les micelles dels lípids i absorbit en la mucosa intestinal per difusió passiva, on és incorporat als quilomicrons i alliberat al sistema limfàtic per ser transportat al fetge. Finalment, es transportat per les lipoproteïnes dins del plasma per la seva distribució fins als òrgans.

A la sang s'han identificat al voltant de 34 carotenoids, incloent 13 isòmers i 8 metabòlits. D'ells, la luteïna, zeaxantina, licopè, β -criptoxantina, α - i β -carotè, representen al voltant del 90% o més dels carotenoids circulants.

El licopè es distribueix àmpliament pel cos humà. En persones sanes, els carotenoids es distribueixen principalment al teixit adipós (80-85%), fetge (8-12%) i múscul (2-3%) i en concentracions menors a altres teixits. Els nivells de licopè en el plasma i teixits humans reflexa la seva ingesta diària.

La ingesta recomanada en humans sans es de 5-7 mg/dia (Rao et al., 2007). En persones amb malalties cardiovasculars o càncer és de 35-75 mg/dia (Heath et al., 2006).

Alguns dels beneficis del licopè són: acció anticancerígena, prevenció de malalties cardiovasculars, enfortiment del sistema immunitari, prevenció contra malalties degeneratives i efecte antienvelliment. De fet, la ingesta de tomàquets i productes a base d'aquests, s'ha relacionat amb un menor risc de patir càncer, en concret, càncer de pulmó, estómac i pròstata (Giovannucci et al. 1999). És per això que incorporar aliments que continguin licopè a la nostra dieta és molt important per tots els beneficis que ens pot aportar al nostre organisme.

2.2 OLI REFINAT DE BLAT DE MORO

L'oli és un greix de procedència vegetal o animal, líquid a temperatura de 20°C.

Els greixos d'origen vegetal els podem dividir en dos grups: aquells greixos que obtenim a partir de fruits (oli d'oliva i oli de palma) i aquells que procedeixen de llavors oleaginoses (oli de gira-sol, oli de germen de blat de moro, oli de soja, etc).

Els olis de llavors són aquells que s'obtenen a partir de llavors oleaginoses , per un procés d'extracció amb dissolvents. Només són aptes per al consum humà si han estat sotmesos a un procés de refinat.

Les **etapes del procés d'elaboració** d'olis de llavors són:

- 1.-Recepció i neteja de les llavors
- 2.-Eliminació de les cobertes de les llavors
- 3.-Trituració de les llavors oleaginoses
- 4.-Extracció amb dissolvents (hexà, tricloroetilè, etc)
- 5.-Refinat de l'oli: a).-desfangat: per eliminar les impureses sòlides, b).-Desgomat: consisteix en eliminar mucíl·lags, gomes i resines. Amb aquest procés també es facilita la desacidificació, c).-Neutralització: comença amb la neutralització de l'àcida lliure de la matèria primera que es realitza en rentadores centrifugadores, on s'hi afegeix àcid fosfòric i hidròxid de sodi a 65-85°C, d).-Decoloració: tracta d'eliminar el color excessiu per la presència de diversos pigments responsables de colors no desitjats o excessius en l'oli com

són els carotens, clorofil·la i derivats, xantofil·la, gossipol i derivats d'oxidacions del tocoferol, e).-Desodorització: eliminar diferents compostos responsables d'aromes no desitjats en l'oli o aconseguir olis sense olor ni gust destinats a la producció de margarines, f).-Hivernació, g).-Filtració/Centrifugació i j).-Envasament

La refinació dels olis és un procés que consisteix en l'eliminació de d'excessiva acidesa, gust i olor desagradables, coloració inadequada, terbolesa etc. i això fa que l'oli adquireixi les característiques desitjades per al seu consum.

De tots els olis de llavors que tenim al mercat, l'oli de blat de moro és un dels més consumits a nivell mundial. Aquest procedeix del germen de les llavors de panís (*Zeamays*). L'oli de blat de moro, s'utilitza principalment per l'elaboració de margarines i maioneses, i en alguns llocs per amanir alguns productes vegetals. És un oli de gran interès des del punt de vista dietètic pel seu elevat contingut d'àcids grassos poliinsaturats, principalment àcid linoleic (més d'un 50%) (Gil, 2010). També és ric en vitamina E (tocoferols), i això es relaciona amb efectes beneficiosos sobre el sistema circulatori ja que actua com antioxidant (Taula 1).

Taula 1. *Composició per 100 g de la porció comestible d'oli de blat de moro. (Taules de composició d'aliments del CESNID, 2004).*

Component	Valor
Energia	899 kcal
Aigua	traces
Lípids totals	99,90 g
Àcids grassos saturats (AGS)	12,3 g
Àcids grassos monoinsaturats (AGM)	26,10 g
Àcids grassos poliinsaturats (AGP)	56,70
Vitamina E	30,00 mg

2.3 PECTINA

La pectina és un polisacàrid natural i un dels constituents majoritaris de les parets de les cèl·lules vegetals. S'obté a partir de subproductes de la industrialització dels cítrics i de pomes.

La seva estructura és la del àcid poligalacturònic esterificat parcialment amb grups metils i cadenes laterals de sucres neutres, que faciliten la separació de les cadenes i per tant, la seva hidratació.

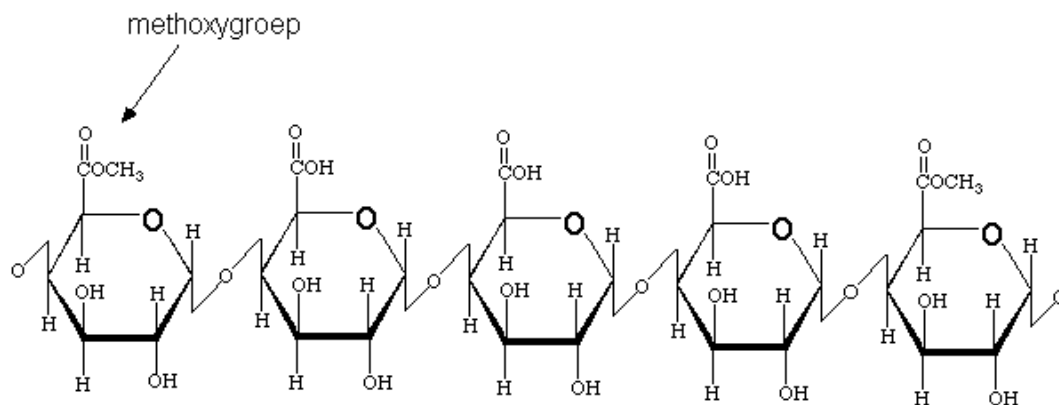


Figura 2. Estructura de la pectina.

La pectina és un dels principals agents de gelificació. Té la propietat de gelificar en medi àcid. A més a més, funciona com agent espessant, estabilitzant i de suspensió.

Les pectines es classifiquen en dos grups principals, depenent del mecanisme de gelificació (Cubero et al., 2002):

- **pectines d'alta metoxilació (HM):** formen gels només si el contingut total en sòlids solubles és superior al 55% i dins d' un interval de pH (2,5-3,5). Té un efecte gelificant, donant lloc a gels elàstics, tous i no reversibles tèrmicament.
- **pectines de grau de metoxilació baix (LM):** tenen un grau d'esterificació inferior al 50% i gelifica en intervals més amples de sòlids solubles i pH, a més de presència de calci.

Aquests dos tipus de pectines són anomenades per la CEE com E440a. La dosis diària que s'admet no està limitada (determinada per experts de la FAO i de la OMS) . En canvi, hi ha un grup de pectina anomenat E440b, la qual té fixada una dosis de 25 mg/kg (Navarro et al., 1985).

La pectina s'utilitza per a diferents aplicacions en la indústria agroalimentària, però sobretot en confitures, postres variats, productes dietètics etc.

S'ha vist que la ingesta de pectina disminueix els nivells de colesterol en sang, sobretot si parlem de pectina d'alta metoxilació (HM). El mecanisme a través del qual es produeix aquest efecte positiu és incert, encara que sembla que varia segons la naturalesa de la pectina ingerida i la forma com és consumida. No obstant, sembla que està relacionat amb canvis reològics que tenen lloc al tracte intestinal, com podria ser l'increment de la viscositat (Bello, 2005).

2.4 NANOTECNOLOGIA

La nanotecnologia es defineix com aquella tecnologia relacionada amb sistemes, materials i processos que operen a una escala de 100 nanòmetres (nm) o menys. La nanotecnologia té molts camps d'aplicació i s'utilitza per la fabricació de molts productes com són nanocapes, nanocàpsules i nanoemulsions, però en l'àmbit de l'alimentació encara hi ha poca informació sobre la seva aplicació ja que ha estat recentment quan s'han llançat al mercat productes alimentaris utilitzant la nanotecnologia. Altres aplicacions són en electrònica, medicina, indústria tèxtil, cosmètica etc. (Chen et al., 2006).

Les aplicacions actuals de la nanotecnologia en el sector alimentari són:

a).-Mètodes per reduir el contingut de greixos, carbohidrats o calories o augmentar el contingut en proteïnes, fibres o vitamines en productes com són les

begudes refrescants, gelats, xocolata i patates chips, permetent així la seva comercialització com a aliments “saludables”.

b).-Producció de saboritzants, colorants i additius nutricionals.

c).-Desenvolupament d'aliments que poden canviar les propietats nutritives, el color o el sabor segons les necessitats de l'alimentació de cada individu, les seves al·lèrgies o preferències de sabor (un àmbit molt prioritari en programes d'investigació de grans empreses alimentaries).

d).-Envasos i materials que augmenten el temps de conservació dels aliments mitjançant la detecció de descomposició, bactèria o pèrdua de nutrients, i que responguin alliberant agents antimicrobians, saboritzants, colorants o suplementos nutricionals.

S'ha observat en la literatura que, gràcies als avanços de la nanotecnologia i a les seves aplicacions, es pot reduir la mida de les gotes que formen les emulsions fins al punt de disminuir-les en un ordre de magnitud. Quan parlem de nanoemulsions ens referim a emulsions, en què mitjançant equips i tècniques especials, s'aconsegueixen diàmetres de partícula de l'ordre dels nanòmetres (50-500 nm).

Les nanoemulsions presenten unes característiques molt innovadores, cosa que podria significar noves oportunitats per la indústria agrícola i alimentaria; com per exemple, en forma de colorants, saboritzants, additius nutricionals, com a ingredients antibacterians per l'envasat d'aliments, etc (Foladori et al., 2008).

Les nanopartícules tenen una elevada àrea d'interfase, fet que millora les propietats i característiques de la emulsió. Els seus avantatges principals respecte a les emulsions convencionals serien vàries. En primer lloc, són sistemes d'alliberació controlats d'ingredients lipofílics nanoencapsulats a l'interior de les gotes que poden ser incorporats als aliments (Yue, 2010). En segon lloc, són sistemes que presenten més estabilitat. En tercer lloc, les nanoemulsions sembla que milloren l'acceptació sensorial degut a les seves propietats de color i viscositat (McClements, 2005). Per últim, la bioaccessibilitat d'aquestes nanopartícules sembla que es major que les

partícules que tenen un tamany més gran. Com a resultat, l'absorció augmenta tant per part de les cèl·lules com dels teixits i dels òrgans (Garnett i Kallinteri 2006; Limbach et al., 2007; Nel et al., 2006).

En els últims anys hi ha hagut avenços en el desenvolupament de mètodes i tècniques per a la formació de nanoemulsions. Es poden obtenir mitjançant tècniques diferents, però en general es poden classificar en **mètodes d'alta energia** i **mètodes de baixa energia**, en funció del principi subjacent que s'utilitzi.

1.-Els *mètodes d'alta energia* utilitzen dispositius mecànics capaços de generar forces intenses amb la capacitat de pertorbar la barreja d'oli amb la fase aquosa i formar petites gotes de tamany nanomètric. Els equips capaços de produir aquest fenomen són, entre d'altres, els homogeneïtzadors, vàlvules d'alta pressió, microfluiditzadors, i els homogeneïtzadors d'ultrasons. En l'actualitat, els mètodes d'alta energia són els més comuns i els que més s'utilitzen per a la preparació de nanoemulsions convencionals en la indústria alimentària ja que la seva eficàcia per a produir a escala industrial és alta i els rendiments que s'obtenen són millors. A més, són capaços de preparar nanoemulsions provinents de diferents materials i matèries primes.

2.-Els *mètodes de baixa energia* es basen en la formació espontània de petites gotes de la barreja d'oli amb fase aquosa quan els sistemes, la solució o les condicions ambientals són alterades, per exemple, l'inversió de fases, i l'emulsificació espontània.

2.5 NOUS ALIMENTS ENRIQUITS AMB COMPONENTS BIOACTIUS

Existeix evidència científica de que un consum habitual de substàncies amb activitat antioxidant, com són els components bioactius, es relaciona amb una disminució de la incidència de malalties cardiovasculars i també proporciona propietats antienvelliment. És per això que durant els últims anys han augmentat al

mercat els productes enriquits amb components bioactius. No obstant, s'ha d'anar amb compte ja que algunes d'aquestes substàncies consumides amb una dosi alta poden tenir un efecte prooxidant (efecte contrari a antioxidant). A més a més, caldria realitzar més estudis per veure quin és el percentatge de component antioxidant absorbit en funció de la composició i característiques de la matriu, el mecanisme d'acció d'aquestes substàncies a l'organisme i quin és el benefici que aporten a la nostra salut.

La bioaccessibilitat i biodisponibilitat dels components que són altament lipofílics, com són els carotenoids, juga un paper molt important en la determinació de la seva activitat biològica. El fet de conèixer i saber tant les propietats, com els mecanismes fisiològics que es produeixen dins del tracte intestinal després d'ingerir lípids es podria utilitzar per dissenyar sistemes eficaços que tindrien com a objectiu millorar la biodisponibilitat dels compostos bioactius dels aliments (McClements et al., 2009; Singh et al., 2009).

Les nanoemulsions s'estan convertint en una alternativa a les emulsions convencionals per protegir i donar components lipofílics funcionals ja que aporten una major estabilitat física, millora de la qualitat òptica i un augment de la bioaccessibilitat dels components bioactius presents (McClements et al., 2011; Nik et al., 2012). De fet, hi ha estudis que indiquen que les nanoemulsions poden aportar una millora a la bioaccessibilitat dels compostos bioactius lipofílics, com és el beta-carotè (Nik, et al., 2011; Nik et al., 2012). No obstant, no hi ha treballs que determinin la bioaccessibilitat del licopè incorporat en nanoemulsions alimentàries, i això podria significar un punt molt interessant a estudiar per tot el que s'ha comentat anteriorment.

A la Unió Europea, l'ús d'una formulació de licopè com a nou ingredient alimentaria està autoritzat des de 2009. Comercialitzat des de fa alguns anys en altres països fora de la UE, aquests pigments s'utilitzen en suc, begudes per a esportistes, suplementos alimentaris per a dietes, cereals per esmorzar, pa o salses per amanides. La EFSA té previst examinar de nou el licopè com a ingredient en aquests productes l'any 2014.

En una revisió de tots els colorants alimentaris, la EFSA va valorar la seguretat global del licopè. En el dictamen del 30 de gener de 2008, el Panel d'experts va obtenir una IDA de 0.5 mg/kg pes corporal/dia procedent de totes les fonts. El Panel també va arribar a la conclusió que degut al consum elevat de begudes refrescants, font potencial de licopè, la ingesta d'aquest component bioactiu supera el valor de IDA.

D'altra banda, hi ha un gran interès en el desenvolupament de nutracèutics i aliments funcionals que estiguin dissenyats per combatre algunes malalties com són el càncer, hipertensió, malalties cardiovasculars, obesitat i diabetis. Un gran nombre de components lipofílics s'han identificat com a beneficiosos per la salut si són consumits de forma regular i adequada, com són l'àcid gras omega-3, fitosterols, antioxidants, carotenoids, coenzim Q, vitamina A i D (Ubbink, 2002). A més a més, és important que aquests components es trobin en medis adequats, ja que aporten un sabor més agradable, fan el producte més atractiu i també augmenta la bioactivitat. De fet, aquests components lipofílics poden ser incorporats en begudes o productes alimentaris i ser consumits. Tot i això, existeixen diversos factors que fan que la incorporació de components lipofílics a productes per ser consumits, no sigui tan fàcil ja que cada un d'ells presenta característiques i propietats molt diferents. Segons MacClements (2010) la utilització de la nanotecnologia pot facilitar la incorporació dels components lipofílics a diferents aliments reduint els problemes associats amb les propietats físico-químics, moleculars i fisiològiques pròpies d'aquests components insolubles en aigua.

En general, per a que un component lipofílic sigui incorporat a una nanoemulsió calen una sèrie de requisits que s'anomenen a continuació (McClements, 2010):

- I. El sistema que s'utilitzi cal que tingui la capacitat d'encapsular una gran quantitat del component lipofílic i una retenció del mateix eficient.
- II. Ha d'haver una protecció enfront mecanismes de degradació, com per exemple de l'oxidació de certs components lipofílics com el licopè o betacarotè.

- III. Ha d'existir una compatibilitat amb la matriu alimentaria on s'incorporarà el component lipofílic d'interès, evitant així que la textura, el sabor i/o l'aparença d'aquell producte es vegi afectada.

- IV. El sistema ha de ser resistent al medi ambient i a tot el procés de fabricació d'aquell producte i que conté el component lipofílic.

3. HIPÒTESIS I PLANTEJAMENT DEL PROBLEMA

A partir de la informació que disposem sobre les nanoemulsions i els seus avantatges, s'ha proposat incorporar un oli enriquit en licopè a nanoemulsions alimentaries amb biopolímers de pectina, ja que utilitzant aquest tipus d'encapsulament es podria augmentar la bioaccessibilitat del component bioactiu amb tots els avantatges que això comportaria.

A més a més, les nanoemulsions sembla que presenten millors propietats físico-químiques com són el color i la viscositat, entre d'altres, que les emulsions convencionals, fet podria significar un benefici molt important per tot el sector alimentari ja que implicarien una millora sensorial de molts productes que es convertirien en més atractius pel consumidor. De fet, aquest és un camp molt ampli a estudiar, ja que aquestes propietats físico-químiques sembla que varien segons la composició de la nanoemulsió.

4. OBJECTIUS

4.1 OBJECTIU GENERAL:

L'objectiu general del present estudi és obtenir nanoemulsions a base d'olis enriquits amb components bioactius com el licopè, incorporats en una fase aquosa biopolimèrica de pectina. Es pretén estudiar l'aptitud dels olis enriquits amb aquest component bioactiu i dels biopolímers de pectina per a la formació de nanoemulsions i avaluar la bioaccessibilitat del licopè incorporat a les nanoemulsions alimentaries. A més, es compararà la bioaccessibilitat del component bioactiu en emulsions preparades sense l'aplicació de tècniques nanomètriques.

4.2 OBJECTIUS ESPECÍFICS:

-Avaluar i comparar les propietats físico-químiques (tamany de partícula, potencial zeta, color, viscositat i estabilitat) de les emulsions convencionals i nanoemulsions.

-Establir l'efecte de la composició de les nanoemulsions sobre les diferents propietats físico-químiques (tamany de partícula, potencial zeta, color, viscositat i estabilitat) d'aquestes.

-Determinar i comparar la digestibilitat de l'oli i la bioaccessibilitat del licopè incorporats a emulsions convencionals i nanoemulsions alimentaries amb diferents concentracions de pectina.

-Determinar quins paràmetres físico-químics (tamany de partícula, potencial zeta, color, viscositat) influeixen en la bioaccessibilitat del licopè incorporat a les diferents nanoemulsions.

5. PLA DE TREBALL

El pla de treball que es va dur a terme en l'execució d'aquest treball és el següent:

- 1.** Revisió bibliogràfica.
- 2.** Preparació de l'oli enriquit amb licopè.
- 3.** Formació de les nanoemulsions.
- 4.** Caracterització de les nanoemulsions inicials:
 - Tamany de partícula
 - Potencial Z
 - Viscositat
 - Color
 - Estabilitat
- 5.** Digestió *in vitro* de les nanoemulsions preparades.
- 6.** Determinació de la digestibilitat de l'oli.
- 7.** Obtenció de la fracció micel·lar de la nanoemulsió
- 8.** Determinació del contingut en licopè de les nanoemulsions digerides i de la fracció micel·lar.
- 9.** Obtenció de la bioaccessibilitat del licopè incorporat a les nanoemulsions
- 10.** Discussió i comparació dels resultats obtinguts
- 11.** Elaboració de les conclusions de l'estudi realitzat
- 12.** Redacció del treball

6. MATERIAL I MÈTODES

6.1 MATERIALS

Les emulsions es van formar a partir de quatre components: fase apolar o lipídica (oli vegetal de blat de moro enriquit amb licopè), fase polar (aigua), surfactant (Tween 80) i agent texturitzant o biopolímer (pectina).

El *Tween 80* (Scharlau, Espanya) és un compost orgànic, que en la indústria alimentaria s'utilitza per fer emulsions, ja que és líquid i soluble en aigua i en oli. Té baix pes molecular i a 20 °C, una densitat semblant a la de l'aigua i la seva aparença és de color groga.

La *pectina* (biopolímer) és un polisacàrid que en presència d'aigua es converteix en una substància en forma de gel, fet que dona propietats estabilitzants, gelificants i espessants. Té una àmplia aplicació en la indústria alimentaria.

L'*aigua* que es va utilitzar per a la preparació de les emulsions convencionals i nanoemulsions va ser aigua MilliQ, que es tracta d'aigua ultra pura, és a dir, desionitzada mitjançant osmosi inversa.

L'*oli refinat de blat de moro* procedeix del germen de les llavors de panís i se li atribueix beneficis a nivell del sistema circulatori i antioxidant degut al seu contingut elevat en vitamina E.

El *licopè* és un carotenoid soluble en greixos i que presenta beneficis per la nostra salut quan es consumit de forma habitual. El podem trobar en el tomàquet i productes derivats.

6.2 MÈTODES

6.2.1 PREPARACIÓ DE LES NANOEMULSIONS

6.2.1.1 Preparació de l'oli enriquit

Per tal d'obtenir les nanoemulsions, primer es va preparar l'oli enriquit en aquest cas amb licopè.

Primerament, es van fer una sèrie de proves fins a aconseguir un oli saturat ric en licopè. L'objectiu va ser trobar la quantitat (g) d'extracte en pols que havíem d'incorporar a l'oli de blat de moro per enriquir-lo fins a la saturació. Amb els resultats obtinguts, es va observar que a partir de 10 g d'extracte ric en licopè l'oli ja es saturava i precipitaven les partícules sòlides. Per tant, l'oli no era capaç de solubilitzar més extracte.

Per la preparació de l'oli enriquit en licopè, primerament es van pesar els grams d'extracte (10 g en el cas de l'oli saturat) i es van afegir als 100 mL d'oli de blat de moro refinat. La barreja es va sonicar durant un minut i després es va escalfar fins a uns 50°C aproximadament durant cinc minuts en un calefactor elèctric. Després, es va tornar a repetir el mateix procés, és a dir, sonicar durant un minut i escalfar fins a 50°C durant cinc minuts. Com després d'acabar tot aquest procés, encara quedaven partícules en suspensió insolubles en l'oli, es va filtrar per poder-les eliminar. Com a resultat, es va obtenir un oli vegetal (de blat de moro) enriquit amb licopè.

6.2.1.2 Preparació de les emulsions

En primer lloc es va preparar l'emulsió primària o convencional. Per la seva formació es va pesar la pectina altament metoxilada (HM) per preparar emulsions a diferents concentracions (Taula 2). Paral·lelament, es va posar a bullir 300 mL d'aigua MilliQ en un calefactor elèctric. Quan l'aigua miliQ va arribar a uns 80°C aproximadament, l'aigua necessària per elaborar cada una de les nanoemulsions (Taula 2) es va passar per l'ultraturrax (Ultra-Turrax, Janke&Kunkel, Staufen, Germany) durant 5 minuts a 9500 rpm i es va anar afegint la pectina a poc a poc per evitar la formació de grumolls. Després es va deixar refredar l'emulsió fins a temperatura ambient tapada amb un paper d'alumini. Quan la temperatura de l'aigua va arribar a 25°C-30°C, es va afegir 9 mL de Tween 80 i 3 mL d'oli enriquit amb licopè i la barreja es va tornar a passar per l'ultraturrax amb les mateixes revolucions, però aquest cop durant dos minuts.

Nanoemulsió	Oli enriquit (mL)	Tween 80 (mL)	Aigua (mL)	Pectina (biopolímer) (g)
0% pectina	3	9	288	0
0,5% pectina	3	9	286,5	1,5
1% pectina	3	9	285	3
1,5% pectina	3	9	283,5	4,5
2% pectina	3	9	282	6

Taula 2. *Composició de les diferents nanoemulsions.*

6.2.1.3 Formació de les nanoemulsions

La nanoemulsió es va obtenir mitjançant l'equip d'alta pressió també anomenat microfluiditzador (Microfluidics M-110P-Figura 3). Es va fer passar l'emulsió primària tres vegades per l'equip per tal d'obtenir una emulsió secundària o nanoemulsió amb el tamany de partícula desitjat. La pressió a la qual es va treballar amb l'equip va ser a 150 MPa.



Figura 3. *Microfluidics-M110.*

Aquest sistema d'alta pressió té una vàlvula que desvia el producte a l'interior del sistema, i un pistó que genera en el seu interior una alta pressió. El producte arriba a la càmera de tractament i és sotmès a altes velocitats, la qual cosa provoca una col·lisió entre les partícules produint una disminució del tamany de gota. Dins la cambra hi ha dissenyats uns microcanals de geometria fixa a través dels quals la corrent de fluid circula a grans velocitats. Al sortir de la càmera el fluid circula per una bobina externa en forma d'espiral que refreda el producte, i per tant la temperatura de les nanoemulsions mai va superar els 20°C.

Una cop obtinguda la nanoemulsió es va procedir immediatament a efectuar la seva caracterització i digestió per tal d'obtenir tots els paràmetres desitjats.

6.2.2 CARACTERITZACIÓ DE LA NANOEMULSIÓ

6.2.2.1 Tamany de partícula

El diàmetre de partícula es va mesurar mitjançant la dispersió de llum dinàmica (DLS) amb l'equip làser ZetasizerNanoZS (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Regne Unit). Les condicions de treball del equip van ser de 633 nm de longitud d'ona i a una temperatura de 25°C.

La dispersió de llum dinàmica mesura el moviment de les gotes de tamany nanomètric i ho relaciona amb el diàmetre hidrodinàmic mitjançant l'equació de Stokes-Einstein.

Les emulsions s'introdueixen dins de l'equip per fer les lectures mitjançant cubetes de plàstic, amb una capacitat aproximada de 2 ml cada cubeta. Les mostres es van diluir 1:100, és a dir, 100 µL de nanoemulsió i 900 µL d'aigua miliQ. Seguidament es va tancar la tapa de l'equip i es va realitzar la lectura.

Per determinar el tamany de partícula es van introduir tres mostres de cada una de les nanoemulsions i de l'emulsió convencional i es van fer dos lectures cada una d'elles.

6.2.2.2 Potencial zeta

El potencial zeta es va mesurar mitjançant la mobilitat electroforètica de les gotes de la emulsió. Es va mesurar per dispersió de la llum mitjançant l'equip làser ZetasizerNanoZS (Malvern Instruments Ltd, UK). El seu principi de funcionament consisteix en la determinació de la càrrega superficial a l'interfase de les petites gotes disperses en l'emulsió i si la càrrega es suficientment alta o baixa per assumir que les forces de repulsió entre les gotes són predominants en la emulsió i no es produiran fenòmens de coalescència. Per tant, és una indicació de l'estabilitat de l'emulsió.

Les emulsions es van introduir dins de l'equip mitjançant unes cubetes de plàstic amb un elèctrode a cada banda de la cubeta, amb una capacitat aproximada de 1 ml cada cubeta (Figura 4). Seguidament es va tancar la tapa de l'equip i es va fer la lectura. Tant de les nanoemulsions com de l'emulsió convencional, es van agafar tres mostres diferents de cada una d'ella per realitzar tres lectures.



Figura 4. *Fotografia cubetes per la determinació del potencial zeta*

6.2.2.3 Viscositat

La viscositat de les emulsions es va mesurar agafant aproximadament 10 ml de mostra amb una pipeta Pasteur i col·locant-la en la cubeta de lectura de l'equip.

L'equip amb el qual es va fer la mesura és el SV-10 Vibro-viscosímetre (A & D Company, Tòquio, Japó), que produeix una vibració de 30 Hz i manté una amplitud constant. Es van realitzar un total de tres mesures de la nanoemulsió, així com de l'emulsió convencional.

6.2.2.4 Color

El color de les emulsions es va mesurar mitjançant el colorímetre Minolta CR-400 (KonicaMinoltaSensing, Inc, Osaka, Japó). L'aparell funciona a temperatura ambient i porta incorporat l'il·luminant D65. La calibració del colorímetre es fa mitjançant el color blanc estàndard. En la lectura del color de les emulsions s'obtenen tres valors (L^* , a^* , b^*), els quals representen:

- Eix perpendicular al pla (L^*): la lluminositat (clar-fosc).
- Eix abscisses (a^*): posició entre verd i vermell. Els valors que siguin negatius indicaran verd, mentre que aquells siguin positius indicaran vermell).
- Eix ordenades (b^*): posició entre groc i blau. Aquells valors que siguin negatius indicaran blau, i els positius indicaran groc.

Aquest model de color LAB és tridimensional i es representa adequadament en un espai tridimensional (Figura 5).

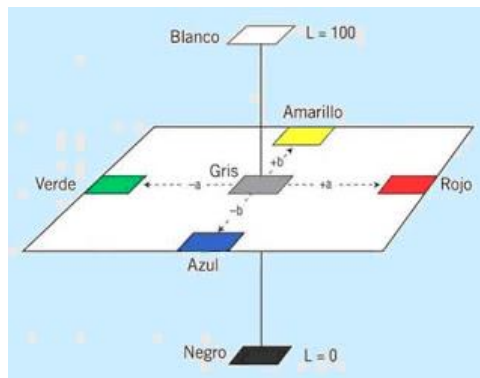


Figura 5. Diagrama colorimètric de Hunter.

Es van agafar tres mostres diferents de cada nanoemulsió i de l'emulsió convencional i es van fer tres lectures de cada una d'elles.

El to és l'atribut de la sensació visual segons el qual l'estímul sembla molt similar a un dels colors que es percep: vermell, groc, verd, blau o certes proporcions de dos d'ells. Ve donat per la següent expressió:

(Equació 1)
$$h_{ab} = \tan^{-1} \left[\frac{b}{a} \right]$$

6.2.2.5. Estabilitat

Per determinar l'estabilitat de les nanoemulsions es van col·locar 10 ml de nanoemulsió en dos tubs de vidre i es van emmagatzemar a 4°C. El dia després d'haver preparat la nanoemulsió i l'emulsió convencional es va determinar l'alçada de la capa de sèrum utilitzant un micròmetre. És van realitzar tres lectures de cada mostra. Posteriorment, es va calcular l'índex de descremat mitjançant la fórmula següent:

(Equació 2)
$$\text{Índex de descremat} = \frac{H_s}{H_E} \times 100$$

On:

H_E : alçada de la nanoemulsió

H_s : alçada de la capa de sèrum

6.2.3 DIGESTIÓ *IN VITRO*

La digestió in vitro, simulada sota condicions intestinals, es va realitzar amb un pH-statdevice (MetrohmUSA, Riverview, FL-Figura 6). Primerament, es van posar 30 ml de la nanoemulsió en un vas de precipitats i es va introduir al bany a 37°C. Després, es van afegir 4mL de bilis (47 mg/mL) i 1mL de clorur càlcic (110 mg/ml), el pH de la barreja es va ajustar a 7,0 amb l'addició de NaOH. Posteriorment, es van addicionar 2.5 mL de lipasa pancreàtica (24 mg/ml).



Figura 6. PH-stat Device. MetrohmUSA, Riverview, FL.

Després de dos hores de digestió, es va anotar el volum de NaOH (mL) gastat per neutralitzar l'acidesa produïda pels àcids grassos lliures (FFA), alliberats per la lipasa durant la digestió. Aquest paràmetre ens indica el grau de digestibilitat de l'oli. La nanoemulsió es va mantenir a pH 7 durant tot el procés de digestió. La concentració de NaOH utilitzada va ser de 0,25 M.

Per calcular el percentatge d'àcids grassos lliures que s'alliberen durant les dos hores que dura el procés de digestió es va utilitzar la següent equació:

(Equació 3)

$$FFA(\%) = 100 \times \frac{V_{NaOH} \times C_{NaOH} \times M_{oli}}{2 \times m_{oli}}$$

On:

V_{NaOH} : el volum de NaOH que s'ha gastat per neutralitzar els àcids grassos lliures que s'han alliberat durant la digestió.

C_{NaOH} : la molaritat del NaOH (0,25 M)

M_{oli} : el pes molecular de l'oli (800 g/mol)

m_{oli} : pes total de l'oli inicial que hi ha en la barreja (g).

La nanoemulsió que es va obtenir després de la digestió es va anomenar **nanoemulsió digerida**. Per obtenir la **fracció micel·lar**, es van agafar aproximadament 15 ml de nanoemulsió digerida i es van centrifugar a 4000 rpm durant 40 minuts a

25°C. El sobrenedant obtingut, part on està solubilitzat el component bioactiu alliberat de la nanopartícula, es va agafar amb una pipeta Pasteur. En totes les mostres centrifugades, es va poder observar una petita capa de gotes d'oli no digerit i que es trobava a la part més alta del tub, la qual es va descartar. Tanmateix, es podia observar un precipitat al fons del tub i que tampoc va ser utilitzat.

Una vegada es va obtenir la nanoemulsió digerida i la fracció micel·lar es va procedir a determinar el contingut de licopè d'aquestes.

6.2.4 CONTINGUT EN LICOPÈ

El contingut en licopè de la nanoemulsió digerida i de la fracció micel·lar es va determinar espectrofotomètricament, seguint el mètode proposat per Davis et al. (2003). Inicialment, es van barrejar 2 g de la mostra amb 2,5 mL de butilhidroxitoluè (BHT) en acetona 0.05% (w/v), 2,5 mL d'etanol i 5mL d'hexà. La barreja es va passar pel vòrtex per a que tota la mostra s'homogeneïtzés. Després, es va centrifugar a 200rpm durant 15 minuts a 4°C. Posteriorment, es van afegir 3 mL d'aigua destil·lada i es va procedir a la lectura de l'absorbància de la part orgànica a 503 nm. El contingut en licopè es va calcular mitjançant la següent equació (Fish et al.):

(Equació 4)

$$Licopè = \frac{A_{303} \times PM \times DF \times 1000}{\epsilon \times L}$$

On:

PM: és el pes molecular del licopè (536,9 g/mol)

DF: factor de dilució

ϵ : coeficient d'extinció (172,000 L/mols x cm)

L: longitud de la cubeta en cm (1cm)

6.2.5 DETERMINACIÓ DE LA BIOACCESSIBILITAT

La bioaccessibilitat del licopè de les diferents nanoemulsions es va determinar després de realitzar les digestions. Amb la quantitat de licopè present a la nanoemulsió digerida i a la fracció micel·lar, es va calcular la bioaccessibilitat mitjançant l'equació següent:

$$\text{(Equació 5)} \quad \text{Bioaccessibilitat} = 100 \times \frac{C_{\text{micel·lar}}}{C_{\text{digerida}}}$$

On:

$C_{\text{micel·lar}}$: concentració de licopè en la fracció micel·lar

C_{digerida} : concentració de licopè en la nanoemulsió digerida

6.2.6 ANÀLISI ESTADÍSTIC

Tots els experiments van ser realitzats per duplicat, i els resultats estan expressats com la mitjana i la desviació estàndard. La significació dels resultats obtinguts, així com les diferències entre ells van ser analitzades amb el programa estadístic Statgraphics Plus v.5.1 per a Windows (StatisticalGraphics Co., Rockville, Md). Es va realitzar l'anàlisi de la variança (ANOVA) per a la comparació de les mitjanes obtingudes. El test utilitzat per a establir diferències significatives entre les mitjanes va ser el de la mínima diferència significativa (Least Significant Difference - LSD) amb un nivell de significació del 95%.

7. RESULTATS I DISCUSSIÓ

7.1 TAMANY DE PARTÍCULA

Es va avaluar el tamany de partícula de les cinc nanoemulsions i de l'emulsió convencional (Taula 3).

Taula 3. *Tamany de partícula de les nanoemulsions i de l'emulsió convencional.*

MOSTRA	TAMANY DE PARTÍCULA (nm)
Emulsió convencional 0% pectina	6117,66 ± 1702, 99
Nanoemulsió 0% pectina	168,54 ± 15,9
Nanoemulsió 0,5% pectina	189,97 ± 13,64
Nanoemulsió 1% pectina	211,79 ± 7,90
Nanoemulsió 1,5% pectina	254,65 ± 57,27
Nanoemulsió 2% pectina	233,96 ± 36,33

Com es pot observar a la taula 3, l'emulsió convencional és la que presenta un tamany de partícula major (6,12 µm), mentre que el tamany de partícula de les nanoemulsions oscil·la entre 168,54 nm (nanoemulsió sense pectina) i 254,65 nm (nanoemulsió 1,5% pectina). Com ja s'ha dit anteriorment, les nanoemulsions són emulsions que presenten un tamany de partícula d'entre 50 i 500 nanòmetres. Per tant es pot afirmar que en el nostre estudi, s'ha aconseguit obtenir emulsions amb el tamany de partícula més petit que l'emulsió convencional i així arribar a tamanys nanomètrics. A més a més, els valors de tamany de partícula obtinguts per les nanoemulsions són més baixos que els presentats a altres estudis. Burapapadh et al. (2010) va elaborar nanoemulsions amb concentracions de pectina entre 1.5-3%, i el tamany de partícula de les quals va oscil·lar entre 200-400 nm.

Taula 4. Anàlisi de varianza del tamany de partícula de les diferents nanoemulsions avaluades.

Variable	F-ratio	P-value
Tipus de Nanoemulsions	13,75	0,000

Com es pot observar, existeixen diferències estadísticament significatives pel que fa al tamany de partícula entre nanoemulsions ($p < 0,05$) (Taula 4). S'observa que a mesura que s'incrementa la quantitat de pectina incorporada a la nanoemulsió, el tamany de partícula també augmenta, a excepció de la nanoemulsió al 2% de pectina. Aquesta tendència podria justificar-se pel fet que a baixes concentracions de pectina, no hi ha suficient biopolímer, durant la formació de les gotes de la nanoemulsió i es produeixen fenòmens de coalescència entre aquestes. En canvi, quan hi ha un excés, s'observa una disminució del tamany de partícula ja que la concentració de pectina que es trobava en la nanoemulsió és suficient per permetre una ràpida difusió i absorció de les gotes que es formen (Dickinson, 2003). A més a més, el fet de que al augmentar la pectina es produeixi un augment de la viscositat, pot produir un increment del tamany de partícula. Walstra (1993) va suggerir que el tamany de partícula de les emulsions augmenta a mesura que la viscositat es major.

Contràriament, Burapapadh et al., (2010) van estudiar l'efecte de la concentració de pectina en la formació de nanoemulsions per a usos farmacèutics i van arribar a la conclusió que a baixes concentracions de pectina (per sota del 2%), el tamany de partícula de les nanoemulsions disminueix significativament amb l'increment de la concentració del biopolímer.

Les gràfiques de distribució del tamany de partícula de cada nanoemulsió es presenten a continuació (figura 7, 8, 9, 10 i 11). Es pot observar en totes elles que la seva distribució oscil·la entre 100 i 1000 nanòmetres. A més a més, es veu un únic pic que significa que les nanoemulsions són homogènies i que no hi ha cap partícula que es trobi fora dels rangs comentats anteriorment. Tot i això, el pic es veu una mica

desplaçat cap a la dreta (partícules amb un tamany més gran) a mesura que augmenta la quantitat de pectina.

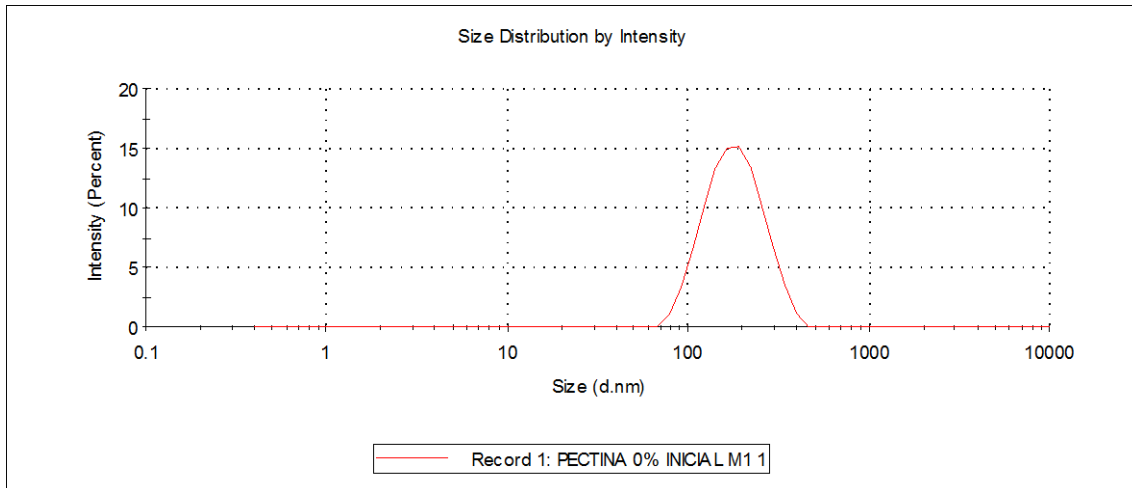


Figura 7. Representació de la distribució del tamany de partícula de la nanoemulsió 0% de pectina.

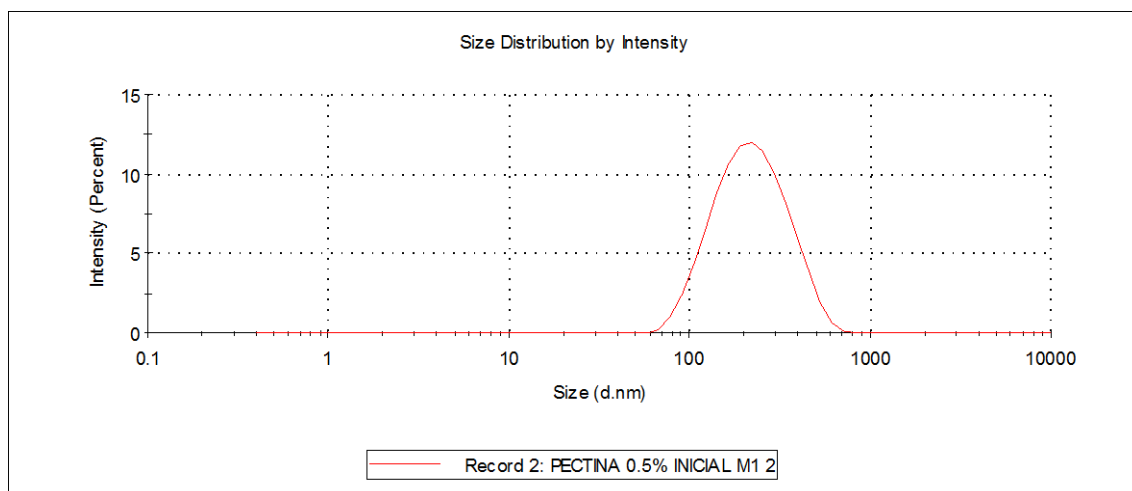


Figura 8. Representació de la distribució del tamany de partícula de la nanoemulsió 0.5% de pectina

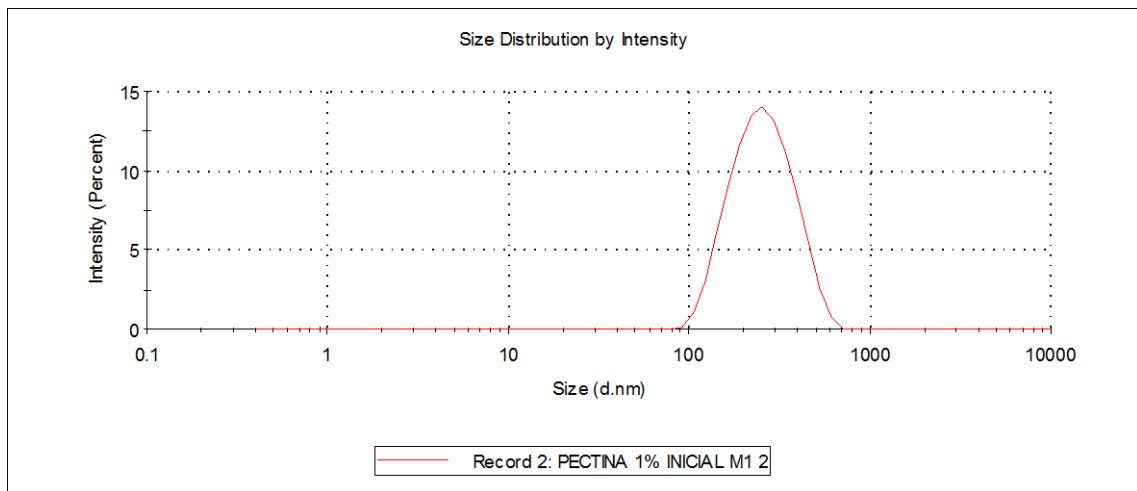


Figura 9. Representació de la distribució del tamany de partícula de la nanoemulsió 1% de pectina.

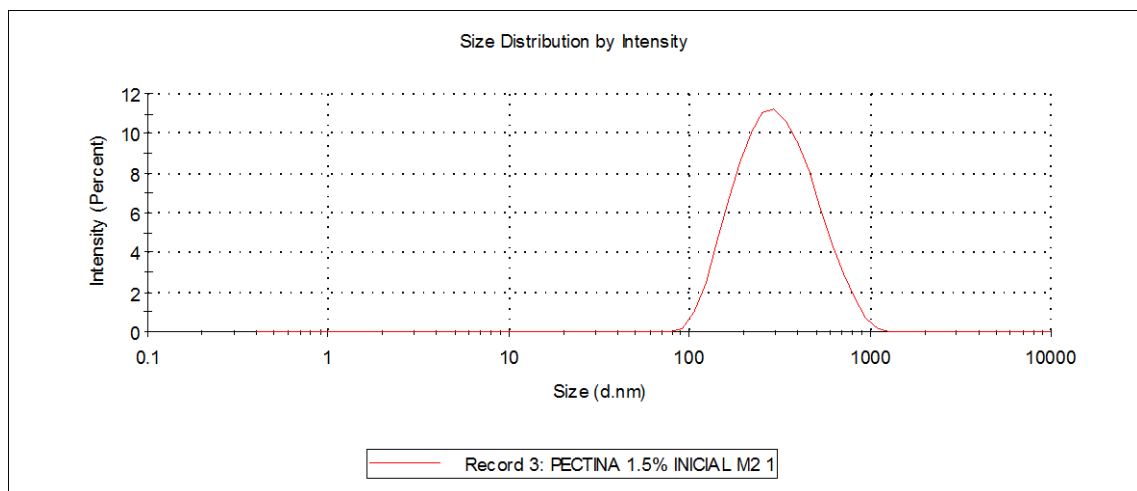


Figura 10. Representació de la distribució del tamany de partícula de la nanoemulsió 1.5% de pectina.

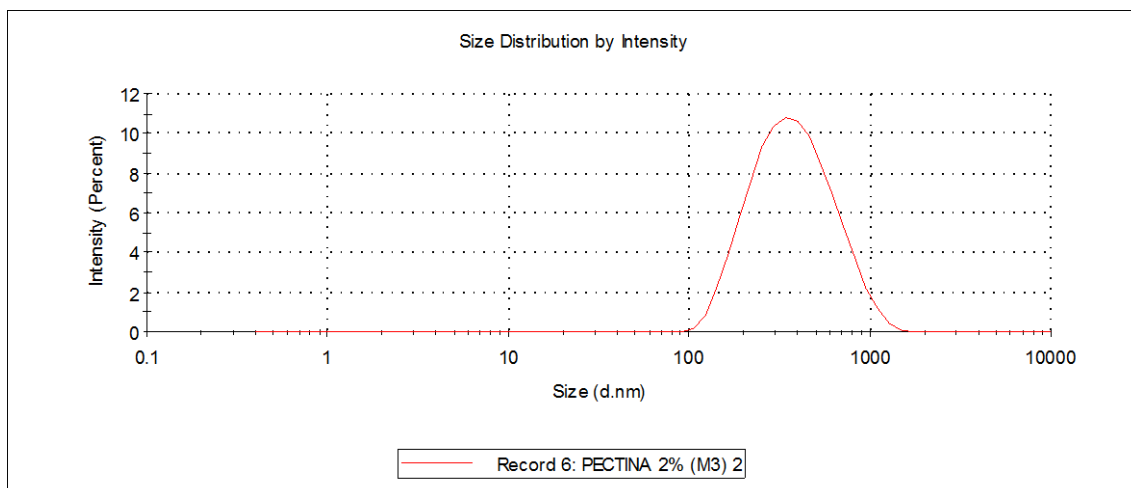


Figura 11. Representació de la distribució del tamany de partícula de la nanoemulsió 2% de pectina.

7.2 ÍNDEX DE POLIDISPERSIÓ

L'índex de polidispersió (Pdl) ens informa de si la mostra es homogènea o no. Aquest índex oscil·la entre 0,1 i 1. Un Pdl alt indica que el rang del tamany de partícula d'aquella mostra és més ampli, i per tant que aquella mostra es poc homogènea. A més a més, ens dona una idea de les diferències en el tamany de partícula de les partícules que trobem dins de la nanoemulsió.

A la taula 5 es poden observar els valors d'índex de polidispersió que s'han obtingut a les nanoemulsions i l'emulsió convencional.

Taula 5. Índex de polidispersió (Pdl) de les nanoemulsions i de l'emulsió convencional.

MOSTRA	Índex de polidispersió
Emulsió convencional 0% pectina	0,66 ± 0,26
Nanoemulsió 0% pectina	0,24 ± 0,07
Nanoemulsió 0,5% pectina	0,23 ± 0,02
Nanoemulsió 1% pectina	0,30 ± 0,20
Nanoemulsió 1,5% pectina	0,28 ± 0,07
Nanoemulsió 2% pectina	0,25 ± 0,04

Com es pot observar en la taula 5, l'emulsió convencional és la mostra que presenta un índex de polidispersió més elevat ($0,66 \pm 0,26$) i per tant, es consideraria poc homogènia. Les nanoemulsions presenten valors molt pròxims a zero. Per tant, es pot considerar que aquestes són homogènies.

Taula 6. Anàlisi de varianza de l'índex de polidispersió de les diferents nanoemulsions avaluades.

Variable	F-ratio	P-value
Tipus de Nanoemulsió	0,80	0,5304

Tal i com es veu en la taula 6 no hi ha diferències estadísticament significatives en el índex de polidispersió de les mostres ($p > 0,05$). Per tant, podem dir que la quantitat de pectina afegida per a la formació de la nanoemulsió no afecta a l'índex de polidispersió. Els valors d'índex de polidispersió de les nanoemulsions són similars entre ells independentment de la quantitat de pectina afegida.

7.3 POTENCIAL ZETA

El potencial zeta mesurat a totes les mostres es presenta a la taula 7.

Taula 7. *Potencial zeta de les nanoemulsions i de l'emulsió convencional.*

MOSTRA	Potencial Zeta
Emulsió convencional 0% pectina	-16,05 ± 5,63
Nanoemulsió 0% pectina	-8,78 ± 0,62
Nanoemulsió 0,5% pectina	-3,55 ± 0,81
Nanoemulsió 1% pectina	-7,61 ± 1,62
Nanoemulsió 1,5% pectina	-7,23 ± 2,29
Nanoemulsió 2% pectina	-6,03 ± 1,29

Es pot observar que en totes les mostres el potencial zeta és negatiu ja que tant la pectina, polisacàrid aniònic, com el surfactant (Tween 80) aporten grups carregats negativament a l'interfase de les gotes d'oli. L'emulsió convencional és la que presenta un potencial zeta més negatiu (-16,05 ± 5,63), mentre que la nanoemulsió amb 0,5% de pectina presenta un potencial zeta menys negatiu (-3,55 ± 0,81).

Taula 8. *Anàlisi de variança del potencial zeta de les diferents nanoemulsions avaluades.*

Variable	F-ratio	P-value
Tipus de Nanoemulsió	33,40	0,000

Com es veu en la taula 8, hi ha diferències estadísticament significatives en el potencial zeta de les nanoemulsions. Es produeix una disminució del potencial zeta (és a dir, valors menys negatius) a mesura que s'afegeix pectina a la mostra a excepció de la nanoemulsió 0,5% (taula 7). Aquest últim resultat, podria ser fruit d'un error puntual en el mètode o en la preparació de la mostra alhora de ser introduïda en l'aparell per ser mesurada. Aquesta tendència coincideix amb la obtinguda amb altres estudis on a mesura que s'augmenta la concentració de pectina a la nanoemulsió, el potencial zeta tendeix a disminuir. Segons Burapapadh et al. (2010) a elevades concentracions de pectina aquesta es troba fortament unida a les gotes d'oli, i i per tant els seus grups carboxils lliures disminueixen. Per una altra banda, totes les mostres estan estabilitzades per un surfactant no iònic (tween 80). S'ha vist que aquest pot aportar una càrrega negativa a les gotes d'oli degut a l'absorció d'hidroxil a partir de la fase aquosa o per la presència de impureses aniòniques com són els àcids grassos lliures (McClements et al., 2005).

7.4 VISCOSITAT

La taula 9 mostra els resultats de la viscositat de les diferents nanoemulsions preparades, així com de l'emulsió convencional.

Taula 9. *Viscositat de les nanoemulsions i de l'emulsió convencional.*

MOSTRA	Viscositat (mPa·S)
Emulsió convencional 0% pectina	47,23 ± 50,53
Nanoemulsió 0% pectina	1,09 ± 0,08
Nanoemulsió 0,5% pectina	6,29 ± 0,48
Nanoemulsió 1% pectina	24,08 ± 3,86
Nanoemulsió 1,5% pectina	80,1 ± 3,48
Nanoemulsió 2% pectina	202,66 ± 8,68

La nanoemulsió amb 2% de pectina presenta la viscositat més elevada ($202,66 \pm 8,68$), mentre que la nanoemulsió amb sense de pectina és la que menys ($1,09 \pm 0,08$). Es pot veure en la taula 10 que hi ha diferències significatives en la viscositat entre les nanoemulsions avaluades ($p < 0,05$). A mesura que augmenta la concentració de pectina en la emulsió, la viscositat també augmenta (taula 9).

Taula 10. Anàlisi de varianza de la viscositat de les diferents nanoemulsions avaluades.

Variable	F-ratio	P-value
Tipus de Nanoemulsió	2069,07	0,000

Com ja s'ha dit anteriorment, la pectina és un polisacàrid que actua com agent espessant i és per això que les nanoemulsions a les quals s'ha afegit més quantitat de pectina, presenten una viscositat més elevada. La diferència es veu més accentuada amb les nanoemulsions amb concentracions de pectina per damunt de 1,5%, fet que s'explica per la elevada concentració de pectina que contenen. Per tant, els resultats obtinguts concorden amb la literatura ja que la pectina presenta la propietat d'espessant i també és responsable de la viscositat (Saézn, 2006).

A l'any 1993, l'autor Walstra va veure que el tamany de partícula de les emulsions, utilitzant mètodes d'alta energia, disminuïa a mesura que la viscositat i la tensió interfacial eren menors. Aquests resultats concorden amb els obtinguts en aquest treball. Nanoemulsions que presenten elevades viscositats, com per exemple la nanoemulsió realitzada amb un 2% de pectina, són les que tenen un major tamany de partícula (taula 3). Contràriament, Saberi et al. (2012) va suggerir que no hi havia cap relació entre el tamany de partícula, la viscositat i la tensió interfacial de les nanoemulsions.

La viscositat és un paràmetre físico-químic de les emulsions molt important en la indústria alimentaria pel que fa a diverses aplicacions en la fabricació de productes alimentaris. De fet, els nostres resultats indiquen que la nanoemulsió sense pectina presenta menys viscositat que l'emulsió convencional. D'aquesta manera, l'aplicació en el sector alimentari de nanoemulsions podria ser una alternativa enfront emulsions convencionals.

7.5 COLOR

Es van determinar el valor L^* , el qual ens indica la lluminositat i el to de totes les nanoemulsions, així com de la nanoemulsió convencional .

7.5.1 Lluminositat (L^*)

En la taula 11 es pot observar els resultats de L^* de les nanoemulsions i de l'emulsió convencional.

Taula 11. Valor de L^* de les nanoemulsions i de l'emulsió convencional.

MOSTRA	L^*
Emulsió convencional 0% pectina	$30,72 \pm 1,08$
Nanoemulsió 0% pectina	$56,14 \pm 0,22$
Nanoemulsió 0,5% pectina	$49,76 \pm 0,57$
Nanoemulsió 1% pectina	$41,60 \pm 2,70$
Nanoemulsió 1,5% pectina	$51,38 \pm 0,605$
Nanoemulsió 2% pectina	$53,31 \pm 0,20$

Taula 12. Anàlisi de variances del valor L^* de les diferents nanoemulsions i l'emulsió convencional.

Variable	F-ratio	P-value
Tipus de Nanoemulsió	112,98	0,000

El valor L^* és un paràmetre que oscil·la entre 0 i 100. Valors elevats, pròxims a 100, d'aquest paràmetre indiquen una lluminositat alta de la mostra. Observant la taula 11, es pot dir que totes les nanoemulsions analitzades presenten una lluminositat elevada amb valors que oscil·len entre (41,60-56,14). No obstant, es van observar diferències significatives en el valor de L^* de les nanoemulsions analitzades (taula 12). Totes les nanoemulsions presenten una lluminositat similar a excepció de la nanoemulsió amb 1% de pectina que té una lluminositat més baixa. Aquesta singularitat es podria atribuir a un error de lectura.

Els nostres resultats ens mostren que les nanoemulsions presenten una lluminositat més elevada que l'emulsió convencional. No obstant, no s'ha trobat cap treball a la bibliografia sobre lluminositat en nanoemulsions. L'aparença de les nanoemulsions és un factor a tenir en compte alhora de desenvolupar nous productes, ja que l'aspecte d'un aliment és una de les característiques més importants que tenen més en compte els consumidors alhora d'elegir un producte (Salvia et al., 2012).

7.5.2 To

El t_o s'ha calculat a partir dels valors a^* i b^* segons l'equació 1. En la següent taula es mostren els resultats obtinguts per a les nanoemulsions i l'emulsió convencional (taula 13).

Taula 13. *To de les nanoemulsions i de l'emulsió convencional.*

MOSTRA	to
Emulsió convencional 0% pectina	7,80 ± 1,39
Nanoemulsió 0% pectina	-2,01 ± 1,12
Nanoemulsió 0,5% pectina	13,29 ± 11,74
Nanoemulsió 1% pectina	14,82 ± 6,03
Nanoemulsió 1,5% pectina	10,62 ± 4,61
Nanoemulsió 2% pectina	10,76 ± 4,74

Taula 14. *Anàlisi de varianza del to de les diferents nanoemulsions i l'emulsió convencional.*

Variable	F-ratio	P-value
Tipus de Nanoemulsió	5,94	0,0006

Es pot observar a la taula 13 que la nanoemulsió sense pectina presenta un to negatiu, mentre que l'emulsió convencional un to positiu. Un valor negatiu ens informa que la nanoemulsió és d'un color menys rogenc, mentre que com més positiu és el valor obtingut del to, més rogenc és la emulsió convencional. Les nanoemulsions presenten una aparença més transparent que les emulsions convencionals, fet que podria significar un gran avantatge pel sector alimentari ja sigui per begudes o productes alimenticis amb aquestes característiques (Wooster et al., 2008).

McClements a l'any 2002, va poder observar que el color de l'emulsió depèn del índex de refracció de la fase continua i dispersa, de la concentració de l'oli i del tamany de partícula. En altres articles previs de la literatura, s'han descrit les nanoemulsions com transparents degut a que com presenten un tamany de partícula més petit, la dispersió de la llum és més baixa (Mason et al., 2006; Solans et al 2005; Tadros et al., 2004).

També es pot observar que a mesura que s'augmenta la concentració de pectina de les nanoemulsions, el to tendeix a disminuir i per tant, tenen un color menys vermellós.

7.6 ESTABILITAT

L'estabilitat d'una emulsió es mesura mitjançant l'índex de descremat, i com més baix és el valor més estable és aquella mostra. La taula 15 presenta els resultats obtinguts de totes les mostres analitzades.

Taula 15. Índex de descremat de les nanoemulsions i de l'emulsió convencional.

MOSTRA	Índex de descremat (%)
Emulsió convencional 0% pectina	0,50 ± 0,04
Nanoemulsió 0% pectina	0,38 ± 0,16
Nanoemulsió 0,5% pectina	27,17 ± 0,88
Nanoemulsió 1% pectina	0,73 ± 0,04
Nanoemulsió 1,5% pectina	0,00
Nanoemulsió 2% pectina	0,00

Taula 16. Anàlisi de varianza de l'estabilitat de les diferents nanoemulsions avaluades.

Variable	F-ratio	P-value
Tipus de Nanoemulsió	1772,13	0,000

Existeixen diferències estadísticament significatives entre les nanoemulsions analitzades ($p < 0,05$) (taula 16). La nanoemulsió 0,5% de pectina té un índex de descremat significativament elevat, fet que indica una baixa estabilitat. Les mostres que tenen un índex de descremat significativament més baix són les nanoemulsions 1.5% i 2% pectina, amb un valor d'un 0%. Per tant són les mostres amb una estabilitat major. D'altra banda, l'emulsió convencional presenta un índex de descremat més elevat que la nanoemulsió sense pectina. És per això, que podem dir que aquesta última presenta una major estabilitat que l'emulsió convencional i que un tamany de partícula més petit, podria incrementar l'estabilitat de les emulsions.

L'estabilitat de l'emulsió es relaciona amb el volum d'oli retingut per la fibra després del col·lapse de l'emulsió. Altres factors que influeixen són el tamany de partícula, la temperatura, font de la fibra, tipus d'oli utilitzat, concentració de fibra afegida etc. (Peraza et al. 1999). Pongsawatmanit et al. (2006). van suggerir que l'estabilitat de nanoemulsions realitzades amb alginat depèn de diferents factors, entre ells de la concentració d'alginat present en l'emulsió. En aquest estudi es va observar que l'estabilitat augmentava al augmentar la concentració del biopolímer. Per tant, es pot arribar a la conclusió que la pectina influeix en l'estabilitat de les nanoemulsions que hem preparat i que es podria atribuir al fet que es tracta d'un agent espessant és a dir, l'estabilitat és veu augmentada a mesura que la concentració de pectina és més elevada i s'incrementa la viscositat.

Tot i això, en l'estudi de Pongsawatmanit et al. (2006) també es va afirmar que la presència d'alginat en concentracions per damunt del 0,5% per l'elaboració de nanoemulsions pot promoure la floculació de les gotes i la formació de crema mitjançant un mecanisme d'agotament.

7.7 ÀCIDS GRASSOS LLIURES

El percentatge d'àcids grassos lliures (AGL) indica la quantitat d'àcids grassos que s'han alliberat del triglicèrid durant la digestió i per tant ens informa de l'activitat de la lipasa pancreàtica al llarg del temps. Els resultats de FFA es trobem recollits a la taula 17.

Taula 17. Àcids grassos lliures que s'han alliberat durant tot el procés de digestió de les nanoemulsions i de l'emulsió convencional

MOSTRA	FFA (%)
Emulsió convencional 0% pectina	135,73 ± 9,99
Nanoemulsió 0% pectina	34,1 ± 3,53
Nanoemulsió 0,5% pectina	27,88 ± 3,51
Nanoemulsió 1% pectina	27,07 ± 1,41
Nanoemulsió 1,5% pectina	23,92 ± 4,39
Nanoemulsió 2% pectina	69,70 ± 9,74

La emulsió convencional presenta significativament més quantitat d'AGL (135.73%) que les nanoemulsions. Per tant, les nanoemulsions tenen una menor digestibilitat que les emulsions convencionals. Li et al (2011) va suggerir que alguns components que han estat hidrolitzats, com són els fosfolípids, proteïnes o surfactants, poden influir en el número total d'àcids grassos lliures alliberats per les lipases. Per tant, podriem dir que la presència; així com la quantitat de surfactant (Tween 80) utilitzat per la elaboració de les nanoemulsions pot impedir l'activitat de la lipasa. Sembla que el surfactant dificulta la penetració de la lipasa en les gotes d'àcids grassos reduint la quantitat d'àcids grassos alliberats. En el present estudi es van preparar nanoemulsions amb una relació d'oli:surfactant de 1%:3%. Per tant, la concentració de surfactant utilitzada per la fabricació de la nanoemulsió és molt superior a la de l'oli. Altres estudis (Salvia et al., 2012) proposen augmentar la concentració d'oli enriquit afegit a un 4% i disminuir la quantitat de surfactant utilitzat a un 1% per l'elaboració de

nanoemulsions, ja que aquest fet podria augmentar la quantitat d'àcids grassos lliures alliberats i d'aquesta manera també podria influir en l'absorció posterior del component bioactiu de forma positiva.

Taula 18. Anàlisi de variançadelsàcids grassos lliures de les diferents nanoemulsions avaluades

Variable	F-ratio	P-value
Tipus de Nanoemulsió	95,85	0,000

La quantitat AGL a les nanoemulsions oscil·la entre 27,07% i 69,70%. Com es pot observar en la taula 18, hi ha diferències estadísticament significatives entre les nanoemulsions estudiades ($p < 0.05$). La nanoemulsió amb un 2% de pectina presenta valors de AGL significativament més grans que les elaborades amb concentracions de pectina iguals o menors a 1,5%. Per tant, la pectina no impedeix que la lipasa actuï tal com es podria pensar inicialment. De fet, alguns autors suggereixen que les fibres presents a les matrius alimentaries, com exemple la pectina, actuen captant els lípids impeding que d'aquesta manera siguin digerits (Mataix, 2009).

7.8 BIOACCESSIBILITAT DEL LICOPÈ

La bioaccessibilitat del licopè es va calcular mitjançant la determinació del contingut de licopè en la nanoemulsió digerida i en la fracció micel·lar per a cada una de les mostres estudiades. A continuació es presenten els resultats de bioaccessibilitat del licopè que s'han obtingut (taula 19).

Taula 19. *Bioaccessibilitat del licopè a les mostres.*

MOSTRA	Bioaccessibilitat (%)
Emulsió convencional 0% pectina	73,18 ± 12,41
Nanoemulsió 0% pectina	76,87 ± 6,38
Nanoemulsió 0,5% pectina	56,73 ± 3,98
Nanoemulsió 1% pectina	34,35 ± 6,81
Nanoemulsió 1,5% pectina	26,43 ± 5,89
Nanoemulsió 2% pectina	78,22 ± 21,84

Taula 20. *Anàlisi de varianza de la bioaccessibilitat del licopè de les diferents nanoemulsions avaluades.*

Variable	F-ratio	P-value
Tipus de Nanoemulsió	16,00	0,000

La nanoemulsió que presenta una bioaccessibilitat del licopè més elevada és la del 2% de pectina, i la més baixa la de 0,5% de pectina, amb uns valors de 78,22% i 34,35%, respectivament (taula 19). Es pot observar en la taula 20 que la concentració de pectina influeix significativament en la bioaccessibilitat del licopè ($p < 0,05$). A mesura que augmenta la concentració de pectina disminueix la bioaccessibilitat (taula 19), però hi trobem una excepció; la nanoemulsió amb 2% de pectina és la que presenta la bioaccessibilitat més alta. Això es podria explicar perquè la lipasa ha tingut un índex d'actuació alt i per tant ha trencat i ha alliberat els àcids grassos que contenen encapsulats al licopè, tal i com es pot observar en la taula 17. S'ha vist que l'addició de fibra dietètica com és la pectina en la nostra alimentació, podria fer disminuir l'absorció dels carotenoids (Riedl et. al 1999). En humans, Rock i Swendseid

(1992), van demostrar que l'addició de pectina a la nostra alimentació disminueix la concentració de beta-carotè en plasma. Aquesta evidència coincideix amb els resultats obtinguts, ja que la nanoemulsió amb un 1,5 % de pectina presenta una bioaccessibilitat del licopè baixa. Existeixen altres factors que influeixen en la bioaccessibilitat dels carotenoids. S'ha vist que els lípids són necessaris per fer que l'absorció sigui més eficient, i per tant pot afectar la bioaccessibilitat d'aquests compostos de diferents maneres. En primer lloc, els lípids de la nostra dieta aporten una part lipofílica que es tradueix en una facilitació del transport dels carotenoids de la matriu alimentaria a les gotes d'oli durant la digestió. En segon lloc, els lípids estimulen la secreció de lipases pancreàtiques i sals biliars (Mu et al. 2004). I finalment, els productes hidrolitzats que s'han format a partir dels lípids (Borne et al. 2003), poden modificar les característiques fisicoquímiques de les micel·les, i per tant els carotenoids es poden redistribuir de diferent forma i afectar la bioaccessibilitat. Alguns investigadors han demostrat que el grau d'insaturació dels àcids grassos afecta l'absorció dels carotenoids. Clark et al. (2000), va observar que l'absorció de licopè i d'astaxantina en rates, era millor quan s'administrava oralment en forma d'emulsió i amb oli d'oliva que no amb oli de blat de moro.

Tot i que trobem en la literatura estudis previs que demostren que les nanoemulsions augmenten la bioaccessibilitat de components lipofílics, en aquest estudi no és així, ja que no s'observen diferències significatives pel que fa a la bioaccessibilitat entre la nanoemulsió sense pectina ($76,87 \pm 6,38$) i l'emulsió convencional ($73,18 \pm 12,41$). D'aquesta manera, es pot afirmar que el tamany de partícula i el potencial zeta no influeixen en la bioaccessibilitat de licopè.

Tenint en compte que la concentració d'AGL de la nanoemulsió sense pectina és baixa (taula 17), caldria esperar que la bioaccessibilitat del licopè en aquesta nanoemulsió no fos tan elevada. Salvia et al. (2012), va suggerir que les molècules dels carotenoids tenen la capacitat de traslladar-se des de la fase de l'oli no digerit a la fase micel·lar. Això s'explica ja que hi ha una elevada concentració i capacitat de solubilització de les micel·les mixtes. Per tant, aquest fet podria justificar aquest augment de bioaccessibilitat en nanoemulsions poc digerides per la lipasa pancreàtica.

8. CONCLUSIONS

- I. Les nanoemulsions presenten diàmetres de partícula menors que les emulsions convencionals, arribant a valors nanomètrics. A més a més, a mesura que s'augmenta la concentració de pectina incorporada a la nanoemulsió, el tamany de partícula es major.
- II. L'emulsió convencional presenta un índex de polidispersió (Pdl) més elevat que les nanoemulsions, considerant així que aquestes últimes són més homogènies.
- III. L'emulsió convencional va presentar valors de potencial zeta més negatius que les nanoemulsions, per tant les gotes de la nanoemulsió tenen una mobilitat elèctrica major. Com més quantitat de pectina conté la nanoemulsió, el potencial zeta és menys negatiu.
- IV. L'emulsió convencional presenta una major viscositat que la nanoemulsió sense pectina. Tot i això, a mesura que augmenta la concentració de pectina en la nanoemulsió la viscositat augmenta, superant fins i tot la de l'emulsió convencional.
- V. Les nanoemulsions presenten una lluminositat més elevada que l'emulsió convencional. Això seria molt útil per la indústria alimentària de cara a la fabricació i/o millora de productes dirigits al consumidor.
- VI. La nanoemulsió sense pectina és l'única que presenta un to negatiu. Com més positiu és aquest valor, més rogenc serà el color de l'emulsió.
- VII. En general, les nanoemulsions tenen una major estabilitat que l'emulsió convencional. Aquest fet s'atribueix a fet que a les nanoemulsions s'ha

incorporat pectina a diferents concentracions, i que aquesta presenta la propietat d'espessant.

- VIII. Durant la digestió de l'emulsió convencional s'alliberen més àcids grassos que durant la digestió de les nanoemulsions. Per tant, aquestes últimes tindrien una menor digestibilitat. Una possible hipòtesis que dificultaria l'alliberació dels àcids grassos podria ser un excés de concentració del surfactant.
- IX. Tot i que hi ha estudis que demostren que les nanopartícules presenten una major bioaccessibilitat del licopè, en aquest treball la bioaccessibilitat entre l'emulsió convencional i la nanoemulsió sense pectina és similar. En general, les nanoemulsions elaborades amb pectina presenten una menor bioaccessibilitat. És a dir, ni el tamany de partícula ni el potencial zeta influïren en la bioaccessibilitat del licopè.
- X. Aquest estudi aportaria nova informació per poder dissenyar sistemes òptims que augmentin la bioaccessibilitat del licopè. Per exemple, l'incorporació a la nanoemulsió de menys quantitat de surfactant i més quantitat d'oli enriquit podria ser una bona opció per duu a terme en un nou estudi i veure quina influència tenen aquests dos components en la bioaccessibilitat dels carotenoids, concretament del licopè.

9. BIBLIOGRAFIA

- BELLO, J. "Calidad de vida, alimentos y salud humana. Fundamentos Científicos" (2005). Ediciones Díaz de Santos. ISBN 978-84-7978-699-1

- BOREL, P.; TYSSANDIER, V.; MEKKI, N.; GROLIER, P.; ROCHETTE, Y.; ALEXANDRE-GOUABAU, M.C. "Chylomicron b-carotene and retinylpalmitate responses are dramatically diminished when men ingest b-carotene with medium-chain rather than long-chain triglycerides". *Journal of Nutrition* (1998). 128(8):1361-7

- BORNE, J.; NYLANDER, T.; KHAN, A. "Vesicle formation and other structures in aqueous dispersions of monoolein and sodium oleate". *Journal of Colloid and Interface Science* (1998). 257(2):310-20

- BURAPAPADH, K.; KUMPUGDEE-VOLLRATH, M.; CHANTASART, D.; SRIAMORNSAK, P. "Fabrication of pectin-based nanoemulsions loaded with itraconazole for pharmaceutical application". *Carbohydrate Polymers* (2010). 384–393

- CASTENMILLER, J.J.M; WEST, C.E. "Bioavailability and bioconversion of carotenoids". *Annual Review of Nutrition* (1998). 18:19-38

- CHEN, H.D; WEISS, J.C; SHAHIDI, F. "Nanotechnology in nutraceuticals and functional foods" *Food Technology* (2006). 60 (3), p. 30

- CLARK, R.M.; YAO, L.; SHE, L.; FURR, H.C. "A comparison of lycopene and astaxanthin absorption from corn oil and olive oil emulsions". *Lipids* (2000). 803-6.
- CUBERO, N.; MONFERRER, A.; VILLALTA, J. *Aditivos Alimentarios* (2002). Aedos. Grupo Mundi-Prensa. ISBN 84-8476-088-X
- DICKINSON, E. "Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems". *Food Hydrocolloid* (2003). 17,25-39
- DIMITROV, N. V; MEYER, C; ULLREY, D. E; CHENOWETH, W; MICHELAKIS, A; MALONE, W. "Bioavailability of b-carotene in humans". *American Journal of Clinical Nutrition* (1988). 48(2):298-304
- FOLADORI, G. [en línea] (2006) *Nanotecnologías en la alimentación y la agricultura*. Universidad de la República, Montevideo. [Consultat: 28 maig 2013]. Disponible a internet: <http://4dlab.info/nanotecnologia/nanotec-nanotecnologias-en-la-alimentacion-y-agricultura.pdf>.
- FUNAMI, T.; ZHANG, G.; HIROE, M.; NODA, S.; NAKAUMA, M.; ASAI, I. "Effects of proteinaceous moiety on the emulsifying properties of sugar beet pectin". *Food Hydrocolloid* (2007). 21,1319-1329
- GARNETT, M.C; KALLINTERI, P. "Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles". *Occupational Medicine* (2006). 56 (5): 307-311.

- GIOVANNUCCI E. "Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature". *Journal of the National Cancer Institute* (1999). 17;91(4):317-31.

- GIL, A. "Tratado de Nutrición. Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos" (2010). Editorial Medica Panamericana. ISBN 978-84-9835-347-1

- HEATH, E; SEREN, S; SAHIN, K; KUCUK, O. "The role of tomato lycopene in the treatment of prostate cancer". *Caledonian Science Press* (2006). ISBN 9780955356506

- HUO, T; FERRUZZI, M. G; SCHWARTZ, S. J; & FAILLA, M. L. "Impact of fatty acylcomposition and quantity of triglycerides on bioaccessibility of dietary carotenoids". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2007). 31;55(22):8950-7

- JAYARAJAN, P; REDDY, V; MOHANRAM, M. "Effect of dietary fat on absorption of β carotene from green leafy vegetables in children". *Indian Journal of Medical Research* (1980). 71:53-6.

- LI, Y.; MCCLEMENTS, D.J. "New Mathematical Model for interpreting pH-stat digestion profiles: impact of lipid droplet characteristics on in vitro digestibility". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2010). 58, 8085-8092

- KRIS-ETHERTON, P.M; HECKER, K.D; BONAMONE, A; COVAL, S.M; BINKOSKI, A.E; HILPERT, K.F; GRIEL, A.E; ETHERTON, T.D. "Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer". *American Journal of Medicine* (2002). 30;113 Suppl 9B:71S-88S

- LIMBACH, L; WICK, P; MANSER, P; GRASS, R; BRUININK, A; STARK, W. "Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress". *Environmental Science & Technology* (2006). 41 (11), pp 4158–4163

- MATAIX, J. "Tratado de Nutrición y Alimentación" (2009). Grupo Oceano. ISBN13: 978-84-95199-83-6

- MC CLEMENTS, D.J. (2005). "Handbook OF Industrial Water Soluble Polymer". [Consultat: 15 juny de 2013]. Disponible a internet: http://books.google.es/books/about/Handbook_of_Industrial_Water_Soluble_Pol.html?id=E_uuzF-PCHwC&redir_esc=y

- MCCLEMENTS, D. J; DECKER, E. A; PARK, Y; WEISS, J. "Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (2009). 49(6):577-606

- MCCLEMENTS, D. J. "Design of Nano-Laminated coatings to control bioavailability of lipophilic food components". *Journal of Food Science* (2010). 75(1):R30-42

- MCCLEMENTS, D. J. "Edible nanoemulsions: Fabrication, properties, and functional performance". *Soft Matter* (2011). 7, 2297-2316

- MU, H.; HOY, C.E. "The digestion of dietary triacylglycerols". *The Journal of Lipid Research* (2004). 43(2):105-33.

- NEL, A; XIA, T; LI, N. "Toxic potential of materials at the nanolevel". *Science* (2006). 311 (5761): 622-627

- NIK, A. M.; LANGMAID, S.; WRIGHT, A. J. "Digestibility and beta-carotene release from lipid nanodispersions depend on dispersed phase crystallinity and interfacial properties". *Food & Function* (2012). 3(3):234-45.

- NIK, A. M.; WRIGHT, A. J.; CORREDIG, M. "Micellization of beta-carotene from soy-protein stabilized oil-in-water emulsions under in vitro conditions of lipolysis". *Journal of the American Oil Chemists Society* (2011). 1397-1407

- PARKER, R.S; SWANSON, J.E; YOU C.S; EDWARDS, A.J; HUANG, T. "Bioavailability of carotenoids in human subjects". *Proceedings of the Nutrition Society* (1999). 58(1):155-62.

- PONGAWATMANIT, R.; HARNSILAWAT, T.; MCCLEMENTS, D.J. "Influence of alginate, pH and ultrasound treatment on palm oil-in-water emulsions stabilized by beta-lactoglobulin". *Colloids and Surfaces* (2006). 287, 59-67

- PRINCE, M. R., FRISOLI, J. K., GOETSCHKES, M. M., STRINGHAM, J. M., & LAMURAGLIA, G. M. "Rapid serum carotene loading with high-dose beta-carotene: Clinical implications". *Journal of Cardiovascular Pharmacology* (1991). 17(2), 343–347.

- RAO, A. V; RAO, L. G. "Carotenoids and human health". *Pharmacological Research* (2007). 55(3):207-16

- REBOUL, E; RICHELLE, M; PERROT, E; DESMOULINS-MALEZET, C; PIRISI, V; BOREL, P. "Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary Sources". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2006). 15;54(23):8749-55.

- RIEDL, J; LINSEISEN, J; HOFFMANN, J; WOLFRAM, G. "Some dietary fibers reduce the absorption of carotenoids in women". *The Journal of Nutrition* (1999). 129(12):2170-6

- ROCK, C. L. & SWENDSEID, M. E. "Plasma b-carotene response in humans after meals supplemented with dietary pectin". *American Journal of Clinical Nutrition* (1992). 55: 96–99.

- SABERI HOSSEIN, A.; FANG, Y.; MCCLEMENTS, D.J. "Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science* (2012). 391, 95-102

- SALVIA-TRUJILLO, L.; QIAN, C.; MARTÍN-BELLOSO, O.; MCCLEMENTS, D.J. "Modulating betacarotene bioaccessibility by controlling oil composition and concentration in edible nanoemulsions". *Food Chemistry* (2012) 139, 878-884

- SINGH, H; YE, A; HORNE, D. "Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion". *Progress in Lipid Research* (2009). 48(2):92-100

- UBBINK, J. "Flavor delivery systems: trends, technologies and applications". *Abstr Pap Am Chem S* (2002). 223:U34-U34

- WALSTRA, P. "Principles of emulsion formation" Chemical Engineering Science (1993). 48:333-349

- WOOSTER, T.J; GOLDING, M.; SANGUANSRI, P. "Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability". Langmuir (2008). 24(22):12758-65

- Tablas de Composición de Alimentos del CESNID, 2003. McGraw-Hill. Interamericana ISBN: 84-486-0590X

10. ANNEXES

Taula 20. Resultats dels paràmetres analitzats de totes les mostres de l'emulsió convencional 0% pectina.

Paràmetre	Mostra 1	Mostra 2	Mostra 3	Mostra 4	Mostra 5	Mostra 6
Tamany de partícula	5530	6943	7785	6987	5701	7165
	2218	4989	6904	6472	4270	8448
PdI	0,455	0,615	1,000	0,301	1,000	0,591
	0,555	0,344	1,000	0,606	1,000	0,476
Potencial z	-11,9	-10,8	-14,7	-15,3	-30,3	-20,9
	-13,1	-10,8	-13,3	-14,5	-21,8	-23,9
	-11,3	-10,6	-13,0	-11,6	-19,4	-21,7
Viscositat	93,1	93,6	93,4	1,11	1,09	1,10
Color						
L	31,06	29,76	29,00	31,41	31,72	31,38
a	1,39	0,84	0,68	1,52	1,89	1,70
b	9,74	7,49	6,56	10,85	11,40	10,73

PdI: índex de polidispersió

Taula 21. Resultats dels paràmetres analitzats de totes les mostres de la nanoemulsió 0% pectina.

Paràmetre	Mostra 1	Mostra 2	Mostra 3	Mostra 4	Mostra 5	Mostra 6
Tamany de partícula	156,5	165,3	197,1	181,5	158,5	157,8
	153,0	165,2	196,3	178,8	156,1	156,4
PdI	0,170	0,245	0,368	0,274	0,183	0,196
	0,194	0,264	0,363	0,321	0,181	0,211
Potencial z	-8,6	-9,27	-8,59	-7,73	-8,48	-9,53
	-9,02	-9,02	-8,07	-8,58	-8,06	-8,94
	-10,1	-9,44	-8,24	-9,30	-9,09	-8,09
Viscositat	1,08	0,99	1,00	1,19	1,17	1,12
Color						
L	56,38	56,21	56,33	55,93	55,81	56,19
a	-0,14	-0,17	-0,16	-0,41	-0,42	-0,41
b	9,14	8,78	9,14	7,71	7,54	8,23

PdI: índex de polidispersió

Taula 22. Resultats dels paràmetres analitzats de totes les mostres de la nanoemulsió 0,5% pectina.

Paràmetre	Mostra 1	Mostra 2	Mostra 3	Mostra 4	Mostra 5	Mostra 6
Tamany de partícula	185,5	184,9	179,0	213,2	195,5	178,7
	186,0	182,6	178,4	218,6	197,5	179,8
Pdl	0,220	0,229	0,213	0,273	0,245	0,206
	0,217	0,214	0,203	0,291	0,257	0,209
Potencial z	-3,79	-3,50	-3,89	-3,32	-2,24	-5,05
	-3,93	-3,22	-3,76	-3,45	-1,94	-4,19
	-4,00	-3,91	-3,97	-3,59	-1,94	-4,30
Viscositat	6,28	6,62	7,04	6,23	5,93	5,69
Color						
L	50,06	50,18	50,54	49,15	49,27	49,36
a	0,64	0,68	0,66	0,08	0,14	0,09
b	1,39	1,43	1,66	2,15	2,26	2,26

Pdl: índex de polidispersió

Taula 23. Resultats dels paràmetres analitzats de totes les mostres de la nanoemulsió 1% pectina.

Paràmetre	Mostra 1	Mostra 2	Mostra 3	Mostra 4	Mostra 5	Mostra 6
Tamany de partícula	210,6	218,0	216,4	207,7	223,0	196,6
	212,0	218,3	209,0	207,5	220,8	201,6
Pdl	0,238	0,944	0,221	0,235	0,285	0,243
	0,219	0,225	0,228	0,232	0,301	0,234
Potencial z	-8,37	-9,10	-7,96	-9,77	-7,62	-4,94
	-9,75	-5,76	-6,9	-8,35	-7,83	-4,46
	-8,56	-7,79	-7,49	-9,61	-7,56	-5,17
Viscositat	28,4	26,7	27,6	20,1	20,9	20,8
Color						
L	44,08	44,04	44,09	39,31	39,46	39,05
a	0,99	1,02	0,96	1,46	1,45	1,45
b	6,03	5,99	6,08	3,91	3,95	3,91

Pdl: índex de polidispersió

Taula 24. Resultats dels paràmetres analitzats de totes les mostres de la nanoemulsió 1,5% pectina.

Paràmetre	Mostra 1	Mostra 2	Mostra 3	Mostra 4	Mostra 5	Mostra 6
Tamany de partícula	220,4	246,8	321,0	358,4	225,1	210,3
	221,9	246,2	309,3	359,4	224,0	213,1
Pdl	0,222	0,268	0,407	0,382	0,230	0,242
	0,226	0,252	0,388	0,353	0,235	0,254
Potencial z	-7,51	-6,39	-5,87	-3,12	-10,2	-10,1
	-8,28	-8,35	-8,57	-2,79	-9,41	-9,55
	-8,11	-7,07	-8,45	-3,24	-6,99	-6,29
Viscositat	84,7	80,5	83,4	76,7	76,2	79,0
Color						
L	50,67	50,86	50,99	51,90	52,00	51,88
a	1,39	1,51	1,50	4,02	4,10	4,10
b	13,02	13,08	13,03	15,53	15,31	15,32

Pdl: índex de polidispersió

Taula 25. Resultats dels paràmetres analitzats de totes les mostres de la nanoemulsió 2% pectina.

Paràmetre	Mostra 1	Mostra 2	Mostra 3	Mostra 4	Mostra 5	Mostra 6
Tamany de partícula	224,6	243,6	294,9	246,1	196,5	193,3
	229,8	245,6	299,9	241,0	198,7	193,6
Pdl	0,353	0,236	0,291	0,262	0,230	0,241
	0,305	0,244	0,274	0,233	0,217	0,224
Potencial z	-5,49	-7,27	-2,59	-6,87	-5,07	-5,67
	-5,60	-4,89	-5,18	-7,52	-5,67	-6,88
	-5,25	-7,19	-5,80	-7,59	-6,28	-7,89
Viscositat	207	216	195	207	196	195
Color						
L	53,46	53,46	53,49	53,97	53,73	53,56
a	1,63	1,69	1,69	4,09	3,98	3,98
b	14,34	14,22	14,23	15,34	15,02	15,10

Pdl: índex de polidispersió