



**Universitat
de Lleida**



**Escola
Tècnica
Superior
d'Enginyeria
Agrària**

OBTENCIÓ DE NANOEMULSIONS ESTABILITZADES AMB PROTEÏNES D'ORIGEN VEGETAL PER MILLORAR LA BIOACCESSIBILITAT DEL β -CAROTÈ

Treball de final de Grau

Margalida Amengual Ramon

Tutora: Laura Sàlvia Trujillo

Grau en Ciència i Tecnologia dels Aliments

11 de juliol de 2023

ÍNDEX

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUCCIÓ | 5 |
| 1.1 | B-CAROTÈ | 5 |
| 1.1.1 | Propietats..... | 6 |
| 1.2 | NANOEMULSIONS | 7 |
| 1.2.1 | Definició | 7 |
| 1.2.2 | Formulació | 8 |
| 1.2.3 | Formació | 11 |
| 1.3 | PROTEÏNES | 12 |
| 1.3.1 | Pèsol..... | 13 |
| 1.3.2 | Blat..... | 14 |
| 1.3.3 | Soja | 15 |
| 1.4 | DIGESTIBILITAT NANOEMULSIONS | 16 |
| 2 | OBJECTIUS | 19 |
| 3 | MATERIALS I MÈTODES | 20 |
| 3.1 | MATERIALS | 20 |
| 3.2 | CAPACITAT EMULSIONANT DE LES PROTEÏNES | 20 |
| 3.3 | FORMACIÓ DE LES NANOEMULSIONS | 21 |
| 3.3.1 | Enriquiment de l'oli amb β -carotè | 21 |
| 3.3.2 | Formulació i formació de les nanoemulsions | 22 |
| 3.4 | CARACTERITZACIÓ DE LES NANOEMULSIONS | 22 |
| 3.4.1 | Mida de partícula | 23 |
| 3.4.2 | Potencial zeta | 23 |
| 3.4.3 | Microscòpia..... | 24 |
| 3.4.4 | Viscositat..... | 24 |
| 3.4.5 | Turbiscan..... | 24 |
| 3.5 | DIGESTIBILITAT <i>IN VITRO</i> | 25 |
| 3.5.1 | Mètode de digestió <i>in vitro</i> | 25 |
| 3.5.2 | Estabilitat col·loidal durant la digestió <i>in vitro</i> | 26 |
| 3.5.3 | Alliberament d'àcids grassos | 26 |
| 3.5.4 | Bioaccessibilitat del β -carotè | 27 |
| 4 | RESULTATS I DISCUSSIÓ | 28 |
| 4.1 | CAPACITAT EMULSIONANT DE LES PROTEÏNES | 28 |
| 4.1.1 | Tensió interfacial | 28 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.2 | EMULSIONS INICIALS..... | 29 |
| 4.2.1 | Mida de partícula i distribució de mida de partícula..... | 29 |
| 4.2.2 | Microscòpia..... | 30 |
| 4.2.3 | Potencial-zeta..... | 32 |
| 4.2.4 | Viscositat..... | 33 |
| 4.2.5 | Turbiscan..... | 34 |
| 4.2.6 | Imatges turbiscan | 35 |
| 4.3 | DIGESTIÓ <i>IN VITRO</i> | 36 |
| 4.3.1 | Mida de partícula | 36 |
| 4.3.2 | Microscòpia..... | 39 |
| 4.3.3 | Potencial-zeta..... | 41 |
| 4.3.4 | Digestibilitat lípids | 42 |
| 4.3.5 | Bioaccessibilitat β -carotè | 43 |
| 5 | CONCLUSIONS..... | 45 |
| 6 | BIBLIOGRAFIA | 46 |

ÍNDIX D'IL·LUSTRACIONS

| | |
|---|-----------|
| <i>Il·lustració 1. Estructura química del β-carotè. Font: Ji et al. (2023).....</i> | <i>6</i> |
| <i>Il·lustració 2. Estructura molecular de la proteïna de pèsol. Font: A. C. Y. Lam et al. (2016).....</i> | <i>13</i> |
| <i>Il·lustració 3. Estructura molecular de la proteïna de blat. Font: Shevkani et al. (2019).....</i> | <i>15</i> |
| <i>Il·lustració 4. Estructura molecular de la proteïna de soja. Font: Chove et al.(2001).....</i> | <i>15</i> |
| <i>Il·lustració 5. Representació dels possibles canvis en l'estructura de les nanoemulsions durant el pas a través del tacte gastrointestinal. Font: Salvia-Trujillo et al. (2018).....</i> | <i>17</i> |

ÍNDIX DE FIGURES

| | |
|---|-----------|
| <i>Figura 1. Tensió interfacial (mN/m) expressat en temps (min) de les emulsions inicials estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80 al 0,04% a pH 3 (A) i a pH 7 (B). ...</i> | <i>29</i> |
| <i>Figura 2. Mida (d·nm) de les emulsions inicials estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80 a diferents pH.....</i> | <i>30</i> |
| <i>Figura 4. Imatges microscòpiques (magnificació x100) de la fase inicial de les emulsions estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80 a diferents pH.....</i> | <i>31</i> |
| <i>Figura 5. Potencial zeta (mV) de les emulsions estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80 a pH 3 (A) i a pH 7 (B) en la fase inicial.....</i> | <i>33</i> |
| <i>Figura 6. Viscositat (mPa·s) mesurada de les emulsions inicials estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80 a diferents pH.....</i> | <i>34</i> |
| <i>Figura 8. Imatges del turbiscan de les diferents emulsions estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween 80 a pH 3 i pH 7 durant les primeres 24 h.</i> | <i>35</i> |
| <i>Figura 9. Aparença visual de les nanoemulsions estabilitzades amb Tween 80 i diferents aïllats de proteïna vegetal (soja, blat i pèsol) a diferents pH després de dues setmanes.</i> | <i>36</i> |
| <i>Figura 10. Mida de partícula (µm) expressada en % de densitat volumètrica de les emulsions inicials (A,B), després de la fase gàstrica (C,D) i intestinal (E,F) d'emulsions estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80 a valors de pH 3 (A,C,E) i pH 7 (B,D,F).</i> | <i>38</i> |
| <i>Figura 11. Imatges microscòpiques x100 després de la fase gàstrica (esquerra) i després de la fase intestinal (dreta) de les emulsions inicials estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80 a diferents pH.</i> | <i>40</i> |
| <i>Figura 12. Potencial zeta (mV) de les emulsions estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80, durant les fases inicial, gàstrica i intestinal (d'esquerra a dreta) a pH 3 (A) i pH 7 (B).</i> | <i>41</i> |
| <i>Figura 13. Digestibilitat lipídica expressada com a alliberació d'àcids grassos lliures (%) durant la fase intestinal (min) de les emulsions estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80 a a pH 3 (A) i a pH 7 (B).....</i> | <i>43</i> |
| <i>Figura 14. Àcids grassos lliures acumulats (%) alliberats al final de la fase intestinal de la digestió in vitro de les emulsions estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80.....</i> | <i>43</i> |
| <i>Figura 15. Bioaccessibilitat del β-carotè (%) en la fase micel·lar al final de la fase intestinal in vitro (120 min) de les emulsions estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80, a diferents pH.....</i> | <i>44</i> |

1 INTRODUCCIÓ

1.1 B-CAROTÈ

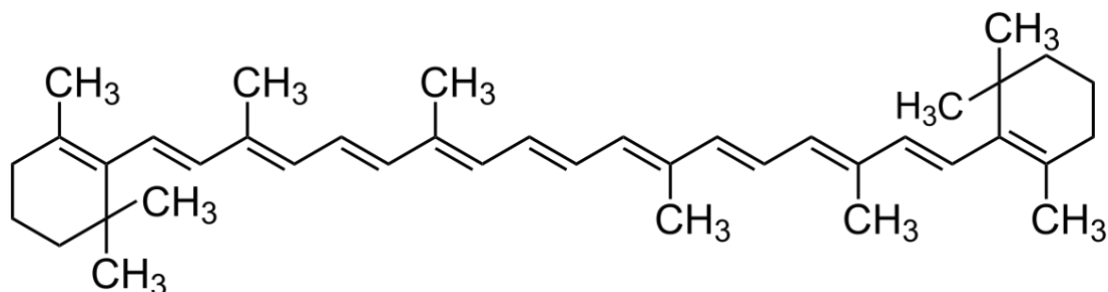
La dieta és un factor altament determinant en l'estat nutricional i l'envelliment d'un individu, ja que pot incidir en l'estat oxidatiu aquest, afectant directament a la seva salut i qualitat de vida (Lim et al., 2012). Per aquesta raó, una alimentació adequada esdevindrà un recurs fonamental per ajudar al cos a combatre l'estrès oxidatiu que està sotmès de manera constant (Hyun et al., 2023).

A més de proporcionar els nutrients essencials per viure, els aliments contenen compostos bioactius que exerceixen activitats biològiques funcionals, com ara propietats antiinflamatòries i antioxidants (Du et al., 2023), amenitzant els processos d'envelliment. El desenvolupament i la utilització de recursos alimentaris amb una possible activitat "antienvelliment" ha atret, cada cop més, l'atenció dels investigadors i la població en general. A més, un nombre creixent d'evidències suggereixen que els aliments que contenen compostos bioactius tenen potencials efectes contra l'acumulació de danys oxidatius (Adomaityte et al., 2014). D'aquesta manera s'ha donat una gran importància a aquestes propietats antioxidants, que podrien contribuir en la prevenció de malalties degeneratives com el càncer (Grande de França et al., 2023), i un exemple d'aquests compostos són els carotenoides.

Els carotenoides són una classe de pigments orgànics que presenten coloracions vermelles, grogues i taronges, i són sintetitzats per organismes fotosintètics com plantes i alguns bacteris, o per organismes no fotosintètics com fongs (Burgos et al., 2009). Tret que els animals (a excepció d'algunes espècies de pugons), no poden sintetitzar carotenoides, aquests han d'arribar al nostre organisme a través de la ingesta (Meléndez-Martínez et al., 2004), on les fruites i les verdures seran la font primària de carotenoides en la dieta humana.

Els carotenoides són tetra-terpens constituïts per diverses unitats d'isoprens amb un anell de ciclohexà substituït i insaturat en cada un dels extrems posicionats sobre una cadena de 40 àtoms de carboni (Pfander, 1992).

El β -carotè forma part de la família dels carotenoides d'hidrocarburs, a classificar segons estructura química o també es pot classificar dins el grup de carotenoides provitamina A (Pfander, 1992).



Il·lustració 1. Estructura química del β -carotè. Font: Ji et al. (2023)

1.1.1 Propietats

Absorció de llum

Pel fet que l'estructura del β -carotè conté cromòfors de dobles enllaços conjugats, aquest absorbeix llum UV-visible a 420, 450 i 472 nm, presentant un color vermell-ataronjat (Spence, 2006). Aquesta pot ser la seva característica estructural més clau, ja que a part d'absorbir llum, també li aporta la possibilitat de transmetre energia. Igualment, s'ha de tenir en compte que el color depèn d'altres factors a part de l'estructura química, com serien la concentració, l'agregació o la interacció amb altres molècules (Jeffrey Hurst, 2002).

A causa de la gran atracció que exerceix el color del β -carotè, aquest és utilitzat en una àmplia varietat de productes, tals com pigments alimentaris, cosmètics i productes farmacèutics (Steinmetz & Potter, 1996).

Solubilitat

El β -carotè és insoluble en aigua a causa de la seva lipofília inherent, per la qual cosa també se solubilitzarà pobrament en els fluids intestinals, tenint així una bioaccessibilitat molt baixa. D'aquesta manera, es requerirà una reacció d'unió del compost amb altres components que puguin afavorir l'efecte de solubilització en aigua i estabilitat del color (Saini et al., 2015).

L'ús de nanoemulsions com a transportadors dels carotenoides ha demostrat una millora en la bioaccessibilitat, la qual s'ha relacionat amb la digestibilitat de les gotes d'oli (Helena de Abreu-Martins et al., 2020), per la qual cosa la dissolució del β -carotè utilitzant un sistema d'alliberació basat en emulsions pot ser un mètode idoni per augmentar l'absorció d'aquest.

Propietats per la salut

El pigment s'oxida fàcilment degut al gran nombre de dobles enllaços conjugats (Lopez-Serrano et al., 2010). Per la mateixa raó, els carotens exhibiran una elevada capacitat antioxidant, ja que tenen l'habilitat de capturar l'oxigen singlet i, per tant, protegir les cèl·lules de danys oxidatius (Lopez-Serrano et al., 2010).

Una exemplificació d'aquest fenomen serà amb les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL), que quan s'oxiden s'acumulen dins de les parets arterials i són consumides pels macròfags, els quals no tenen prou capacitat per alliberar al colesterol, quedant aquest acumulat dins les cèl·lules (Quesne, 1997). Estudis han demostrat que existeix una estreta relació entre les LDL i el β -carotè, ja que posseeix capacitat d'evitar que les lipoproteïnes pateixin el procés d'oxidació, prevenint així la formació de plaques arterioescleròtiques dins dels vasos sanguinis i aconseguint així, una reducció del risc de partir malalties cardiovasculars (Dugas et al., 1998).

1.2 NANOEMULSIONS

1.2.1 Definició

La nanotecnologia és una ciència multidisciplinària que està rebent una alta atenció en l'actualitat, atès que proporciona productes amb propietats fisicoquímiques úniques, que resulten atractives per una àmplia gamma d'aplicacions (Choudhary et al., 2021).

Davant de les limitacions de les emulsions convencionals, és possible obtenir un tipus d'emulsió que presenta partícules de dimensions reduïdes, anomenada nanoemulsió, que comporta varies avantatges. Gràcies a la disminuïda mida de les gotes (inferiors a 100 nm), són més estables pel que fa a la coalescència, la separació gravitacional i l'agregació de partícules (Jiménez-Colmenero, 2013). També, s'ha observat que les nanoemulsions

milloren el transport dels ingredients a través de membranes, augmentant la biodisponibilitat de compostos bioactius (Salvia-Trujillo et al., 2014).

Tot i que es pugui definir de diverses maneres, la nanotecnologia es pot descriure com el disseny, caracterització, producció i aplicació d'estructures, dispositius i sistemes controlant la mida i la forma a escala nanomètrica (generalment inferiors a 100 nm) (Bernardes et al., 2014).

D'entre les moltes estratègies tecnològiques per desenvolupar aliments funcionals, hi trobem les basades en la modificació en els sistemes de transformació. En aquest context, l'aplicació de la nanotecnologia en el sector alimentari està tenint gran importància pel fet que permet l'elaboració d'aliments més saludables i més resistents (de Ariño Otxoa, 2018).

1.2.2 Formulació

Generalment les emulsions estan formades per aigua i oli, podent ser del tipus gotes d'oli disperses en medis aquosos (O/W) o viceversa, on el dispersant és l'oli i la fase dispersa l'aigua (W/O) (McClements & Rao, 2011).

No obstant això, una emulsió que només sigui formada per aquests dos components serà molt poc uniforme en el temps, a causa del fet que l'energia lliure necessària per separar les dues fases és més baixa que la necessària per produir l'emulsió. D'aquesta manera, serà freqüent que les fases se separin durant l'emmagatzematge, ja que ocurreran mecanismes com la separació gravitacional, floculació, coalescència o la maduració d'Ostwald, que es produeix quan les molècules d'oli es difonen de gotes petites a grans a través de la fase aquosa, fent que les gotes més grans consumeixin les més petites (Sohan et al., 2023). A més, internament es produeixen reaccions químiques i biològiques, tal com l'oxidació de lípids o hidròlisis de biopolímers, d'entre altres, que provocaran una degradació i afectaran l'aspecte i a les característiques de les nanoemulsions (Qian & McClements, 2011a). En conseqüència, per aconseguir una correcta homogeneïtzació dels components, s'afegiran compostos emulsionants a la formulació que assegurin l'estabilitat.

Aquests components variaran segons la naturalesa de l'emulsió. En el cas de les emulsions O/W, les gotes d'oli estaran recobertes amb un emulsionant hidrofòbic, mentre que en les emulsions W/O, les gotes estaran recobertes amb un emulsionant lipòfil.

1.2.2.1 Fase lipídica

La fase lipídica estarà formada per components hidrofòbics no polars, que tindran la principal distinció de poder actuar com a solvents d'ingredients actius amb caràcter lipòfil (McClements & Rao, 2011).

El tipus d'oli utilitzat per la formació de la nanoemulsió influeix directament sobre la digestibilitat i bioaccessibilitat dels composts bioactius (Lin et al., 2023). Els olis es poden classificar en triglicèrids de cadena llarga, triglicèrids de cadena mitjana o triglicèrids de cadena curta, depenent en la llargària de les cadenes. Salvia-Trujillo et al. (2013) i Qian et al. (2012) van demostrar que la digestibilitat dels lípids de les nanoemulsions és més elevada que la dels àcids grassos de cadena llarga, que a la vegada també redueix a mesura que redueix la mida de cadena. Aquest fet també es relaciona amb la bioaccessibilitat de composts bioactius, que seran absorbits en grau més alt si es troben dissolts en olis que presentin una major digestibilitat.

1.2.2.2 Emulsionant

És summament important que els productes basats en nanoemulsions siguin física i químicament estables, tot i trobar-se en condicions desfavorables com augments de temperatura, forces mecàniques o forces iòniques. D'aquesta manera, les nanoemulsions hauran de ser dissenyades de manera que es millori la seva estabilitat cinètica, mitjançant l'addició d'emulgents (Azeem et al., 2009).

Els surfactants són un grup de molècules amfifliques que tenen capacitat de posicionar-se en la interfase d'aigua-oli. La seva funció principal és reduir la tensió interfacial per discontinuar les gotes i crear una capa en la interfase que limiti la unió d'aquestes (Leong et al., 2009). En la indústria alimentària són utilitzats principalment dos tipus de surfactants (McClements & Gumus, 2016).

Els surfactants de baix pes molecular consisteixen en una cap hidròfil ben definit i una cua hidrofòbica que generalment està composta per cadenes acils. En aquesta categoria hi troben el grup dels Tween (Rajitha et al., 2019).

El Tween 80 és un líquid viscos amb un pes molecular de 1309,7 Da i una densitat d'1,064 g/mL. El seu nom químic bàsic és monooleat de polioxietilè-20-sorbitan, i és estructuralment semblant als polietilenglicols. Aquest surfactant és capaç de formar micelles en solució aquosa en concentracions micel·lars ínfimes (del 0,009% pes/volum) (Van Zuylen et al., 2001). Tot i presentar unes característiques magnífiques com a agent emulgent, en els darrers anys s'han generat proves substancials que suggereixen que el Tween 80 és un compost biològicament actiu, i que pot tenir efectes perjudicials sobre la salut (Weiszhar et al., 2012). En ratolins es va demostrar que Tween 80 provocava un augment de les concentracions plasmàtiques de doxorubicina i també disminuïa el volum plasmàtic sobre el volum total de sang com a efecte osmòtic (Casazza et al., 1978; Harrison et al., 1981). També, Koroleva et al. (2021) van determinar que l'efecte negatiu observat es va intensificar amb un augment de la concentració del Tween 80.

Per altra banda, els surfactants d'alt pes molecular consisteixen en diferents tipus de substàncies solubles en aigua, principalment proteïnes solubles en aigua i polisacàrids (Berton-Carabin et al., 2018).

Moltes proteïnes alimentàries són molècules amfifíliques que tenen tendència a ser absorbides a la interfase oli-aigua, creant una pel·lícula viscoelàstica que protegeix a les gotes de l'emulsió de la desestabilització física, principalment la coalescència. En aquest camp, les proteïnes animals han estat aplicades en amplis usos com a emulgents, ja que conformen nanoemulsions amb mides entre 190 i 210 nm (Hwang et al., 2017), sent aquestes molt estables. No obstant això, les proteïnes d'origen vegetal han guanyat interès en els últims anys com a alternatives més sostenibles per substituir les proteïnes animals, i per això també s'estan realitzant gran nombre d'estudis per poder analitzar àmpliament les característiques d'aquestes. Xu et al. (2018) van preparar nanoemulsions (20-300 nm) amb diferents tipus de proteïnes vegetals com a emulsionant, i la majoria van demostrar una bona estabilitat durant períodes d'emmagatzematge d'entre 0 i 45 dies. Per tant, es pot suposar que les proteïnes vegetals podrien substituir altres emulgents utilitzats més sovint com els d'origen animal o els Tween.

1.2.3 Formació

Els mètodes usats per formular nanoemulsions es poden dividir en dos grups principals, denominats mètodes de baixa energia i mètodes d'alta energia (Forgiarini et al., 2001).

Els mètodes de baixa energia consisteixen principalment en la modificació dels factors ambientals o de la composició de les nanoemulsions, i basen el seu principi en la formació espontània de petites gotes d'oli (Solans & Solé, 2012).

Els mètodes d'alta energia consumeixen una gran quantitat de potència, ja que les nanoemulsions són creades usant forts fluxos de cavitació, cisalla i turbulència generats per aparells especialitzats, que mesclaran forces disruptives sobre les fases d'oli i aigua provocant la formació de petites gotes d'oli (Qian & McClements, 2011b). Alguns dels dispositius emprats amb aquesta finalitat són els homogeneïtzadors de vàlvula d'alta pressió, els microfluiditzadors i els sonicadors. Aquest mètode és actualment el més usat per formar emulsions en la indústria alimentària, ja que els instruments utilitzats són més efectius en la reducció de la mida de les gotes. De fet, múltiples estudis han demostrat que la mida de partícula tendeix a disminuir quan augmenta la pressió d'homogeneïtzació o el nombre de cicles, pel fet que també disminueix la tensió interfacial i augmenta la velocitat d'absorció de l'emulsionant (Tadros et al., 2004; Walstra, 1993).

La selecció d'un mètode adequat per formar una nanoemulsió dependrà de les característiques pròpies dels components per a ser homogeneïtzats (especialment el tensioactiu i l'oli), així com els atributs fisicoquímics requerits i les qualitats operatives del producte final.

En aquest cas concret, es detallaran els fonaments del microfluiditzador, ja que ha estat l'instrument emprat en el procés experimental.

1.2.3.1 Microfluidització

El microfluiditzador fa servir una bomba per forçar una emulsió convencional a passar a través d'un circuit de petit diàmetre a altes pressions, provocant la disrupció de les gotes (Mahdi Jafari et al., 2007). El circuit està dissenyat de manera que separa l'emulsió inicial en dos corrents (que pot arribar als 500 m/s) en una cambra d'interacció, on les molècules xocaran amb les parets i entre sí, generant forces de cisalla, impacte i energia de

dissipació. Com a conseqüència, es trencaran les gotes i obtindrem la nanoemulsió (Jafari et al., 2007).

A causa de l'alta pressió també s'incrementa intrínsecament la temperatura de la mostra, que pot arribar a superar els 70 °C. D'aquesta manera, tot i que l'aparell disposi de sistemes de refrigeració, es pot produir una degradació del component bioactiu d'interès, tal com va demostrar Donsì et al. (2012).

1.3 PROTEÏNES

L'ús de proteïnes vegetals com a ingredients està condicionat a les característiques funcionals que presenti cada una. Aquestes característiques s'utilitzaran per mesurar el seu comportament durant les diferents fases de preparació, processat, emmagatzematge i consum. De totes maneres, les propietats de les emulsions es veuran afectades per la mateixa naturalesa composicional i per interaccions entre proteïnes, aigua o altres ingredients de la mescla (Amagliani et al., 2017).

Les característiques funcionals que es requereixin dependran completament de les aplicacions que es vulgui fer amb les emulsions. Les propietats més requerides per al processament de formulacions amb proteïnes són, d'entre altres, la capacitat de retenció d'aigua, capacitats de vinculació amb oli i solubilització, espumació o capacitat d'emulsionar, espessir i formar gels (Hadidi et al., 2021; Lu et al., 2020).

Els extractes de proteïnes s'obtenen fent una eliminació del midó i altres components solubles en aigua de les proteïnes inicials (Shi et al., 2021). Les formes de cultivar i les tècniques d'extracció de proteïnes també tenen un paper important sobre la identificació de propietats funcionals en aquestes (Cui et al., 2020). D'aquesta manera, la utilització de proteïnes vegetals requereix l'existència de tecnologies d'extracció basades en les matrius de les plantes. Actualment, s'utilitzen diversos procediments d'extracció en aplicacions científiques i industrials, de manera que es puguin aconseguir proteïnes amb diverses funcionalitats.

La solubilitat és una de les funcionalitats de les proteïnes amb més importància, ja que altres propietats com l'emulsificació o gelatinització estan directament relacionades amb

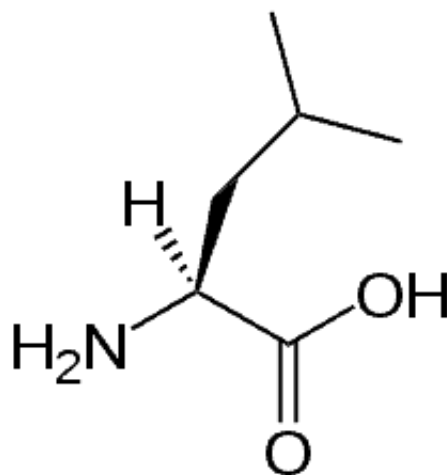
aquesta (Shevkani et al., 2019). Generalment, proteïnes natives i de baixa desnaturalització poden indicar alta solubilitat (Mokni Ghribi et al., 2015). També, quan les proteïnes es trobin prop del seu punt isoelèctric, presentaran la mínima solubilitat, pròxima a 0 (Schmid et al., 2022).

1.3.1 Pèsol

La proteïna de pèsol està constituïda, com totes les proteïnes de lleguminoses, per tres classes de proteïnes: globulines i albúmines (85%) i proteïnes insolubles.

Sobre la llavor nativa, hi trobem aproximadament un 78,01 % de proteïna. Es preveu que aquesta sigui àmpliament utilitzada en la indústria alimentària gràcies a uns alts valors nutricionals, beneficis per a la salut, baix cost i alta disponibilitat (A. C. Y. Lam et al., 2016; Tulbek et al., 2017)

A la seva superfície, la proteïna de pèsol presenta legumines connectades a través de ponts disulfur. Les cadenes α són de caràcter hidròfil i es troben a la superfície de la molècula, mentre que les regions hidrofòbiques estan col·locades a la subsuperfície, minimitzant el contacte amb l'aigua (Reinkensmeier et al., 2015). Aquesta proteïna presenta un punt isoelèctric d'entre 4 i 6 (Boye et al., 2010) i una massa de 280 kDa.



Il·lustració 2. Estructura molecular de la proteïna de pèsol. Font: A. C. Y. Lam et al. (2016)

Els mètodes més utilitzats per a l'extracció de proteïnes són precipitació micel·lar, diàlisi d'extracció amb sal i precipitació alcalina d'extracció isoelèctrica (Tanger et al., 2020).

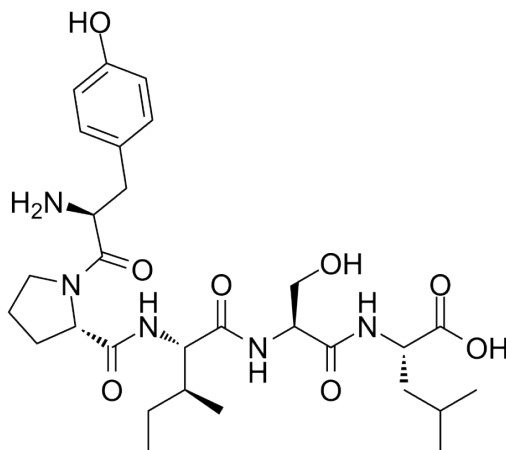
La col·locació de la proteïna en la interfase oli-aigua normalment es realitza en dos passos. En el primer, les albúmines i les globulines es mouran cap a la interfase O/W, i gràcies a la seva naturalesa hidròfila es podran situar en la interfase en una manera soluble-depenent (Burger & Zhang, 2019). Quan aquestes es torben en la interfase, l'absorció es promou gràcies a les zones hidrofòbiques en la superfície de les proteïnes. En la segona etapa, ocorre una recol·locació estructural, on les molècules de les proteïnes es desnaturalitzen parcialment i s'organitzen en forma de fraccions hidròfiles sobre la fase aquosa, mentre que les parts hidrofòbiques se situen en la fase oliosa (McCarthy et al., 2016). Això permet a les molècules de proteïna crear una pel·lícula viscoelàstica a la capa interfacial, que estabilitzarà les gotes d'oli mitjançant repulsió electroestàtica (R. S. H. Lam & Nickerson, 2013).

Segons Hayati Zeidanloo et al. (2019), la proteïna de pèsol presenta una capacitat emulsionant del 27,37 % a pH 7 i la màxima d'un 36,73 % a pH 8.

1.3.2 Blat

La proteïna de blat és la que presenta major mida de totes. Sobre la llavor nativa hi trobem un 86.98 % proteïna. En general, aquesta té mala solubilitat en aigua, resultant en males propietats funcionals com a emulsificador, escumador o gelatinitzador (Wang, 2020).

Segons Radhika & Rao (2015), i utilitzant el mètode d'Osborne de l'any 1924, que va desenvolupar una classificació segons solubilitat, les proteïnes del blat es classifiquen en albúmines, globulines, gliadines i glutenines. Aquestes proteïnes es comporten, des d'un punt de vista reològic, com un fluid viscoelàstic, formant una massa amb una gran força i compacticitat. Les gliadines comporten un pes molecular d'entre 30 i 70 kDa, mentre que les glutenines comporten un pes d'entre 200 i 20000 kDa (Velázquez-Barrón & Fuentes-Dávila, 2009).



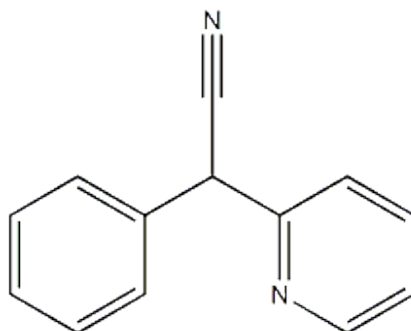
Il·lustració 3. Estructura molecular de la proteïna de blat. Font: Shevkani et al. (2019)

Mamani et al. (2014) va reportar que la proteïna de blat presenta un punt isoelèctric d'entre 6 i 7, presentant una mínima solubilitat a pH neutre. Segons Vegas et al. (2017), la farina de blat presenta una capacitat emulsionant de 31,63 % a pH 3 i una capacitat de 23,25 % a pH 7.

1.3.3 Soja

La soja és un ingredient clau en la indústria respecte a la formulació de dietes veganes o lliures de lactosa, ja que a partir d'aquesta es fabriquen aliments altament comercialitzats com la beguda de soja o el tofu.

La llavor nativa de soja representa un 86,36 % de proteïna. Les proteïnes de la soja es poden classificar segons els seus coeficients de sedimentació en gradient de sacarosa. Reportat per (K. Liu, 1997), la fracció de proteïnes de soja té quatre components fonamentals: 15S, 11S (riques en glicinina), 7S (β -conglucininina i γ -conglucininina) i 2S.



Il·lustració 4. Estructura molecular de la proteïna de soja. Font: Chove et al.(2001)

En el procés d'extracció dels isolats de proteïna de soja es busca eliminar els factors antinutritius presents en la llavor, especialment els oligosacàrids i les proteïnes antigèniques. Els concentrats de proteïna de soja s'obtenen després d'un tractament alcalí i precipitació àcida de la proteïna, ajustant el pH de l'extracte al PI d'aquesta (Yang et al., 2017). La proteïna de soja presenta un punt isoelèctric d'entre 4 i 5 (Chove et al., 2001). Aquest mateix autor va reportar que la proteïna de soja presenta una capacitat emulsionant de 24,6 % a pH 7.

1.4 DIGESTIBILITAT NANOEMULSIONS

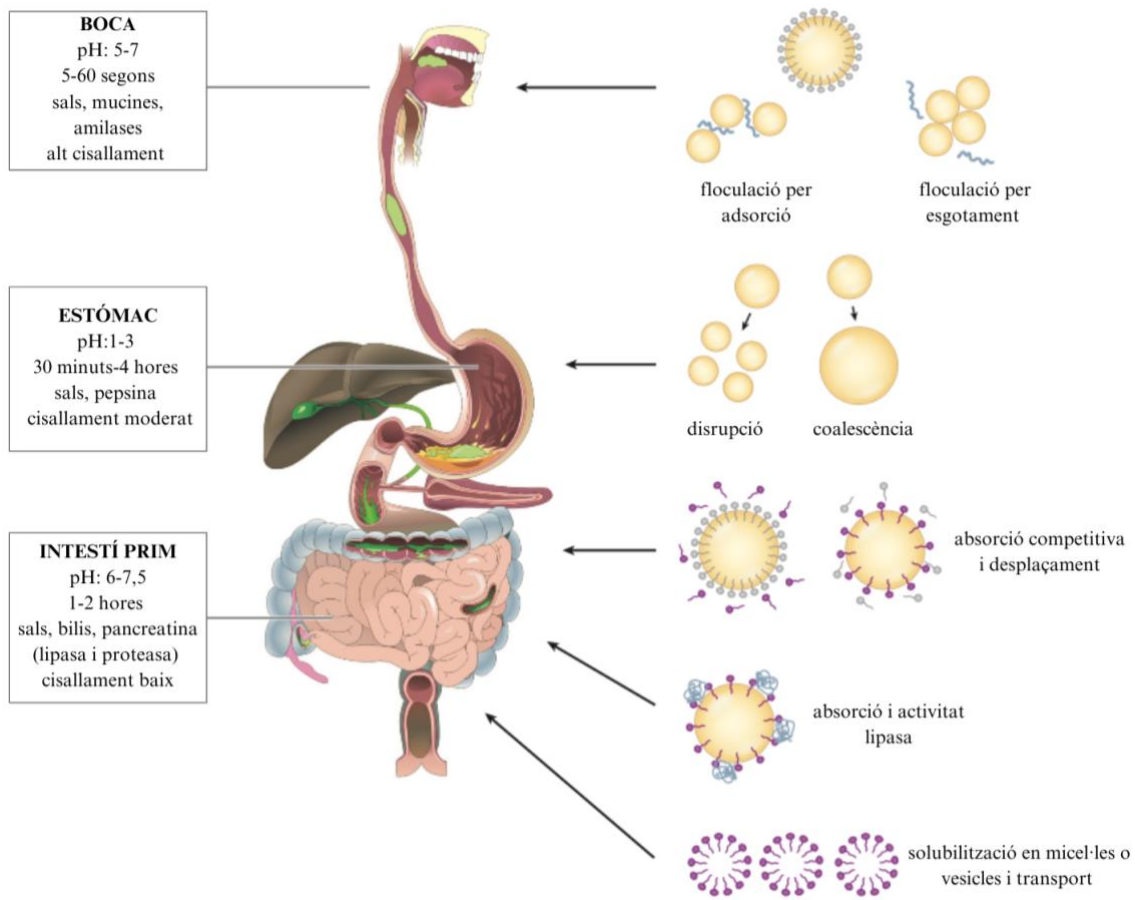
La bioaccessibilitat es pot definir com la quantitat de compostos alliberats des de la matriu alimentària al lumen gastrointestinal (Saura-Calixto et al., 2007). Així, es pot determinar que la digestibilitat dels compostos tindrà un efecte directe sobre la biodisponibilitat i, entendre els mecanismes de la digestió de lípids, serà una qüestió important a l'hora de conèixer el comportament dels compostos bioactius que es puguin incorporar a l'organisme (Date et al., 2016).

La digestió de lípids és un procés complex que consisteix en el pas de l'aliment per la boca, estómac i intestí prim, regions que tenen composicions iòniques, pH, activitats enzimàtiques, patrons de flux i nivells de biopolímers i emulgents completament diferents (Joyce et al., 2016).

Un cop ingerides, les nanoemulsions entren en contacte amb la cavitat oral, on patiran modificacions estructurals i de composició com canvis de temperatura, mescla amb saliva, canvis de pH i de composició mineral. Aquests canvis alteraran la força iònica del sistema i poden induir a canvis en l'estabilitat de l'emulsió (Silletti et al., 2007). A més, la mucina de la saliva pot provocar una agregació de les gotes a través de floculació per adsorció o per esgotament.

Després de ser deglutit, el bol entra al tracte digestiu, on serà sotmès a una varietat de condicions ambientals. El propòsit principal de l'estómac és proporcionar la digesta al duodè en una forma que es pugui optimitzar la digestió intestinal. Tot i que en la fase estomacal es pugui produir una certa digestió de lípids, la majoria d'aquesta es porta a terme en l'intestí. Generalment, la fase gàstrica té una duració d'unes 3-4 h, però com que

els lípids que formen la nanoemulsió ja tenen de per si una mida molt reduïda, l'activitat de les lipases es veurà accelerada.



Il·lustració 5. Representació dels possibles canvis en l'estructura de les nanoemulsions durant el pas a través del tracte gastrointestinal. Font: Salvia-Trujillo et al. (2018)

D'aquesta manera, com es pot veure en la il·lustració 2, aquestes condicions poden induir una redispersió de les gotes o la seva coalescència (Salvia-Trujillo et al., 2013a) a causa del baix pH o a l'alta força iònica; tot depèn de les característiques de l'emulsió i de l'emulsionant utilitzat. Mun et al. (2007) i van Aken et al. (2011) van demostrar que es produïen agregacions de gotes en emulsions estabilitzades amb proteïnes, mentre que quan l'estabilització que es realitzava amb surfactants no iònics, les agregacions eren més petites. D'aquesta manera es pot deduir que l'agregació està relacionada a la càrrega iònica de la substància feta servir com a emulgent.

Seguidament, en percebre lípids, el sistema intestinal estimula la secreció de lipases, que iniciaran la digestió de triglicèrids de cadena mitjana o curta, produint monoglicèrids, diglicèrids i àcids grassos lliures més senzills. La digestió de la fracció oliosa també

suposa l'alliberació de fracció de component bioactiu que es trobi encapsulat dins aquesta (Mao & Miao, 2015). Els àcids grassos lliures i els monoacilglicèrids generats interactuaran amb les sals biliars i els fosfolípids per formant micel·les mixtes, capaces de solubilitzar qualsevol substància lipòfila present dins de les gotes d'oli (Porter et al., 2007). Aquestes micel·les podran transportar els compostos solubilitzats a través de la mucosa intestinal i a la superfície de les cèl·lules epitelials, on podran ser absorbides (Yao et al., 2016).

A més, en algunes ocasions la hidròlisi de les gotes d'oli pot veure's inhibida pel surfactant utilitzat per estabilitzar l'emulsió, ja que aquest impedeix l'adhesió de la lipasa a la superfície de la gota. En aquests casos, les sals biliars de l'intestí poden desplaçar les molècules de surfactant de la interfase permetent la unió de l'emulsió amb l'enzim (Reis et al., 2009).

Per tant, es pot concloure que a bioaccessibilitat del β -carotè dependrà de diversos factors com el contingut estomacal, el peristaltisme intestinal, el flux sanguini i limfàtic, la temperatura o tipus de sucre conjugat, d'entre molts altres (Fernández-García et al., 2009; Vitaglione et al., 2013).

2 OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball final de grau és estudiar la formació de nanoemulsions mitjançant l'ús de proteïnes d'origen vegetal com a emulgent com a estratègia d'encapsulació, protecció i alliberament de β -carotè com a compost bioactiu lipòfil, tot avaluant la seva estabilitat, digestibilitat i bioaccessibilitat *in vitro*.

L'objectiu mencionat es divideix en els següents objectius específics:

1. Formar nanoemulsions utilitzant proteïnes de pèsol, soja i blat com a emulgent optimitzant el tipus i la concentració a utilitzar en dues condicions de pH.
2. Caracteritzar les nanoemulsions formades en relació amb la seva mida de partícula, càrrega elèctrica, viscositat, tensió interfacial, microestructura i estabilitat col·loidal.
3. Avaluar la digestibilitat de les nanoemulsions formades mitjançant un mètode de digestió *in vitro* simulant condicions gastrointestinals.
4. Determinar l'estabilitat de les nanoemulsions sota condicions gastrointestinals amb relació a la seva mida de partícula, potencial zeta i microestructura.
5. Analitzar la lipòlisi mitjançant el mètode pH-stat per determinar l'alliberament d'àcids grassos en la fase intestinal.
6. Estudiar la bioaccessibilitat del β -carotè encapsulat en les nanoemulsions al final de la digestió *in vitro*.

3 MATERIALS I MÈTODES

3.1 MATERIALS

L'oli elegit per realitzar la part experimental d'aquest treball és l'oli refinat de panís provinent de Deoleo global, S.A.U. (Córdoba, Espanya), utilitzat com a fase lipídica per formar totes les nanoemulsions.

El surfactant emprat per formular les nanoemulsions control, Tween 80 es va obtenir de Panreac (Barcelona, Espanya). El Tween 80 és un surfactant de naturalesa orgànica, soluble en aigua i de caràcter no iònic, que se situa en la interfase d'oli-aigua, reduint la tensió interfacial i ajudant a la reducció de la mida de gota, resultant en una emulsió estable de les gotes d'oli disperses dins la fase contínua.

Per dur a terme l'experimentació de l'estudi es va fer ús de proteïna de blat, proteïna de pèsol i proteïna de soja, totes elles provinents de l'empresa ADM (Illinois, USA). També es van usar aquestes mateixes proteïnes per calcular la tensió interfacial.

El β -carotè usat prové de Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanya). Per determinar la bioaccessibilitat d'aquesta es van usar dos dissolvents orgànics; etanol amb puresa del 99,9 % de Fisher Chemical, Thermo Fisher Scientific (Leicestershier, UK) i hexà amb >95% de puresa de Scharlau, Scharlab S.L. (Barcelona, Espanya).

L'aigua Milli-Q emprada en la preparació de les solucions es va obtenir del mateix sistema de filtració Milli-Q del laboratori.

Finalment, per portar a cap la digestió *in vitro* es va fer ús de pepsina procedent de mucosa gàstrica porcina, enzim pancreatina procedent de pàncrees porcí i bilis bovina, totes elles procedents de Sigma-Aldrich Co (St. Louis, USA). La resta de reactius utilitzats provenien de Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanya).

3.2 CAPACITAT EMULSIONANT DE LES PROTEÏNES

La capacitat emulsionant de les proteïnes estudiades es va determinar mitjançant l'avaluació de la caiguda de la tensió interfacial que provoquen en una gota d'oli.

Per determinar la tensió interfacial es va fer servir l'equip Kruss DSA 25 Drop Shape Analyzer (Krüss, Alemanya). Es va usar el mètode de la gota penjant invertida (*inverted pendant drop method*), citat per Baig et al. (2019), que van suspendre una gota d'oli dins d'una dissolució, mesurant la deformació que patia al llarg del temps. En aquest estudi es va usar una dissolució del 0,04 % de proteïna dissolta en buffers de pH 3 i pH 7. La deformació que va presentar la gota va permetre calcular mitjançant la fórmula de Young-Laplace (1), la capacitat de cada emulgent per situar-se en la interfase de la gota d'oli.

$$P_{cap} = P_o - P_a = \frac{4\gamma_{wo}\cos\theta}{d_p}$$

On γ_{wo} és la tensió interfacial equilibri entre la fase dispersa i la fase contínua i θ és l'angle de contacte (angle on la fase contínua, la fase dispersa i la membrana es troben). P_{cap} és la pressió capil·lar, P_o és la pressió exercida per la fase dispersa, P_a és la pressió exercida per la fase contínua i d_p és la mida dels porus.

Es van fer dues repeticions de cada mesura i es va fer la mitja de les dues.

3.3 FORMACIÓ DE LES NANOEMULSIONS

3.3.1 Enriquiment de l'oli amb β -carotè

Amb l'objectiu de procurar la formació de nanoemulsions amb les propietats bioactives característiques del β -carotè, és necessari primerament obtenir la dissolució d'aquesta substància en la fase lipídica. Per aconseguir una concentració final del 4 % en la nanoemulsió, es van afegir 8 mg del compost a 8 g d'oli. A continuació, la mescla es va escalfar sobre una placa a una temperatura de 50 °C, amb agitació contínua durant 30 minuts. Al cap de 15 minuts es va interrompre el procés per realitzar un cicle d'ultrasons d'un minut de durada, amb l'objectiu d'assegurar la desintegració de totes les aglomeracions de β -carotè. Posteriorment, es va reprendre l'agitació sobre la placa durant els 15 minuts restants. Durant tot el procediment, des del moment del pesatge fins a la finalització de la dissolució, es va prendre precaució amb el maneig del compost, ja que aquest és sensible a la llum i a l'oxigen. Per evitar la degradació es van embolicar tots els recipients utilitzats amb paper d'alumini.

3.3.2 Formulació i formació de les nanoemulsions

Es van preparar un total de 16 nanoemulsions, que es van distribuir de la següent manera: dues emulsions amb Tween 80 a pH 3 i pH 7, cadascuna amb les seves respectives repeticions, i sent aquestes les emulsions control. A part, es va dur a terme el mateix procés amb proteïnes de pèsol, blat i soja, en ambdós pH, i també amb les seves repeticions corresponents.

Per formular les emulsions preparades amb proteïnes, es va requerir la dissolució dels isolats dins dels buffers amb una antelació de 24 hores abans de la preparació de l'emulsió. Aquest procediment difereix de les emulsions control preparades amb Tween, ja que aquest component es dissolia en el mateix moment de la preparació, sense requerir cap temps d'hidratació prèvia. Per la resta de passos, totes les emulsions van seguir el mateix procediment.

Inicialment, es va preparar una emulsió convencional homogeneïtzant un 96 % de fase aquosa amb un 4 % de fase lipídica amb el β -carotè dissolt, utilitzant la mescladora d'alta velocitat Ultra-Turrax T18 homogenizer, IKA Works, Inc, (Wilmington, NC, USA) a 7200 rpm durant un temps de 3 minuts. Seguidament, aquesta mescla va passar pel microfluiditzador MP-110 Microfluidics (MA, USA), processant el fluid a altes pressions (100-150 MPa) durant 3 cicles.

Aquest nombre de cicles va ser determinat experimentalment mitjançant altres assajos en els quals es van realitzar 4 i 5 seqüències. Es va observar que no hi havia diferències significatives en la mida de les partícules entre les emulsions de 3 cicles i les de 4 i 5.

3.4 CARACTERITZACIÓ DE LES NANOEMULSIONS

Un cop preparades les nanoemulsions inicials, es van analitzar diverses propietats d'aquestes, amb l'objectiu d'obtenir dades inicials comparables amb les dades de les fases gàstrica i intestinal posteriors. Aquestes determinacions van permetre conèixer si s'havien produït canvis a causa de les condicions de les fases gàstrica o intestinal, o si bé les característiques analitzades ja eren presents en les emulsions inicials. Aquest procés va proporcionar informació essencial per comprendre la influència de les diferents fases en

el comportament de les nanoemulsions en funció del tipus de proteïna vegetal utilitzada per la seva formulació i en funció del pH.

3.4.1 Mida de partícula

Per analitzar el comportament de les emulsions durant el procés es van realitzar mesures de la mida inicial i després de la fase gàstrica i intestinal, respectivament. La mida de partícula es va determinar fent servir la mesura de la dispersió estàtica de la llum, de mostres que es dissolien en aigua Milli-Q. Totes les analítiques es van portar a cap amb una agitació de 1800 rpm, controlada mitjançant l'equip Dispersion Unit Controller, Malvern Instruments Ltd (Worcestershire, Regne Unit).

En aquest estudi, la determinació de mida de partícules de les nanoemulsions inicials es va mesurar fent ús de l'equip Zetasizer NanoZS Malvern Instruments LTD (Worcestershire, Regne Unit). Es van obtenir resultats precisos que se situaven dins dels paràmetres de mesura. No obstant això, després de les fases gàstrica i intestinal, les emulsions formulades amb proteïnes van mostrar grandàries fora de l'escala nanomètrica, de manera que les mesures es van fer amb l'equip Mastersizer 3000TM Malvern Instruments LTD (Worcestershies, Regne Unit). Les mesures es van dur a terme per triplicat.

3.4.2 Potencial zeta

La mesura del potencial ζ , també coneguda com a mobilitat electroforètica, pot proporcionar informació sobre els canvis que es produeixen en les propietats de la interfase. Els resultats aconseguits en aquestes determinacions donen informació sobre les forces de repulsió que s'exerceixen entre les gotes d'oli que formen l'emulsió, donant una informació clau per preveure l'estabilitat que presentarà l'emulsió enfront de fenòmens de coalescència.

Les determinacions es van dur a terme en la fase inicial, gàstrica i intestinal per triplicat cada una. Per fer l'anàlisi, es van dissoldre 10 μ L de l'emulsió o la fase dins 10 mL d'aigua Milli-Q, tenint així una dissolució de 1:1000. El potencial ζ es va calcular utilitzant cel·les capil·lars DTS1070, on es va introduir la mescla dissolta i es va introduir dins l'equip ZetaPotential. La tècnica usada és la microelectroforesi de làser Doppler, on s'aplica un camp elèctric a la dispersió de partícules que es mouen a una velocitat

determinada, relacionant-la amb el seu potencial. La velocitat es determina fent servir M3-PALS (dispersió de llum per anàlisi de fase), permetent així el càlcul de la mobilitat electroforètica, obtenint la mesura de potencial ζ .

3.4.3 Microscòpia

Es van obtenir imatges microscòpiques a 4, 10 i 100 augments, de les emulsions inicials i després de les fases gàstrica i intestinal amb un microscopi òptic (BX41 Olympus, Göttingen, Alemanya). Les imatges de microscòpia van permetre estudiar la microestructura de les gotes d'oli disperses en la fase contínua de les emulsions i nanoemulsions.

3.4.4 Viscositat

La viscositat va ser mesurada amb l'equip SV-10-vibro-viscosímetre A&D Company (Tokio, Japó), que mesurava la susceptibilitat de la mostra a ser deformada. La viscositat de les emulsions és una funció de les variables de temperatura, fracció de volum de la fase dispersa, viscositat de la fase contínua, mida de les gotes, pressió i velocitat de cisalla. D'aquesta manera, suposant que la pressió és constant, les principals variables que afectaran la viscositat d'una emulsió seran la temperatura i la concentració de la fase dispersa (Farah et al., 2005).

3.4.5 Turbiscan

La mesura del Turbiscan permet tenir una caracterització òptica de qualsevol mena de dispersió, i a través d'aquesta podem tenir idea gràfica sobre l'estabilitat que presentarà l'emulsió durant les primeres 24 hores. Aquest aparell escaneja el nivell de turbidesa de l'emulsió que s'ha introduït dins d'un tub, permetent una identificació ràpida i sensible dels mecanismes de desestabilització que presentaran les mostres (Huck-Iriart et al., 2011). Per realitzar aquesta mesura es va utilitzar l'equip Turbiscan TMA 2000 Formulacion (Toulouse, França). L'evolució física del procés es porta a terme sense interrompre el sistema original, i amb una gran exactitud i repetibilitat.

3.5 DIGESTIBILITAT *IN VITRO*

3.5.1 Mètode de digestió *in vitro*

Pel mètode de digestió *in vitro* es va seguir el model descrit pel consens internacional INFOGEST (Minekus et al., 2014), consistent de dues fases, una gàstrica i una intestinal.

Fase gàstrica

En la primera etapa, es va introduir l'emulsió inicial dins d'un matràs ambre a fi d'aconseguir 0,25 g d'oli en la mostra. D'aquesta manera, tenint en compte que la proporció d'oli en la nanoemulsió era del 4 %, es va determinar que es requerien 6,25 g de l'emulsió. Aquesta quantitat es va mesclar amb 15,14 mL d'aigua Mili-Q, 0,4 mL de HCl 1M, 10 µL de solució CaCl₂ 0,3 M i 18,2 mL de solució de pepsina (176 mg dissolts en 20 mL de SGF), simulant les condicions estomacals i obtenint així un volum total de 40 mL. El matràs ambre es va tancar amb paper d'alumini i es va introduir dins de l'orbital a 37 °C amb agitació contínua de 100 rpm durant 2 hores.

La preparació de SGF constava d'una mescla d'electròlits composta per 6,9 mL de KCl 0,5 M, 11,8 mL de NaCl 2 M, 12,5 mL de NaCl 1M, 0,9 mL de KH₂PO₄ 0,5 M, 0,4 mL de MgCl₂(H₂O)₆ 0,15 M, 0,5 mL de (NH₄)₂CO₃ 0,5 M i 1,3 mL d'aigua Mili-Q.

Fase intestinal

Un cop finalitzades les dues hores en el digestor, es van mesurar 30 g del resultant, que es van introduir en un vas de precipitats. Per simular les condicions intestinals es van afegir 1,5 mL de sals intestinals i 3,5 mL de bilis (270 mg dissolts en 5 mL de buffer pH 7). Seguidament, es va ajustar el pH a 7,014 amb NaOH (1 M i 0,1 M) mentre es mantenia en agitació constant dins d'un bany a temperatura de 37 °C, simulant la temperatura corporal.

Un cop ajustat el pH, es van afegir 2,5 mL de pancreatina (620 mg dissolts en 5 mL de buffer pH 7), iniciant en aquest moment les 2 hores de fase gàstrica. Durant el procés de simulació, la reacció es va monitorar mitjançant un dispositiu de titulació pH-stat, Metrohm USA Inc. (Riverview, FL, USA), que mesurava el volum de NaOH consumit mantenint el pH a 7.

3.5.2 Estabilitat col·loidal durant la digestió *in vitro*

Després de la simulació de les fases gàstrica i intestinal, es van caracteritzar les emulsions pel que fa a mida de partícula, càrrega elèctrica interfacial (potencial ζ) i microscòpia.

A més, es va emmagatzemar una mostra d'uns 10 mL després de cada etapa intestinal per poder calcular la bioaccessibilitat un cop finalitzada l'experimentació.

3.5.3 Alliberament d'àcids grassos

Durant la fase intestinal es produeix un trencament dels triglicèrids a àcids grassos, que deriva en una alliberació de triacilglicerols. Aquest trencament es produeix gràcies a la lipasa present en la pancreatina que s'introdueix durant el procés de digestió *in vitro*. Entre aquests hi trobem la pepsina gàstrica, que té efectes hidrolítics, convertint els triacilglicerols en diacilglicerols, àcids grassos lliures i monoacilglicèrids. Tot i l'acció que presenta la pepsina enfront dels lípids, la major part d'aquests composts són hidrolitzats per l'acció de la pancreatina intestinal. Per aquest motiu, la determinació de l'alliberació d'àcids grassos lliures es realitza després de la fase intestinal.

Els AG són alliberats a conseqüència del contacte entre pepsina pròpia del SIF i els triacilglicerols no digerits del quim en el digestor. La quantitat d'AG alliberats durant la digestió es va determinar en funció de la següent equació (2):

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

On V_{NaOH} és el volum consumit per neutralitzar els àcids grassos alliberats durant la lipòlisi, C_{NaOH} és la concentració molar del NaOH (0,1 M), M_{oli} és el pes molecular de l'oli (873,51946 g/mol), i m_{oli} correspon al pes en grams que es troba en la fracció digerida en l'equip de titració.

Un valor elevat d'alliberació indica una bona digestibilitat de la nanoemulsió, sent la primera passa per l'absorció del compost bioactiu en l'intestí, ja que es pot establir una relació directament proporcional amb els lípids presents en la fracció micel·lar i la proporció d'àcids grassos (Cheong et al., 2016).

3.5.4 Bioaccessibilitat del β -carotè

Per a la determinació de la bioaccessibilitat del β -carotè, es va prendre una mostra de 10 mL en un tub Falcon després de completar totes les etapes digestives i immediatament després de finalitzar la fase intestinal. Cada mostra es va emmagatzemar a una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ i, en concloure tots els experiments, la bioaccessibilitat es va mesurar simultàniament per garantir la igualtat de condicions.

Per determinar la concentració es va centrifugar la mostra a 25000 rpm durant 30 minuts a temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en l'equip AVANTI J-25 Beckman Instruments Inc. (Fullerton, CA, USA). El sobrenedant, sent la fracció aquosa que contenia les micel·les mixtes on es trobava el β -carotè dissolt, es va recollir amb molta cura de no contaminar la mostra amb l'oli del sobrenedant o la proteïna precipitada. La quantificació del β -carotè es va realitzar seguint el mètode de W. Liu et al. (2018), on es van mesclar 0,5 mL d'alíquota amb 2 mL d'etanol i 3 mL d'hexà, vortejan-los en l'equip MS2, Fisher Scientific (Leicestershire, UK) durant 10 s. Posteriorment, es va recollir la fase superior d'hexà, que contenia el β -carotè solubilitzat.

L'absorbància es va determinar mitjançant l'equip d'espectrofotometria V-670 Jasco (Tokio, Japó) a 450 nm, ja que és la zona d'espectre on el β -carotè presenta el seu pic d'absorbància màxima. Aquest equip projecta un eix de llum monocromàtica a través de la mostra. La quantitat de llum absorbida aporta informació sobre la quantitat de composts que es torben en la mostra.

4 RESULTATS I DISCUSSIÓ

En aquest apartat s'ha realitzat la determinació i anàlisi dels resultats obtinguts sobre la influència de la composició de les emulsions. S'ha fet una caracterització de les proteïnes vegetals utilitzades per avaluar la seva capacitat estabilitzadora mitjançant la mesura de la tensió interfacial. A més, s'han analitzat les característiques de les emulsions inicials i després de ser sotmeses a les fases gàstrica i intestinal, incloent-hi la mida de partícula, la viscositat inicial, la microestructura, l'estabilitat durant les primeres 24 hores, la digestibilitat i finalment, la bioaccessibilitat.

4.1 CAPACITAT EMULSIONANT DE LES PROTEÏNES

4.1.1 Tensió interfacial

Es va determinar la tensió interfacial de 4 emulsionants (Figura 1). Es pot observar com totes les proteïnes presenten una reducció gradual de la tensió interfacial, ja que totes presenten propietats emulgents. Segons Amine et al. (2014), una tensió interfacial més petita resulta en una millor formació i estabilització d'emulsions, i a la vegada, aquesta mesura es relaciona comunament amb la capacitat que tenen els emulsionants de col·locar-se en la interfase.

La Figura 1A mostra el canvi en la tensió interfacial de les proteïnes vegetals utilitzades com a emulgents a pH 3. El Tween 80 va ser l'emulgent que va mostrar una corba més pronunciada (de 4,43 mN/m a 2,28 mN/m), ja que a causa del seu pes molecular, té millors capacitats per posicionar-se en la interfase de manera molt ràpida i, per tant, reduir la tensió interfacial entre l'oli i l'aigua. De la mateixa manera, les proteïnes també van mostrar una disminució de la tensió interfacial, però de manera menys pronunciada en comparació amb el Tween. Aquesta reducció va dependre del tipus de proteïna. Com es veu en la Figura 2, aquesta capacitat es va relacionar el pes molecular, ja que les proteïnes són macromolècules que presenten estructures de grandària molt superior al Tween, i per tant es posicionen en la superfície de lípids més lentament, reduint la tensió interfacial en grau més baix. Les proteïnes de soja i pèsol pràcticament es van superposar l'una sobre l'altra, iniciant en valors de 5,2 mN/m i finalitzant a valors de 3,9 i 4,2 mN/m, respectivament. En canvi, la de blat va mostrar un valor intermedi entre el Tween i les

altres proteïnes, disminuint la tensió interfacial des de valors de 4,4 a 3,2 mN/m. Als dos pH les proteïnes van presentar comportaments pràcticament iguals, amb diferència única en valors absoluts a pH 7 (Figura 1B), on els emulgents van presentar disminucions iguals en la tensió interfacial en magnituds d'escala inferiors.

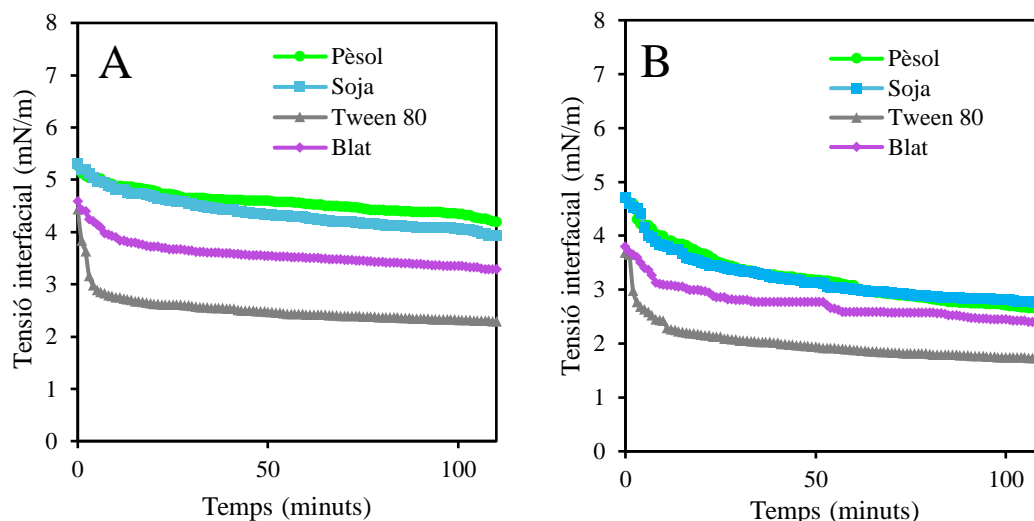


Figura 1. Tensió interfacial (mN/m) expressat en temps (min) de les emulsions inicials estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80 al 0,04% a pH 3 (A) i a pH 7 (B).

4.2 EMULSIONS INICIALS

4.2.1 Mida de partícula i distribució de mida de partícula

La mida de partícula (Figura 2) va ser determinada en les emulsions inicials. En ambdós pH, es va poder determinar que l'emulsió estabilitzada amb Tween era l'única que presentava mides dins de l'escala nanomètrica (183 d·nm a pH 3 i 195 d·nm a pH 7), sent l'única nanoemulsió. A pH 3 l'emulsió de blat també va mostrar mides dins de l'escala nanomètrica (380 d·nm), presentant una major capacitat per situar-se en la interfase, ja que com s'ha mostrat en l'apartat anterior, la proteïna de blat va reduir la tensió interfacial en grau més alt, resultant en emulsions que van presentar menor mida de partícula. La proteïna de soja i la de pèsol van produir emulsions de mida superior, 1260 i 1530 d·nm, respectivament.

En el cas de pH 7, les emulsions van presentar resultats menys uniformes. La proteïna de pèsol va mostrar una mida de 4149 d·nm, notablement superior a les altres. En mida intermèdia, la proteïna de soja va presentar una mida de partícula de 1868 d·nm.

Finalment, l'emulsió de menor mida va ser la proteïna de blat, que va mostrar una mida de partícula de 1518 d·nm.

En ambdós pH es mostren resultats semblants a magnituds diferents, on la proteïna de pèsol va formular emulsions de major mida, la de soja mida intermèdia i la de blat va formular les emulsions amb menor mida de partícula.

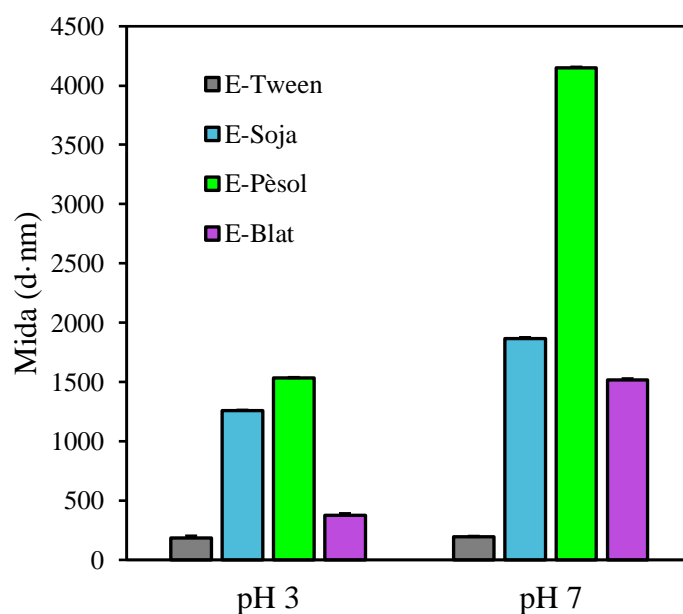


Figura 2. Mida (d·nm) de les emulsions inicials estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80 a diferents pH.

4.2.2 Microscòpia

En la Figura 3 es mostren les imatges de la microestructura de les diferents emulsions abans de ser sotmeses a les condicions gastrointestinals. En aquest apartat es recullen les imatges obtingudes a x100 magnificacions, separades en dues columnes en funció del pH.

Després de la visualització de les imatges, es pot afirmar que les emulsions produïdes amb Tween 80 van mostrar mides de gota d'oli inferiors a la resta d'emulsions estabilitzades amb proteïnes, tal com s'ha determinat en l'apartat anterior. També es va observar una agregació en les emulsions de proteïna, destacant les de pèsol i soja.

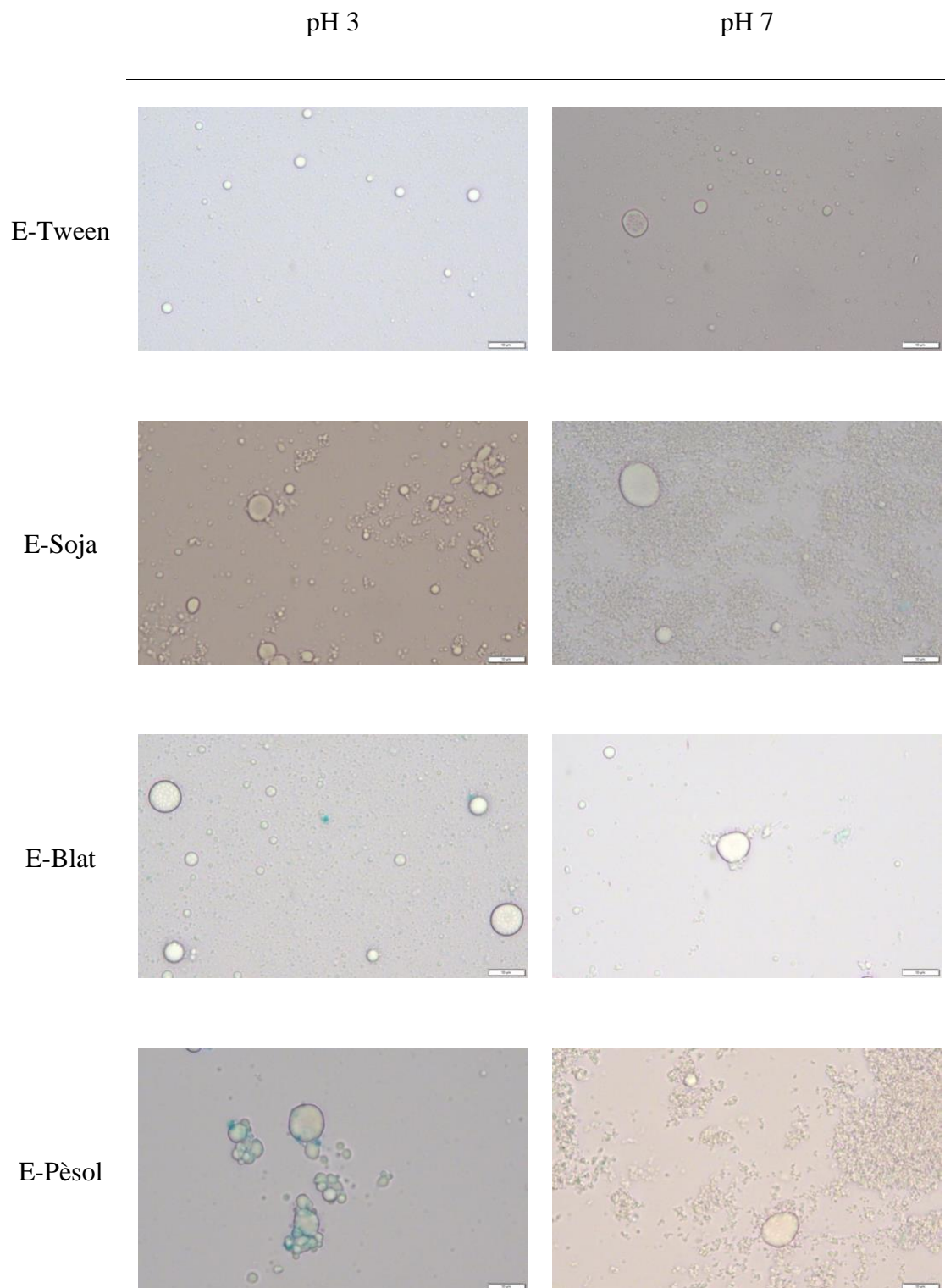


Figura 3. Imatges microscòpiques (magnificació x100) de la fase inicial de les emulsions estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80 a diferents pH.

4.2.3 Potencial-zeta

La càrrega elèctrica de les partícules (potencial ζ) de les emulsions en la seva fase inicial es representa en la Figura 4. El potencial zeta és indicador de la càrrega elèctrica de la capa interfacial de les emulsions, i està influenciada pel tipus d'emulgent utilitzat i el pH del medi (Qian & McClements, 2011c), per la qual cosa a partir d'aquests resultats es va poder obtenir una suposició sobre l'estabilitat que tindran en el temps les diferents emulsions.

Comparant els resultats assolits als diferents pH, es va poder observar com a pH 3 (Figura 4A) les mostres van presentar un valor de potencial-zeta pròxim a 0, mentre que a pH 7, les emulsions presentaven valor més allunyat del mateix nombre. Aquest fet es podria atribuir a què les proteïnes, en la seqüència d'aminoàcids, poden tenir diferents constants de dissociació. Les que tenen grups carboxílics (-COOH), tenen la capacitat de dissociar el grup -OH, quedant carregades negativament (-COO⁻). Aquesta dissociació, però, depèn del pH, i només ocorre quan aquest està per sobre de la constant de dissociació, és a dir, a pH més elevats (on la concentració de H⁺ del medi és més baixa). A pH 3 el medi està molt carregat, per la qual cosa els grups funcionals capaços de cedir hidrogenions són pocs, quedant les proteïnes neutres o poc carregades, ja que no es dissocien. En canvi, quan augmenta el pH, no hi ha tanta concentració d'hidrogenions en el medi, i per això tots els grups capaços de dissociar-se ho faran, cedint el H⁺ dels grups carboxílics i quedant les proteïnes carregades negativament. D'aquesta manera, es va poder relacionar el potencial zeta amb la càrrega elèctrica de les proteïnes, on a pH baixos les proteïnes que tenien grups amino van quedar carregades positivament a causa que no s'havien dissociat, i mostraven càrrega elèctrica positiva, com el cas del blat (+10,5 mV). Pel que fa a les altres proteïnes, la de pèsol va ser la que va presentar un major potencial (-17,4 mV) i la de soja el valor més baix (-0,05 mV). Per aquest mateix motiu, com que les proteïnes a pH 7 (Figura 4B) es trobaven més dissociades, i per tant més carregades, van mostrar valors amb major càrrega per la proteïna de blat (-24 mV), i també resultats molt similars per les proteïnes de soja i pèsol (-39 mV en els dos casos).

Així mateix, també es va poder determinar que en els dos casos, l'emulsió produïda amb Tween va ser la que presentava major estabilitat. Aquest va mostrar una major uniformitat amb els seus resultats (-35,5 mV a pH 3 i -57 mV a pH 7) pel fet que no s'ionitza i, per

tant, no es dissocia. Gràcies a les seves característiques de composició, la seva funcionalitat no és determinada pel pH.

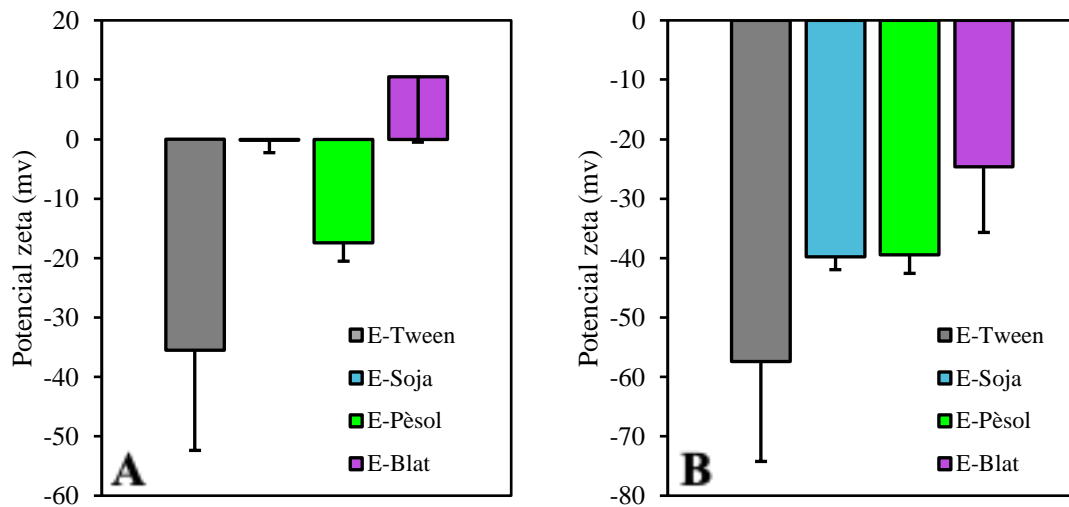


Figura 4. Potencial zeta (mV) de les emulsions estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80 a pH 3 (A) i a pH 7 (B) en la fase inicial.

4.2.4 Viscositat

La viscositat és una propietat important en la formulació de nanoemulsions, ja que influeix en l'estabilitat i alliberació de β -carotè. L'interès en aquesta mesura recau en l'aportació d'informació que aporta sobre l'estructura de l'emulsió, ja que viscositats més altes poden significar en nivells més alts d'aglomeració (De Oliveira et al., 2018).

En la Figura 5 es poden comparar els resultats de viscositats de les diferents emulsions inicials. Aquesta evidència que les mostres que es troben a pH àcids van ser menys viscoses, fet que es pot atribuir a què quan es troben en càrrega negativa, les molècules es repelen més entre si, oposant-se a la fluïdesa de la mostra.

En ambdós casos, les emulsions preparades amb pèsol van ser les que van presentar viscositats més elevades (1,92 mPa.s a pH 3 i 2,66 mPa.s a pH 7), mentre que les emulsions preparades amb blat van ser les que presentaven emulsions amb valors de viscositat més baixos (1,14 mPa.s a pH 3 i 1,73 mPa.s a pH 7), quedant les emulsions de soja en valors entremitjos (1,84 mPa.s a pH 3 i 2,14 mPa.s a pH 7).

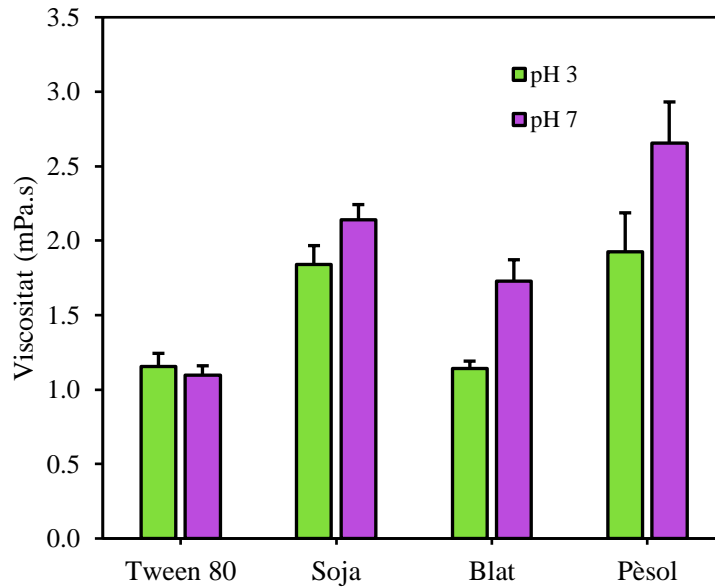


Figura 5. Viscositat (mPa.s) mesurada de les emulsions inicials estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80 a diferents pH.

4.2.5 Turbiscan

A partir de les imatges que apareixen en la Figura 5 es va poder observar una representació gràfica de l'estabilitat que van presentar les emulsions durant les primeres 24 hores. Es va poder veure com el Tween 80 era l'emulgent que oferia emulsions de caràcter més uniforme i continu en el temps. En el cas de les emulsions estabilitzades amb proteïnes de soja i pèsol es va afirmar una gran diferència respecte a estabilitat, on van ser altament estables a pH 7, i molt més inestables a pH 3. En situació oposada, la proteïna de blat mostra una major estabilitat a pH 3 i una major inestabilitat a pH 7.

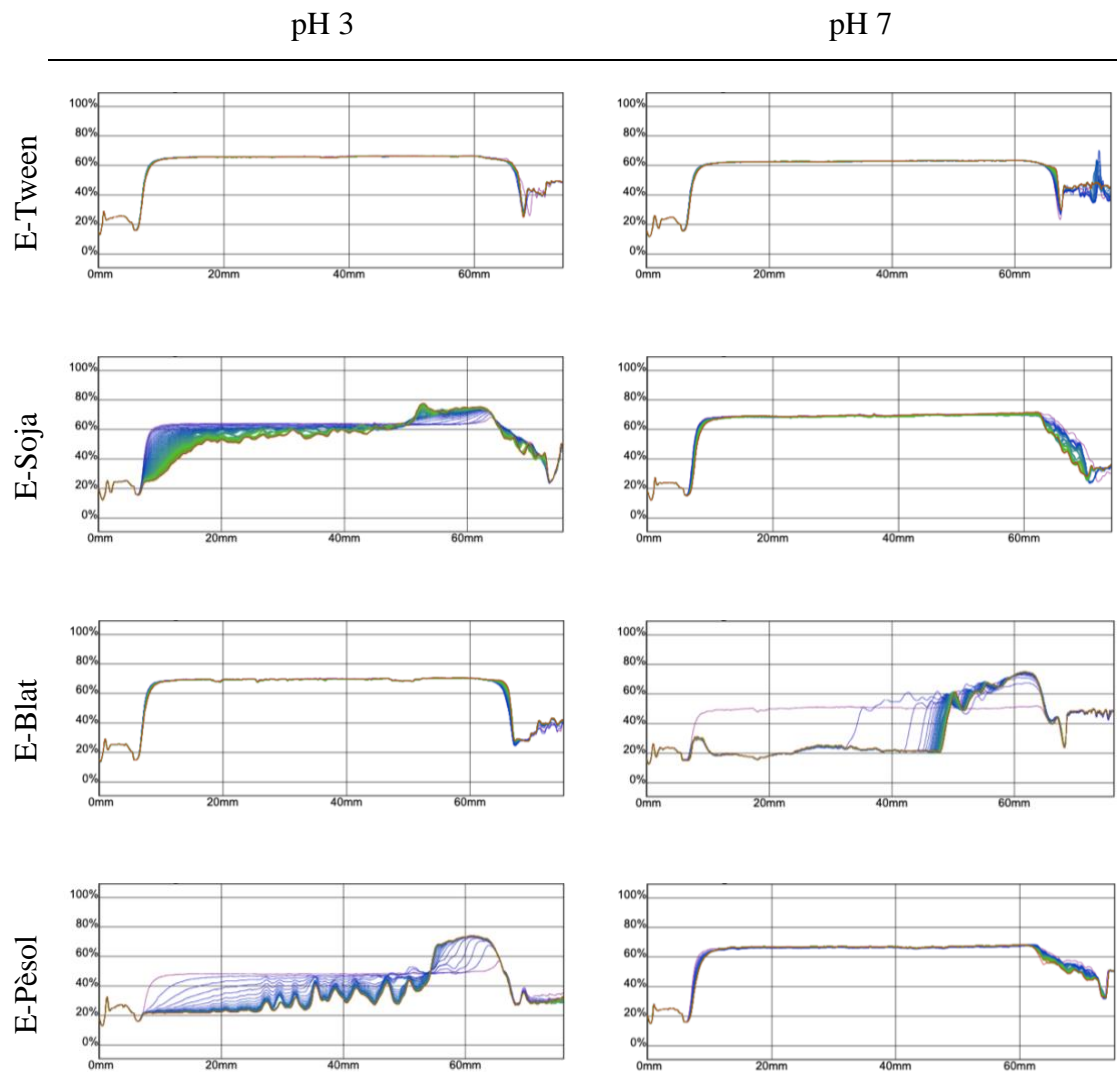


Figura 6. Imatges del turbiscan de les diferents emulsions estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween 80 a pH 3 i pH 7 durant les primeres 24 h.

4.2.6 Imatges turbiscan

Com es mostra en la **Error! Reference source not found.**, i corresponentment als resultats vistos en l'apartat anterior, les proteïnes van presentar diferents estabilitats en funció del pH. El Tween va mostrar una alta estabilitat al llarg del temps en ambdós casos. A pH 3, la proteïna de blat va mostrar una gran estabilitat, presentant mínims fenòmens de cremat a la part superior i clarificació a la part inferior, imatge totalment oposada a les proteïnes de soja i pèsol, que van presentar una gran flocculació dels components a la part superior, acompanyada d'una pràcticament total clarificació en la resta del tub.

En el cas contrari, a pH 7, l'única proteïna que va presentar estabilitat va ser la de soja, considerant també una notable clarificació de la part inferior. La proteïna de blat va ser la que va presentar una inestabilitat major. Finalment, tot i que la proteïna de pèsol havia presentat estabilitat durant les primeres 24 hores, es va poder observar com aquest fenomen no era constant al llarg del temps, ja que també es va poder comprovar una gran inestabilitat en aquest cas. Segons van citar Di Giorgio et al. (2019), les emulsions estabilitzades amb proteïnes són inestables.

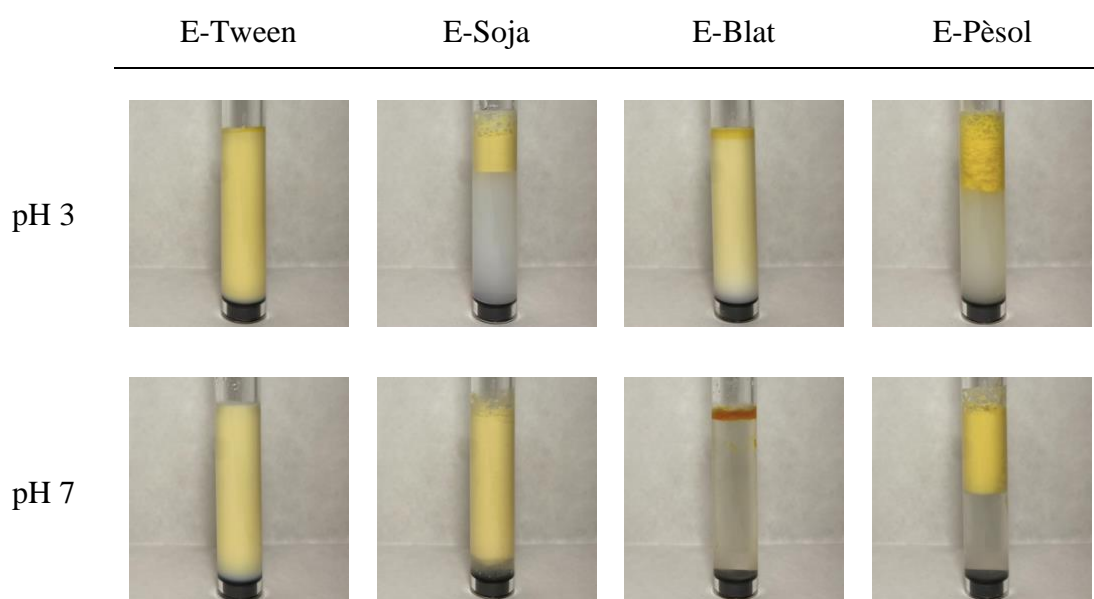


Figura 7. Aparència visual de les nanoemulsions estabilitzades amb Tween 80 i diferents aïllats de proteïna vegetal (soja, blat i pèsol) a diferents pH després de dues setmanes.

4.3 DIGESTIÓ *IN VITRO*

4.3.1 Mida de partícula

La mida de partícula (Figura 8) es va determinar després de les fases gàstrica i intestinal. Es va veure que la mida de partícula de les emulsions i nanoemulsions va augmentar després de la fase gàstrica (Figura 8CD) en comparació amb la mida de partícula inicial (Figura 8AB). No obstant això, la mida de partícula va disminuir després de la fase intestinal (Figura 8EF).

Es va afirmar que en tots els casos, les proteïnes presentaven distribucions multimodals (amb diversos pics), indicant la presència de diverses poblacions. Després de la fase gàstrica a pH 3 (Figura 8A), la proteïna de soja va mostrar una mida més gran, amb un

pic màxim a 61,8 μm , juntament amb una segona població de 9,86 μm . Les proteïnes de pèsol i blat van mostrar distribucions gairebé idèntiques, amb pics màxims de 9,86 μm i una segona població de 60 μm en tots dos casos, mostrant aquestes les mides més petites d'entre les proteïnes. Després de la fase intestinal a pH 3 (Figura 8B) les proteïnes de soja i pèsol van mostrar distribucions iguals, amb una mida de partícula homogènia de 25 μm , tenint aquestes la mida més gran. En aquest cas, la proteïna de soja va mostrar una distribució bimodal, amb un pic màxim als 0,67 μm i un segon pic als 4,03 μm , essent la proteïna amb la mida de partícula més petita.

Després de la fase gàstrica a pH 7 (Figura 8C) es va observar que les proteïnes de blat i soja presentaven una mida superior amb una distribució pràcticament idèntica. Els seus pics màxims van estar per sobre dels 14,5 μm i també es va determinar una segona població als 0,6 μm . D'altra banda, la proteïna de pèsol va exhibir una mida molt inferior, amb un sol pic prop dels 0,46 μm . Aquestes determinacions van mostrar que les proteïnes de blat i soja tenen tendència a tenir mides similars després de la fase gàstrica a pH 7, mentre que la proteïna de pèsol es presenta en una escala molt diferent. En la fase intestinal a pH 7 (Figura 8D), es va veure que la proteïna de blat exhibia una mida superior, amb un pic màxim als 14,5 μm i una segona distribució als 0,5 μm . La proteïna de soja va presentar la menor de les mides, amb un sol pic prop dels 0,46 μm . Finalment, la proteïna de pèsol va presentar un petit pic als 12,7 μm .

Per acabar, el Tween va mostrar uniformitat de mida després de la fase gàstrica i intestinal en ambdós pH. A pH 3 es va veure un pic als 0,46 μm després de la fase gàstrica, que es manté després de l'etapa intestinal. El mateix va passar a pH 7 després d'ambdues fases, on va presentar un pic als 0,6 μm i un altre als 2,6 μm .

Aquestes determinacions suggereixen que les proteïnes poden experimentar canvis en la seva distribució de mida de partícula en funció de les condicions del medi, considerant el pH com un factor determinant en les seves propietats físiques.

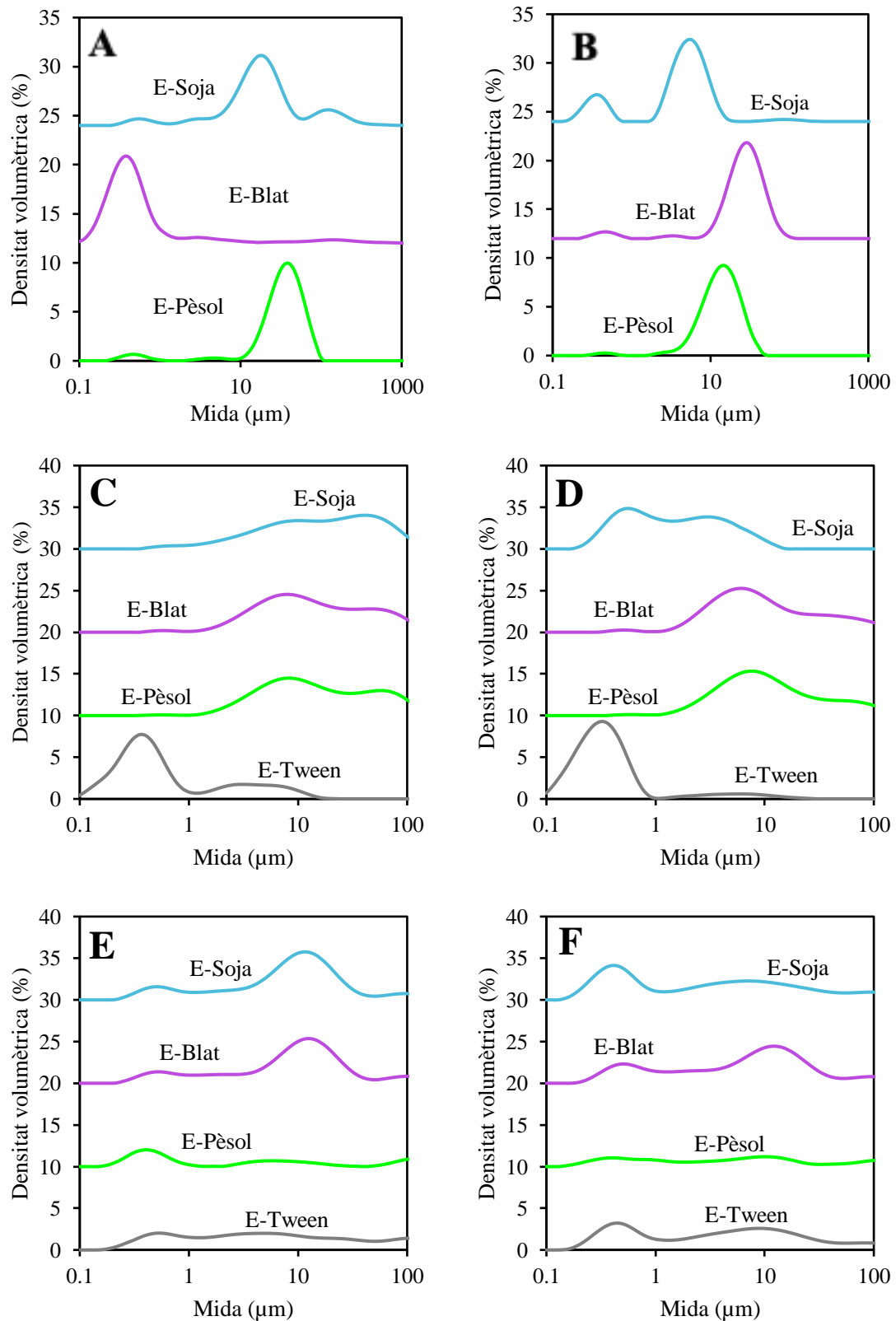


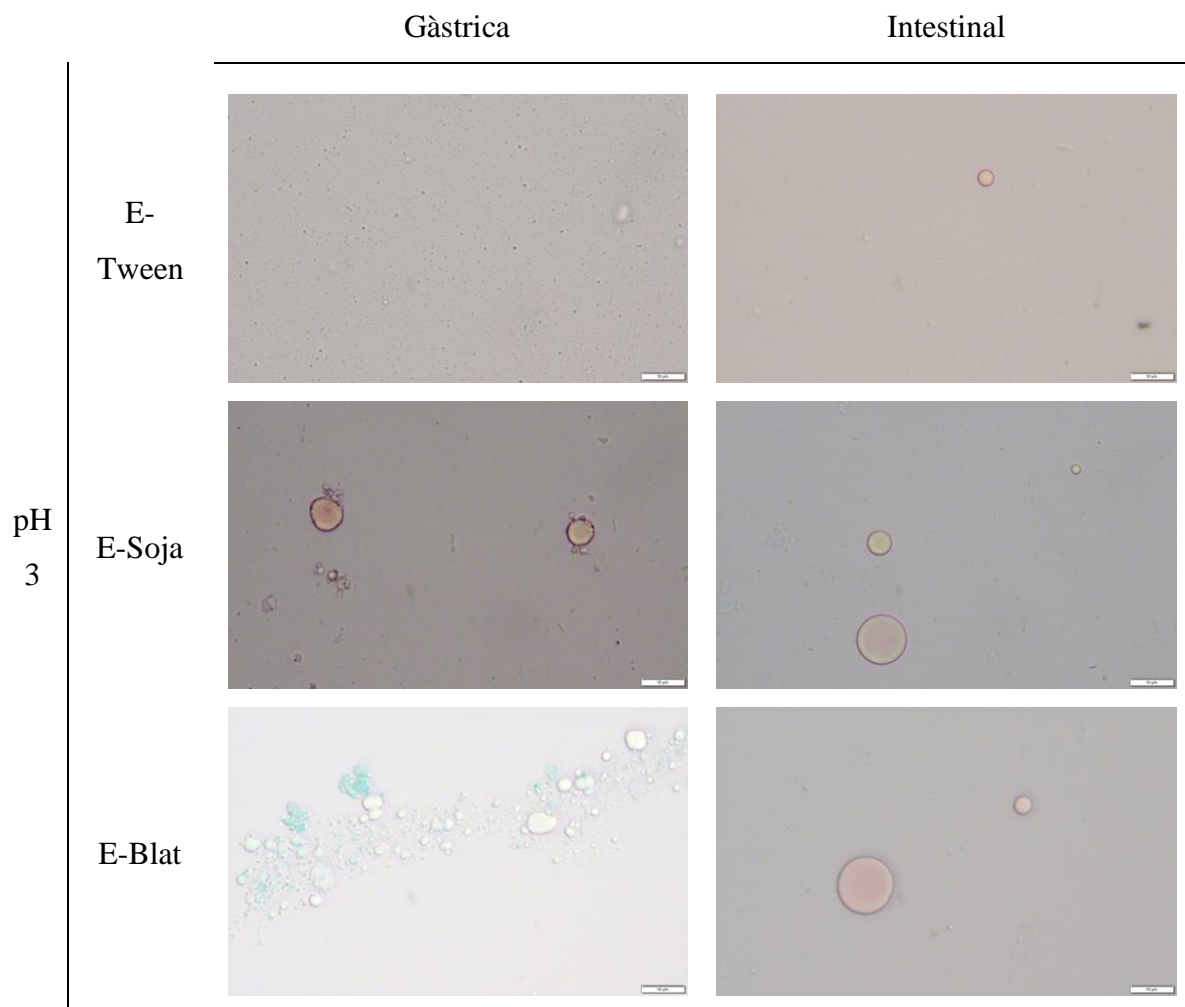
Figura 8. Mida de partícula (μm) expressada en % de densitat volumètrica de les emulsions inicials (A,B), després de la fase gàstrica (C,D) i intestinal (E,F) d'emulsions estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80 a valors de pH 3 (A,C,E) i pH 7 (B,D,F).

4.3.2 Microscòpia

En la Figura 9 es resumeixen les imatges de la microestructura de les nanoemulsions després de ser sotmeses a les condicions gàstrica i intestinal i a pH 3 i pH 7, respectivament.

Després de la visualització dels resultats i analitzant aquests resultats juntament amb els obtinguts en l'apartat anterior, podem afirmar que es van formar agregats de gotes d'oli durant la digestió *in vitro*. Després d'una anàlisi exhaustiva de les imatges recollides en les dues fases, es va poder veure com en cada pH on les emulsions presentaven menor estabilitat, formaven també agregats de gota de major mida de partícula.

A més, també es va poder comprovar que la digestibilitat de lípids no s'havia completat, ja que romanien gotes d'oli amb posterioritat a la fase intestinal.



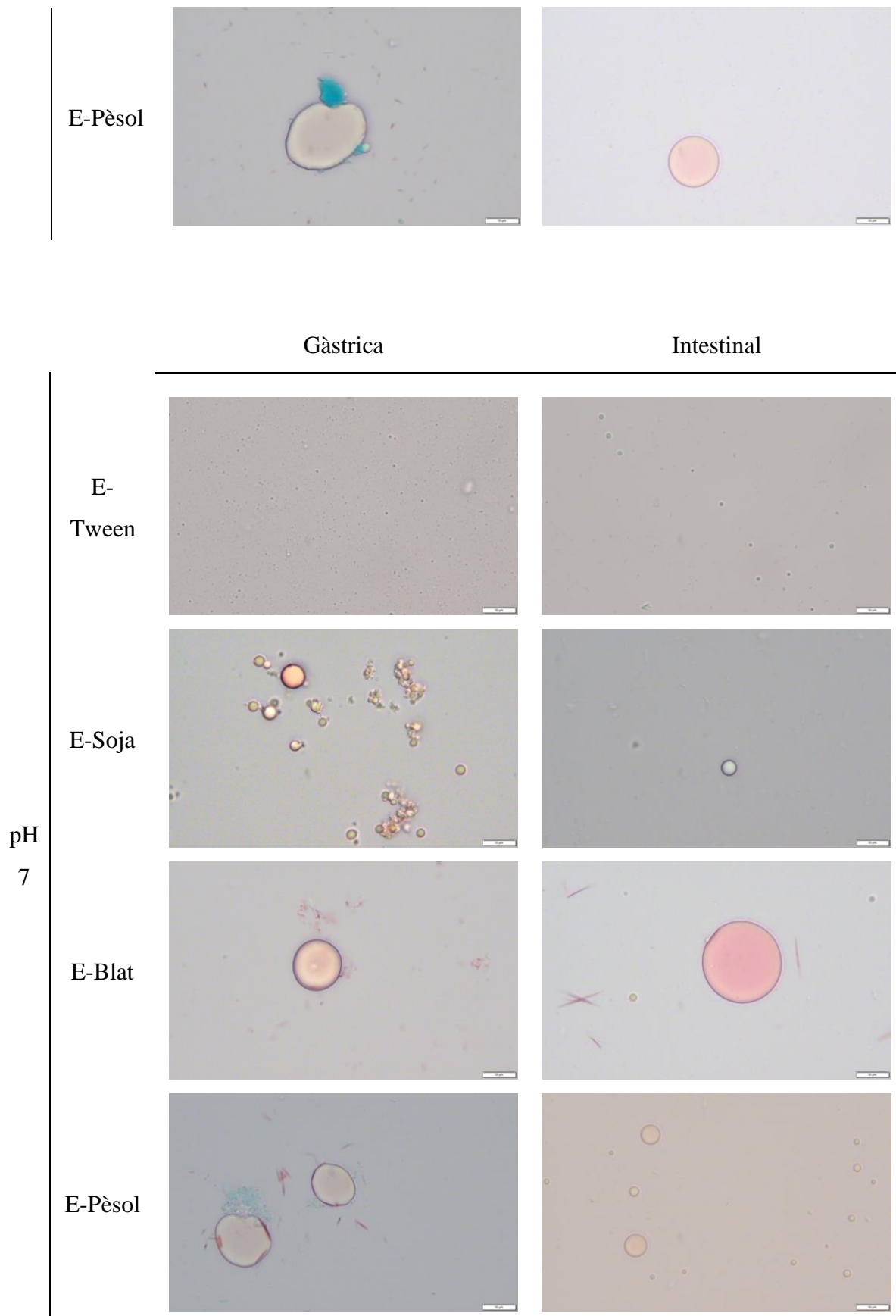


Figura 9. Imatges microscòpiques x100 després de la fase gàstrica (esquerra) i després de la fase intestinal (dreta) de les emulsions inicials estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80 a diferents pH.

4.3.3 Potencial-zeta

En la Figura 10 es representa la càrrega elèctrica de les partícules de les nanoemulsions abans i després de ser sotmeses a la simulació *in vitro* gàstrica i intestinal.

A pH 3 (Figura 10A), el Tween va mostrar major potencial en la fase inicial (-35,5 mV) i en la fase gàstrica (-35,9 mV), mentre que en la fase intestinal va ser el pèsol (-40,5 mV). En aquesta fase pràcticament totes les emulsions van presentar potencials molt semblants, sent el mínim la de soja (-34 mV). En la fase gàstrica la proteïna de pèsol també va mostrar un potencial superior (-24,7 mV), seguida de la de blat (-19,6 mV) i la de soja (-12,3 mV). Aquests resultats es van mantenir molt semblants a pH 7 (Figura 10B), on només es van observar diferències a la fase gàstrica, on la de pèsol i soja van presentar potencials molt semblants (-35,8 i -35,3 mV, respectivament), i en aquest cas la de blat va tenir un menor potencial (-21,7 mV).

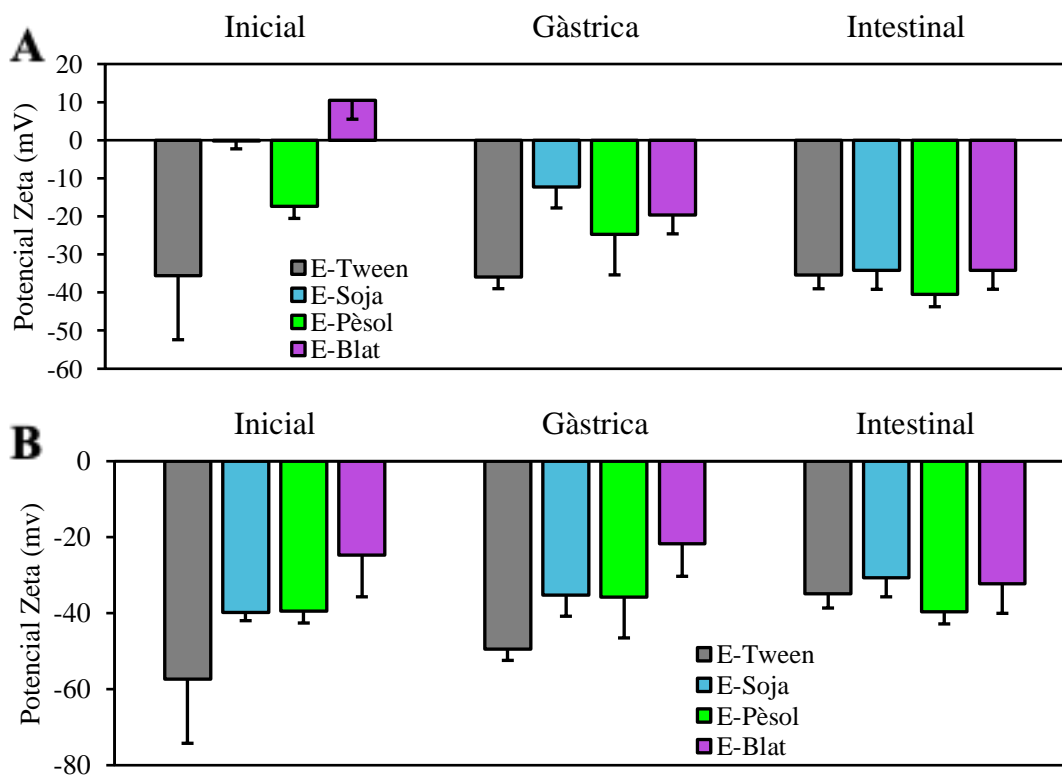


Figura 10. Potencial zeta (mV) de les emulsions estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80, durant les fases inicial, gàstrica i intestinal (d'esquerra a dreta) a pH 3 (A) i pH 7 (B).

4.3.4 Digestibilitat lípids

La reacció de lipòlisis es va monitorar durant la fase intestinal *in vitro* a través de l'alliberació d'àcids grassos lliures, permetent determinar les diferències entre la digestibilitat dels lípids en les emulsions formulades amb les diferents proteïnes vegetals com a emulgents. Amb els resultats obtinguts i mitjançant l'aplicació de l'equació (2), es va calcular el percentatge d'AG lliures alliberats durant la digestió intestinal, representats en Figura 11 en format temporal i a la Figura 12 en format final.

Per una banda, com es pot comprovar en la Figura 11A, on s'indica la velocitat a la qual es va produir la reacció, pràcticament totes les proteïnes van tenir el mateix recorregut durant els primers 10 minuts. Llavors a partir d'aquest punt es va poder observar que les emulsions estabilitzades amb proteïnes tenien una digestibilitat més lenta. Com s'ha mencionat en l'apartat 1.4, aquest fet pot tenir relació al fet que les proteïnes impedeixen que la lipasa arribi a la superfície de la gota d'oli, provocant que la digestió de lípids sigui més lenta. D'aquesta manera, com es comprova en la Figura 12, l'emulsió de pèsol va ser la que va presentar una menor digestibilitat (57,3 %), la de soja una major digestibilitat (72,9 %), i la de blat en posició intermèdia (69,6 %), factors que són proporcionals a la velocitat de les corbes de digestibilitat que presenten les emulsions en la Figura 11A.

En el cas de pH 7 (Figura 11B), com que les proteïnes estaven més carregades i el pH era més alt, l'impediment va ser encara més fort i la lipòlisi va ser inferior. Aquest fenomen es va poder visualitzar també en la digestibilitat lipídica total (Figura 12) on la proteïna de soja mostra la digestibilitat més gran (70,3 %), igual que a pH 3, la proteïna de pèsol en aquest cas queda en valors entremitjos (65,6 %) i finalment la proteïna de blat presenta la mínima digestibilitat (53,9 %), que també es correlaciona amb la velocitat de les corbes de digestibilitat.

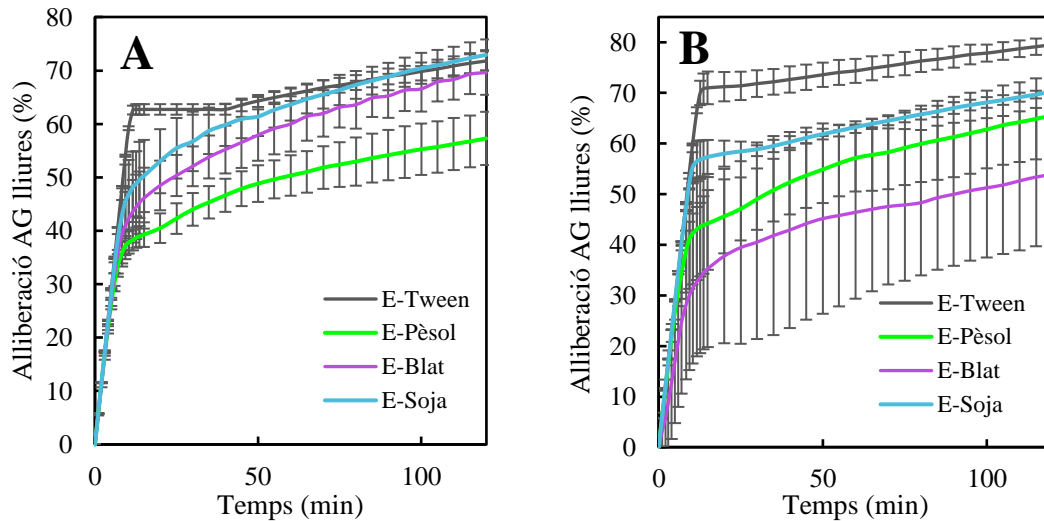


Figura 11. Digestibilitat lipídica expressada com a alliberació d'àcids grassos lliures (%) durant la fase intestinal (min) de les emulsions estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80 a pH 3 (A) i a pH 7 (B).

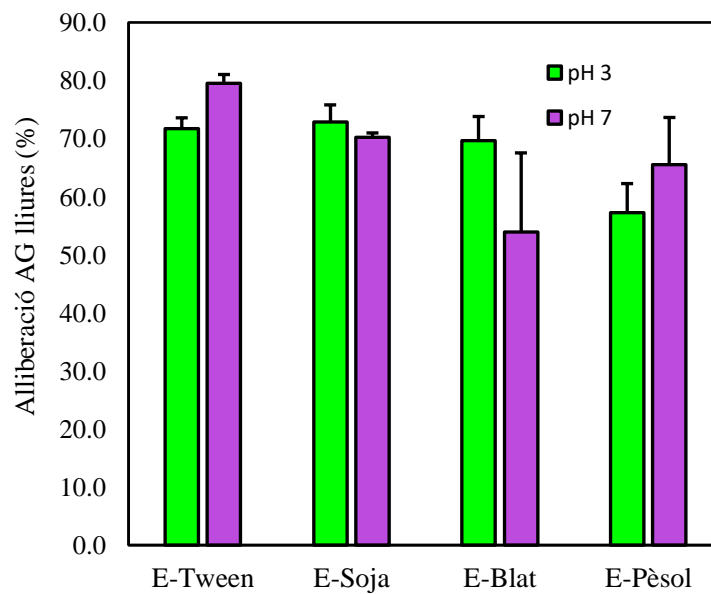


Figura 12. Àcids grassos lliures acumulats (%) alliberats al final de la fase intestinal de la digestió *in vitro* de les emulsions estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80.

4.3.5 Bioaccessibilitat β -carotè

En la Figura 13 es representa la concentració de β -carotè en la fase micel·lar de les diferents nanoemulsions just acabada la fase intestinal de la digestió *in vitro*. El valor de bioaccessibilitat es va calcular com la concentració de β -carotè present en la fracció

micel·lar. El Tween 80 va resultar en una concentració d'1,79 $\mu\text{g/mL}$ a pH 3 i de 2,06 $\mu\text{g/mL}$ a pH 7. El blat va mostrar els valors de bioaccessibilitat superiors, sent de 2,76 $\mu\text{g/mL}$ a pH 3 i de 2,22 $\mu\text{g/mL}$ a pH 7. Llavors les proteïnes de soja i pèsol van presentar valors similars en pH invertits. La proteïna de soja va resultar en una concentració de 2,29 $\mu\text{g/mL}$ a pH 3 i de 2,13 $\mu\text{g/mL}$ a pH 7. Finalment, la proteïna de pèsol va indicar una concentració de 2,07 $\mu\text{g/mL}$ a pH 3 i de 2,34 $\mu\text{g/mL}$ a pH 7.

Observant els resultats obtinguts i comparant-los amb els de l'apartat anterior, es va poder observar una correlació directa entre digestibilitat i bioaccessibilitat del compost, evidenciant que en aquest cas el grau de lipòlisis va determinar la capacitat de solubilització i, per tant, de capacitat de ser absorbit del β -carotè.

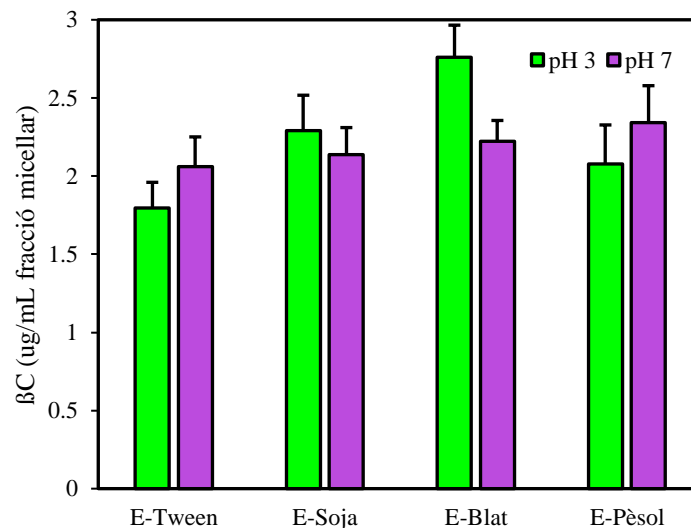


Figura 13. Bioaccessibilitat del β -carotè (%) en la fase micel·lar al final de la fase intestinal *in vitro* (120 min) de les emulsions estabilitzades amb diferents aïllats de proteïna vegetal (pèsol, blat i soja) i Tween-80, a diferents pH.

5 CONCLUSIONS

L'ús d'aïllats de proteïnes vegetals provinents de blat, pèsol i soja com a emulgents van donar lloc a emulsions de mida de partícula al voltant de 1800 nm. No obstant això, la seva estabilitat es va veure afectada pel pH del medi. A pH 3, les proteïnes van donar lloc a emulsions amb càrrega elèctrica interfacial propera a la neutralitat, a causa del baix grau de dissociació dels principals grups funcionals dels aminoàcids (NH^{3+} , COOH). Aquesta baixa càrrega elèctrica va fer que les gotes d'oli de les emulsions no presentessin repulsió entre elles, i per tant es desestabilitzessin, presentant fenòmens d'agregació, coalescència i en última instància de separació de fases per cremat. En canvi, a pH 7, les emulsions estabilitzades amb proteïna vegetal, van presentar una major estabilitat en comparació a pH 3, a causa del grau més gran de dissociació de les proteïnes vegetals en la interfase i, per tant, presentant una càrrega elèctrica més negativa, afavorint així la repulsió entre les gotes d'oli i millorant-ne l'estabilitat.

Pel que fa a la digestibilitat *in vitro*, les emulsions estabilitzades amb proteïnes vegetals van presentar una menor lipòlisi en comparació amb les nanoemulsions estabilitzades amb Tween 80. Això es podria atribuir a la seva major mida de partícula o a causa d'un fenomen d'impediment estèric causat per les proteïnes, provocant l'impediment de la lipasa pancreàtica a accedir al seu substrat. Tanmateix, tot i presentar una menor digestibilitat lipídica, les emulsions estabilitzades amb proteïnes vegetals van presentar majors valors de bioaccessibilitat de β -carotè, que podria ser degut a la contribució de les proteïnes a la capacitat de solubilització de les micel·les mixtes formades després de la digestió.

Els resultats d'aquest estudi evidencien la possibilitat d'utilitzar proteïnes vegetals com a emulgents per a la formulació d'emulsions alimentàries amb òptima funcionalitat.

6 BIBLIOGRAFIA

- Adomaityte, J., Mullin, G. E., & Dobs, A. S. (2014). Anti-aging diet and supplements: Fact or fiction? *Nutrition in Clinical Practice*, 29(6), 844–846. <https://doi.org/10.1177/0884533614546889>
- Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A. L., & O'Mahony, J. A. (2017). The composition, extraction, functionality and applications of rice proteins: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 64, 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.01.008>
- Amine, C., Dreher, J., Helgason, T., & Tadros, T. (2014). Investigation of emulsifying properties and emulsion stability of plant and milk proteins using interfacial tension and interfacial elasticity. *Food Hydrocolloids*, 39, 180–186. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2014.01.001>
- Azeem, A., Rizwan, M., Ahmad, F. J., Iqbal, Z., Khar, R. K., Aqil, M., & Talegaonkar, S. (2009). Nanoemulsion components screening and selection: A technical note. *AAPS PharmSciTech*, 10(1), 69–76. <https://doi.org/10.1208/S12249-008-9178-X>
- Baig, M. K., Soleimani, H., Yahya, N., Sabet, M., Baig, M. K., Soleimani, H., Yahya, N., & Sabet, M. (2019). Magnetic Behavior of Ni/NiO Core-Shell Nanoparticles under Electromagnetic Waves for Oil-Water Interfacial Tension Reduction. *JMEP*, 28(9), 5882–5889. <https://doi.org/10.1007/S11665-019-04301-X>
- Bernardes, P. C., De Andrade, N. J., & Soares, N. da F. F. (2014). Nanotecnologia na indústria de alimentos. *Bioscience Journal*, 30(6), 1919–1932.
- Berton-Carabin, C. C., Sagis, L., & Schroën, K. (2018). Formation, Structure, and Functionality of Interfacial Layers in Food Emulsions. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, 551–587. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-FOOD-030117-012405>
- Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., & Rajamohamed, S. H. (2010). Comparison of the functional properties of pea,

- chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 537–546. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2009.07.021>
- Burger, T. G., & Zhang, Y. (2019). Recent progress in the utilization of pea protein as an emulsifier for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 25–33. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2019.02.007>
- Casazza, A. M., Pratesi, G., Giuliani, F., Formelli, F., & Di Marco, A. (1978). Enhancement of the antitumor activity of adriamycin by Tween 80. *Tumori*, 64(2), 115–129. <https://doi.org/10.1177/030089167806400202>
- Cheong, A. M., Tan, C. P., & Nyam, K. L. (2016). In-vitro gastrointestinal digestion of kenaf seed oil-in-water nanoemulsions. *Industrial Crops and Products*, 87, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2016.04.019>
- Choudhary, M., Jones, J. B., & Paret, M. L. (2021). Natural or green synthesis nanomaterials and impact on plant pathogens. *Nanotechnology-Based Sustainable Alternatives for the Management of Plant Diseases*, 5–29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823394-8.00003-2>
- Chove, B. E., Grandison, A. S., & Lewis, M. J. (2001). Emulsifying properties of soy protein isolate fractions obtained by isoelectric precipitation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(8), 759–763. <https://doi.org/10.1002/JSFA.877>
- Cui, L., Bandillo, N., Wang, Y., Ohm, J. B., Chen, B., & Rao, J. (2020). Functionality and structure of yellow pea protein isolate as affected by cultivars and extraction pH. *Food Hydrocolloids*, 108, 106008. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2020.106008>
- Date, A. A., Hanes, J., & Ensign, L. M. (2016). Nanoparticles for oral delivery: Design, evaluation and state-of-the-art. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 240, 504–526. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.06.016>

- de Ariño Otxoa, A. (2018). Nanotechnology and food safety. *Nutricion Hospitalaria*, 35(Ext4), 146–149. <https://doi.org/10.20960/NH.2141>
- De Oliveira, M. C. K., Miranda, L. R. O., De Carvalho, A. B. M., & Miranda, D. F. S. (2018). Viscosity of Water-in-Oil Emulsions from Different American Petroleum Institute Gravity Brazilian Crude Oils. *Energy and Fuels*, 32(3), 2749–2759. <https://doi.org/10.1021/ACS.ENERGYFUELS.7B02808>
- Di Giorgio, L., Salgado, P. R., & Mauri, A. N. (2019). Encapsulation of fish oil in soybean protein particles by emulsification and spray drying. *Food Hydrocolloids*, 87, 891–901. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.09.024>
- Donsì, F., Sessa, M., & Ferrari, G. (2012). Effect of emulsifier type and disruption chamber geometry on the fabrication of food nanoemulsions by high pressure homogenization. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 51(22), 7606–7618. https://doi.org/10.1021/IE2017898/ASSET/IMAGES/LARGE/IE-2011-017898_0007.JPEG
- Du, R., Xiong, W., Xu, L., Xu, Y., & Wu, Q. (2023). Metagenomics reveals the habitat specificity of biosynthetic potential of secondary metabolites in global food fermentations. *Microbiome*, 11(1), 115. <https://doi.org/10.1186/S40168-023-01536-8>
- Dugas, T. R., Morel, D. W., & Harrison, E. H. (1998). Impact of LDL carotenoid and α -tocopherol content on LDL oxidation by endothelial cells in culture. *Journal of Lipid Research*, 39(5), 999–1007. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)33867-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)33867-0)
- Especies Frutas Y Verduras Comercializadas En La Zona Metropolitana De San Salvador, O. DE, Jessica Tatiana Burgos Sierra Fausto Roman Calderon Rivera Para Optar Al Grado De, B. B., Salvador, S., Salvador, E., & America, C. (2009). *UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CAROTENOIDES TOTALES EN TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR.*

- Farah, M. A., Oliveira, R. C., Caldas, J. N., & Rajagopal, K. (2005). Viscosity of water-in-oil emulsions: Variation with temperature and water volume fraction. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 48(3–4), 169–184. <https://doi.org/10.1016/J.PETROL.2005.06.014>
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 29(11), 751–760. <https://doi.org/10.1016/J.NUTRES.2009.09.016>
- Forgiarini, A., Esquena, J., González, C., & Solans, C. (2001). Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature. *Langmuir*, 17(7), 2076–2083. <https://doi.org/10.1021/LA001362N>
- Grande de França, N. A., Rolland, Y., Guyonnet, S., & Souto Barreto, P. de. (2023). The role of dietary strategies in the modulation of hallmarks of aging. *Ageing Research Reviews*, 101908. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2023.101908>
- Hadidi, M., Motamedzadegan, A., Jelyani, A. Z., & Khashadeh, S. (2021). Nanoencapsulation of hyssop essential oil in chitosan-pea protein isolate nano-complex. *LWT*, 144, 111254. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111254>
- Harrison, S. D., Cusic, A. M., & McAfee, S. M. (1981). Tween 80 increases plasma adriamycin concentrations in mice by an apparent reduction of plasma volume. *European Journal of Cancer*, 17(4), 387–389. [https://doi.org/10.1016/0014-2964\(81\)90246-2](https://doi.org/10.1016/0014-2964(81)90246-2)
- Hayati Zeidanloo, M., Ahmadzadeh Ghavidel, R., Ghiafeh Davoodi, M., & Arianfar, A. (2019). Functional properties of Grass pea protein concentrates prepared using various precipitation methods. *Journal of Food Science and Technology*, 56(11), 4799–4808. <https://doi.org/10.1007/S13197-019-03930-3/TABLES/5>
- Helena de Abreu-Martins, H., Artiga-Artigas, M., Hilsdorf Piccoli, R., Martín-Belloso, O., & Salvia-Trujillo, L. (2020). The lipid type affects the in vitro digestibility and β -carotene bioaccessibility of liquid or solid lipid nanoparticles. *Food Chemistry*, 311. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126024>

- Huck-Iriart, C., Candal, R. J., & Herrera, M. L. (2011). Effect of processing conditions and composition on sodium caseinate emulsions stability. *Procedia Food Science*, 1, 116–122. <https://doi.org/10.1016/J.PROFOO.2011.09.019>
- Hwang, J. Y., Ha, H. K., Lee, M. R., Kim, J. W., Kim, H. J., & Lee, W. J. (2017). Physicochemical Property and Oxidative Stability of Whey Protein Concentrate Multiple Nanoemulsion Containing Fish Oil. *Journal of Food Science*, 82(2), 437–444. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13591>
- Hyun, J., Katz, M. J., Derby, C. A., Roque, N., Muñoz, E., Sliwinski, M. J., Lovasi, G. S., & Lipton, R. B. (2023). Availability of healthy foods, fruit and vegetable consumption, and cognition among urban older adults. *BMC Geriatrics*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/S12877-023-04003-Z>
- Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides*. (n.d.). Retrieved June 8, 2023, from http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000200003
- Jafari, S. M., He, Y., & Bhandari, B. (2007). Optimization of nano-emulsions production by microfluidization. *European Food Research and Technology*, 225(5–6), 733–741. <https://doi.org/10.1007/S00217-006-0476-9>
- Jeffrey Hurst, W. (2002). Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals. *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*, 1–400. <https://doi.org/10.1201/9781420014679/METHODS-ANALYSIS-FUNCTIONAL-FOODS-NUTRACEUTICALS-JEFFREY-HURST>
- Ji, S., Xiong, M., Chen, H., Liu, Y., Zhou, L., Hong, Y., Wang, M., Wang, C., Fu, X., & Sun, X. (2023). Cellular rejuvenation: molecular mechanisms and potential therapeutic interventions for diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41392-023-01343-5>
- Jiménez-Colmenero, F. (2013). Emulsiones múltiples; compuestos bioactivos y alimentos funcionales. *Nutricion Hospitalaria*, 28(5), 1413–1421. <https://doi.org/10.3305/NH.2013.28.5.6673>

- Joyce, P., Whitby, C. P., & Prestidge, C. A. (2016). Nanostructuring Biomaterials with Specific Activities towards Digestive Enzymes for Controlled Gastrointestinal Absorption of Lipophilic Bioactive Molecules. *Advances in Colloid and Interface Science*, 237, 52–75. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2016.10.003>
- Koroleva, M. Y., Yurtov, E. V, Piri, F., Afarani, S., Masoud, A., Tasso, G., Machado, P., Veleirinho, M. B., Aparecida, L., Zyuzina, K. D., Gelman, M. M., Zhdanova, G. O., Kupchinsky, A. B., & Stom, D. I. (2021). IOP Conference Series: Earth and Environmental Science Toxic effects of Tween-80 and its mixtures with oil on oligochaetes You may also like Ostwald ripening in macro-and nanoemulsions Synthesis of copper oxide quantum dots: effect of surface modifiers Formulation and evaluation of anti-MRSA nanoemulsion loaded with Achyrocline satureioides: a new sustainable strategy for the bovine mastitis Toxic effects of Tween-80 and its mixtures with oil on oligochaetes. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci*, 723, 42067. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/723/4/042067>
- Lam, A. C. Y., Can Karaca, A., Tyler, R. T., & Nickerson, M. T. (2016). Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. *Https://Doi.Org/10.1080/87559129.2016.1242135*, 34(2), 126–147. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1242135>
- Lam, R. S. H., & Nickerson, M. T. (2013). Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. *Food Chemistry*, 141(2), 975–984. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.04.038>
- Leong, T. S. H., Wooster, T. J., Kentish, S. E., & Ashokkumar, M. (2009). Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(6), 721–727. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2009.02.008>
- Lim, S. S., Vos, T., Flaxman, A. D., Danaei, G., Shibuya, K., Adair-Rohani, H., Amann, M., Anderson, H. R., Andrews, K. G., Aryee, M., Atkinson, C., Bacchus, L. J., Bahalim, A. N., Balakrishnan, K., Balmes, J., Barker-Collo, S., Baxter, A., Bell, M. L., Blore, J. D., ... Ezzati, M. (2012). A comparative risk

assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380(9859), 2224–2260. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61766-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61766-8)

Lin, Y., McClements, D. J., Xiao, J., Cao, Y., & Liu, X. (2023). In Vitro–In Vivo Study of the Impact of Excipient Emulsions on the Bioavailability and Antioxidant Activity of Flavonoids: Influence of the Carrier Oil Type. *Cite This: J. Agric. Food Chem*, 71, 1488–1498. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c05836>

Liu, K. (1997). *Soybeans*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1763-4>

Liu, W., Wang, J., McClements, D. J., & Zou, L. (2018). Encapsulation of β -carotene-loaded oil droplets in caseinate/alginate microparticles: Enhancement of carotenoid stability and bioaccessibility. *Journal of Functional Foods*, 40, 527–535. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.11.046>

Lopez-Serrano, F., Mendizábal, E., & Ortega-Gudiño, P. (2010). Fennema química de los alimentos. *Manuales Básicos (MANUBAS)*, November, 338. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=403506>

Lu, Z. X., He, J. F., Zhang, Y. C., & Bing, D. J. (2020). Composition, physicochemical properties of pea protein and its application in functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(15), 2593–2605. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1651248>

Mahdi Jafari, S., He, Y., & Bhandari, B. (2007). Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization—A Comparison. *Http://Dx.Doi.Org/10.1080/10942910600596464*, 9(3), 475–485. <https://doi.org/10.1080/10942910600596464>

Mamani, M., Majzoobi, M. M., Ghahfarokhi, S. M., Esna-Ashari, F., & Keramat, F. (2014). Assessment of Health-related Quality of Life among Patients with Tuberculosis in Hamadan, Western Iran. *Oman Medical Journal*, 29(2), 102–105. <https://doi.org/10.5001/OMJ.2014.25>

- Mao, L., & Miao, S. (2015). Structuring Food Emulsions to Improve Nutrient Delivery During Digestion. *Food Engineering Reviews*, 7(4), 439–451. <https://doi.org/10.1007/S12393-015-9108-0>
- McCarthy, N. A., Kennedy, D., Hogan, S. A., Kelly, P. M., Thapa, K., Murphy, K. M., & Fenelon, M. A. (2016). Emulsification properties of pea protein isolate using homogenization, microfluidization and ultrasonication. *Food Research International*, 89, 415–421. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2016.07.024>
- McClements, D. J., & Gumus, C. E. (2016). Natural emulsifiers - Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloid and Interface Science*, 234, 3–26. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2016.03.002>
- McClements, D. J., & Rao, J. (2011). Food-Grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, Biological fate, and Potential Toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 285–330. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.559558>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., MacIerzanka, A., MacKie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Mokni Ghribi, A., Maklouf Gafsi, I., Sila, A., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., Bougatef, A., & Besbes, S. (2015). Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. *Food Chemistry*, 187, 322–330. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.04.109>
- Mun, S., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2007). Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Research International*, 40(6), 770–781. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2007.01.007>

- Pfander, H. (1992). [1] Carotenoids: An overview. *Methods in Enzymology*, 213, 3–13. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(92\)13105-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(92)13105-7)
- Porter, C. J. H., Trevaskis, N. L., & Charman, W. N. (2007). Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 2007 6:3, 6(3), 231–248. <https://doi.org/10.1038/nrd2197>
- Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H., & McClements, D. J. (2012). Nanoemulsion delivery systems: influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility. *Food Chemistry*, 135(3), 1440–1447. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.06.047>
- Qian, C., & McClements, D. J. (2011a). Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1000–1008. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2010.09.017>
- Qian, C., & McClements, D. J. (2011b). Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1000–1008. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2010.09.017>
- Qian, C., & McClements, D. J. (2011c). Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1000–1008. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2010.09.017>
- Quesne, P. W. Le. (1997). *Phytochemistry of Fruit and Vegetables* Edited by F. A. Tomás-Barberán and R. J. Robins. Oxford University Press: New York, 1997. xii + 375 pp. \$140.00. ISBN 0-19-857790-7. *Journal of the American Chemical Society*, 119(48), 11723–11723. <https://doi.org/10.1021/JA975568V>
- Radhika, V., & Rao, V. S. H. (2015). Computational approaches for the classification of seed storage proteins. *Journal of Food Science and Technology*, 52(7), 4246. <https://doi.org/10.1007/S13197-014-1500-X>

- Rajitha, P., Shammika, P., Aiswarya, S., Gopikrishnan, A., Jayakumar, R., & Sabitha, M. (2019). Chaulmoogra oil based methotrexate loaded topical nanoemulsion for the treatment of psoriasis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *49*, 463–476. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2018.12.020>
- Reinkensmeier, A., Bußler, S., Schlüter, O., Rohn, S., & Rawel, H. M. (2015). Characterization of individual proteins in pea protein isolates and air classified samples. *Food Research International*, *76*(P1), 160–167. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.05.009>
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E., & Miller, R. (2009). Lipases at interfaces: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, *147–148*(C), 237–250. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2008.06.001>
- Saini, R. K., Nile, S. H., & Park, S. W. (2015). Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International*, *76*, 735–750. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.07.047>
- Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O., & McClements, D. J. (2013a). Influence of particle size on lipid digestion and β -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chemistry*, *141*(2), 1472–1480. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.03.050>
- Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O., & McClements, D. J. (2013b). Modulating β -carotene bioaccessibility by controlling oil composition and concentration in edible nanoemulsions. *Food Chemistry*, *139*(1–4), 878–884. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.02.024>
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2014). Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against *Escherichia coli* of lemongrass oil-loaded nanoemulsions. *Food Control*, *37*(1), 292–297. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2013.09.015>

- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, *101*(2), 492–501. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2006.02.006>
- Schmid, E. M., Farahnaky, A., Adhikari, B., & Torley, P. J. (2022). High moisture extrusion cooking of meat analogs: A review of mechanisms of protein texturization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *21*(6), 4573–4609. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13030>
- Shevkani, K., Singh, N., Chen, Y., Kaur, A., & Yu, L. (2019). Pulse proteins: secondary structure, functionality and applications. *Journal of Food Science and Technology*, *56*(6). <https://doi.org/10.1007/S13197-019-03723-8>
- Shi, X.-D., Huang, J.-J., Han, J.-Z., & Wang, S.-Y. (2021). Physicochemical and Functional Properties of Starches from *Pachyrhizus erosus* with Low Digestibility. *EFood*, *2*(3), 154–161. <https://doi.org/10.2991/EFOOD.K.210626.001>
- Silletti, E., Vingerhoeds, M. H., Norde, W., & van Aken, G. A. (2007). The role of electrostatics in saliva-induced emulsion flocculation. *Food Hydrocolloids*, *21*(4), 596–606. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2006.07.004>
- Sohan, M. S. R., Elshamy, S., Lara-Valderrama, G., Changwatchai, T., Khadizatul, K., Kobayashi, I., Nakajima, M., & Neves, M. A. (2023). Encapsulation of D-Limonene into O/W Nanoemulsions for Enhanced Stability. *Polymers* *2023*, Vol. 15, Page 471, *15*(2), 471. <https://doi.org/10.3390/POLYM15020471>
- Solans, C., & Solé, I. (2012). Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *17*(5), 246–254. <https://doi.org/10.1016/J.COCIS.2012.07.003>
- Spence, J. T. (2006). Challenges related to the composition of functional foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*(SUPPL.), S4–S6. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2005.11.007>

- Steinmetz, K. A., & Potter, J. D. (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: A review. *Journal of the American Dietetic Association*, 96(10), 1027–1039. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(96\)00273-8](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(96)00273-8)
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., & Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108–109, 303–318. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2003.10.023>
- Tanger, C., Engel, J., & Kulozik, U. (2020). Influence of extraction conditions on the conformational alteration of pea protein extracted from pea flour. *Food Hydrocolloids*, 107. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2020.105949>
- Tulbek, M. C., Lam, R. S. H., Wang, Y. C., Asavajaru, P., & Lam, A. (2017). Pea: A Sustainable Vegetable Protein Crop. *Sustainable Protein Sources*, 145–164. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00009-3>
- van Aken, G. A., Bomhof, E., Zoet, F. D., Verbeek, M., & Oosterveld, A. (2011). Differences in in vitro gastric behaviour between homogenized milk and emulsions stabilised by Tween 80, whey protein, or whey protein and caseinate. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 781–788. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2010.09.016>
- Van Zuylen, L., Karlsson, M. O., Verweij, J., Brouwer, E., De Bruijn, P., Nooter, K., Stoter, G., & Sparreboom, A. (2001). Pharmacokinetic modeling of paclitaxel encapsulation in Cremophor EL micelles. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 47(4), 309–318. <https://doi.org/10.1007/s002800000215>
- Vegas, R., Zavaleta, A., & Vegas, C. (2017). Effect of the pH and sodium chloride on the functional properties of flour of lupinus mutabilis “tarwi” seeds variety criolla. *Agroindustrial Science*, 7(1), 49–55. <https://doi.org/10.17268/agroind.sci.2017.01.05>
- Velázquez-Barrón, M. de los Á., & Fuentes-Dávila, G. (2009). GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE CUATRO VARIEDADES DE TRIGO (*Triticum* spp. L.). in vitro. *Biotecnia*, 11(3), 12–24. <https://doi.org/10.18633/BT.V11I3.70>

- Vitaglione, P., Barone Lumaga, R., Ferracane, R., Sellitto, S., Morelló, J. R., Reguant Miranda, J., Shimoni, E., & Fogliano, V. (2013). Human bioavailability of flavanols and phenolic acids from cocoa-nut creams enriched with free or microencapsulated cocoa polyphenols. *The British Journal of Nutrition*, *109*(10), 1832–1843. <https://doi.org/10.1017/S0007114512003881>
- Walstra, P. (1993). Principles of emulsion formation. *Chemical Engineering Science*, *48*(2), 333–349. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(93\)80021-H](https://doi.org/10.1016/0009-2509(93)80021-H)
- Wang, J. (2020). Exploring cereal functions: A profile of Wang Jing. *Food Frontiers*, *1*(2), 205–207. <https://doi.org/10.1002/FFT2.17>
- Weiszhar, Z., Czucz, J., Révész, C., Rosivall, L., Szébeni, J., & Rozsnyay, Z. (2012). Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, tween-80 and tween-20. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *45*(4), 492–498. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2011.09.016>
- Xu, J., Mukherjee, D., & Chang, S. K. C. (2018). Physicochemical properties and storage stability of soybean protein nanoemulsions prepared by ultra-high pressure homogenization. *Food Chemistry*, *240*, 1005–1013. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.07.077>
- Yang, Y., Fang, Z., Chen, X., Zhang, W., Xie, Y., Chen, Y., Liu, Z., & Yuan, W. (2017). An overview of pickering emulsions: Solid-particle materials, classification, morphology, and applications. *Frontiers in Pharmacology*, *8*(MAY). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2017.00287>
- Yao, M., McClements, D. J., Zhao, F., Craig, R. W., & Xiao, H. (2016). *Controlling the gastrointestinal fate of nutraceutical and pharmaceutical-enriched lipid nanoparticles: From mixed 2 micelles to chylomicrons*. <http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/2>