

**Universitat de Lleida**

**Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agroalimentària  
i Forestal i de Veterinària**

## **TREBALL FINAL DE GRAU**

**Grau en Enginyeria Agrària i Alimentària**

# **FORMACIÓ DE NANOEMULSIONS AMB $\beta$ -CAROTÈ ESTABILITZADES AMB PROTEÏNA DE PATATA**

**Autor: Adrià Safont Serra**

**Tutor: Salvador Garza Garza**  
**Cotutora: Laura Salvia Trujillo**

**Desembre, 2024**

# RESUM DEL TREBALL FINAL DE GRAU

**Autor:** Adrià Safont Serra

**Tutor:** Dr. Salvador Garza Garza

**Cotutora:** Dra. Laura Salvia Trujillo

**Títol:** Formació de nanoemulsions amb  $\beta$ -carotè estabilitzades amb proteïna de patata

**Titulació:** Grau en Enginyeria Agrària i Alimentària (GEAA)

**Especialitat:** Indústries Agràries i Alimentàries

**Centre:** : Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agroalimentària i Forestal i de Veterinària - Universitat de Lleida

**Departament:** Departament de Tecnologia dels Aliments

**Any d'elaboració:** 2024

## RESUM

Aquest treball es centra en la investigació de la formulació de nanoemulsions estabilitzades amb proteïna de patata i enriquides amb  $\beta$ -carotè, amb l'objectiu d'avaluar-ne el comportament en dues línies d'estudi diferenciades. D'una banda, es van comparar dos mètodes d'homogeneïtzació, microfluidització i ultrasons, per determinar les seves diferències en la mida de partícula, distribució i potencial zeta de les emulsions. De l'altra, es va analitzar l'efecte de dues condicions de pH (3 i 7) sobre la formació i estabilitat de les emulsions, considerant que el pH afecta la funcionalitat de la proteïna de patata, especialment en relació amb el seu punt isoelèctric.

Els resultats van evidenciar que la microfluidització és més efectiva que els ultrasons per produir emulsions amb una mida de partícula més petita i una distribució més homogènia. Així mateix, es va observar que les emulsions formades a pH 3 són més estables que les produïdes a pH 7, gràcies a una millor solubilitat i capacitat d'emulsificació de la proteïna en condicions àcides. Aquestes conclusions subratllen el potencial de la proteïna de patata com a emulgent natural per a la formulació de nanoemulsions.

Complementàriament, el treball inclou una anàlisi tècnica i econòmica del procés industrial, en què s'han avaluat equips i costos per escalar la producció de les nanoemulsions. Tot i no ser l'objectiu principal del projecte, aquesta demostració tècnica i econòmica posa les bases per valorar la viabilitat industrial del sistema proposat, destacant la seva aplicació en el desenvolupament de nous aliments funcionals.

## RESUMEN

Este trabajo se centra en la investigación de la formulación de nanoemulsiones estabilizadas con proteína de patata y enriquecidas con  $\beta$ -caroteno, con el objetivo de evaluar su comportamiento en dos líneas de estudio diferenciadas. Por un lado, se compararon dos métodos de homogeneización, microfluidización y ultrasonidos, para determinar sus diferencias en el tamaño de partícula, distribución y potencial zeta de las emulsiones. Por otro lado, se analizó el efecto de dos condiciones de pH (3 y 7) sobre la formación y estabilidad de las emulsiones, considerando que el pH afecta la funcionalidad de la proteína de patata, especialmente en relación con su punto isoeléctrico.

Los resultados evidenciaron que la microfluidización es más efectiva que los ultrasonidos para producir emulsiones con un tamaño de partícula más pequeño y una distribución más homogénea. Asimismo, se observó que las emulsiones formadas a pH 3 son más estables que las producidas a pH 7, gracias a una mejor solubilidad y capacidad de emulsificación de la proteína en condiciones ácidas. Estas conclusiones destacan el potencial de la proteína de patata como emulgente natural para la formulación de nanoemulsiones.

Complementariamente, el trabajo incluye un análisis técnico y económico del proceso industrial, en el que se evaluaron equipos y costos para escalar la producción de las nanoemulsiones. Aunque no es el objetivo principal del proyecto, esta demostración técnica y económica sienta las bases para valorar la viabilidad industrial del sistema propuesto, destacando su aplicación en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales.

## **ABSTRACT**

This project focuses on the investigation of the formulation of nanoemulsions stabilized with potato protein and enriched with  $\beta$ -carotene, aiming to evaluate their behavior in two distinct lines of study. On one hand, two homogenization methods, microfluidization and ultrasonication, were compared to determine their differences in particle size, distribution, and zeta potential of the emulsions. On the other hand, the effect of two pH conditions (3 and 7) on the formation and stability of the emulsions was analyzed, considering that pH affects the functionality of potato protein, particularly concerning its isoelectric point.

The results showed that microfluidization is more effective than ultrasonication in producing emulsions with smaller particle sizes and more homogeneous distributions. Likewise, emulsions formed at pH 3 were observed to be more stable than those produced at pH 7, due to better solubility and emulsifying capacity of the protein under acidic conditions. These conclusions highlight the potential of potato protein as a natural emulsifier for nanoemulsion formulation.

Additionally, the project includes a technical and economic analysis of the industrial process, evaluating the equipment and costs needed to scale up nanoemulsion production. Although not the main objective of the project, this technical and economic demonstration lays the groundwork for assessing the industrial feasibility of the proposed system, emphasizing its application in the development of new functional foods.

# ÍNDIX

1.	INTRODUCCIÓ .....	10
1.1.	$\beta$ -CAROTÈ .....	10
1.2.	NANOEMULSIONS .....	11
1.2.1.	Definició.....	12
1.2.2.	Formació .....	12
1.2.3.	Estabilitat .....	13
1.2.4.	Digestibilitat.....	14
1.3.	PROTEÏNA DE PATATA.....	15
1.3.1.	Estructura .....	17
1.3.1.1.	Propietats àcid-base de les proteïnes i funcionalitat .....	17
1.3.2.	Valor nutricional.....	18
1.3.3.	Propietats funcionals .....	19
2.	OBJECTIUS.....	20
3.	MATERIALS I MÈTODES .....	21
3.1.	MATERIALS .....	21
3.2.	MÈTODES.....	22
3.2.1.	Enriquiment de l'oli .....	22
3.2.2.	Formació de les nanoemulsions .....	23
3.2.3.	Caracterització de les nanoemulsions .....	24
3.2.3.1.	Mida de partícula .....	24
3.2.3.2.	Potencial zeta .....	27
3.2.3.3.	Digestió in vitro .....	27
3.2.4.	Determinació de la bioaccessibilitat del $\beta$ -carotè .....	30
3.2.5.	Microscopia.....	30
3.2.6.	Anàlisi estadístic .....	31
4.	RESULTATS I DISCUSSIÓ .....	32
4.1.	MÈTODE DE FORMACIÓ D'EMULSIONS .....	32
4.1.1.	Mida de partícula .....	32
4.1.2.	Índex de polidispersió .....	36
4.1.3.	Potencial zeta .....	37
4.2.	ESTABILITAT DIGESTIVA DE LES EMULSIONS .....	39
4.2.1.	Mida de partícula .....	39
4.2.2.	Índex de polidispersió .....	43
4.2.3.	Potencial zeta .....	44
4.2.4.	Microscopia.....	46
4.2.5.	Digestibilitat del oli enriquit amb $\beta$ -carotè .....	46

4.2.6.	Bioaccessibilitat del $\beta$ -carotè .....	48
5.	CONCLUSIONS.....	49
6.	DEMOSTRACIÓ TÈCNICA I ECONÒMICA .....	50
6.1.	DESCRIPCIÓ DEL PRODUCTE.....	50
6.2.	TECNOLOGIA I ENGINYERIA DEL PROCÉS PRODUCTIU.....	51
6.2.1.	Descripció del procés .....	51
6.2.2.	Diagrama de flux del procés .....	52
6.2.3.	Equips de producció i auxiliars .....	52
6.2.2.	Càlcul de la superfície.....	56
6.3.	AVALUACIÓ ECONÒMICA.....	58
6.3.1.	Inversió inicial.....	58
6.3.2.	Pagaments ordinaris .....	59
6.3.3.	Cobraments ordinaris .....	60
6.3.4.	Fluxos de caixa.....	61
6.3.5.	Indicadors de rentabilitat.....	62
6.4.	CONCLUSIÓ RENDIBILITAT I VIABILITAT .....	64
7.	BIBLIOGRAFIA .....	65

## ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Estructura química del $\beta$ -carotè.....	11
Figura 2. Càmera d'interacció del microfluidizer. (Font: Laura Salvia) .....	13
Figura 3. Nanoemulsió de oli en aigua (O/W). (Font:(Salvia-Trujillo et al., 2018a)) .....	14
Figura 4. Representació dels possibles canvis en l'estructura de les nanoemulsions durant el pas a través del tacte gastrointestinal.( Font: (Salvia-Trujillo et al., 2018b)) .....	15
Figura 5. Procés d'obtenció de la Solanic 300. (Font: Royal Avebe). .....	22
Figura 6. Microfluidics M110P. (Font: Adrià Safont).....	23
Figura 7. Mastersizer 3000TM Malvern Instruments LTD. (Font: Adrià Safont) .....	25
Figura 8. Zetasizer NanoZS Malver Instruments LTD. (Font. Adrià Safont).....	26
Figura 9. Digestor i pH-stat Device. (Font: Adrià Safont).....	29
Figura 10 .Influència del mètode de formació d'emulsions en la mida mitjana de partícula en A: superfície (D3,2; $\mu\text{m}$ ) i B: volum (D4,3; $\mu\text{m}$ ) de les emulsions oli en aigua estabilitzades amb solucions aquoses de proteïna de patata a pH 3 i pH 7. ....	33
Figura 11.Influència del mètode de formació d'emulsions en la distribució de partícula en A: intensitat (DLS, nm), B: volum (DLS, nm) i C: volum (SLS, $\mu\text{m}$ ) de les emulsions oli en aigua estabilitzades amb proteïna de patata a pH 3 i pH 7. ....	35
Figura 12: Influència del mètode de formació d'emulsions en el índex de Polidispersió de les emulsions oli en aigua estabilitzades amb solucions aquoses de proteïna a pH 3 i pH 7.....	37
Figura 13. Influència del mètode de formació d'emulsions en el potencial zeta de les emulsions oli en aigua estabilitzades amb solucions aquoses de proteïna de patata a pH 3 i pH 7. ....	38
Figura 14. Influència del pH en la mida mitjana de partícula en A: superfície (D3,2; $\mu\text{m}$ ) i B: volum (D4,3; $\mu\text{m}$ ) de les emulsions oli en aigua estabilitzades amb solucions aquoses de proteïna de patata en les fases de digestió. Equip de dispersió de llum estàtica (SLS).....	40
Figura 15.Efecte del pH (pH3 i pH7) en la distribució de partícula en A: intensitat (nm) i B i C: volum (nm i $\mu\text{m}$ ) de les emulsions oli en aigua estabilitzades amb proteïna de patata en les fases de digestió. ....	42
Figura 16. Influència del pH en el índex de Polidispersió de les emulsions oli en aigua estabilitzades amb solucions aquoses de proteïna de patata en les fases de digestió.....	44
Figura 17. Efecte del pH (pH3 i pH7) en el potencial zeta de les emulsions oli en aigua estabilitzades amb solucions aquoses de proteïna de patata en les fases de digestió.....	45
Figura 18. Imatges microscòpiques x20 de les emulsions estabilitzades amb proteïna de patata com a emulgent formades al microfluidizer a pH 3 i pH 7. ....	46
Figura 19. Digestibilitat lipídica expressada com a alliberació d'àcids grassos (AG) lliures (%)	

durant la fase intestinal (min) de les emulsions estabilitzades amb proteïna de patata a pH3 i a pH7.  
.....47

Figura 20. Diagrama de flux del procès productiu.....52



## ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Característiques de la Solanic 200 i Solanic 300. (Font: Royal Avebe).....	21
Taula 2. Característiques tanc de mescla. ....	52
Taula 3. Característiques dispersor en línia. ....	53
Taula 4. Característiques homogeneïtzador d'altres pressions. ....	54
Taula 5. característiques envasadora automàtica. ....	54
Taula 6. Càlcul de superfície d'àrees. ....	57
Taula 7. Cost de la parcel·la i la nau. ....	58
Taula 8. Cost dels equips de la indústria. ....	58
Taula 9. Inversió inicial total.....	58
Taula 10. Pagaments ordinaris de la matèria prima. ....	59
Taula 11. Pagaments ordinaris d'envasos i embalatges. ....	59
Taula 12. Pagaments ordinaris de mà d'obra. ....	59
Taula 13. Pagaments ordinaris de consum d'aigua i energia elèctrica. ....	60
Taula 14. Pagaments ordinaris totals.....	60
Taula 15. Cobraments ordinaris totals.....	61
Taula 16. Fluxos de caixa, flux de caixa actualitzat i flux de caixa actualitzat i acumulat.....	61

# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. $\beta$ -CAROTÈ

Els carotenoides són una família diversa de pigments lipofílics que es troben de manera natural en una varietat de fruites, verdures i altres aliments d'origen vegetal. Aquests compostos són responsables dels colors brillants que van des del groc i el taronja fins al vermell en molts aliments. A més del seu paper en la coloració dels aliments, els carotenoides tenen múltiples beneficis per a la salut humana, principalment a causa de les seves propietats antioxidants i la seva capacitat per actuar com a precursors de la vitamina A (Maiani et al., 2009).

Els carotenoides han estat objecte de nombrosos estudis degut al seu potencial per millorar la salut i prevenir diverses malalties. Alguns dels carotenoides més estudiats inclouen la luteïna, la zeaxantina, el licopè i el  $\beta$ -carotè.

Tenen la capacitat de neutralitzar els radicals lliures al cos, que són molècules inestables que poden causar dany cel·lular i contribuir al desenvolupament de malalties cròniques (Rodríguez-Concepcion et al., 2018).

Diversos estudis han suggerit que una dieta rica en carotenoides està associada amb un menor risc de certs tipus de càncer, com ara el càncer de pulmó, pròstata i pell (Kaulmann & Bohn, 2014). El  $\beta$ -carotè també ha estat objecte de recerca en relació amb la prevenció de malalties cardiovasculars. Estudis han mostrat que el  $\beta$ -carotè pot reduir l'oxidació del colesterol LDL, cosa que podria reduir el risc d'aterosclerosi i malalties cardíques (Palozza et al., 2003).

El  $\beta$ -carotè és probablement el carotenoide més conegut i estudiat a causa de la seva importància com a font dietètica de vitamina A. Aquest compost conté nou dobles enllaços conjugats i conté un grup  $\beta$ -ionona que és el que li proporciona el poder antioxidant que posseeix. Es troba en aliments com pastanagues, batates, espinacs i altres verdures de fulles verdes. El  $\beta$ -carotè és un pigment liposoluble que té la capacitat de ser convertit en retinol (vitamina A) a l'intestí prim després del seu consum, cosa que és essencial per a diverses funcions biològiques com la visió, el creixement cel·lular, la reproducció i la funció immune.

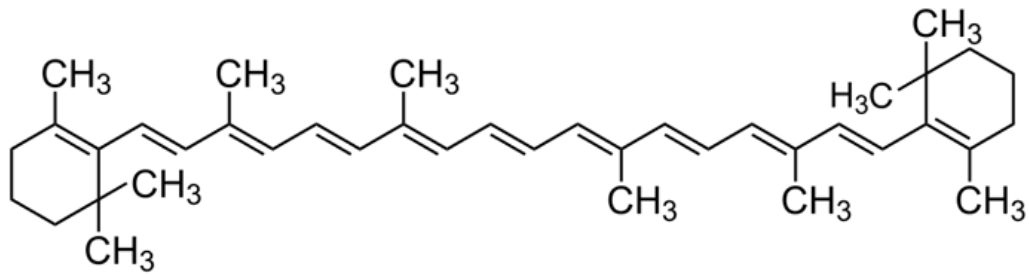


Figura 1. Estructura química del  $\beta$ -carotè.

Els greixos dietètics faciliten l'absorció dels carotenoides, ja que es processen juntament amb els lípids i s'integren en micelles mixtes. Aquestes micelles inclouen fosfolípids, colesterol, àcids grassos lliures i sals biliars, elements que contribueixen a la digestió lipídica. Un cop els carotenoides estan dins les micelles, són absorbits a l'intestí prim mitjançant difusió passiva. Un cop arribats a l'enteròcit, la lipasa allibera aquests compostos bioactius de les micelles, permetent la seva incorporació als quilomicrons, que després els transporten pel sistema limfàtic fins al fetge (Bohn et al., 2017).

Per millorar la incorporació dels carotenoides als aliments, una estratègia efectiva és encapsular-los en petites gotes de lípids dins d'una emulsió oli en aigua, cosa que facilita la seva absorció i estabilitat en el producte final.

## 1.2. NANOEMULSIONS

En l'actualitat, l'ús de nanoemulsions en la indústria alimentària està experimentant un notable creixement. Aquest increment es deu als múltiples avantatges que ofereixen en comparació amb les emulsions tradicionals. Entre els beneficis destacats es troben una major estabilitat a llarg termini, ja que la reduïda mida de les gotes evita la separació de fases i l'oxidació, cosa que allarga la durabilitat dels productes alimentaris. Les nanoemulsions permeten l'encapsulació efectiva de compostos bioactius, preservant les seves propietats i millorant la seva conservació dins dels aliments. A més, ofereixen la capacitat de dirigir l'alliberació dels compostos bioactius a llocs específics dins del sistema digestiu, cosa que potencia l'eficàcia dels nutrients i altres components actius. La mida nanomètrica de les gotes afavoreix una millor absorció dels compostos bioactius, incrementant la seva biodisponibilitat i eficàcia en el cos. Les forces d'atracció entre les gotes disminueixen a mesura que la mida de

les gotes es redueix, reduint així el risc d'agrupament i millorant la seva estabilitat. A més, les nanoemulsions poden millorar les propietats del producte alimentari, com el color, el gust i la textura, facilitant així la seva integració en una gran varietat d'aliments i potenciant el seu atractiu per als consumidors. Aquestes avantatges no només amplien les possibilitats d'ús de les nanoemulsions en la formulació i millora de productes alimentaris, sinó que també contribueixen a una millor qualitat nutricional i sensorial dels aliments.

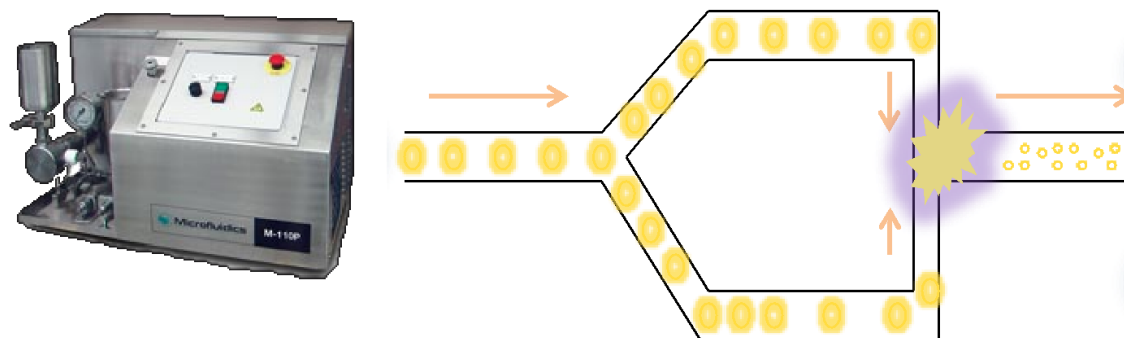
### **1.2.1. Definció**

Les nanoemulsions es defineixen com a emulsions d'oli en aigua amb gotes d'oli amb diàmetres inferiors a 200 nm (McClements, 2011). A causa de la seva mida reduïda de les gotes d'oli, presenten característiques fisicoquímiques úniques. D'una banda, tenen una major estabilitat cinètica que les emulsions convencionals i són òpticament transparents. D'altra banda, a causa de la seva major superfície activa, poden interactuar en major mesura amb superfícies biològiques en comparació amb emulsions amb una mida de gota més gran (Salvia-Trujillo et al., 2017).

### **1.2.2. Formació**

Les nanoemulsions es poden formar mitjançant l'ús de mètodes d'alta o baixa energia. Tanmateix, els mètodes d'alta energia són generalment més utilitzats, ja que han demostrat ser eficaços per reduir la mida de les gotes d'oli en una àmplia gamma de formulacions i es consideren mètodes més fàcils d'escalar a nivell industrial. D'una banda, s'ha informat que els ultrasons produeixen nanoemulsions amb una mida mitjana de gotes d'oli inferior a 100 nm (Ziani et al., 2011). Els principals factors que afecten la fabricació de nanoemulsions mitjançant sonicació són la freqüència, l'amplitud i el temps de tractament, que determinen la intensitat del fenomen de cavitació i, per tant, la disrupció de les gotes (Abbas et al., 2013; Kentish et al., 2008).

D'altra banda, els homogeneïtzadors d'alta pressió, com els homogeneïtzadors de vàlvules o els microfluidificadors, s'utilitzen àmpliament per produir nanoemulsions. En general, com més gran sigui la pressió d'homogeneïtzació i el nombre de cicles, més petita serà la mida de les gotes, formant-se nanoemulsions amb mides de partícula inferiors a 50 nm (Qian & McClements, 2011; Solans et al., 2005).



*Figura 2. Càmera d'interacció del microfluidizer. (Font: Laura Salvia)*

A més del mètode de fabricació i els paràmetres de processament, la formació de nanoemulsions depèn molt del tipus d'oli utilitzat com a transportador d'ingredients actius. S'ha observat que els olis amb triglicèrids de cadena llarga, com molts olis vegetals, produeixen nanoemulsions amb gotes d'oli més grans que els que contenen triglicèrids de cadena mitjana o curta (Wooster et al., 2008). De fet, això s'ha relacionat amb la viscositat de la fase lipídica, ja que els triglicèrids de cadena llarga tenen una viscositat més alta, i això redueix l'eficàcia dels homogeneïtzadors d'alta pressió en la disrupció de les gotes (Qian & McClements, 2011).

### **1.2.3. Estabilitat**

L'estabilitat de les nanoemulsions, i en general de les nanostructures basades en emulsions, està principalment determinada per la presència de molècules actives en superfície. Els tensioactius tenen la capacitat d'adsorbir-se a la interfase oli/aigua, reduint així la tensió interfacial entre ambdós líquids immiscibles, i també ajuden a estabilitzar les gotes recentment formades durant els processos d'emulsificació creant una capa interfacial de molècules adsorbides. En general, els tensioactius són molècules amfifíliques amb regions tant hidrofòbiques com hidrofíliques, que poden adsorbir-se a la interfase oli/aigua. S'ha informat que les nanoemulsions són sistemes cinèticament estables, mantenint la mida de

les gotes i les característiques fisicoquímiques durant l'emmagatzematge a llarg termini (Guerra-Rosas et al., 2016).

A més dels emulsionants, es poden utilitzar estabilitzadors d'emulsions per preservar les propietats de les nanoemulsions al llarg del temps. En aquest sentit, els hidrocol·loides s'utilitzen sovint com a agents espessidors de la fase aquosa, conferint així una alta viscositat a la fase contínua i prevenint la desestabilització de les gotes d'oli retardant el seu moviment (Dickinson, 2009). En aquest sentit, es poden utilitzar diversos hidrocol·loides aptes per a l'ús alimentari, com ara l'alginat, la goma aràbiga, el quitosà, la pectina, entre d'altres.

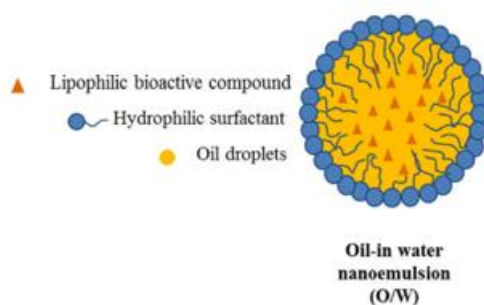


Figura 3. Nanoemulsió de oli en aigua (O/W). (Font:(Salvia-Trujillo et al., 2018a))

#### 1.2.4. Digestibilitat

La digestibilitat de les emulsions i, en general, de les nanostructures basades en emulsions té lloc principalment a l'intestí prim, on les lipases pancreàtiques s'adsorbeixen a la interfase oli/aigua i hidròlisis els triacilglicerols en monoacilglicerols i àcids grassos lliures (McClements, 2018). A causa de la seva petita mida de les gotes d'oli, les nanoemulsions es digereixen potencialment a una velocitat més alta que les emulsions convencionals amb gotes més grans (Salvia-Trujillo et al., 2013; Troncoso et al., 2012). De fet, això s'ha atribuït a l'àrea interfacial més gran exposada per a l'adsorció de les lipases pancreàtiques (Reis et al., 2009). Així mateix, la seva major digestibilitat pot influir en la lliberació dels compostos bioactius lipofílics atrapats dins del nucli lipídic. La cinètica de digestió superior de les gotes d'oli en les nanoemulsions pot provocar una alliberació més ràpida dels compostos bioactius lipofílics. Això, al seu torn, podria resultar en una major bioaccessibilitat a causa de la solubilització dels

compostos bioactius lipofílics en micel·les mixtes formades a partir dels productes de digestió lipídica (Salvia-Trujillo, Verkempinck, et al., 2017). Per tant, les nanoemulsions podrien potencialment millorar el valor nutricional dels compostos bioactius lipofílics.

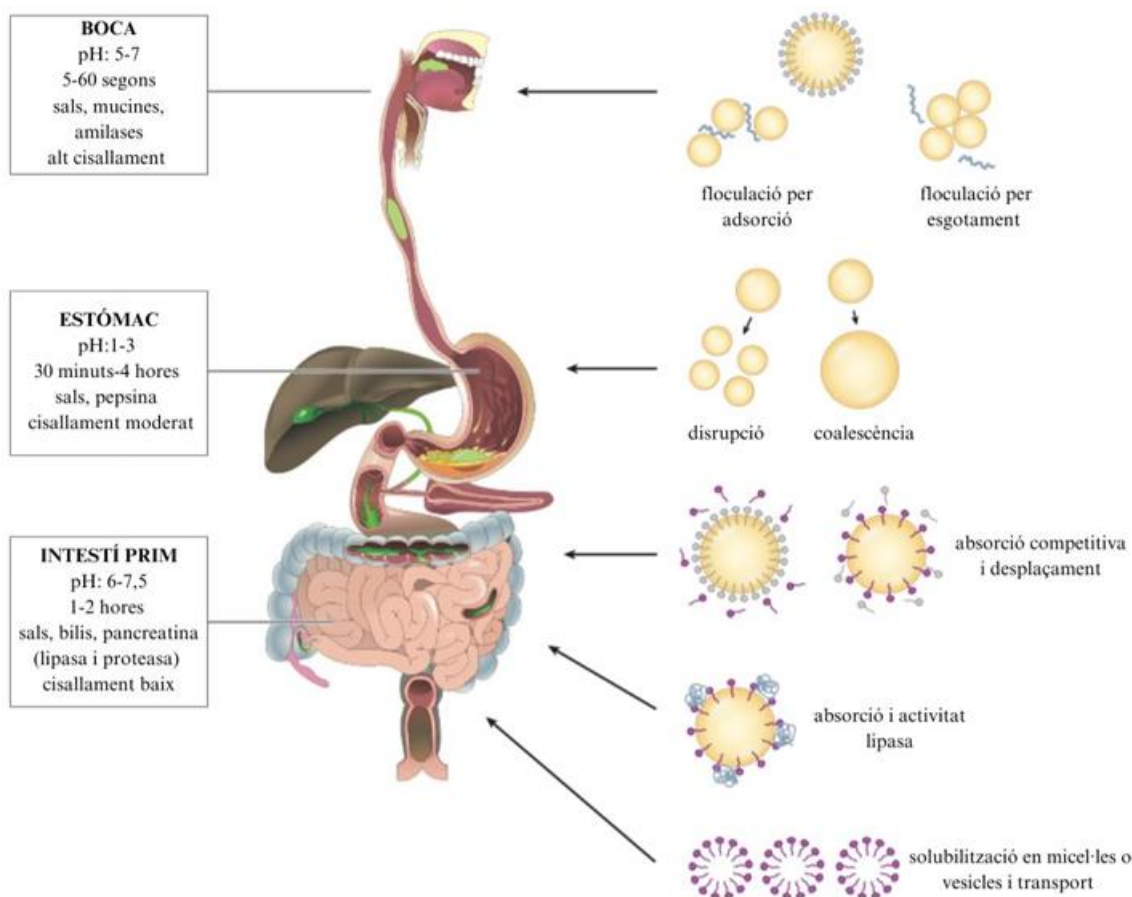


Figura 4. Representació dels possibles canvis en l'estructura de les nanoemulsions durant el pas a través del tracte gastrointestinal. (Font: (Salvia-Trujillo et al., 2018b))

### 1.3. PROTEÏNA DE PATATA

L'aïllament de les proteïnes de la patata s'ha convertit en un tema clau en la indústria alimentària, impulsat per la necessitat de reduir l'impacte ambiental dels subproductes derivats de la processament de la patata. Aquest interès ha crescut especialment per aprofitar els residus rics en nutrients, com el suc de patata, amb l'objectiu de crear fonts de proteïnes sostenibles i eficients. Inicialment derivades de l'aigua del procés de producció de midó, avui en dia s'han desenvolupat tècniques avançades per extreure aquestes proteïnes, destacant-ne el potencial com a emulgents naturals en diverses aplicacions alimentàries.

La investigació ha mostrat l'alt valor nutricional de les fraccions de proteïnes de patata, especialment la patatina, i la seva variabilitat funcional significativa. Tanmateix, la complexa composició química del suc de patata, que inclou carbohidrats no amilacis, polifenols i substàncies tòxiques com els glucoalcaloides, ha fet difícil produir preparacions proteiques pures i digestibles amb característiques funcionals òptimes (Pęksa & Miedzianka, 2021).

Les investigacions recents busquen noves tècniques per obtenir i modificar proteïnes de baix pes molecular, destacant les seves propietats antimicrobianes i usos tecnològics, com ara la filtració en l'elaboració del vi. També hi ha un interès creixent en l'ús de polpa de patata amb sistemes multi-enzimàtics. La Unió Europea processa aproximadament 8 milions de tones de patates anualment, produint unes 6 milions de m<sup>3</sup> de suc de fruita de patata, que conté un 1-2% de proteïna crua (Bártová et al., 2018; Waglay & Karboune, 2017). La separació d'aquestes proteïnes és un repte, però proporciona una proteïna d'alt valor nutricional amb un significatiu valor afegit.

L'ús de proteïnes de patata coagulades tèrmicament en la producció d'aliments és limitat per la seva baixa solubilitat i característiques desfavorables. Malgrat això, la recerca està desenvolupant mètodes més eficients i econòmics per aïllar les principals fraccions proteiques. Això ofereix una gran oportunitat per enriquir aliments processats amb proteïna vegetal, aportant beneficis nutricionals i funcionals (Pęksa et al., 2009.; Waglay & Karboune, 2020).

La proteïna de patata es pot classificar principalment en tres tipus segons la seva solubilitat i propietats:

-Patatina: És la proteïna més abundant de la patata (30-40%). Té una funció d'emmagatzematge i posseeix bones propietats emulsificants i estabilitzants, a més de ser rica en aminoàcids essencials.

-Inhibidors de proteasa: Aquestes proteïnes tenen una funció protectora per la patata, inhibint l'acció d'enzims que degraden les proteïnes. També tenen aplicacions en la indústria per la seva capacitat de bloquejar enzims en productes alimentaris.



-Proteïnes de baix pes molecular: Com les solanines i xantofil·les, que tot i estar en menor quantitat, poden tenir un impacte en la funcionalitat de les emulsions, especialment pel seu paper en la interacció amb lípids.

### **1.3.1. Estructura**

La majoria de les proteïnes de patata són fraccions d'albumina i globulina, solubles en aigua i en solucions de sal, respectivament, conegudes com a glicoproteïnes patatines, amb un pI entre 4.8 i 5.2 (Straetkvern & Lokra, 2009). Les proteïnes globulars representen del 75 al 85% de les fraccions proteiques solubles de les patates, mentre que al voltant del 25% són proteïnes insolubles que formen les parets cel·lulars de la patata. A més, el suc de patata conté petites quantitats de proteïnes glutelíniques (aproximadament el 9%) solubles en àlcali diluït i prolamines (2-4%) solubles en alcohol aquós.

Les fraccions proteiques del suc de patata es poden classificar en tres grups segons el pes molecular: (1) patatines (40-45 kDa), (2) proteïnes solubles en àcid (16-25 kDa), i (3) proteïnes de pes alt (més de 87 kDa) (Van Koningsveld et al., 2006).

Les fraccions de proteïnes de patata mostren diferències notables en valor nutricional i propietats funcionals i activitat biològica, fent preferible separar les fraccions de patatina i inhibidors de proteases (Ralet & Guéguen, 2000).

#### **1.3.1.1. Propietats àcid-base de les proteïnes i funcionalitat**

El pH té un paper crucial en l'estructura molecular de les proteïnes i afecta directament la seva capacitat per estabilitzar emulsions, incloent nanoemulsions. Aquest efecte es pot entendre a través de diversos factors:

1. **Càrrega neta i punt isoelèctric (pI):** Cada proteïna té un punt isoelèctric, el pH en el qual té una càrrega neta nul·la. Quan el pH està per sobre del pI, la proteïna adquireix una càrrega negativa, i per sota del pI, una càrrega positiva. A prop del pI, la proteïna té poca càrrega neta, fet que pot afavorir l'agregació i disminuir la seva solubilitat, comprometent la seva capacitat per estabilitzar les emulsions (McClements, 2004). Això pot provocar coalescència, ja que la proteïna no pot generar suficient repulsió entre les gotes d'oli.

2. **Desnaturalització i canvi conformacional:** En condicions de pH molt àcid o bàsic, les proteïnes es poden desnaturalitzar, alterant la seva estructura tridimensional i reduint la seva capacitat per adsorbir-se a la interfase oli-aigua. Aquesta desnaturalització afecta la seva funció emulsificadora, ja que les proteïnes necessiten mantenir la seva estructura parcialment desplegada per envoltar i estabilitzar adequadament les gotes d'oli (Khan et al., 2015).
3. **Solubilitat:** La solubilitat de les proteïnes també es veu influenciada pel pH. Quan el pH està a prop del punt isoelèctric, la proteïna tendeix a ser menys soluble i, per tant, és més probable que s'agregui o precipiti, disminuint així la seva capacitat d'estabilitzar les emulsions (Walstra, 2003). Lluny del pI, la proteïna és més soluble, cosa que afavoreix la seva capacitat emulsificant i la formació de nanoemulsions més estables.
4. **Repulsió electrostàtica:** A pH lluny del pI, les proteïnes tenen una càrrega neta elevada, la qual cosa genera repulsió electrostàtica entre les gotes d'oli, prevenint la seva coalescència. Aquesta repulsió és essencial per mantenir la estabilitat de les nanoemulsions, especialment quan les gotes són molt petites (Dickinson, 2011). Així, les proteïnes poden formar una barrera interfacial més efectiva, reduint el risc d'agregació i augmentant la vida útil de l'emulsió.

### 1.3.2. Valor nutricional

Les proteïnes de patata tenen un alt valor nutricional comparable al de les proteïnes animals i superen moltes vegetals. Tot i això, són poc utilitzades en alimentació per limitacions tecnològiques i econòmiques. Els avenços en els mètodes d'aïllament i purificació de proteïnes podrien impulsar el desenvolupament de preparacions alimentàries amb alt potencial nutricional i tecnològic.

El valor nutricional de les proteïnes es determina pel contingut d'aminoàcids, les seves proporcions i la digestibilitat. Les patates contenen aminoàcids essencials i lliures que milloren el seu valor nutricional (Peksa et al., 2018). La varietat i les condicions d'emmagatzematge influeixen en el contingut proteic i d'aminoàcids (Peksa et al., 2021). Les proteïnes de patata són riques en lisina, comparable a les proteïnes d'ou, i podrien ser un additiu alimentari valuós.

### **1.3.3. Propietats funcionals**

Les propietats funcionals de les proteïnes depenen de factors com la hidrofobicitat, la presència de enllaços creuats, l'estructura espacial (secundària, terciària i quaternària) i la flexibilitat/rigidesa molecular [(Straetkvern & Lokra, 2009)b.

Com que les al·lèrgies a les proteïnes de patata són molt menys comunes, podrien substituir les proteïnes tradicionals com les de blat, soja, ou, peix o llet, que tenen una al·lergenicitat altament comprovada (Straetkvern & Lokra, 2009)c.

A causa de la baixa temperatura de desnaturalització de les proteïnes patatines (50–55 °C), el procés d'aïllament afecta com es desenvolupen aquestes propietats . Així, per mantenir les propietats funcionals positives de les patatines, és crucial utilitzar condicions de temperatura suaus durant l'obtenció. Segons Van Koningsveld et al., 2001, les proteïnes inhibidores de proteases tenen una activitat relativament inferior en la formació i estabilització d'escumes i emulsions comparades amb les patatines, degut a la seva major temperatura de desnaturalització, que varia entre 55–70 °C

Les proteïnes de patata poden tenir beneficis més enllà de l'alimentació, com efectes antimicrobians, antitumorals, antioxidants i antiradicals (Waglay et al., 2014).

## 2. OBJECTIUS

### **Objectiu general:**

Estudiar el potencial de proteïnes extretes de patata per formular i estabilitzar nanoemulsions amb oli de gira-sol enriquit amb  $\beta$ -carotè com a sistemes d'alliberament de compostos bioactius en aliments.

### **Objectius específics:**

- Comparar l'eficiència de diversos equips d'homogenització (ultrasons versus homogenització per alta pressió) per a la formació d'emulsions oli-en-aigua estabilitzades amb proteïnes patata.
- Formar nanoemulsions utilitzant proteïnes de patata com a emulgent en dues condicions de pH (pH 3 i pH 7).
- Caracteritzar les emulsions oli-en-aigua estabilitzades amb proteïnes de patata.
- Estudiar la digestibilitat lipídica in vitro d'emulsions oli-en-aigua estabilitzades amb proteïnes de patata.
- Estudiar la bioaccessibilitat del  $\beta$ -carotè encapsulat en les nanoemulsions al final de la digestió in vitro.
- Elegir equips industrials per fer el procés de formació de nanoemulsions a la indústria alimentària. Calcular la seva capacitat, producció i cost.



### 3. MATERIALS I MÈTODES

#### 3.1. MATERIALS

Per a la formulació de les emulsions es va utilitzar una fase lipídica (oli enriquit en  $\beta$ -carotè) i una fase aquosa (aigua milli-Q i proteïna de patata).

- *Oli enriquit en  $\beta$ -carotè*: l'oli elegit per realitzar la part experimental d'aquest treball és l'oli de gira-sol provinent de Borges Agricultural & Industrial Edible Oils, S.A.U. (Tàrrrega, Espanya), utilitzat com a fase lipídica per formar totes les nanoemulsions enriquit amb  $\beta$ -carotè pur al 0,1% procedent de Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanya).
- *Aigua Milli-Q*: totes les solucions es van preparar amb aigua milli-Q amb una resistivitat de 18,2 M $\Omega$ .cm a 25°C (aparell Milli-Q, Millipore, Bedford, Regne Unit).
- *Proteïna*: es va fer ús de proteïna de patata, en concret la Solanic 300, provinent de l'empresa Royal Avebe (Veendam, Països Baixos).

Taula 1. Característiques de la Solanic 200 i Solanic 300. (Font: Royal Avebe)

Solanic® Fractions Protein Isolates	 Solanic® 200 High MW >35 KDa	Solanic® 300 > 4 Low MW < 35 kDa 
Solubility 100% (g/l)	> 200 @ pH>6.5	> 250 @ pH<4.5
Protein content (% on dry matter)	> 92	> 95
Colour	beige	off-white
Salt level	low	low
Unique characteristics Separated by Iso-Electric Point (pI)	pI 3.5 – 5.5 - charged lipophilic	pI >6 – > 8 + charged
Gelling @ pH 4   pH 7	>55°C (compare egg white) --   ++	Ionic gel >80°C (+0.5% salt) +   -
Foaming	++	+++
Emulsifying	+++	+++
Water binding	++	+

La Solanic 300 és una millor opció per a nanoemulsions en comparació amb la Solanic 200 i altres proteïnes, el seu major contingut proteic (>95%) garanteix una emulsificació més eficient i estable. El seu punt isoelèctric (pI 6-8) la fa més adequada per treballar en un ampli rang de pH, especialment en condicions àcides o neutres, millorant l'estabilitat en les teves mostres a pH 3 i pH 7. A més, la seva fracció significativa de proteïnes de baix pes molecular (<35 kDa) permet la formació d'una capa més compacta i flexible al voltant de les gotes d'oli, cosa essencial per evitar la coalescència

i mantenir la nanoemulsió estable. Tot i que la Solanic 300 té menys capacitat de retenció d'aigua, la seva major capacitat espumant pot fins i tot ajudar a una millor dispersió de les fases.

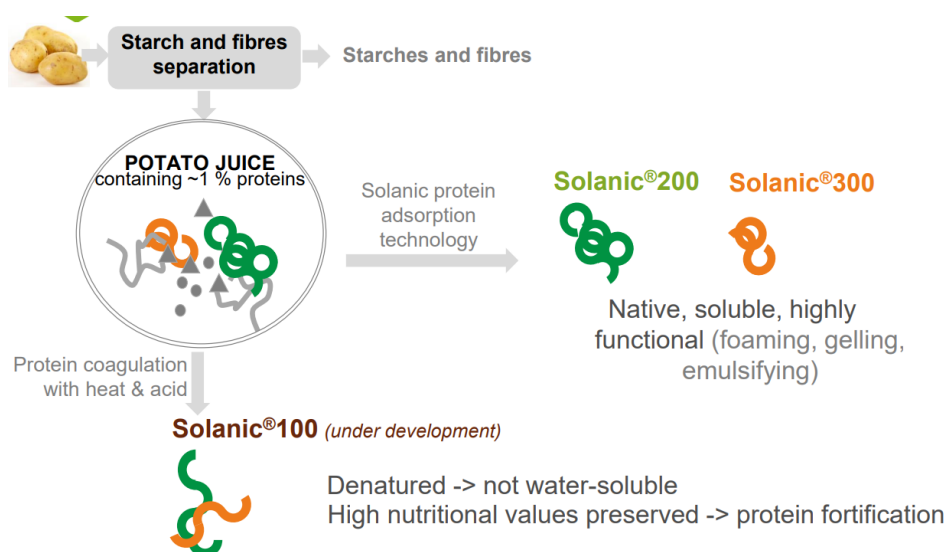


Figura 5. Procés d'obtenció de la Solanic 300. (Font: Royal Avebe).

Per portar a cap la digestió in vitro es va fer ús de pepsina (P7012) procedent de mucosa gàstrica porcina, enzim pancreatina (P7545) procedent de pàncrees porcí i bilis bovina (B3883), totes elles procedents de Sigma-Aldrich Co (St. Louis, USA). També es va fer ús de clorur càlcic ( $\text{CaCl}_2$ ), hidròxid de sodi ( $\text{NaOH}$ ), àcid clorhídric ( $\text{HCl}$ ), sals boca, sals gàstriques i sals intestinals.

## 3.2. MÈTODES

### 3.2.1. Enriquiment de l'oli

Es va utilitzar un oli de gira-sol del qual es van agafar 150 ml. Per a enriquir aquest oli, en els 150 ml s'hi van afegir 150 mg de  $\beta$ -carotè en pols, pesat en una balança de precisió, i es van barrejar en un vas de precipitats. Aquest es va tancar amb paper d'alumini per evitar possibles alteracions provocades per la llum. L'oli enriquit es va sonicar durant 5 minuts. Seguidament, la mostra es va posar a agitar a 50 °C durant 10 minuts. Es va repetir el procediment fins assegurar la completa solubilització del  $\beta$ -carotè, es va repetir el procés 8 vegades.

### 3.2.2. Formació de les nanoemulsions

Es van fer un total de dos nanoemulsions, una primera a pH 3 i una segona a pH 7, amb dues repeticions per cada pH.

Per fer les nanoemulsions, primer, dos dies abans, es va preparar en un vas de precipitats 1,76 gr de proteïna de patata P300 en 93,24 mL d'H<sub>2</sub>O, enrasat amb proveta de 100 ml de vidre. Es va deixar agitant 3-4 hores i posteriorment es va canviar el pH amb l'addició de NaCl i HCl tant 0,1M com 1M, fins obtenir el pH desitjat de pH 3 o pH 7.

Al cap de dos dies es va afegir 5 grams de oli enriquit amb  $\beta$ -carotè i es va fer una pre-emulsió amb l'ultra-turrax (màquina de dispersió) a 12000 rpm durant 2 minuts.

Per a obtenir les nanoemulsions, un cop feta la pre-emulsió, es va fer ús d'un microfluiditzador (M110P, Microfluidics, Massachusetts, USA) d'altres pressions (100-150MPa). Aquest aparell bombeja l'emulsió cap a l'interior on es troba amb un pistó que sotmet l'emulsió a pressions i velocitats elevades, provocant forces de cisallament que disminueixen la mida de les partícules. Dins d'aquesta càmera hi ha uns microcanals de geometria fixa a través dels quals la corrent del fluid circula a grans velocitats. Al sortir d'aquesta càmera, el fluid és dirigit a una bobina externa en forma d'espiral que fa que disminueixi la temperatura de l'emulsió quan passa a través d'aquesta procurant que el fluid mantingui un temperatura igual o inferior als 20 °C, això es produeix gràcies a que aquesta espiral es troba envoltada de gel.

Per obtenir les nanoemulsions desitjades es va passar la emulsió 3 vegades per l'equip.



*Figura 6. Microfluidics M110P. (Font: Adrià Safont)*

També es van fer dos nanoemulsions amb ultrasons (una a pH 3 i l'altra a pH 7) amb dues repeticions per cada pH, per tal de poder fer la comparació amb el microfluidizer.

La preparació i la pre-emulsió es van fer exactament igual que el microfluidizer.

Es va fer ús d'un processador ultrasònic UP400S (Hielscher, Teltow, Alemanya). Aquest equip genera ones ultrasòniques que converteix l'energia elèctrica en vibracions mecàniques d'alta freqüència. Aquestes vibracions es transmeten al sonotrodo, que entra en contacte directe amb la mostra. Les ones ultrasòniques generen bombolles de buit en el líquid que col·lapsen violentament, alliberant grans quantitats d'energia. Aquest fenomen produeix forces de cisallament localitzades que són capaces de crear emulsions de mida nanomètrica. L'ús de l'equip es va fer amb una amplitud del 40% (major amplitud, major intensitat) i durant un temps de l'equip en funcionament d'un total de 3 minuts. El que es va fer per tal de no sobreescalfar la mostra, va ser, 15 segons de l'equip en funcionament i un minut en pausa, controlats per un temporitzador.

### **3.2.3. Caracterització de les nanoemulsions**

Després de preparar les nanoemulsions inicials, es van avaluar diverses propietats d'aquestes, amb la finalitat d'obtenir dades inicials que es poguessin comparar amb les dades obtingudes en les fases gàstrica i intestinal posteriors. Aquest procediment va oferir informació clau per entendre com les diferents fases afecten el comportament de les nanoemulsions segons el tipus de pH emprat.

#### **3.2.3.1. Mida de partícula**

La determinació de mida de partícules de les nanoemulsions es va mesurar fent ús de l'equip Zetasizer NanoZS Malvern Instruments LTD (Worcestershire, Regne Unit) i amb l'equip Mastersizer 3000TM Malvern Instruments LTD (Worcestershire, Regne Unit).

Les mesures es van dur a terme per duplicat en cada equip. Els resultats del Zetasizer van ser en nanòmetres (nm) i els del Mastersizer en micròmetres ( $\mu\text{m}$ ). Es va realitzar la caracterització amb els dos equips, degut a que les partícules de les emulsions varien molt de tamany segons la fase i molts cops es troben entre el límit de mida nanomètrica i micromètrica. Per tant, per tal de poder caracteritzar tot l'ombrall de tamany de partícula, és va mesurar les nanoemulsions amb els dos equips.



La mida i la distribució de la mida de les partícules es van mesurar en el Mastersizer va ser mitjançant la dispersió de la llum estàtica (SLS). Les mostres es van dispersar en aigua destil·lada a 1000 rpm i la mida mitjana de les partícules i la distribució de mida es van informar com a mitjana ponderada en superfície ( $D[3;2]$ ), en mitjana ponderada en volum ( $D[4;3]$ ) i volum (%), respectivament.

Mida en superfície ( $D3,2$ ): Aquesta mesura es basa en el diàmetre mitjà ponderat per la superfície de les partícules. És útil per descriure l'efecte de la mida de les partícules en les propietats superficials, com la superfície d'interacció entre les partícules i el medi. En emulsions, una mida de partícula més petita es tradueix en una major àrea superficial, la qual cosa és important per la seva estabilitat i la capacitat de dispersió.

Mida en volum ( $D4,3$ ): Aquesta mesura pondera la mida de les partícules en funció del seu volum, tenint en compte les partícules més grans de manera més significativa que les petites. La mida en volum és rellevant quan es vol entendre l'impacte de la mida de partícula en el volum total de l'emulsió.

Els índexs de refracció de l'oli de gira-sol i l'aigua destil·lada van ser 1,47 i 1,33 respectivament.



Figura 7. Mastersizer 3000TM Malvern Instruments LTD. (Font: Adrià Safont)

La tècnica del Zetasizer és de dispersió de llum dinàmica (DLS). És una tècnica de mesura establerta i precisa per caracteritzar la mida de partícules en suspensions i emulsions. Es basa en el moviment brownià de les partícules, que estableix que les partícules més petites es mouen més ràpidament, mentre que les més grans es mouen més lentament en un líquid. La llum dispersada per les partícules conté informació sobre la velocitat de difusió i, per tant, sobre la distribució de la mida.

En el cas del Zetasizer sempre es va preparar la mostra. Es va diluir l'emulsió 1/100, es va pipetejar 50  $\mu\text{L}$  de la mostra amb una pipeta de precisió i es va diluir amb 5 ml d'aigua Milli-Q mesurats també amb una pipeta de precisió. Posteriorment es va canviar al pH corresponent. Les dilucions preparades van servir per la caracterització de la mida de la partícula i pel potencial zeta. Per la mida de partícula s'introduïen dins de l'equip per fer les lectures mitjançant cubetes de plàstic.



*Figura 8. Zetasizer NanoZS Malver Instruments LTD. (Font. Adrià Safont)*

### **3.2.3.2. Potencial zeta**

El potencial zeta es va determinar a través de la mobilitat electroforètica de les gotes presents a l'emulsió. Aquesta mesura es va obtenir per mitjà de la dispersió de la llum utilitzant l'instrument Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Regne Unit). El funcionament es basa en l'anàlisi de la càrrega superficial de les petites gotes disperses dins l'emulsió. Quan la càrrega és suficientment alta o baixa ( $< -30$  mV o  $> 30$  mV) per garantir que les forces de repulsió entre les gotes dominin, l'emulsió es manté estable, sense que es produeixi la coalescència.

El càlcul del potencial  $\zeta$  es va realitzar amb cel·les capil·lars DTS1070, on es va introduir la mostra dissolta dins l'equip ZetaPotential. La tècnica aplicada és la microelectroforesi làser Doppler, en què un camp elèctric provoca el moviment de les partícules a una velocitat específica, la qual es correlaciona amb el seu potencial. La velocitat es determina utilitzant la tècnica M3-PALS (dispersió de llum per anàlisi de fase), cosa que permet calcular la mobilitat electroforètica i obtenir així el valor del potencial  $\zeta$ , expressat en mil·livolts (mV).

### **3.2.3.3. Digestió in vitro**

Les digestions gastrointestinals in vitro es van realitzar seguint el protocol estàtic INFOGEST (Brodkorb et al., 2019). Destacar que aquesta, només es va fer en les emulsions formades amb el microlfluiditzador.

Es va preparar les solucions mare d'electròlits dels fluids de digestió (concentrades 1,25x), incloent el fluid electrolític simulat de saliva (eSSF: KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, HCl), el fluid electrolític simulat gàstric (eSGF: KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, NaCl, MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) i el fluid electrolític simulat intestinal (eSIF: KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>) es van preparar segons Brodkorb et al. (2019), ajustats a un pH de 7 (oral), pH 3 (gàstric), pH 7 (intestinal) i emmagatzemats a  $-20$  °C.

Per dur a terme la digestió in vitro completa (boca, estómac, intestí) es va deixar pesades, amb una balança de precisió, la pepsina i la bilis per a totes les repeticions.

Abans d'iniciar la preparació de la fase oral, es va deixar la solució de pepsina preparada, als

30 mg de pepsina que ja es tenien pesats, s'hi van afegir 0,915 ml d'aigua Milli-Q i es va deixar agitant.

Per la fase oral en un vas de precipitats de 50 mL (tapat amb paper Albal) es va afegir 5 mL de la emulsió inicial, 4 mL de SSF, 25 µL de 0,3M CaCl<sub>2</sub> i 0,975 mL d'aigua Milli-Q. Es va posar a l'orbital shaker i es va deixar agitar a 100 rpm i 37°C durant 2 min. Es va treure el vas de precipitats del orbital i es va pipetejar 1 mL de la fase oral i es va col·locar en un eppendorf.

Per la fase gàstrica al vas de precipitats s'hi va afegir 7,2 mL de SGF, 4,5 µL de 0,3M CaCl<sub>2</sub>, 20 µL de HCl 1M en les mostres que eren de pH3 i 60 µL de HCl 1M en les mostres que eren de pH7, per tal de estar en pH3. Es va afegir l'aigua Milli-Q (mL) segons els volum d'acid clorhídric segons la fórmula (1,346-volum HCl) i finalment es va afegir 0,450 mL de la solució de pepsina preparada anteriorment. Es va introduir el vas de precipitats tapat de paper d'Albal al agitador orbital i es va deixar agitar a 100 rpm durant 65 minuts.

Quan va quedar 30 minuts per començar la fase intestinal es va preparar la solució de bilis, dels 300 mg que es tenien pesats s'hi va afegir 3,188 mL de SIF i es va deixar agitant. Quan va quedar 15 minuts per l'inici de la fase intestinal, es va preparar la solució de pancreatina. Es van pesar 700 mg de pancreatina en una balança de precisió i es va afegir 4,743 mL de SIF.

Durant aquests 65 minuts, es va guardar 8 mL de mostra inicial per posteriorment poder calcular la bioaccessibilitat, es va caracteritzar la mostra inicial, es va encendre el PH-stat, es va calibrar el pH, es va buidar l'aigua del dosificador i es va omplir amb NaOH 0,1M.

Un cop finalitzada la fase gàstrica es va pipetejar 1 mL d'aquesta i es va afegir en un eppendorf per a caracteritzar.

Per preparar la fase intestinal es va afegir al vas de precipitats 7,225 mL de SIF, 34 µL de 0,3M CaCl<sub>2</sub> i 2,125 mL de la solució biliar. Es va posar el vas de precipitats al bany i es va introduir l'agitador i la sonda de pH dins. Es va afegir 90 µL de NaOH 1 M per ajustar el pH al (pH-stat Device, Metrohm USA, Riverview, FL) a 7,025. Es va iniciar la digestió i durant els 5 segons que et dona l'equip de marge, es va afegir 4,250 mL de la solució de pancreatina.

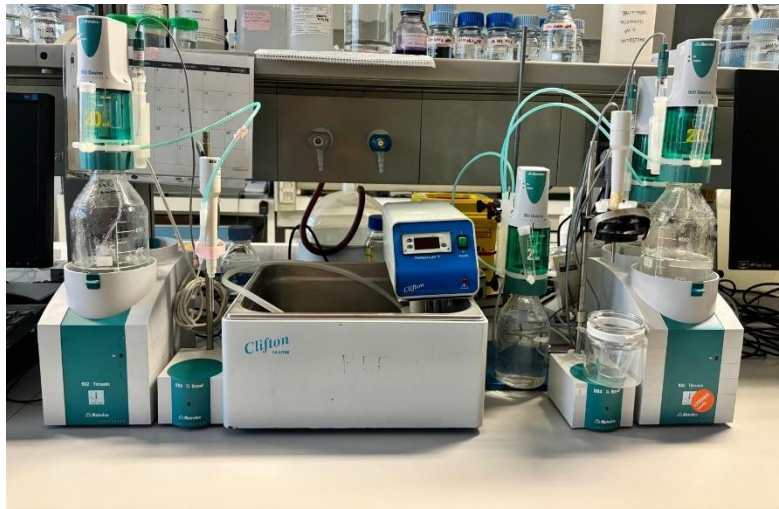


Figura 9. Digestor i pH-stat Device. (Font: Adrià Safont)

Durant els 120 minuts que va durar aquest procés es va caracteritzar la fase gàstrica.

Un cop passats els 120 minuts es va caracteritzar la fase intestinal i es va guardar 8 mL d'aquesta fase per congelar conjuntament amb els de la fase inicial i poder calcular la bioaccessibilitat del  $\beta$ -carotè.

També es va guardar el volum de NaOH 0,1M que l'aparell havia utilitzat per neutralitzar l'acidesa produïda pels àcids grassos lliures, alliberats durant la digestió per l'acció de la lipasa. Posteriorment es va calcular el percentatge d'àcids grassos alliberats durant el procés de digestió. Suposant que cada molècula de triglicèrid genera dos molècules d'àcids grassos lliures completament digerits, se'n determinà la quantitat a partir de la equació següent:

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

On  $V_{NaOH}$  és el volum de dissolució de NaOH necessari per neutralitzar els AGL produïts durant el procés de digestió,  $C_{NaOH}$  és la molaritat de la dissolució de NaOH utilitzada per valorar la mostra,  $M_{oli}$  és el pes molecular de l'oli (g/mol), i  $m_{oli}$  correspon al pes total de l'oli que es troba inicialment en la cèl·lula d'incubació. El pes molecular de l'oli de gira-sol es va considerar de 872,94 g/mol.

### **3.2.4. Determinació de la bioaccessibilitat del $\beta$ -carotè**

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 87 RAD/min amb una força centrífuga relativa (RCF) de 30.120 durant 30 minuts a temperatura de 8 °C. El sobrenedant, sent la fracció aquosa que contenia les micelles mixtes on es trobava el  $\beta$ -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  $\beta$ -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 a 1.800 rpm. Posteriorment, es va recollir la fase superior d'hexà, que contenia el  $\beta$ -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  $\beta$ -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.

### **3.2.5. Microscopia**

Imatges de microscòpia confocal d'emulsions O/W estabilitzades amb la fracció de proteïna de patata de baix pes molecular a pH 3 o 7. Es va utilitzar una solució mare de Nile Red (1 mg/mL en etanol) per tenyir el lípid i l'isòmer I d'isotiocianat de fluoresceïna (FitC) (1 mg/mL en dimetilsulfoxid) per tenyir la proteïna. Es van barrejar 80  $\mu$ L de l'emulsió O/W (1/10 en aigua Milli-Q) amb 10  $\mu$ L de Nile Red o FitC i es va excitar a una longitud d'ona de 488 nm. Els filtres d'emissió es van establir a 555–620 nm per a Nile Red i 493–634 nm per a FitC. Es va utilitzar un microscopi confocal invertit Zeiss LSM 880 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Alemanya) amb una lent de 20 $\times$  i el diàmetre del pinhole mantingut a 1 Unitat Airy per filtrar la majoria de la llum dispersa, capturant les imatges confocals. Totes les imatges es van processar utilitzant el programari de l'instrument Zen.

### **3.2.6. Anàlisi estadístic**

Tots els experiments es van assajar per duplicat i les dades es van expressar com la mitjana amb desviació estàndard. Es va realitzar una anàlisi de variància i es va aplicar la prova HSD de Tukey per determinar diferències significatives a un nivell de significació del 5% ( $p < 0,05$ ) amb el programari estadístic JMP Pro 18 (SAS Institute Inc.).

## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 4.1. MÈTODE DE FORMACIÓ D'EMULSIONS

#### 4.1.1. Mida de partícula

El mètode de formació de les nanoemulsions, essent microfluidització o ultrasons, va determinar significativament la mida de partícula (Figura 10A). En general, les nanoemulsions formades mitjançant microfluidització van presentar una mida de partícula més petita que les formades mitjançant ultrasons. En aquest sentit, les formades amb microfluidització a pH 3 van presentar una mida de partícula de  $0,37 \pm 0,01 \mu\text{m}$  mentre que les formades amb ultrasons va ser de  $0,59 \pm 0,04 \mu\text{m}$ . Aquest fet pot ser atribuït a la capacitat del microfluidizer per generar forces de cisallament més grans i millorar la fragmentació de les gotes d'oli (Jafari et al., 2008)a.

Quant a la influència del pH, les dades van indicar que a pH 7 el tamany de partícula de les emulsions amb proteïna de patata com a emulgent és generalment menor en comparació amb pH 3 per a ambdós equips. Aquesta disminució del tamany de les partícules de les emulsions a pH 3 podria estar relacionada amb l'estabilització de la interfase oli-aigua per la proteïna de patata, que presenta una millor solubilitat i capacitat d'emulsificació a aquest tenint en compte el seu pl de 6-8.

Amb el comportament que es va observar en la tècnica de SLS segons volum (Figura 10B), per exemple a pH 7, amb valors de mida mitjana de partícula de les emulsions amb l'ultrasons de  $30,72 \pm 0,77 \mu\text{m}$  i amb microfluiditzador amb valors de  $13,89 \pm 7,64 \mu\text{m}$ , es va poder veure que amb ultrasons hi havia més partícules de mida mitjana més grans que en les emulsions formades amb microfluiditzador, quelcom que podria indicar una major variabilitat. A més segons (Sidhu et al., 2007) els ultrasons, que generen ones de cavitació acústica, poden ser menys eficients en la ruptura de les gotes d'oli en emulsions a escala submicromètrica, mentre que el microfluiditzador aplica forces mecàniques d'alta pressió que faciliten la formació de partícules més petites i més homogènies.



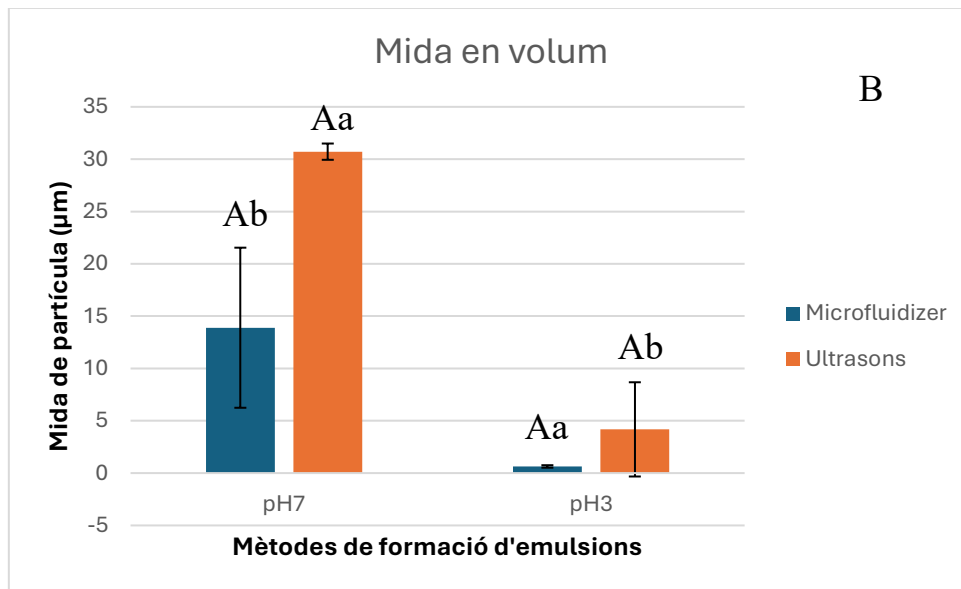
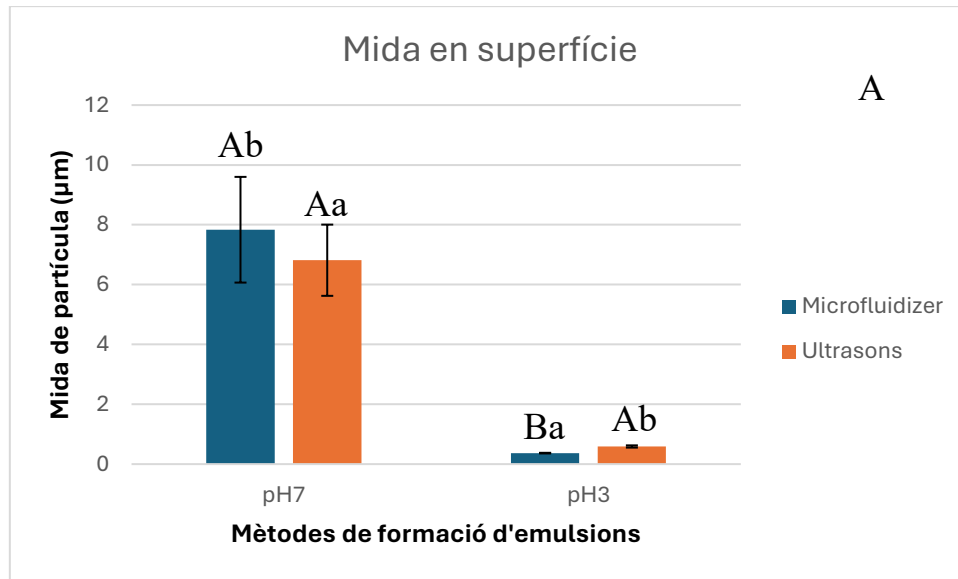


Figura 10 .Influència del mètode de formació d'emulsions en la mida mitjana de partícula en A: superfície (D3,2; µm) i B: volum (D4,3; µm) de les emulsions oli en aigua estabilitzades amb solucions aquoses de proteïna de patata a pH 3 i pH 7. Equip de dispersió de llum estàtica (SLS). Lletres majúscules diferents indiquen diferències significatives ( $p < 0,05$ ) entre les fases de digestió d'una mostra a un pH determinat. Lletres minúscules diferents indiquen diferències significatives ( $p < 0,05$ ) d'una mateixa fase en mostres a diferent pH.

També es va estudiar la distribució de partícula inicial segons el mètode de formació a pH 3 i pH 7:

Segons el mètode de formació d'emulsions en la Figura 11A i 11B, es va poder observar que les emulsions formades amb ultrasons presenten partícules de mida més gran, amb dues poblacions al voltant de +1000 nm i una propera als 10.000 nm. En canvi, les emulsions formades amb microfluiditzador teneien tres poblacions, sent la major propera als 6000 nm. Concorda amb l'esmentat anteriorment en la mida mitjana de partícula.

En la Figura 11B, que va mostrar la distribució en volum (%), a pH 3 va apareixer un nou pic en l'emulsió d'ultrasons entre els 1000 i 10.000 nm, que no estava present en el primer gràfic d'intensitat. Aquest fet suggereix que les partícules de mida més gran ocupen un volum considerable, malgrat la seva menor intensitat relativa. Això coincideix amb els valors mitjans de partícula vistos anteriorment, que mostren un tamany de partícula més gran i més variable. En la Figura 11C, amb la tècnica SLS les distribucions a pH 7 i pH 3 mostren poca diferència entre les tècniques, ja que aquesta al ser en mida micromètrica no s'aprecia tant els pics de poblacions.

Pel que fa a la influència del pH, a pH 3 es va observar que les partícules de les emulsions són generalment més petites que a pH 7, tal com reflecteixen tant els gràfics de DLS com els de SLS. Aquest resultat és coherent amb el comportament de la proteïna de patata, que a pH neutre (pH 7), aquesta s'apropa al seu punt isoelèctric, fet que comporta una càrrega superficial gairebé nul·la i una menor repulsió electrostàtica entre les gotes, afavorint la coalescència (Dickinson, 2010).

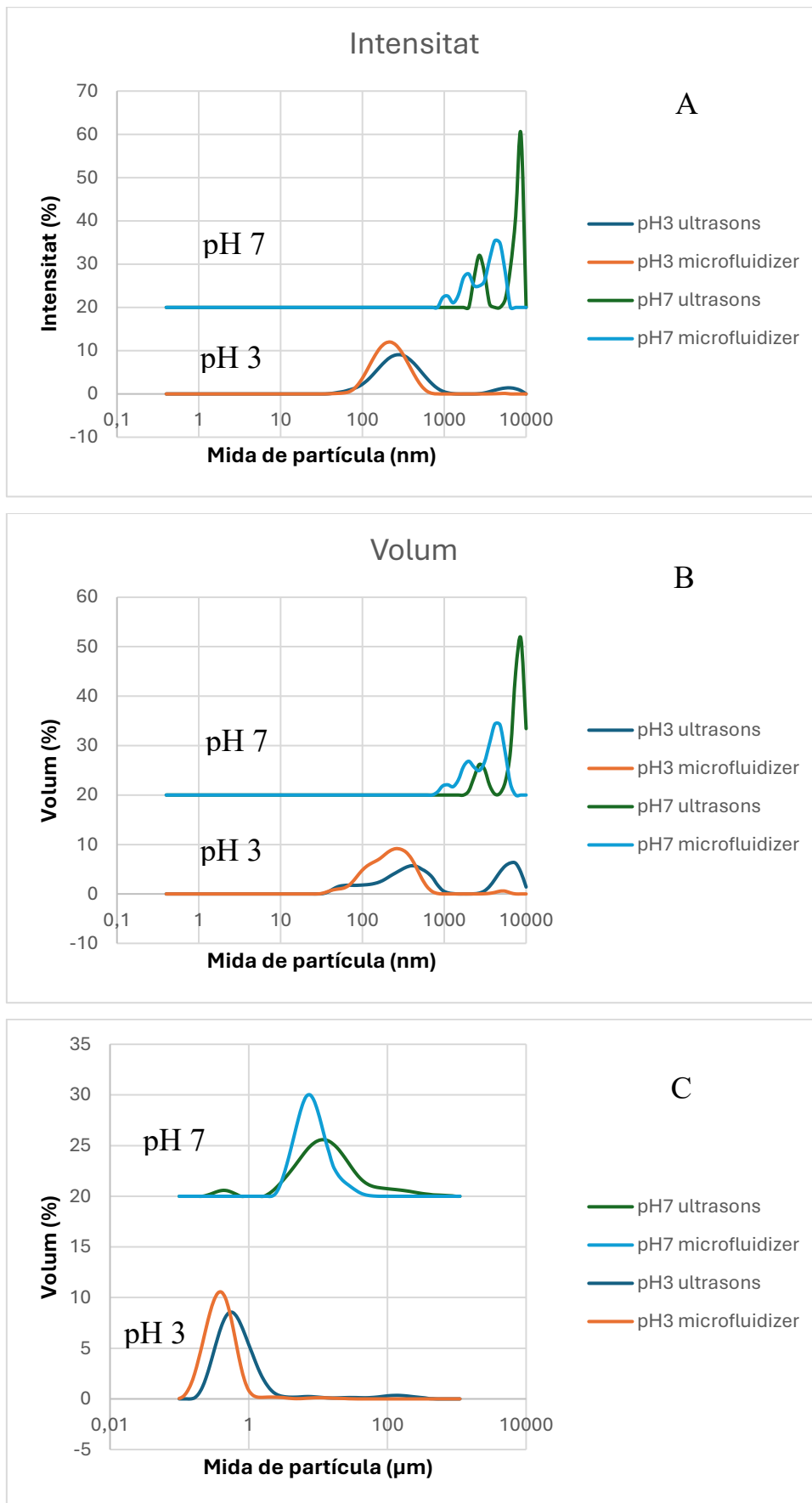


Figura 11. Influència del mètode de formació d'emulsions en la distribució de partícula en A: intensitat (DLS, nm), B: volum (DLS, nm) i C: volum (SLS, μm) de les emulsions oli en aigua estabilitzades amb proteïna de patata a pH 3 i pH 7.

### 4.1.2. Índex de polidispersió

Quan es tracta de l'índex de polidispersió, que reflecteix la uniformitat en la mida de les partícules dins l'emulsió, els resultats no van mostrar diferències estadísticament significatives entre el microfluidizer i els ultrasons a pH 7.

No obstant, a pH 3, sí que es van detectar diferències entre ambdues tècniques. En aquest cas, el microfluidizer va presentar un índex de polidispersió de  $0,19 \pm 0,007$ , menor en comparació amb els ultrasons que es de  $0,30 \pm 0,032$ , fet que indica una distribució de mida de partícula més homogènia de les nanoemulsions formades en el microfluidizer. Això podria ser degut a la major eficàcia del microfluidizer per reduir les fluctuacions en la mida de les gotes a pH àcid, fent-les més uniformes (Jafari et al., 2008)b. Els ultrasons, en canvi, poden donar lloc a una emulsió amb més dispersió en la mida de les partícules a causa de la seva dinàmica de cavitació més variable, tal com s'havia pensat amb els resultats de mida mitjana de partícula.

Si comparem les mostres per pH, vam observar que a pH 3, tant el microfluidizer com els ultrasons van generar índexs de polidispersió per sota de 0,35, és a dir, més baixos que a pH 7 que estan per sobre de 0,40, indicant una distribució de partícules més homogènia en condicions àcides. Això pot estar relacionat amb la reducció de la solubilitat de la proteïna de patata a pH àcid, la qual cosa limita la formació de partícules més grans o agregats, i per tant genera una emulsió més uniforme (Bashash et al., 2024).

Tot i això, les diferències observades entre pH 3 i pH 7 no van ser estadísticament significatives en cap dels equips d'emulsificació, la qual cosa suggereix que, tot i la tendència a una major uniformitat a pH 3, la variabilitat dins les mostres impedeix establir una distinció clara.

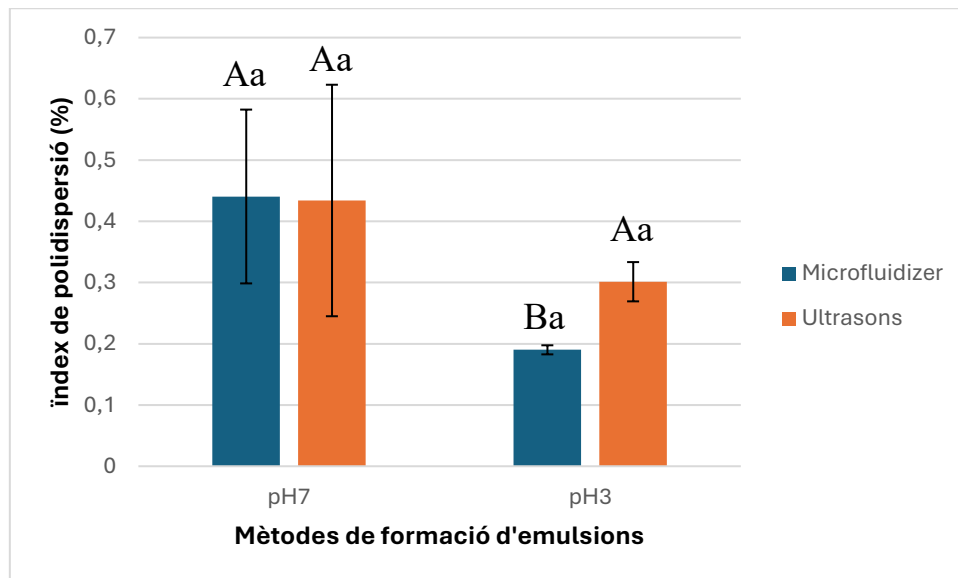


Figura 12: Influència del mètode de formació d'emulsions en el índex de Polidispersió de les emulsions oli en aigua estabilitzades amb solucions aquoses de proteïna a pH 3 i pH 7. Lletres majúscules diferents indiquen diferències significatives ( $p < 0,05$ ) entre les fases de digestió d'una mostra a un pH determinat. Lletres minúscules diferents indiquen diferències significatives ( $p < 0,05$ ) d'una mateixa fase en mostres a diferent pH.

#### 4.1.3. Potencial zeta

Els resultats van mostrar que no hi ha diferències significatives en el potencial zeta segons el mètode de formació d'emulsions, tant a pH 3 com a pH 7, on en aquest últim per exemple amb microfluidizer la emulsió amb proteïna de patata com a emulgent estava en un valor de  $-2,54 \pm 0,72$  i en ultrasons  $-2,12 \pm 2,19$ . Es podria dir que la tècnica d'emulsificació no va tenir un impacte directe en la càrrega superficial de les gotes d'oli. Això podria indicar que, tot i les diferències en la mida de partícula observades entre les tècniques, el mecanisme de generació de la càrrega en les gotes és principalment controlat per la natura de la proteïna emulgent i les condicions de pH (McClements, 2004)b.

Tot i això, dins la igualtat entre les emulsions, es va observar una major variabilitat del potencial zeta en les nanoemulsions formades amb ultrasons, com ja s'ha observat anteriorment en la polidispersió i mida mitjana de partícula.

En canvi, les diferències entre pH 3 i pH 7 van ser clarament evidents. A pH 3, tant per al microfluidizer com per als ultrasons, es va observar un potencial zeta positiu, amb valors al voltant de 60 mV. Aquest alt valor positiu indica una forta repulsió electrostàtica entre les gotes d'oli, la qual cosa contribueix a l'estabilització de l'emulsió. Aquest comportament podríem dir

que és esperat, ja que a pH àcid, la proteïna de patata, amb un punt isoelectric al voltant de pH 6-8, està carregada positivament, generant una càrrega neta a la superfície de les gotes.

A pH 7, però, el potencial zeta va canviar dràsticament, amb valors propers a -2 mV, cosa que indica una càrrega negativa molt baixa a la superfície de les gotes. Aquesta situació suggereix que a pH neutre, la proteïna de patata té una càrrega propera al seu punt isoelectric, on la càrrega neta és quasi nul·la. Això comporta una menor repulsió electrostàtica entre les gotes i una possible menor estabilitat de l'emulsió, fet que podria afavorir la coalescència de les gotes (Schmitt & Turgeon, 2011).

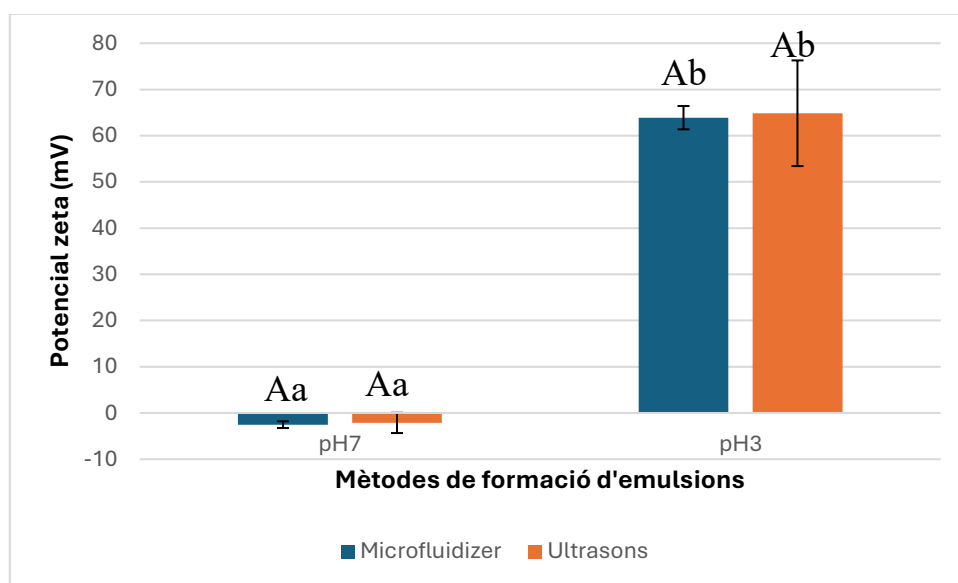


Figura 13. Influència del mètode de formació d'emulsions en el potencial zeta de les emulsions oli en aigua estabilitzades amb solucions aquoses de proteïna de patata a pH 3 i pH 7. Lletres majúscules diferents indiquen diferències significatives ( $p < 0,05$ ) entre les fases de digestió d'una mostra a un pH determinat. Lletres minúscules diferents indiquen diferències significatives ( $p < 0,05$ ) d'una mateixa fase en mostres a diferent pH.

## 4.2. ESTABILITAT DIGESTIVA DE LES EMULSIONS

### 4.2.1. Mida de partícula

Es va mesurar la mida de partícula en cada fase de la digestió per observar-ne la seva estabilitat al pas pel tracte gastrointestinal.

Inicialment, la mida de partícula de les emulsions va presentar diferències significatives a causa del pH de la solució de proteïna de patata utilitzada com a emulsificant, essent menor a pH 3 que a pH 7. Com s'observa en la figura 14A, en les emulsions d'oli en aigua de pH 3 en la fase inicial observem un valor de mida de partícula de  $0,36 \pm 0,003 \mu\text{m}$  a diferència del valor de l'emulsió a pH 7 d'aquesta fase de  $7,83 \pm 0,18 \mu\text{m}$ . No obstant això, durant les fases gàstrica i intestinal no es van observar diferències significatives en la mida de partícula de les emulsions estabilitzades amb proteïna de patata a causa del pH.

Pel que fa a la mida de partícula durant la digestió, l'emulsió estabilitzada amb proteïna de patata a pH 7 va experimentar una disminució significativa de la mida de partícula de  $7,83 \pm 0,18 \mu\text{m}$  a  $2,54 \pm 0,17 \mu\text{m}$  de la fase inicial a la gàstrica. En canvi, a pH 3 es va observar el contrari, inicialment la mida de partícula és més petita que a la fase gàstrica i intestinal. Això es pot deure a que els canvis en el pH indueixen a canvis en les càrregues superficials de la proteïna de patata i al generar menys repulsió electrostàtica, generen agrupacions i per tant, mida de partícula més grans.

Les nanoemulsions d'oli en aigua, que utilitzen proteïnes com la de patata, van mostrar una menor mida mitjana a pH 3 que a pH 7 segurament a la major solubilitat i càrrega superficial de la proteïna en condicions àcides. Aquestes propietats permeten que la proteïna formi una capa més densa i protectora al voltant de les gotes d'oli, cosa que pot reduir la coalescència i millora l'estabilitat de l'emulsió. A pH neutre, la solubilitat i la càrrega de la proteïna disminueixen, fet que resulta en una menor capacitat per estabilitzar les gotes i, per tant, en una major tendència a la desestabilització (Li et al., 2019; Liu et al., 2019).

Destacar que la figura 14B es va observar com en la fase intestinal les nanoemulsions van augmentar molt de mida, això es degut a que les partícules grans de les emulsions ocupen

molt més espai que les petites i per tant dona mida mitjana de partícula més gran.

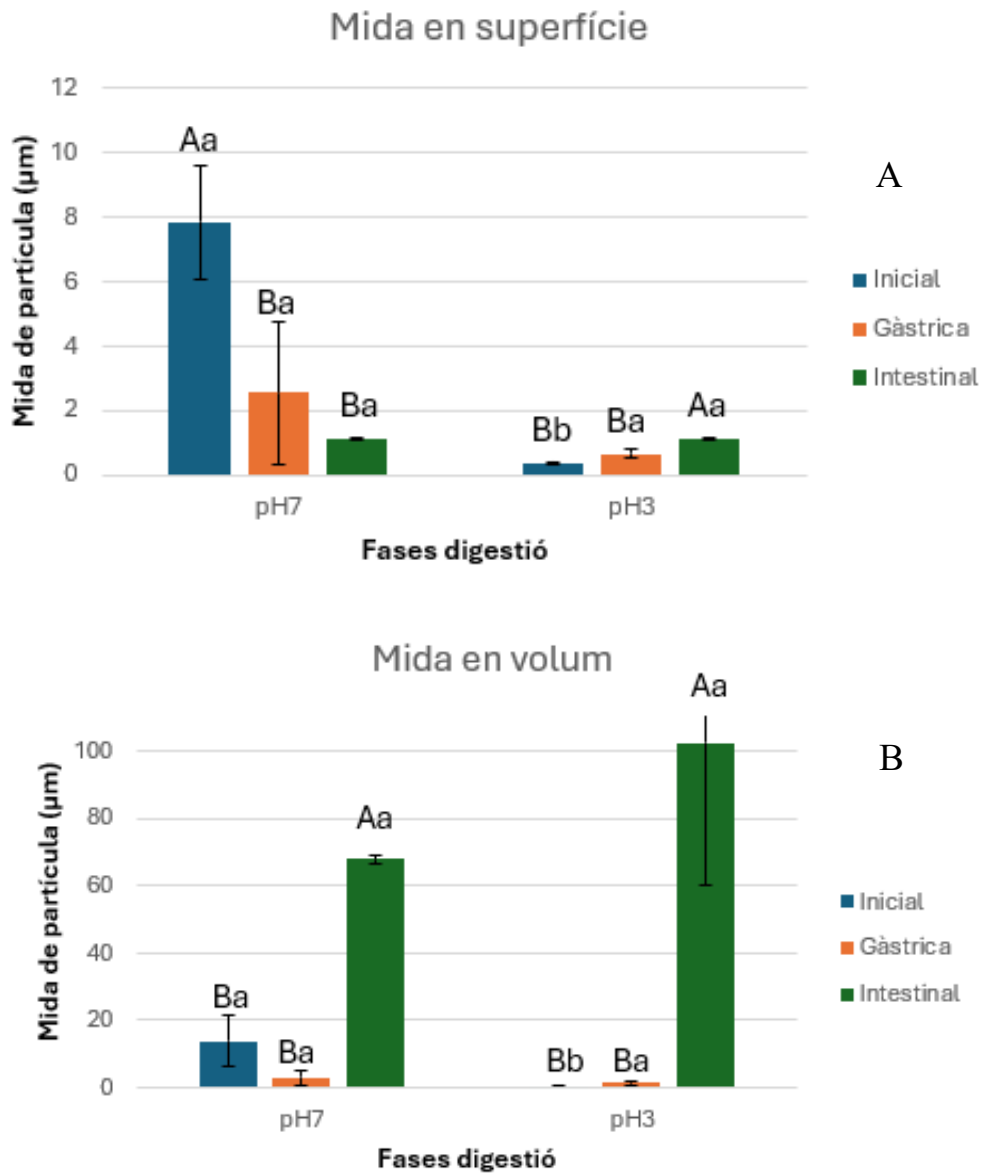


Figura 14. Influència del pH en la mida mitjana de partícula en A: superfície (D3,2; µm) i B: volum (D4,3; µm) de les emulsions oli en aigua estabilitzades amb solucions aquoses de proteïna de patata en les fases de digestió. Equip de dispersió de llum estàtica (SLS). Lletres majúscules diferents indiquen diferències significatives ( $p < 0,05$ ) entre les fases de digestió d'una mostra a un pH determinat. Lletres minúscules diferents indiquen diferències significatives ( $p < 0,05$ ) d'una mateixa fase en mostres a diferent pH.



També es va estudiar la distribució de partícula durant les diferents fases de la digestió a pH 3 i pH 7 que es mostren en la Figura 15.

En quant a l'efecte del pH, en la gràfica de distribució de partícula de les emulsions oli en aigua de la Figura 15A, inicialment, a pH 3 es van presentar mides de partícula menors que en pH 7, ja que es va observar com a pH 3 hi ha una sola població de partícules d'una mida d'entre 100 i 1000 nm, en canvi a pH 7, hi havia tres pics població superior a 1000 nm. També es va poder dir que les emulsions en pH 3, al haver menys pics de població que a pH 7, les partícules eren més homogènies. En tots dos pH en la fase gàstrica i intestinal no hi havia diferències evidents però hi havia més heterogeneïtat a pH 7 ja que es van observar més pics de poblacions.

L'efecte de les diferents fases de la digestió de la Figura 15 (A, B i C), vam veure que en les emulsions a pH 3 en la fase inicial la mida de la partícula era menor que la gàstrica i la intestinal. En canvi, a pH 7 les emulsions van presentar la menor distribució de mida en la fase intestinal, més gran en la fase gàstrica i essent la major en la fase inicial, confirmant el que es va veure en la mitjana de mida de partícula.

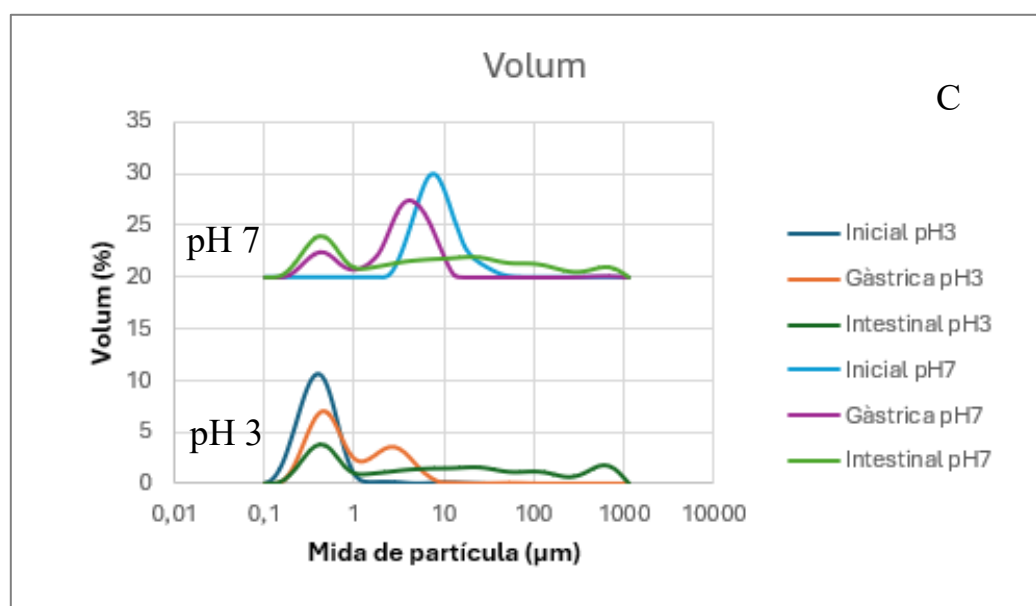
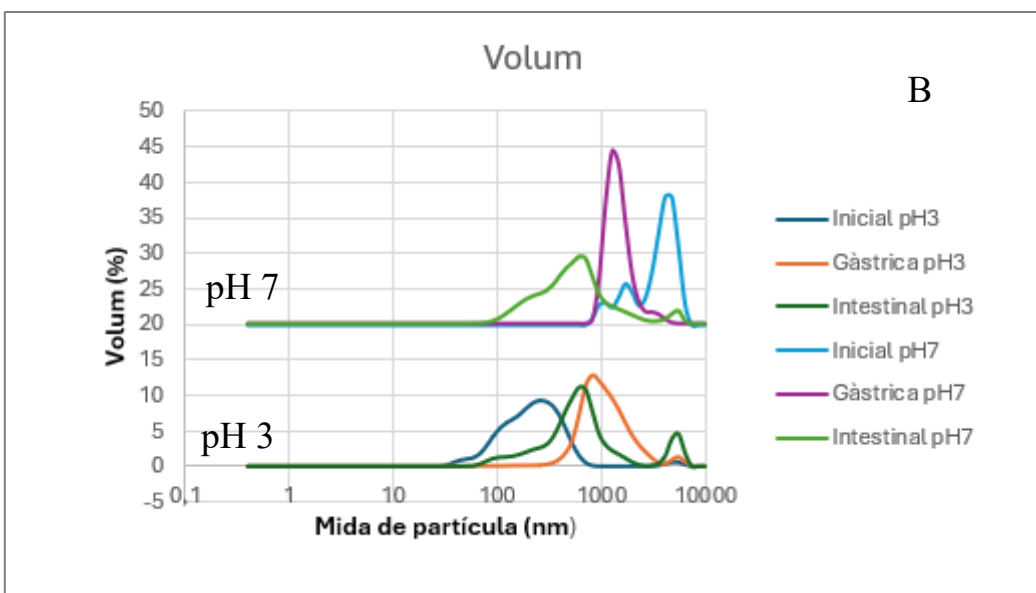
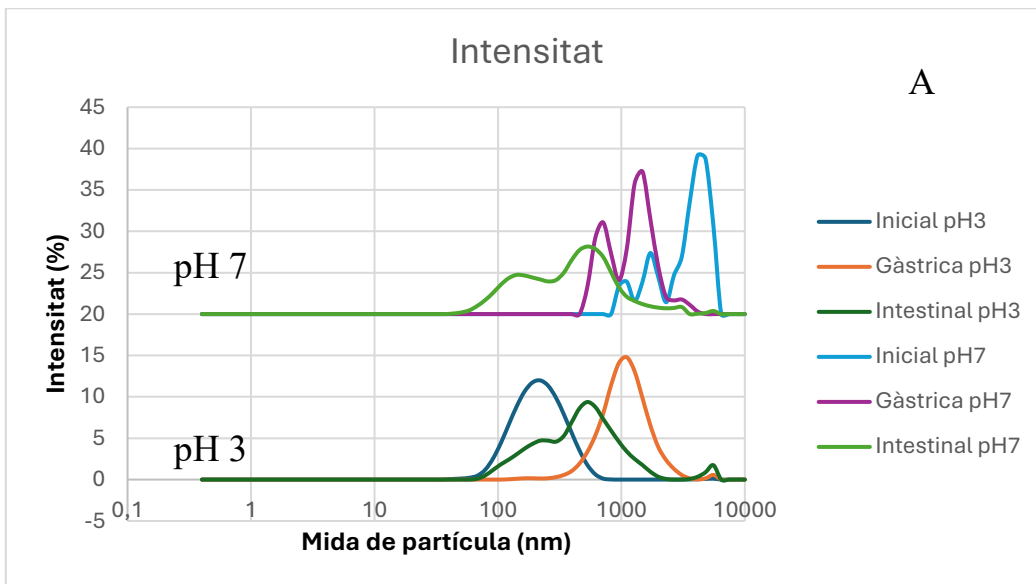


Figura 15. Efecte del pH (pH3 i pH7) en la distribució de partícula en A: intensitat (nm) i B i C: volum (nm i µm) de les emulsions oli en aigua estabilitzades amb proteïna de patata en les fases de digestió.

### 4.2.2. Índex de polidispersió

L'índex de polidispersió indica el grau d'homogeneïtat que presenta la mostra pel que fa a la mida de les partícules. Així doncs, valors pròxims a 0 indiquen que és una mostra homogènia, i com més s'aproxima a 1, més heterogeneïtat presenta.

Destacar que totes les emulsions estabilitzades amb proteïna de patata van tenir valors per sota del 0,6 de polidispersió i que no hi havia grans diferències entre aquestes. Es va observar que presentaven certa heterogeneïtat com ja es va veure anteriorment als resultats de distribució de mida de partícula.

Pel que fa l'efecte del pH, es va observar en la Figura 16 que les emulsions amb proteïna de patata com a emulgent, en la fase inicial eren més homogènies amb pH 3 que amb pH 7 amb un valor de  $0,19 \pm 0,007$  a pH 3 i un valor  $0,44 \pm 0,14$  a pH 7. No hi havia diferències significatives entre els dos pH en la fase gàstrica i intestinal.

Segons les fases de digestió, es va veure que en les emulsions a pH 3 la polidispersió és mínima en la fase gàstrica ( $0,19 \pm 0,0074$ ) i màxim en la fase intestinal ( $0,55 \pm 0,088$ ), no hi ha diferències significatives entre la fase inicial i gàstrica. Al igual que en pH 3, en les emulsions de pH 7, la fase digestiva amb menor polidispersió era la gàstrica amb un valor de  $0,35 \pm 0,11$  i la major en la fase intestinal amb un valor de  $0,45 \pm 0,009$ , no hi havia diferències significatives entre les tres fases. La diferència de les emulsions en la fase intestinal a pH3, podria estar relacionat amb la interacció de les proteïnes emulsionants amb els components de l'entorn intestinal, com ara les sals biliars i enzims, que podrien desestabilitzar l'emulsió a pH més baix, augmentant la polidispersió.

Estudis amb de nanoemulsions estabilitzades amb diferents proteïnes com el de (Teo et al., 2016) , demostren que és comú trobar que el PDI és menor a pH 3 en comparació amb pH 7, cosa que suggereix una emulsió més estable a pH àcid. Això pot ser degut a una major repulsió electrostàtica entre les gotes a pH més baix, cosa que ajuda a mantenir una distribució de mida més uniforme.

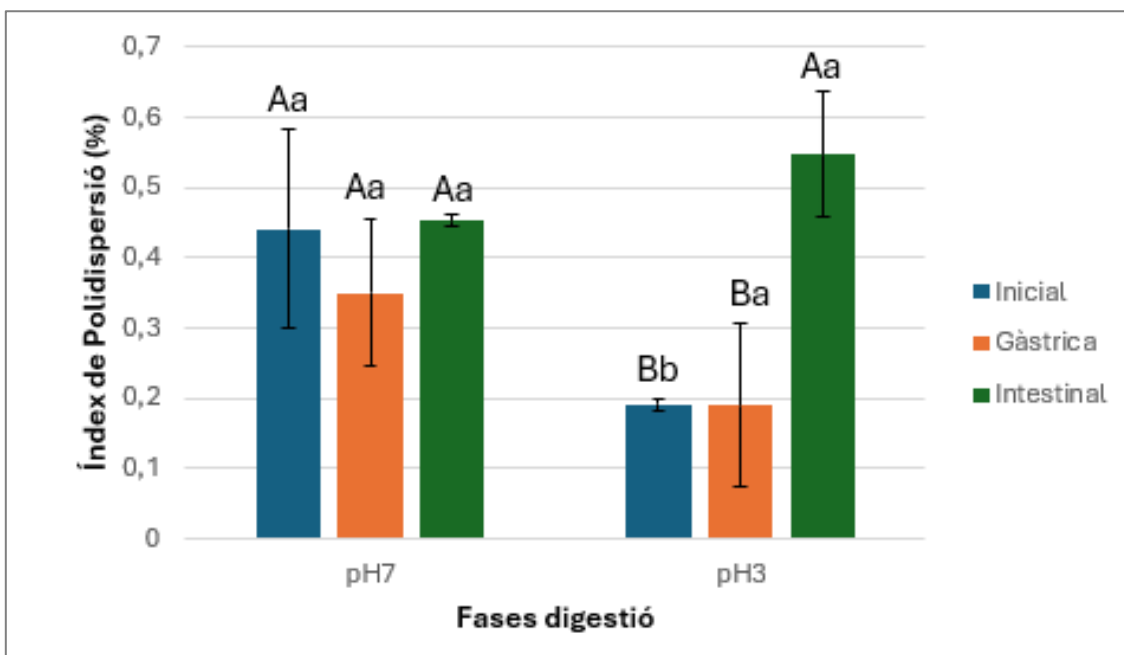


Figura 16. Influència del pH en el índex de Polidispersió de les emulsions oli en aigua estabilitzades amb solucions aquoses de proteïna de patata en les fases de digestió. Lletres majúscules diferents indiquen diferències significatives ( $p < 0,05$ ) entre les fases de digestió d'una mostra a un pH determinat. Lletres minúscules diferents indiquen diferències significatives ( $p < 0,05$ ) d'una mateixa fase en mostres a diferent pH.

#### 4.2.3. Potencial zeta

Es va estudiar el potencial zeta de les emulsions, observant la influència del pH, en la inicial es on observem una diferència estadísticament significativa on les emulsions estabilitzades amb proteïna de patata a pH 7 van ser  $-2,54 \pm 0,72$  mV i de  $63,88 \pm 2,52$  mV en pH 3. En canvi, en la fase gàstrica els valors van ser positius i en la intestinal negatius en tots dos pH i amb valors molt similars.

El potencial zeta és un paràmetre que ens ajuda a determinar l'estabilitat de les emulsions. Valors per sobre de 30 mV o per sota de -30 mV indiquen una estabilitat de les mostres (Heurtault, Saulnier, Pech, Proust, & Benoit, 2003; Preetz, Hauser, Hause, Kramer, & Mäder, 2010). Per tant, es va observar que en pH 3 en la fase inicial, les nanoemulsions eren més estables, això es pot deure a que les càrregues generen més repulsió electrostàtica i per tant, menys agrupacions, com s'ha vist en les gràfiques de mida mitjana i de distribució de partícula.

A les nanoemulsions estabilitzades amb proteïnes de patata com a emulgent, el

comportament de la càrrega superficial varia segons el pH a causa de la ionització dels grups funcionals de la proteïna. A pH 3, la proteïna de patata tenia una càrrega positiva, ja que està per sota del punt isoelèctric. Tot i això, a pH 7, la càrrega es va tornar negativa en trobar-se per sobre d'aquest punt. Durant la digestió gàstrica, l'ambient àcid i les condicions de la fase gàstrica mantenen la càrrega positiva, mentre que a l'intestí l'ambient més alcalí indueix una càrrega negativa en ambdós pH (Calero et al., 2013). L'efecte apantallament també pot induir a la disminució de la càrrega superficial efectiva d'una partícula, a causa de la presència d'ions en la solució, formant una doble capa elèctrica al voltant de la superfície carregada i reduir la repulsió electrostàtica. Això pot conduir a una menor estabilitat de la nanoemulsió, facilitant la seva agregació o coalescència (Biroun et al., 2020).

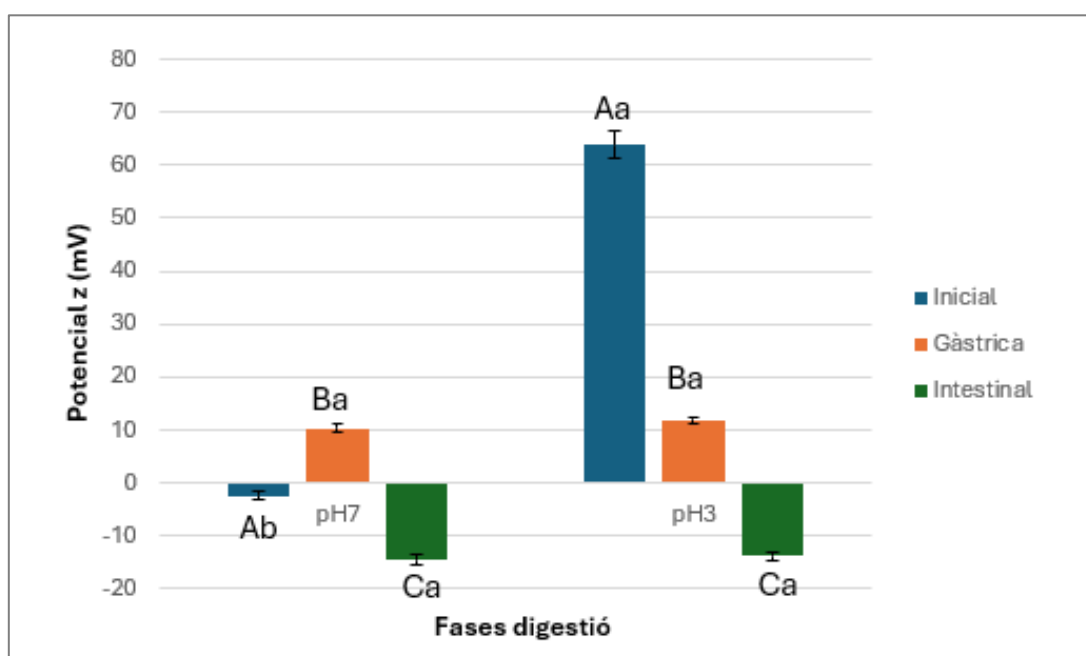
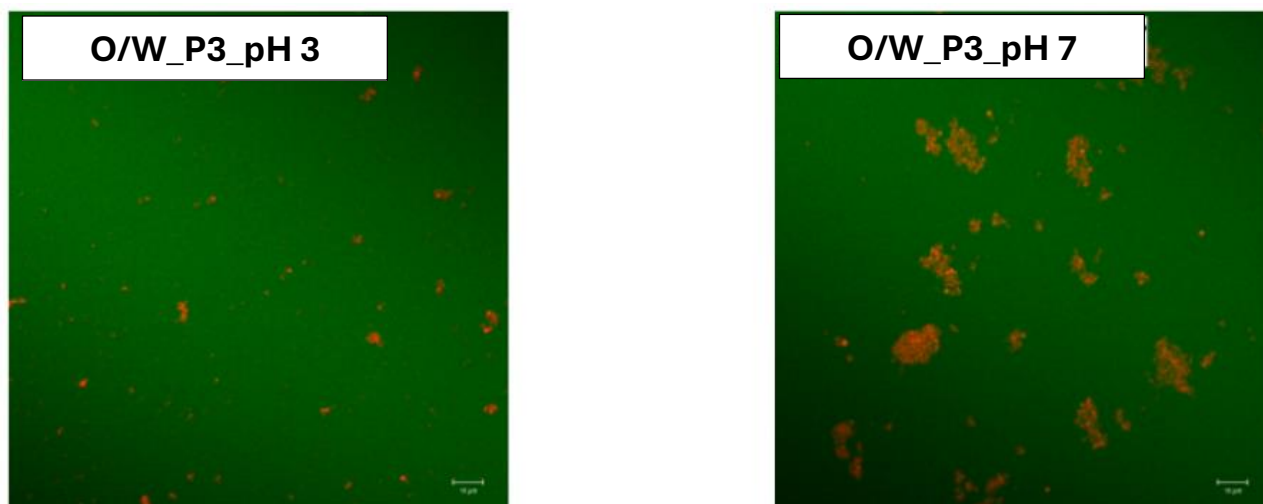


Figura 17. Efecte del pH (pH3 i pH7) en el potencial zeta de les emulsions oli en aigua estabilitzades amb solucions aquoses de proteïna de patata en les fases de digestió. Lletres majúscules diferents indiquen diferències significatives ( $p < 0,05$ ) entre les fases de digestió d'una mostra a un pH determinat. Lletres minúscules diferents indiquen diferències significatives ( $p < 0,05$ ) d'una mateixa fase en mostres a diferent pH.

#### 4.2.4. Microscopia



*Figura 18. Imatges microscòpiques x20 de les emulsions estabilitzades amb proteïna de patata com a emulgent formades al microfluidizer a pH 3 i pH 7.*

En la Figura 18 les imatges de microscòpia van mostrar canvis significatius en la morfologia de les nanoemulsions estabilitzades amb proteïna de patata depenent pH, tenint correlació amb lo comentat anteriorment. A pH 3, inicialment, es va observar una distribució homogènia i sense agregats visibles. Això va ser coherent amb els resultats de mida de partícula que indiquen que, en condicions àcides, les nanoemulsions van formar partícules més petites i més estables gràcies a la major solubilitat i càrrega superficial de la proteïna.

#### 4.2.5. Digestibilitat del oli enriquit amb $\beta$ -carotè

El percentatge d'àcids grassos lliures (AGL) indica la quantitat d'àcids grassos que s'han alliberat del triglicèrid durant la digestió i per tant ens informa de l'activitat de la lipasa pancreàtica al llarg del temps.

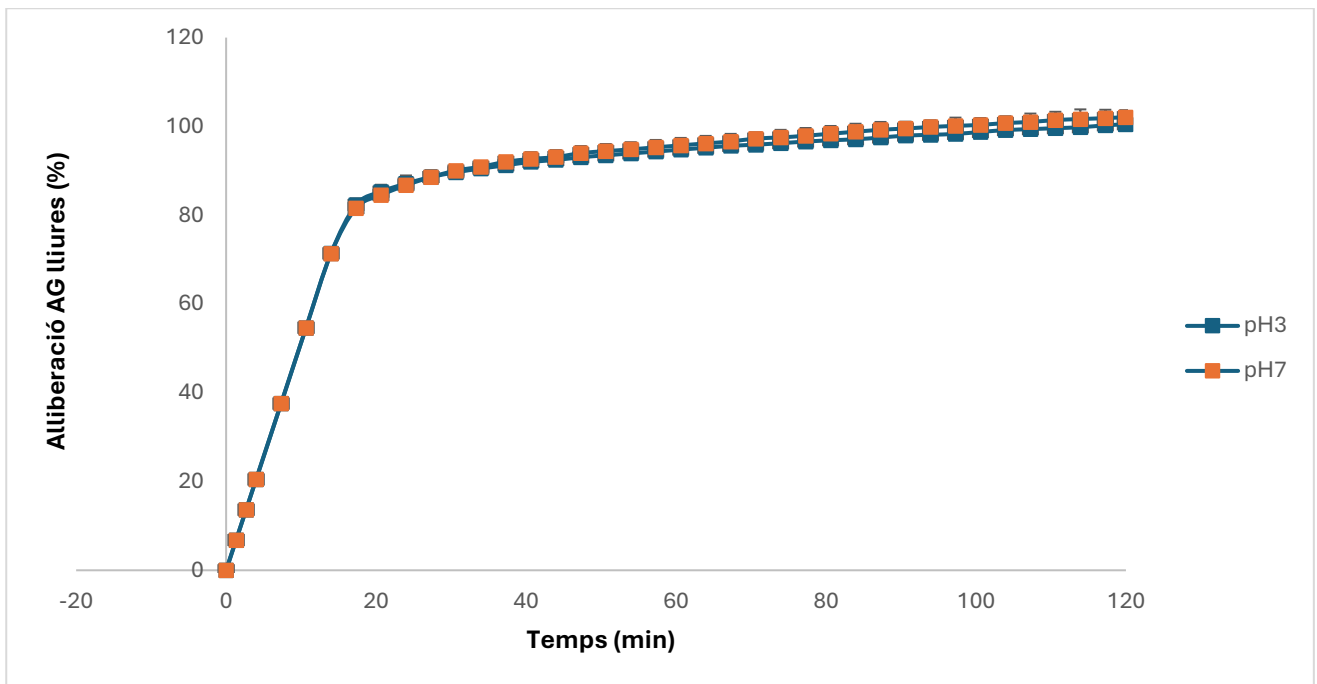


Figura 19. Digestibilitat lipídica expressada com a alliberació d'àcids grassos (AG) lliures (%) durant la fase intestinal (min) de les emulsions estabilitzades amb proteïna de patata a pH 3 i a pH 7.

Per una banda, com es va poder comprovar la velocitat a la qual es va produir la reacció, on durant els primers 15 minuts aquesta va ser ràpida arribant al voltant del 80%. Llavors a partir d'aquest punt es va poder observar que les emulsions tenien una digestibilitat més lenta. Es pot relacionar 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.

Si mirem segons el pH es va veure que en proteïnes estabilitzades amb proteïna de patata, en pH 3 el total d'AGL són del  $100,5 \pm 0,9$  % i en pH7 del  $102,1 \pm 1,6$  %. Tot i que aquesta és més alta en pH 7, no hi havia diferències importants en la digestibilitat.

En pH 3, les nanoemulsions podien ser més estables pel fet que aquest pH està més a prop del punt isoelèctric de la proteïna, cosa que redueix la repulsió entre partícules i afavoreix l'estabilitat de l'emulsió (McClements & Gumus, 2016).

Tot i això, en pH 7, que és més fisiològic, l'activitat enzimàtica de les lipases sol ser màxima, cosa que podria explicar un increment en l'alliberament d'àcids grassos i valors comparables a pH 3 (McClements & Decker, 2000).

#### **4.2.6. Bioaccessibilitat del $\beta$ -carotè**

Els resultats de la bioaccessibilitat del  $\beta$ -carotè no van poder ser llegits ni interpretats degut a que van donar valors per sota del límit de detecció de l'equip espectrofotomètric.

Això es pot justificar degut a que l'oli de gira-sol, pot no ser la millor opció per a estudis de bioaccessibilitat de  $\beta$ -carotè (que és particularment vulnerable a l'oxidació quan s'exposa a condicions que afavoreixen la peroxidació lipídica), a causa del seu alt contingut d'àcids grassos poliinsaturats, especialment àcid linoleic. Aquest tipus de greix és més susceptible a l'oxidació, cosa que pot desestabilitzar el  $\beta$ -carotè, un compost que ja és altament sensible a l'oxigen i a la llum. L'oxidació del  $\beta$ -carotè no només en redueix la concentració, sinó que també en pot alterar l'estructura, afectant la capacitat de ser absorbit i, per tant, la bioaccessibilitat.



## 5. CONCLUSIONS

Com a conclusions de l'efecte del mètode d'emulsificació (microfluidizer i ultrasons) i del pH (pH 3 i pH 7) sobre les propietats fisicoquímiques de nanoemulsions d'oli en aigua estabilitzades amb proteïna de patata podem dir que:

Els resultats obtinguts mostren que el microfluidizer és més eficient en la formació d'emulsions amb partícules més petites i homogènies en comparació amb els ultrasons, especialment a pH 3. Això es deu a la capacitat del microfluidizer per aplicar forces de cisallament més altes, cosa que facilita la fragmentació de les gotes d'oli. Per altra banda, les emulsions formades amb ultrasons presenten una major variabilitat en la mida de partícula i polidispersió, especialment a pH àcid.

Pel que fa a la influència del pH, les emulsions a pH 3 mostren partícules més petites i més estables gràcies a una major solubilitat de la proteïna de patata en condicions àcides, mentre que a pH 7, les emulsions són menys estables a causa de la proximitat de la proteïna al seu punt isoelèctric. Aquest fenomen genera una menor repulsió electrostàtica entre les gotes, afavorint la coalescència i desestabilització de l'emulsió.

Durant les fases de digestió, s'ha observat una disminució general de la mida de les partícules a la fase gàstrica, seguit d'un augment a la fase intestinal. A més, l'índex de polidispersió reflecteix que les emulsions a pH 3 són més homogènies inicialment, mentre que les emulsions a pH 7 presenten una major heterogeneïtat al llarg de la digestió.

Mentre que el pH exerceix una influència significativa en el potencial zeta i, per tant, en l'estabilitat electrostàtica de l'emulsió, la tècnica d'emulsificació no sembla tenir un paper destacat en aquest aspecte.

Les diferències en el pH i les tècniques d'emulsificació afecten significativament la mida de partícula, però en general, les nanoemulsions obtingudes demostren bones propietats funcionals. Això subratlla el potencial de la proteïna de patata com una alternativa competitiva i sostenible en la indústria alimentària, especialment en productes vegans, funcionals i lliures d'altèrgens, amb aplicacions prometedores en la microencapsulació de compostos bioactius.

## **6. DEMOSTRACIÓ TÈCNICA I ECONÒMICA**

En aquest apartat es dissenyarà de manera aproximada una indústria de nanoemulsions i es farà un anàlisi de rentabilitat econòmica.

### **6.1. DESCRIPCIÓ DEL PRODUCTE**

En la indústria objecte s'elaborarà nanoemulsions estabilitzades amb proteïna de patata, utilitzant com a base un oli de gira-sol enriquit amb  $\beta$ -carotè al 0,1%.

La composició serà de 93,24% d'aigua potable purificada, 1,76% de proteïna de patata (P300) i 5% d'oli de gira-sol enriquit amb  $\beta$ -carotè al 0,1%.

S'utilitza aigua potable ja que es més accessible, barata i potable per a la indústria alimentària.

Destacar però, que s'hauria de fer una petita validació de que el tipus d'aigua no afecta a les propietats de la nanoemulsió abans d'utilitzar-la.

La producció industrial es desenvolupa en un calendari setmanal de dilluns a divendres, amb un horari de vuit hores de treball de 08:00 a 16:00 de la tarda, on la última hora es dedicarà a la neteja dels equips. S'estimen 250 dies laborals, en excloure els caps de setmana i festius anuals.

S'estima una producció diària de: 6.000 litres.

És a dir, una producció anual de : 1.500.000 litres.

La finalitat d'aquest producte es per a la fortificació d'aliments. És a dir, que sigui utilitzat per a altres indústries alimentàries per tal de que pugin aplicar-ho als seus productes, adquirint un major valor nutricional o en aquest cas, suplint la carència en provitamina A gràcies a les nostres nanoemulsions. Per tant, la distribució del nostre producte serà a les indústries interessades.

## 6.2. TECNOLOGIA I ENGINYERIA DEL PROCÉS PRODUCTIU

### 6.2.1. Descripció del procés

En primer lloc, es realitza la recepció de les matèries primeres, que inclou aigua potable purificada, l'oli de gira-sol enriquit amb  $\beta$ -carotè refrigerat a 4 °C, proteïna de patata en pols i àcid cítric per l'acidificació. Un cop rebudes, es passa a la fase d'emmagatzematge de les matèries primeres, la proteïna de patata i l'àcid cítric es conserven a temperatura ambient, mentre que el oli enriquit amb  $\beta$ -carotè es manté en una cambra de refrigeració de 4°C per evitar la degradació del pigment. L'aigua s'emmagatzema en dos dipòsits de 4000 litres cadascun. A continuació, es procedeix a la solubilització de la proteïna, on aquesta, es dissol amb l'aigua potable purificada i formar així la fase aquosa. Aquesta solubilització es realitzaria en un tanc de mescla a una temperatura de 30 °C durant 20 minuts, per assegurar una bona solubilització. S'utilitzaria àcid cítric per tal d'ajustar a pH 3 la mescla, aplicat de manera automàtica, controlada per monitoreig.

A continuació la proteïna solubilitzada passa a un dipòsit on s'afegeix l'oli enriquit amb  $\beta$ -carotè i s'inicia la pre-emulsificació utilitzant un dispersor en línia d'alta cisalla. Els components es subministren a la màquina a un ritme adequat a través de diverses connexions d'entrada, i després es s'homogeneïtzen dins de la màquina abans de ser descarregats per la sortida. Això assegura una distribució estreta de la mida de les partícules o gotes amb mínimes variacions de qualitat.

De la pre-emulsificació passa a l'emulsificació final, que es realitza en un homogeneïtzador d'altres pressions. La temperatura del producte en aquesta etapa es manté per sota els 20 °C per garantir la no degradació del  $\beta$ -carotè. A més, s'utilitza aigua de refrigeració per als intercanviadors de calor d'oli hidràulic i pel de fluid de procés per tal de no superar els 20°C així com aire comprimit per alimentar la bomba i controlar el cicle. Finalment, el producte acabat es dirigeix a uns tancs entremitjos i d'aquests a la fase d'envasat de sistema "bag-in-box" en una màquina d'envasar automàtica de manera asèptica, aquests envasos permeten protegir el producte de la llum i l'aire, ajudant a mantenir la qualitat durant més temps i sempre a una T° de 4-5°C per tal d'allargar al vida útil del producte. La capacitat dels envasos es de 20 litres. Després passen a l'expedició, on es fa paletitzat manual, assegurant que el producte arribi en condicions òptimes als punts de distribució.

## 6.2.2. Diagrama de flux del procés

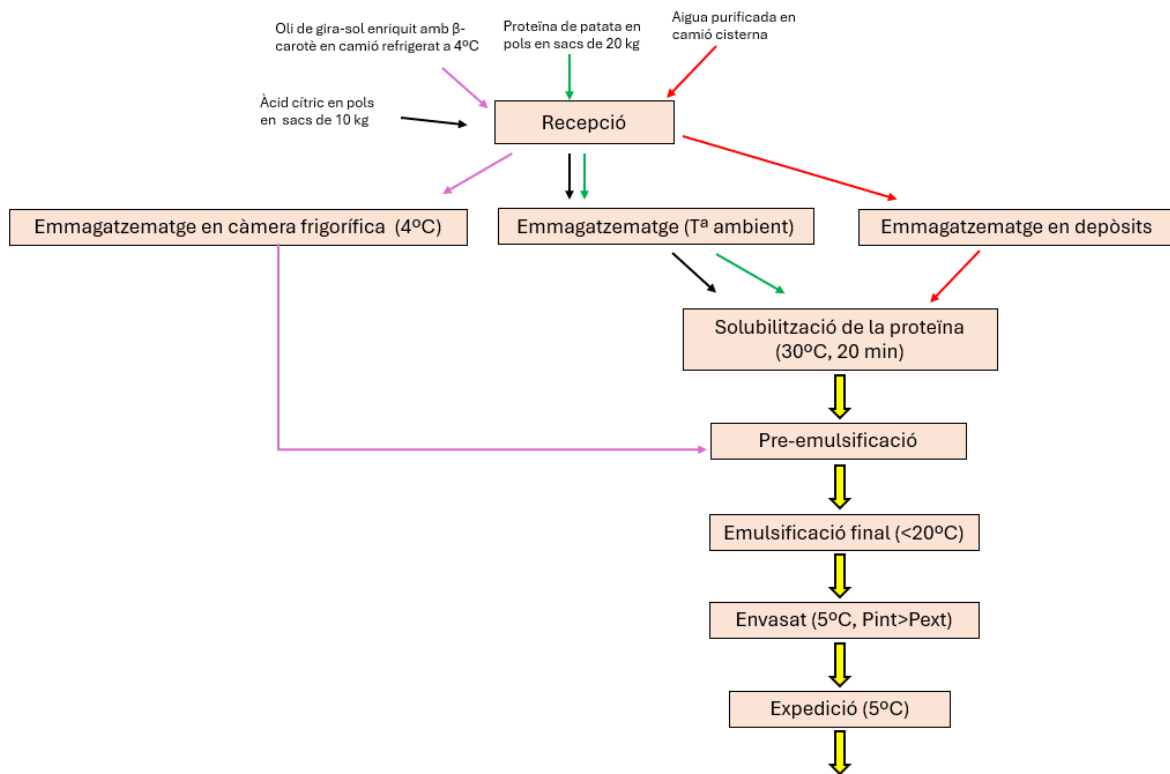


Figura 20. Diagrama de flux del procés productiu

## 6.2.3. Equips de producció i auxiliars

### -Equips de producció:

Taula 2. Característiques tanc de mescla.

Tanc de mescla

<b>Característiques:</b> <b>Capacitat:</b> 500 litres

**Material:** Acer inoxidable SS316L.  
**Pressió de disseny:** De -1 a 10 bars (g) o pressió atmosfèrica.  
**Temperatura de treball:** De 0 a 200 °C  
**Unitats:** 2  
**Potència:** 3 kW

Taula 3. Característiques dispersor en línia.

**Dispersor en línia (ULTRA-TURRAX UTL 2000/05)**



Característiques:

**Cabal (màxim):** 2500 l/h  
**Viscositat (màxima):** 5000 mPas  
**Potència del motor:** 4 kW  
**Velocitat de rotació del rotor:** 6000 rpm  
**Velocitat de punta:** 23 m/s  
**Regulació de velocitat possible:** sí  
**Pressió de procés (màxima):** 16 bar  
**Temperatura de procés, màxima:** 160 °C  
**Segell mecànic simple:** sí  
**Segell mecànic doble:** sí  
**Eina de dispersió:** variable  
**Neteja:** sí, amb CIP  
**Esterilització:** sí, amb CIP  
**Unitats:** 1

Taula 4. Característiques homogeneïtzador d'altres pressions.

<b>Homogeneïtzador d'altres pressions (M7250)</b>

<p><b>Gamma de pressió:</b> fins a 2068 bar <b>Cabal del producte:</b> 15,12 lpm (907 litres/hora) <b>Gamma de temperatura d'alimentació del producte:</b> -10 °C a 75 °C <b>Requisits de potència:</b> 37,3 kW <b>Requisits de serveis:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Aigua de refrigeració pel bescanviador de calor de l'oli hidràulic</li><li>• Aigua de refrigeració pel bescanviador de calor del fluid de procés</li><li>• Aire comprimit per a la bomba d'alimentació i els interruptors de control de cicle</li></ul> <p><b>Dimensions (Ample x Profunditat x Alçada):</b> 236 x 142 x 201 cm <b>Pes amb oli:</b> 1.089 kg <b>Unitats:</b> 1</p>

Taula 5. característiques envasadora automàtica.

<b>Envasadora automàtica (bag-in-box)</b>

<p><b>Característiques:</b></p>

**Capacitat d'envasat:** Fins a 300-600 bosses/hora

**Volum de la bossa:** Suporta bosses de 1 a 20 litres

**Potència:** 7kW

**Dimensions:** de 2.5m x 1.5m x 1.5m.

**Pes:** Al voltant de 800 kg.

**Control:** Sistema de control PLC amb pantalla tàctil per ajustar els paràmetres d'envasat.

**Manteniment:** Disseny modular per facilitar el manteniment i la neteja.

#### **-Equips auxiliars:**

##### **Sistema de refrigeració**

Cambrà de refrigeració per emmagatzematge de l'oli enriquit amb  $\beta$ -carotè a 4 °C.

- **Potència:** 7 kW.
- 4 evaporadors per a la zona d'envasat i expedició de 8kW

##### **Dipòsit d'emmagatzematge**

- **Capacitat:** Dos dipòsits de 4000 litres per a l'aigua.

##### **Intercanviadors de calor**

- **Funció:** Refrigeració de l'oli hidràulic i del fluid de procés.
- **Tipus:** Intercanviador de calor de placa o tub.
- **Potència:** 5 kW

##### **Sistema d'aigua de refrigeració**

- **Funció:** Subministrament d'aigua per als intercanviadors de calor.
- **Potència:** 3 kW

##### **Bomba d'alimentació**

- **Funció:** Proporcionar aire comprimit per a la bomba i controlar el cicle.
- **Potència:** 3,5 kW

##### **Dipòsit entremig**

- **Funció:** Emmagatzematge temporal del producte acabat abans de l'envasat.
- **Capacitat:** 500 litres, dos unitats.

## 6.2.2. Càlcul de la superfície

Per a la determinació d'espais s'utilitzaran tres mètodes diferents:

### - Mètode de càlcul: $S_s + S_g + S_e$

En aquest mètode es determinarà en primer lloc la superfície estàtica ( $S_s$ ), en base a les dimensions dels equips i instal·lacions. A continuació es calcularà la superfície de gravitació ( $S_g$ ), multiplicant  $S_s$  pel nombre de costats accessibles en cada equip. Finalment, el producte de la superfície de gravitació per un coeficient  $K$  resultarà la superfície d'evolució ( $S_e$ ). Es prendran els següents valors de  $K$ : 0,05 per activitats de transport i 1,5 per maquinària de procés i auxiliar, ja que es considera una major freqüència de desplaçaments de personal i de manteniment de l'equip. De manera resumida:

$$\begin{aligned} S_s &= \text{Superfície equip} \\ S_g &= S_s * n^{\circ} \text{ de costats} \\ S_e &= S_g * K \end{aligned}$$

### - Mètode per normes d'espai:

El mètode per normes d'espai consisteix en prendre valors mitjans d'activitats i àrees, que es troben disponibles en la bibliografia del sector. S'utilitzarà per dimensionar àrees on s'hi porten a terme activitats relacionades amb els serveis i oficines. Es prendran els següents valors:

Persona	0,6 m <sup>2</sup> /persona
Despatx	6 m <sup>2</sup> /persona
Menjador	2 m <sup>2</sup> /persona
Recepció visites i proveïdors	12 m <sup>2</sup>
Dutxa	1,5 m <sup>2</sup> /persona
Vestidor	2 m <sup>2</sup> /persona
Bany	2 m <sup>2</sup> /persona

### - Mètode heurístic:

Aquest mètode es basa en el càlcul de superfícies en base a les dimensions de l'equip o materials emmagatzemats, juntament amb certes consideracions heurístiques en les que s'afegeix a la superfície de l'equip un espai addicional. S'utilitzarà en el dimensionat de la cambra frigorífica per a l'emmagatzematge.

Les àrees són només per poder fer el càlcul de superfície, no s'ha fet distribució de àrees i locals.



Taula 6. Càlcul de superfície d'àrees.

	Longitud (m)	Amplada (m)	Altura (m)	Ss (m2)	Nº lados	Sg (m2)	K	Se (m2)	Stotal (m2)	Nº
<b>Àrea de producció</b>										
Tanc de mescla	0,80	0,80	1,25	0,64	2,00	1,28	1,50	1,92	7,68	2
Dispensador en línia	1,00	0,60	0,60	0,60	2,00	1,20	1,50	1,80	3,60	1
Homogeneïtzador d'altres pressions	2,36	1,42	2,01	3,35	2,00	6,70	1,50	10,05	20,11	1
Envasadora automàtica	2,50	1,50	1,50	3,75	2,00	7,50	1,50	11,25	22,50	1
Dipòsit emmagatzematge	1,50	1,50	2,50	2,25	2,00	4,50	1,50	6,75	27,00	2
Dipòsit entremig	3,50	1,10	1,70	3,85	2,00	7,70	1,50	11,55	46,20	2
Bomba d'alimentació	0,70	0,60	1,00	0,42	3,00	1,26	1,50	1,89	3,57	1
Personal				0,60					3,00	5
								<b>Total</b>	<b>134</b>	
	Longitud (m)	Amplada (m)	Altura (m)	Ss (m2)	Nº lados	Sg (m2)	K	Se (m2)	Stotal (m2)	Nº
<b>Emmagatzematge d'útils de neteja.</b>										
Netejadora en sec i humit	1,3	0,75	2	0,975	2	1,95	0,05	0,10	3,02	1
Estanteria amb detergent i altres	1	0,4	2,07	0,4	1	0,4		0,00	0,80	1
Armari	1	0,8	1	0,8	1	0,8		0,00	1,60	1
Personal				0,6					0,6	1
								<b>Total</b>	<b>6</b>	
	Longitud (m)	Amplada (m)	Altura (m)	Ss (m2)	Nº lados	Sg (m2)	K	Se (m2)	Stotal (m2)	Nº
<b>Serveis i vestuaris</b>										
Bany									2	2
Vestidor									2	2
Ducha									1,5	2
								<b>Total</b>	<b>11</b>	
	Longitud (m)	Amplada (m)	Altura (m)	Ss (m2)	Nº lados	Sg (m2)	K	Se (m2)	Stotal (m2)	Nº
<b>Oficines</b>										
Recepció									11	1
Despatx									6	2
Bany									2	2
Menjador									2	1
Persona									0,6	2
								<b>Total</b>	<b>30</b>	
	Longitud (m)	Amplada (m)	Altura (m)	Ss (m2)	Nº lados	Sg (m2)	K	Se (m2)	Stotal (m2)	Nº
<b>Laboratori</b>										
Estanteria	2	0,5		1					1	1
Armari	1,5	1	2	1,5					3	2
Bancs de treball	2	1	1	2	2	4	0,05	0,20	12,4	2
Equip de mesura	0,75	0,5	0,5	0,38	1	0,38	0,05	0,02	0,77	1
Personal				0,6					0,6	1
								<b>Total</b>	<b>18</b>	

Es sumarà 10 m<sup>2</sup> per la càmera frigorífica per l'emmagatzematge de l'oli enriquit amb β-carotè i 8 m<sup>2</sup> pel sistema de refrigeració (incloent la sala de compressors).

Superfície total = **217 m<sup>2</sup>**.

### 6.3. AVALUACIÓ ECONÒMICA

Per tal de poder fer l'avaluació econòmica s'ha d'estimar una vida útil de la indústria que serà de 20 anys. Destacar que tots els preus, tot hi intentant que siguin el més reals possibles, són aproximats.

#### 6.3.1. Inversió inicial

##### Cost parcel·la i nau

Es considerarà una nau de 250 m<sup>2</sup> i una parcel·la de 400 m<sup>2</sup>. S'ha augmentat la superfície de la nau per si fos necessari afegir algun passadís o fer una ampliació.

Taula 7. Cost de la parcel·la i la nau.

Parcel·la			Nau		
m2	€/m2	Preu parcel·la	m2	€/m2	Preu nau
400	80	32.000,00 €	250	350	87.500,00 €

##### Cost dels equips de la indústria

Taula 8. Cost dels equips de la indústria.

Equip	Preu unitari	Unitats	Preu total
Tanc de mescla	8.000,00 €	2	16.000,00 €
Dispensador en línia	35.000,00 €	1	35.000,00 €
Homogeneïtzador d'altres pressions	130.000,00 €	1	130.000,00 €
Envasadora automàtica	70.000,00 €	1	70.000,00 €
Càmera frigorífica	10.000,00 €	1	10.000,00 €
Dipòsit	6.000,00 €	2	12.000,00 €
Intercambiador de calor	5.000,00 €	1	5.000,00 €
Sistemes de refrigeració	4.000,00 €	1	4.000,00 €
Bomba d'alimentació	2.500,00 €	2	5.000,00 €
Dipòsit intermig	1.000,00 €	2	2.000,00 €
Insatl·lació elèctrica	20.000,00 €	1	20.000,00 €
Mobiliari	10.000,00 €	1	10.000,00 €
		Cost total	<b>319.000,00 €</b>

##### Total inversió inicial

Taula 9. Inversió inicial total.

INVERSIÓ INICIAL	
Concepte	Import
Parcel·la i nau	119.500 €
Equips	319.000,00 €
TOTAL (SENSE IVA)	438.500 €
IVA (21%)	92.085 €
TOTAL	<b>530.585 €</b>

### 6.3.2. Pagaments ordinaris

#### Matèria prima

Com que sabem el % de la composició del producte podem saber la quantitat de matèria prima necessària per la seva elaboració. Per l'àcid cítric es considera entre 0,5 kg i 1,5 kg per a cada tanc de mescla.

Taula 10. Pagaments ordinaris de la matèria prima.

MP	Quantitat (kg/L)	Preu/L-kg	Cost
Aigua purificada	1398600	0,20 €	279.720,00 €
Proteïna de patata	26400	10,00 €	264.000,00 €
Oli de gira-sol enriquit amb $\beta$ -carotè	75000	2,50 €	187.500,00 €
Acid cítric	4500	2,00 €	9.000,00 €
		Total	740.220,00 €

#### Envasos i embalatges

Taula 11. Pagaments ordinaris d'envasos i embalatges.

Material	Quantitat	Cost unitat	Coste material
Envasos "bag-in-box"	75000	0,30 €	22.500,00 €
Etiquetes	75000	0,05 €	3.750,00 €
Palets fusta	1500	7,00 €	10.500,00 €
		Total	36.750,00 €

#### Mà d'obra

Taula 12. Pagaments ordinaris de mà d'obra.

Mà d'obra	Quantitat	Cost unitat brut	Cost mà
Gerent	1	40.000,00 €	40.000,00 €
Tècnics	1	36.400,00 €	36.400,00 €
Operaris	4	27.300,00 €	109.200,00 €
Administratiu	1	27.300,00 €	27.300,00 €
Neteja	1	26.000,00 €	26.000,00 €
		Total	238.900,00 €

## Consum d'aigua i d'energia elèctrica

S'estima 500 litres d'aigua al dia de servei i neteja. Si tenim en compte que el preu és de 12.59 €/any per servei i tarifa de 0.69 €/m<sup>3</sup> per consum d'aigua (Font: Tarifes AquaVall, 2021), en total, el valor anual serà de:

$$\text{Cost aigua} = 12,59\text{€} + \left( \frac{1500000\text{l}}{\text{any}} \cdot \frac{0,001\text{m}^3}{1\text{l}} \cdot \frac{0,69\text{€}}{\text{m}^3} \right) = 1035 \text{€ any}$$

Per la potència consumida s'ha tingut en compte tots els equips de la indústria i s'ha sumat un 5% del consum de la il·luminació de la nau.

Potència consumida per hora	Energia elèctrica consumida per jornada laboral (8 hores)	Consum anual d'energia elèctrica (TOTAL)
110,04 kW	880,32 kWh	220.080 kWh

Taula 13. Pagaments ordinaris de consum d'aigua i energia elèctrica.

Material	Quantitat (kWh)	Cost	Cost consum
Energia elèctrica consumida	220080	0,23 €	51.278,64 €
Aigua neteja i rentat			1.035,00 €
		Total	52.313,64 €

## Resum pagaments

Taula 14. Pagaments ordinaris totals.

Pagaments totals	
MP	740.220,00 €
Mà d'obra	238.900,00 €
Envasos i embalatges	36.750,00 €
Electricitat i aigua	52.313,64 €
Total	1.068.183,64 €

### 6.3.3. Cobraments ordinaris

Els cost de producció per un litre de nanoemulsió es de 0,90 euros. Si volem un marge de benefici del 10%:

Preu de venda =  $0,71 \text{€} / (1 - 0,10) = 0,79 \text{€}$  per litre.

És suposa que la indústria els primers dos anys aconseguix un 15% menys d'ingressos fins que s'adapta al tercer any al mercat amb el 100% dels cobraments a partir d'aquest.

Taula 15. Cobraments ordinaris totals.

Producte	L/any	Preu/kg	Cobraments	Cobraments 1-2 any	Cobraments 3 any
Nanoemulsions	1.500.000	0,79 €	1.185.000,00 €	1.007.250,00 €	1.185.000,00 €
		Total	1.185.000,00 €		

### 6.3.4. Fluxos de caixa

Per analitzar la rendibilitat, prèviament es determina el flux de pagament i cobraments, per posteriorment determinar els indicadors de rendibilitat del projecte. Per al flux de caixa actualitzat, s'ha aplicat una taxa de descompte del 4%, ja que es l'habitual en aquest tipus de indústries.

Taula 16. Fluxos de caixa, flux de caixa actualitzat i flux de caixa actualitzat i acumulat.

Any	Cobraments	Pagaments	Flux de caixa	Flux de caixa actualitzat	Flux de caixa actualitzat i acumulat
0		530.585,00 €	- 530.585,00 €	- 530.585,00 €	- 530.585,00 €
1	1.007.250,00 €	1.068.183,64 €	- 60.933,64 €	- 58.590,04 €	- 589.175,04 €
2	1.007.250,00 €	1.068.183,64 €	- 60.933,64 €	- 56.336,58 €	- 645.511,61 €
3	1.185.000,00 €	1.068.183,64 €	116.816,36 €	103.849,32 €	- 541.662,30 €
4	1.185.000,00 €	1.068.183,64 €	116.816,36 €	99.855,11 €	- 441.807,18 €
5	1.185.000,00 €	1.068.183,64 €	116.816,36 €	96.014,53 €	- 345.792,65 €
6	1.185.000,00 €	1.068.183,64 €	116.816,36 €	92.321,67 €	- 253.470,98 €
7	1.185.000,00 €	1.068.183,64 €	116.816,36 €	88.770,83 €	- 164.700,15 €
8	1.185.000,00 €	1.068.183,64 €	116.816,36 €	85.356,57 €	- 79.343,58 €
9	1.185.000,00 €	1.068.183,64 €	116.816,36 €	82.073,63 €	2.730,05 €
10	1.185.000,00 €	1.068.183,64 €	116.816,36 €	78.916,95 €	81.646,99 €
11	1.185.000,00 €	1.068.183,64 €	116.816,36 €	75.881,68 €	157.528,67 €
12	1.185.000,00 €	1.068.183,64 €	116.816,36 €	72.963,15 €	230.491,83 €
13	1.185.000,00 €	1.068.183,64 €	116.816,36 €	70.156,88 €	300.648,71 €
14	1.185.000,00 €	1.068.183,64 €	116.816,36 €	67.458,54 €	368.107,24 €
15	1.185.000,00 €	1.068.183,64 €	116.816,36 €	64.863,98 €	432.971,22 €
16	1.185.000,00 €	1.068.183,64 €	116.816,36 €	62.369,21 €	495.340,43 €
17	1.185.000,00 €	1.068.183,64 €	116.816,36 €	59.970,39 €	555.310,82 €
18	1.185.000,00 €	1.068.183,64 €	116.816,36 €	57.663,84 €	612.974,66 €
19	1.185.000,00 €	1.068.183,64 €	116.816,36 €	55.446,00 €	668.420,66 €
20	1.185.000,00 €	1.068.183,64 €	116.816,36 €	53.313,46 €	721.734,13 €

### 6.3.5. Indicadors de rentabilitat

#### Valor actual net (VAN)

$$VAN = -I_0 + \frac{FC_1}{(1+i)^1} + \frac{FC_2}{(1+i)^2} + \dots + \frac{FC_n}{(1+i)^n}$$

On:

- FC<sub>n</sub>: fluxos de caixa de cada any útil de la inversió
- I<sub>0</sub>: inversió inicial
- n: nombre d'anys
- i: taxa d'actualització

Després de calcular el valor:

- Si VAN > 0, la suma de cobraments actualitzats és més gran que la suma dels pagaments actualitzats (inclosa la inversió) considerant la vida útil del projecte.
- Si VAN = 0, els cobraments actualitzats i acumulats generats són iguals als pagaments actualitzats i acumulats (incloent-hi la inversió).
- Si VAN < 0, el flux de caixa actualitzat i acumulat generat per la inversió es negatiu.

$$VAN = 721.734,13 \text{ €}$$

Per tant, es pot concloure que l'avantprojecte és viable, ja que el VAN > 0.

#### Taxa interna de retorn (TIR)

La taxa interna de retorn (TIR) és la taxa d'interès o rendibilitat que ofereix l'inversió. Es calcula mitjançant la següent expressió:

$$VAN = -I_0 + \sum_{t=1}^n \frac{F_t}{(1+TIR)^t} = -I_0 + \frac{F_1}{(1+TIR)^1} + \frac{F_2}{(1+TIR)^2} + \dots + \frac{F_n}{(1+TIR)^n}$$

On:

- I<sub>0</sub>: inversió realitzada al moment inicial
- F<sub>t</sub>: fluxos de caixa de cada any

- n: nombre d'anys

$$\text{TIR} = 13\%$$

A partir del valor calculat s'extreu la conclusió que la inversió en el projecte és rendible, ja que el TIR és superior a l'interès ofert pels bancs.

### **Termini de recuperació**

El termini de recuperació es defineix com el període de temps necessari per recuperar la inversió inicial realitzada.

A la vista dels resultats obtinguts a la taula 11, el termini de recuperació de la inversió inicial serà de 9 anys.

#### **6.4. CONCLUSIÓ RENDIBILITAT I VIABILITAT**

A la vista dels resultats obtinguts, s'arriba a la conclusió que, considerant un període de vida útil de 20 anys, la construcció i la posada en marxa d'aquesta indústria és rendible i viable, per tant, es podria recomanar la inversió en aquesta.

- El valor del VAN és positiu (VAN=721.734,13 €). Així doncs, l'empresa generarà beneficis.
- El valor del TIR és del 13%, valor superior al tipus d'interès ofert pels bancs.
- El termini de recuperació de la inversió inicial és de 9 anys.

Tot i això, destacar que es tracta d'un estudi de viabilitat previ que, en cas de voler seguir endavant amb el projecte, requeriria d'un estudi tècnic i econòmic molt més detallat.



## 7. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, S., Hayat, K., Karangwa, E., Bashari, M., & Zhang, X. (2013). An Overview of Ultrasound-Assisted Food-Grade Nanoemulsions. In *Food Engineering Reviews* (Vol. 5, Issue 3, pp. 139–157). <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9066-3>
- Bártová, V., Bárta, J., Vlačihová, A., Šedo, O., Zdráhal, Z., Konečná, H., Stupková, A., & Švajner, J. (2018). Proteomic characterization and antifungal activity of potato tuber proteins isolated from starch production waste under different temperature regimes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(24), 10551–10560. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9373-y>
- Bashash, M., Wang-Pruski, G., He, Q. S., & Sun, X. (2024). The emulsifying capacity and stability of potato proteins and peptides: A comprehensive review. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 23, Issue 5). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.70007>
- Biroun, M. H., Rahmati, M., Tao, R., Torun, H., Jangi, M., & Fu, Y. (2020). Dynamic Behavior of Droplet Impact on Inclined Surfaces with Acoustic Waves. *Langmuir*, *36*(34), 10175–10186. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c01628>
- Bohn, T., Desmarchelier, C., Dragsted, L. O., Nielsen, C. S., Stahl, W., Rühl, R., Keijer, J., & Borel, P. (2017). Host-related factors explaining interindividual variability of carotenoid bioavailability and tissue concentrations in humans. In *Molecular Nutrition and Food Research* (Vol. 61, Issue 6). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600685>
- Calero, N., Muñoz, J., & Guerrero, A. (2013). Efecto del pH en emulsiones o/w formuladas con proteína de patata y quitosano. *Grasas y Aceites*, *64*(1), 15–21. <https://doi.org/10.3989/gya.070812>
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, *23*(6), 1473–1482. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.08.005>
- Dickinson, E. (2010). Food emulsions and foams: Stabilization by particles. In *Current Opinion in Colloid and Interface Science* (Vol. 15, Issues 1–2, pp. 40–49). <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.001>
- Dickinson, E. (2011). Mixed biopolymers at interfaces: Competitive adsorption and multilayer structures. *Food Hydrocolloids*, *25*(8), 1966–1983. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.12.001>
- Food Emulsions Principles, Practices, and Techniques Second Edition*. (n.d.).
- Guerra-Rosas, M. I., Morales-Castro, J., Ochoa-Martínez, L. A., Salvia-Trujillo, L., & Martín-Belloso, O. (2016). Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. *Food Hydrocolloids*, *52*, 438–446.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.017>

- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 22, Issue 7, pp. 1191–1202). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.09.006>
- Kaulmann, A., & Bohn, T. (2014). Carotenoids, inflammation, and oxidative stress-implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. In *Nutrition Research* (Vol. 34, Issue 11, pp. 907–929). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2014.07.010>
- Kentish, S., Wooster, T. J., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R., & Simons, L. (2008). The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.07.005>
- Khan, N. M., Mu, T. H., Ali, F., Arogundade, L. A., Khan, Z. U., Zhang, M., Ahmad, S., & Sun, H. N. (2015). Effects of high hydrostatic pressure on emulsifying properties of sweet potato protein in model protein-hydrocolloids system. *Food Chemistry*, 169, 448–454. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.013>
- Li, Y., Jin, H., Sun, X., Sun, J., Liu, C., Liu, C., & Xu, J. (2019). Physicochemical properties and storage stability of food protein-stabilized nanoemulsions. *Nanomaterials*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/nano9010025>
- Liu, Q., Huang, H., Chen, H., Lin, J., & Wang, Q. (2019). Food-grade nanoemulsions: Preparation, stability and application in encapsulation of bioactive compounds. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 23). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24234242>
- Maiani, G., Castón, M. J. P., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I. G., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behnlian, D., & Schlemmer, U. (2009). Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. In *Molecular Nutrition and Food Research* (Vol. 53, Issue SUPPL. 2, pp. 194–218). <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800053>
- McClements, D. J. (2004). Protein-stabilized emulsions. In *Current Opinion in Colloid and Interface Science* (Vol. 9, Issue 5, pp. 305–313). <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.09.003>
- McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: Fabrication, properties, and functional performance. In *Soft Matter* (Vol. 7, Issue 6, pp. 2297–2316). <https://doi.org/10.1039/c0sm00549e>
- McClements, D. J. (2018). The biophysics of digestion: lipids. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 21, pp. 1–6). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.03.009>
- McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. In *1270 JOURNAL OF FOOD SCIENCE* (Vol. 65, Issue 8).

- McClements, D. J., & Gumus, C. E. (2016). Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 234, pp. 3–26). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.03.002>
- Palozza, P., Serini, S., Di Nicuolo, F., Piccioni, E., & Calviello, G. (2003). Prooxidant effects of  $\beta$ -carotene in cultured cells. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 24, Issue 6, pp. 353–362). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00031-1](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00031-1)
- Pęksa, A., & Miedzianka, J. (2021). Potato industry by-products as a source of protein with beneficial nutritional, functional, health-promoting and antimicrobial properties. In *Applied Sciences (Switzerland)* (Vol. 11, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/app11083497>
- Pęksa, A., Miedzianka, J., & Nemš, A. (2018). Amino acid composition of flesh-coloured potatoes as affected by storage conditions. *Food Chemistry*, 266, 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.026>
- Pęksa, A., Miedzianka, J., Nemš, A., & Rytel, E. (2021). The free-amino-acid content in six potatoes cultivars through storage. *Molecules*, 26(5). <https://doi.org/10.3390/molecules26051322>
- Pęksa, A., Rytel, E., Kita, A., Lisiiska, G., & Tajner-Czopek, A. (n.d.). *The Properties of Potato Protein*.
- Qian, C., & McClements, D. J. (2011). 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>
- Ralet, M. C., & Guéguen, J. (2000). Fractionation of Potato Proteins: Solubility, Thermal Coagulation and Emulsifying Properties. *LWT*, 33(5), 380–387. <https://doi.org/10.1006/fstl.2000.0672>
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E., & Miller, R. (2009). Lipases at interfaces: A review. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vols. 147–148, Issue C, pp. 237–250). <https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.06.001>
- Rodriguez-Concepcion, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-Mendez, D., Limon, M. C., Meléndez-Martínez, A. J., Olmedilla-Alonso, B., Palou, A., Ribot, J., Rodrigo, M. J., Zacarias, L., & Zhu, C. (2018). A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. In *Progress in Lipid Research* (Vol. 70, pp. 62–93). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.004>
- Salvia-Trujillo, L., Artiga-Artigas, M., Molet-Rodríguez, A., Turmo-Ibarz, A., & Martín-Belloso, O. (2018). Emulsion-Based Nanostructures for the Delivery of Active Ingredients in Foods. In *Frontiers in Sustainable Food Systems* (Vol. 2). Frontiers Media S.A.

<https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00079>

- Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O., & McClements, D. J. (2013). Influence of particle size on lipid digestion and  $\beta$ -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., Soliva-Fortuny, R., Rojas-Graü, M. A., McClements, D. J., & Martín-Belloso, O. (2017). Edible Nanoemulsions as Carriers of Active Ingredients: A Review. In *Annual Review of Food Science and Technology* (Vol. 8, pp. 439–466). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025908>
- Salvia-Trujillo, L., Verkempinck, S. H. E., Sun, L., Van Loey, A. M., Grauwet, T., & Hendrickx, M. E. (2017). Lipid digestion, micelle formation and carotenoid bioaccessibility kinetics: Influence of emulsion droplet size. *Food Chemistry*, *229*, 653–662. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.146>
- Schmitt, C., & Turgeon, S. L. (2011). Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 167, Issues 1–2, pp. 63–70). <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.10.001>
- Sidhu, J. S., Kabir, Y., & Huffman, F. G. (2007). Functional foods from cereal grains. *International Journal of Food Properties*, *10*(2), 231–244. <https://doi.org/10.1080/10942910601045289>
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., & Garcia-Celma, M. J. (2005). Nano-emulsions. In *Current Opinion in Colloid and Interface Science* (Vol. 10, Issues 3–4, pp. 102–110). <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.06.004>
- Straetkvern, K. O. (n.d.). *Industrial Proteins from Potato Juice. A Review*. <https://www.researchgate.net/publication/278302855>
- Teo, A., Goh, K. K. T., Wen, J., Oey, I., Ko, S., Kwak, H. S., & Lee, S. J. (2016). Physicochemical properties of whey protein, lactoferrin and Tween 20 stabilised nanoemulsions: Effect of temperature, pH and salt. *Food Chemistry*, *197*, 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.086>
- Troncoso, E., Aguilera, J. M., & McClements, D. J. (2012). Influence of particle size on the in vitro digestibility of protein-coated lipid nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, *382*(1), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.05.054>
- Van Koningsveld, G. A., Gruppen, H., De Jongh, H. H. J., Wijngaards, G., Van Boekel, M. A. J. S., Walstra, P., & Voragen, A. G. J. (2001). Effects of pH and heat treatments on the structure and solubility of potato proteins in different preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(10), 4889–4897. <https://doi.org/10.1021/jf010340j>
- Van Koningsveld, G. A., Walstra, P., Voragen, A. G. J., Kuijpers, I. J., Van Boekel, M. A. J. S., & Gruppen, H. (2006). Effects of protein composition and enzymatic activity on formation and

properties of potato protein stabilized emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6419–6427. <https://doi.org/10.1021/jf061278z>

Waglay, A., & Karboune, S. (2017). A novel enzymatic approach based on the use of multi-enzymatic systems for the recovery of enriched protein extracts from potato pulp. *Food Chemistry*, 220, 313–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.147>

Waglay, A., & Karboune, S. (2020). Predictive Consumer Acceptance Models and Quality Attributes for Cookies Enriched with Potato Protein Isolate and Concentrate. *Food and Bioprocess Technology*, 13(9), 1645–1660. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02508-8>

Waglay, A., Karboune, S., & Alli, I. (2014). Potato protein isolates: Recovery and characterization of their properties. *Food Chemistry*, 142, 373–382. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.060>

Walstra, Pieter. (2003). *Physical chemistry of foods*. Marcel Dekker.

Wooster, T. J., Golding, M., & Sanguansri, P. (2008). Impact of oil type on nanoemulsion formation and ostwald ripening stability. *Langmuir*, 24(22), 12758–12765. <https://doi.org/10.1021/la801685v>

Ziani, K., Chang, Y., McLandsborough, L., & McClements, D. J. (2011). Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 6247–6255. <https://doi.org/10.1021/jf200450m>