

ANÀLISI DE L'ESTABILITAT DE L'ENCAPSULACIÓ DE POLIFENOLS DE GARROFA PER EMULSIÓ DOBLE

Treball de fi de grau

Dirigit per Carme Güell Saperas

Grup FoodIE

ARIADNA PIÉ PORTA

GRAU DE BIOTECNOLOGIA, UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
Tarragona, Juny 2018

Aquest projecte s'ha dut a terme en l'estada de pràctiques en el grup d'investigació Food Innovation and Engineering (FoodIE) de la Universitat Rovira i Virgili entre l'abril i el juny de 2018.

M'agradaria donar les gràcies a tot el grup de recerca FoodIE per tota l'ajuda, consells i companyerisme en la meva estada de pràctiques. També vull agrair especialment la Doctora Carme Güell per permetre'm dur a terme aquesta estada i per aconsellar-me tant en la part experimental com en el treball escrit. Per acabar, m'agradaria fer especial esment a la doctorand Junjing Wang, amb qui he compartit tota l'estada de pràctiques i que m'ha fet de mestra i d'amiga.

0. ÍNDEX

1. RESUM	1
2. INTRODUCCIÓ	2
2.1. Valorització de la polpa de garrofa.....	2
2.2. Limitacions dels polifenols	3
2.3. Encapsulació dels polifenols	3
2.4. Encapsulació de polifenols en emulsions.....	3
2.4.1. Emulsions dobles.....	4
2.5. Emulsificants	5
2.6. Llit empackat.....	5
3. HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	6
4. MATERIALS I MÈTODES	7
4.1. Extracció i concentració dels polifenols de garrofa	7
4.1.1. Extracció dels polifenols	7
4.1.2. Concentració dels polifenols	7
4.2. Emulsió doble.....	8
4.2.1. Procediment experimental de l'obtenció de l'emulsió doble.....	9
4.2.2. Flux.....	9
4.3. Seguiment de la mostra	10
4.4. Anàlisi macroscòpica	11
4.5. Anàlisi microscòpica.....	11
4.6. Anàlisi de mida de gota per difracció làser.....	12
4.7. Anàlisi d'encapsulació/alliberament de polifenols	14
4.7.1. Determinació de polifenols en W2	14
4.7.2. Anàlisi de polifenols totals per reactiu Folin-Ciocalteau	15
4.8. Ajust de pressió osmòtica	16

5. RESULTATS	17
5.1. Procés d'emulsificació.....	17
5.1.1. Flux.....	17
5.1.2. Evolució de la mida de gota.....	19
5.1.3. Anàlisi d'encapsulació/alliberament de polifenols	21
5.2. Evolució de les emulsions durant 14 dies.....	22
5.2.1. Anàlisi macroscòpica	22
5.2.2. Anàlisi microscòpica	24
5.2.3. Evolució de mida de gota.....	26
5.2.4. Evolució d'encapsulació/alliberament de polifenols	28
5.3. Emulsió amb la pressió osmòtica de W ₂ ajustada.....	30
5.3.1. Procés d'emulsificació	30
5.3.2. Evolució de les emulsions durant 14 dies	31
6. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS	33
7. CONCLUSIONS	34
8. BIBLIOGRAFIA	35
Annex 1.....	37
Annex 2.....	40
Annex 3.....	43
Annex 4.....	43
Annex 5.....	44

1. RESUM

La polpa de la garrofa és un producte ric en polifenols, molècules amb propietats bioactives i antioxidants. Els antioxidants fenòlics prevenen el dany oxidatiu, que està considerat un dels factors principals de malalties degeneratives com ara càncer, diabetis o Alzheimer. Per aquest motiu, la indústria alimentària aprecia aquest producte com a possible additiu en aliments funcionals.

Els polifenols són poc solubles i romanen poc temps en el tracte gastrointestinal, fets que els fa esdevenir poc biodisponibles. A més, són sensibles a la llum. És per això que s'han desenvolupat diverses tècniques per a protegir-los i allargar-ne la vida útil. En concret, en aquest treball es presenta l'encapsulació de polifenols mitjançant emulsions dobles produïdes combinant agitació mecànica i emulsificació amb sistemes microestructurats. L'emulsió doble consisteix en gotes de la fase aquosa de reconcentrat de polifenols dispersa dins d'una fase oli, que es troba, al seu torn, en forma de gotes dispersa en una fase aquosa contínua. L'objectiu de l'experimentació és obtenir unes emulsions dobles estables, en què els polifenols es mantinguin encapsulats dins de la primera fase aquosa al llarg del temps. Per a assolir la màxima estabilitat de les emulsions s'estudien tres emulsificants diferents: proteïna de sèrum de llet, Tween 20 i caseïnat de sodi.

Un mètode prometedor per a estabilitzar les emulsions és el pas d'aquestes a través d'un llit empaquetat: una membrana dinàmica formada per esferes micromètriques de vidre i suportada per una membrana de níquel. Entre les esferes quedaran uns canals micromètrics per on passarà l'emulsió i les gotes d'oli es trencaran de tal manera que en resultarà una emulsió monodispersa (amb mides de gota molt semblants) i, per tant, homogènia i desitjablement més estable. Es farà el seguiment de les mostres durant 14 dies per poder avaluar l'evolució de les emulsions i, sobretot, la relació encapsulació/alliberament de polifenols i determinar quines són les millors condicions d'emulsificació.

2. INTRODUCCIÓ

2.1. Valorització de la polpa de garrofa

La garrofa prové de l'arbre mediterrani *Ceratonia siliqua* L., de la família de les Fabàcies, típic de països amb climes temperats com Espanya, Itàlia, Portugal i el Marroc. Les baines i llavors del garrofer s'utilitzen en la indústria alimentària, farmacèutica i cosmètica (Benković, Belščak-Cvitanović, Bauman, Komes, & Srećec, 2017). Estan compostes per hidrats de carboni, fibra i una important fracció fenòlica que conté tanins solubles i insolubles, flavonols i àcid gàl·lic.

Les llavors de la garrofa representen el aproximadament 10% del pes del fruit i es processen industrialment trencant la baina, sotmetent-les a un procés de tamisat i a operacions de fresat per aïllar i moldre els endospermes, que són venuts com a farina crua. El producte que s'obté és la goma de garrofi (E410) que s'afegeix a una gran varietat de productes com a espessidor natural, estabilitzador o saboritzant (Prajapati, Jani, Moradiya, Randeria, & Nagar, 2013).

Per altra banda, la polpa de les baines de garrofa es caracteritza per la seva composició alta en sucres (40-50% principalment sacarosa), baixa en proteïnes (3-4%) i lípids (0.4-0.8%). Per això, la farina de polpa garrofa, s'utilitza en la indústria alimentària com a edulcorant natural en pastisseria. També conté minerals (Fe, Na, Ca, K, P i S) i vitamines (E, D, C, Niacina, B6 i àcid fòlic) (Sęczyk, Wieca, and Gawlik-Dziki 2016).

La polpa de garrofa també és coneguda pel seu alt contingut en polifenols i les seves propietats bioactives, sobretot, l'antioxidant. Els antioxidants fenòlics prevenen el dany oxidatiu de biomolècules importants com l'ADN, proteïnes i lípids. El dany oxidatiu és considerat un dels principals factors que influeixen en malalties degeneratives com ara càncer, o malalties inflamatòries, cardiovasculars i neurodegeneratives, diabetis o Alzheimer (Lu, Kelly, & Miao, 2016). Per tant, els polifenols de garrofa podrien ser uns bons enriquidors d'aliments funcionals o nutracèutics amb propietats antioxidants (Benković et al., 2017; Onwulata, 2013).

2.2. Limitacions dels polifenols

Encara que els polifenols gaudeixin de propietats tant desitjables per a la salut, se'n coneixen algunes limitacions tecnològiques: (i) poca solubilitat en aigua, que indueix a la baixa biodisponibilitat; (ii) inestabilitat sota exposició a la llum i/o certes condicions de pH; (iii) poca absorció oral i gastrointestinal (a causa de la degradació, la baixa permeabilitat o el metabolisme ràpid) i (iv) una vida mitjana molt curta i una eliminació ràpida del cos. Tots aquests factors comporten una pèrdua de biodisponibilitat d'aquests compostos i, per tant, una reducció dels beneficis per a la salut (Lu et al., 2016).

2.3. Encapsulació dels polifenols

A causa de les seves característiques i limitacions, s'han desenvolupat diverses tècniques d'encapsulació per a la protecció dels polifenols. Les més comunes per a fer-ho són l'assecat per l'atomització, l'encapsulació mitjançant emulsions, liposomes, micel·les, nanopartícules, l'assecat per congelació i la criocrystal·lització (McClements, 2010). Aquestes tecnologies persegueixen una alta eficiència d'encapsulació, el manteniment de l'estabilitat química de les molècules encapsulades (Klinkesorn, Sophanodora, Chinachoti, McClements, & Decker, 2005) i una alliberació controlada dels polifenols (Mao, Roos, O'Callaghan, & Miao, 2013). De fet, alguns polifenols encapsulats en emulsions presenten fins i tot més activitat biològica que les molècules lliures (Wang et al., 2008).

2.4. Encapsulació de polifenols en emulsions

Les emulsions consisteixen en la dispersió dos líquids immiscibles en forma de petites gotes. Els líquids solen ser oli i aigua combinats amb emulsificants. Les emulsions es poden classificar en funció de la distribució espacial relativa de les dues fases. D'aquesta manera, en un sistema que contingui gotes d'oli dispersades en la fase aquosa, parlarem d'oli-en-aigua (*O/W*), per exemple la llet; si el sistema consisteix en gotes de fase aquosa disperses en fase oli parlarem d'aigua-en-oli (*W/O*), per exemple la mantega (McClements, 2010, 2012; Norton, Gonzalez Espinosa, Watson, Spyropoulos, & Norton, 2015).

L'objectiu principal de les emulsions és garantir la protecció dels compostos que es troben a l'interior en forma de gotes de les condicions ambientals adverses, sobretot les següents: (i) protegir el material interior de la degradació, reduint-ne la reactivitat amb l'ambient, per exemple protegint-lo enfront de l'oxigen; (ii) reduir l'evaporació o la transferència del material interior cap a l'ambient; (iii) modificar les propietats físiques del material original per a poder-lo treballar millor; (iv) reduir l'alliberament del material interior o controlar-lo perquè aquest alliberament tingui lloc en un moment determinat; (v) emmascarar el gust o aroma indesitjable del material interior; (vi) diluir el material interior, si és el cas, quan fan falta quantitats molt petites amb una dispersió uniforme i (vii) ajudar a separar els components d'una barreja que, d'una altra manera, reaccionarien els uns amb els altres (Fang & Bhandari, 2010). D'aquesta manera es pretén aconseguir l'increment de la vida útil del producte i controlar l'alliberament del material encapsulat. Les emulsions simples (oli-en-aigua o aigua-en-oli) són molt útils, però la tecnologia de les emulsions dobles pot suposar encara més beneficis.

2.4.1. Emulsions dobles

Les emulsions dobles es constitueixen d'una emulsió simple dispersa en una altra fase externa. Per tant, quan es parla d'aigua-en-oli-en-aigua ($W_1/O/W_2$), es fa referència a petites gotes d'aigua (W_1) contingudes en gotes d'oli més grans (O), que estan disperses en una fase aquosa contínua (W_2). Igual que les emulsions simples, pretenen protegir les molècules que encapsulen (Lu et al., 2016).

Desafortunadament, aquests sistemes són bastant inestables. És possible que les molècules encapsulades en la fase W_1 s'escapin de manera irreversible a la fase d'aigua externa durant la producció o l'emmagatzematge (Schuch, Deiters, Henne, Köhler, & Schuchmann, 2013). Aquest alliberament pot estar causat pel trencament de les gotes internes i/o per la diferència de la pressió osmòtica entre dins i fora de les gotes d'oli. Per evitar l'alliberament i fomentar l'estabilitat de les emulsions s'utilitzen diversos tipus de molècules i tècniques. Les més comunes són els emulsificants.

2.5. Emulsificants

Els emulsificants són dels estabilitzadors més importants que es poden fer servir en formació d'emulsions. A més d'estabilitzar emulsions, la naturalesa dels emulsificants també determina les característiques del producte final. Per això, és important seleccionar l'apropiat per a cada tipus d'emulsió. Normalment els emulsificants són molècules amfifíliques que tenen tant part hidrofòbica com hidrofílica en la mateixa molècula, com ara tensioactius, fosfolípids, proteïnes, polisacàrids i altres polímers amb superfície activa (McClements, 2010).

2.6. Llit empackat

Les emulsions dobles produïdes per sistemes d'agitació solen estar formades per gotes de mides diferents, que seran més propenses a fenòmens de coalescència, floculació o separació de fases, en definitiva seran propenses a desestabilitzar-se. Una tècnica prometedora per a refinar emulsions és fer passar diverses vegades la pre-emulsió (emulsió obtinguda després del procés d'agitació) a través d'un sistema microestructurat: membrana o llit empackat. El llit empackat que s'utilitza en aquest treball és un sistema format per esferes de silici, que conformen microcanals entre elles, per on passa l'emulsió. La petita mida d'aquests canals promou el trencament de l'emulsió per a obtenir una emulsió monodispersa, qualitat que li confereix estabilitat. (Nazir, Boom, & Schroën, 2013). L'avantatge d'aquest tipus de sistema és que una vegada acabat el procés d'emulsificació, el mòdul del llit empackat pugui ser separat, netejat i reutilitzat (Sahin, Sawalha, & Schroën, 2014).

El mòdul de llit empackat que s'ha emprat es presenta de forma esquemàtica en la Figura 1, on es mostra des del tanc on s'introdueix l'emulsió abans de començar cada cicle (pas de l'emulsió a través del llit empackat), l'entrada de nitrogen que pressuritza sistema i un esquema ampliat del llit empackat i la membrana de níquel, amb l'emulsió passant-hi a través. El sistema disposa també d'una balança electrònica, on es situa el recipient per a recollir la mostra, connectada a un ordinador per a recollir els valors de massa en el flux de sortida.

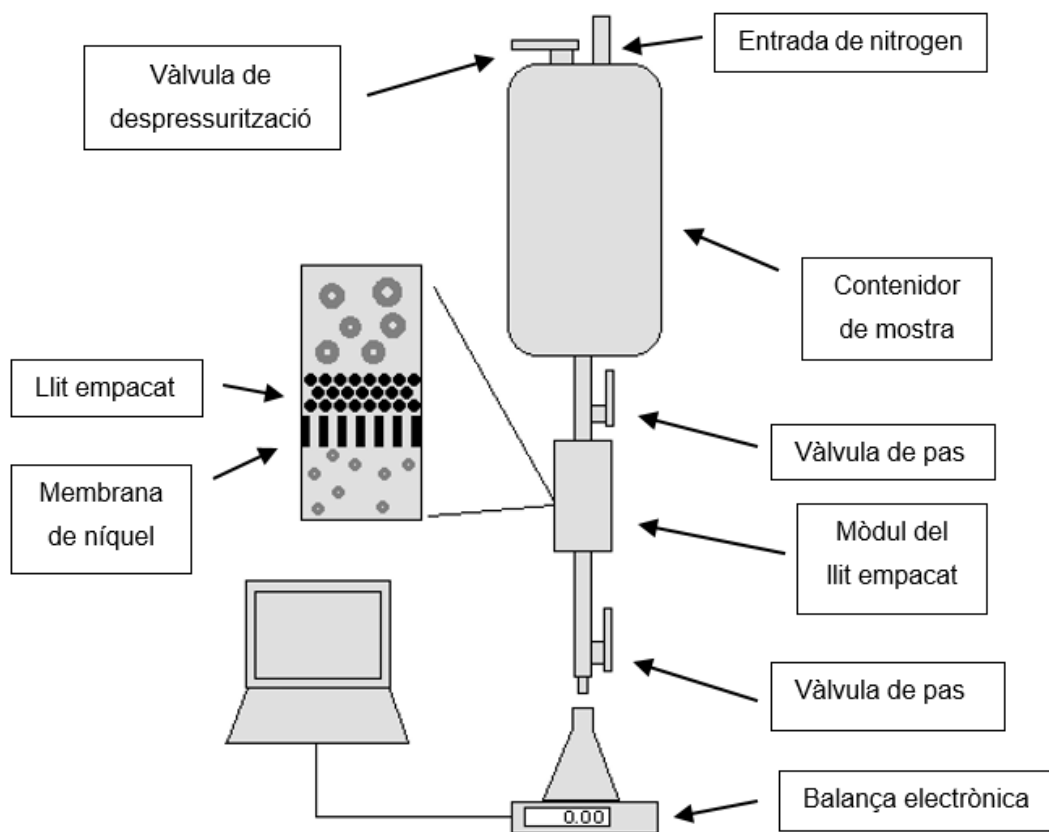


Figura 1: Mòdul complet del llit empackat.

3. HIPÒTESI I OBJECTIUS

La valorització de polpa de garrofa permet obtenir extractes de polifenols, apreciats en indústria alimentària. Els extractes de polifenols comporten limitacions tecnològiques com la inestabilitat sota exposició a la llum per això és recomanable encapsular-los. Les emulsions són un bon mètode d'encapsulació però sovint comporten un alt cost energètic. Es poden aplicar tecnologies energèticament més eficients a les convencionals per a obtenir emulsions dobles com a forma d'encapsulació.

Per tant, l'objectiu d'aquest treball és estudiar l'encapsulació de polifenols de garrofa en emulsions dobles obtingudes mitjançant emulsificació per baixa energia i amb un sistema microestructurat.

4. MATERIALS I MÈTODES

4.1. Extracció i concentració dels polifenols de garrofa

4.1.1. Extracció dels polifenols

L'extracte de la garrofa ha estat proporcionat per Unió Corporació Alimentària. Tal com es mostra en la Figura 2, s'han realitzat dues extraccions amb aigua per extreure els sucres: la primera, a temperatura propera a l'ambient i la segona, a temperatura entre 60-80 °C. Com a producte final, s'ha obtingut una solució que conté un menor percentatge en sucres i una alta presència de polifenols.

4.1.2. Concentració dels polifenols

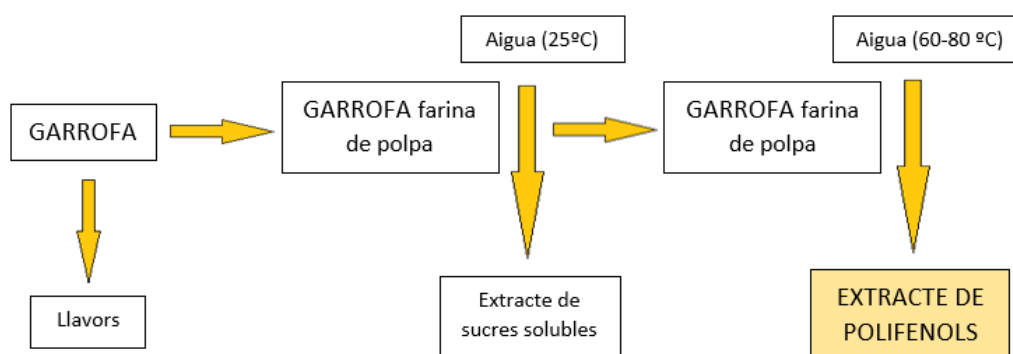


Figura 2: Diagrama del procés d'obtenció de l'extracte de garrofa

La concentració de l'extracte de polifenols de garrofa s'aconsegueix utilitzant l'equip d'osmosi directa "Ederna evapEOs – FO Mode. Micro pilot unit", proporcionada per Ederna SAS, Toulouse (Figura 3) i el duu a terme el grup FoodIE al laboratori.

L'equip consisteix en un contenidor de la mostra amb controlador de temperatura, connectat a una bomba que permet que la mostra es posi en contacte amb la membrana semipermeable i interaccioni amb la solució osmòtica. Aquesta membrana és permeable a l'aigua, que difon des de l'extracte (amb menor pressió osmòtica) cap a la solució osmòtica (amb major pressió osmòtica). D'aquesta manera l'extracte es va concentrant. L'experimentació que es presenta s'ha fet amb un reconcentrat de l'extracte, que s'ha sotmès a dues concentracions successives degut a les limitacions de l'equip experimental.

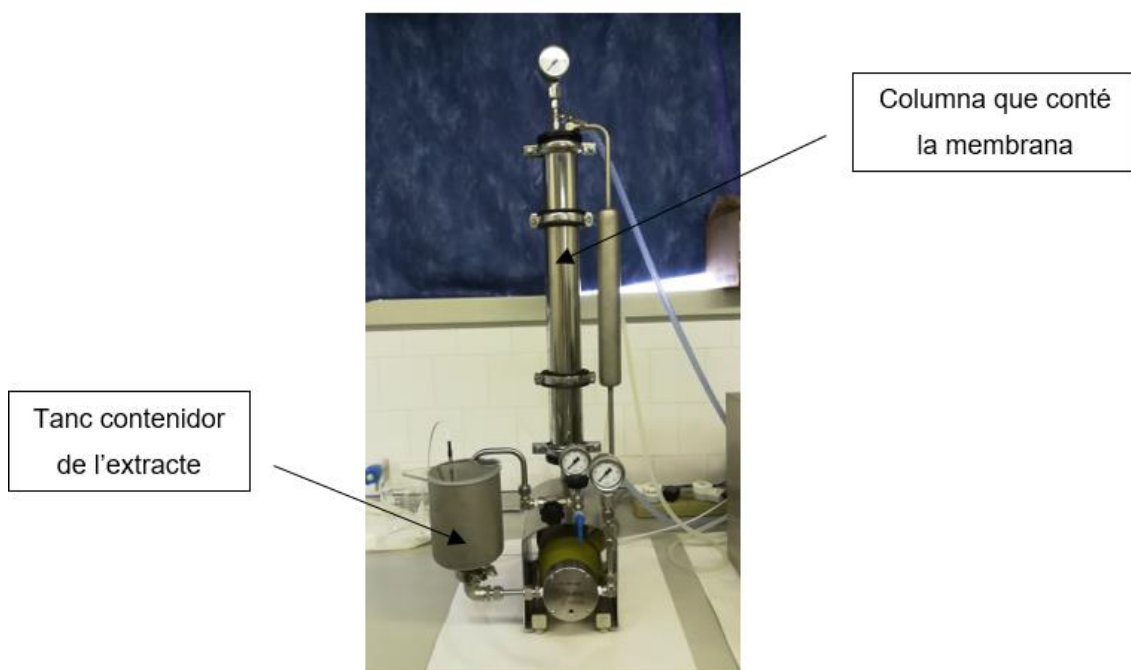


Figura 3: Equip d'osmosi directa

4.2. Emulsió doble

L'emulsió doble consta de tres fases que es preparen per separat. La composició de les fases W₁ i O es recullen a la Taula 1 i les de W₂, a la Taula 2.

	Extracte Polifenols (g)	Oli de gira-sol (g)	PGPR (g)	NaN ₃ (g)
Aigua interna (W1)	15,00	-	-	0,004
Oli (O)	-	33,60	1,40	-

Taula 1: L'extracte de polifenols és un reconcentrat provinent de l'extracte de l'empresa Unió Corporació Alimentària. L'oli de gira-sol és comercial, adquirit en un supermercat local. El PGPR és l'abreviació de poliglicerol poliricinooleat, un emulsificant amfifílic, més afí a solvents hidrofòbics.

	Mostra		
	WPI 1%	Tween 20 2%	NaCas 1%
Emulsificant 2%	80,00 g	160,00 g	80,00 g
Aigua destil·lada	80,00 g	-	80,00 g
NaN₃	0,032 g	0,032 g	0,032 g

Taula 2: El que s'ha anomenat emulsificant 2% correspon a una solució d'aigua destil·lada al 2% de cada emulsificant: proteïna de sèrum de llet (whey protein isolate, WPI), Tween 20 i caseïnat de sodi (NaCas). L'azida sòdica (NaN₃) 0.02% s'afegeix a la W2 per evitar la contaminació per microorganismes. Conseqüentment, s'ha d'afegir a la W1 per compensar la pressió osmòtica de les fases.

4.2.1. Procediment experimental de l'obtenció de l'emulsió doble

Les tres fases de la Taula 1 i 2 es preparen per separat. La fase d'oli es barreja amb un agitador mecànic (*UltraTurrax*) a 3000 rpm durant cinc minuts, per homogeneïtzar l'emulsificant PGPR i l'oli de gira-sol. Després, s'afegeixen 15 g de fase aquosa 1 (W_1) a la fase oli (O), i es barreja amb l'agitador mecànic (*UltraTurrax*) a 11000 rpm durant 5 minuts. S'afegeixen 40g de l'emulsió simple (W_1/O) obtinguda a 160g de la segona fase aquosa (W_2) i s'agita amb un agitador magnètic a màxima velocitat (1600 rpm) durant 15 minuts.

L'emulsió doble es refina mitjançant el seu pas a través del llit empaquetat a fi d'augmentar-ne l'estabilitat. El llit trenca l'emulsió en gotes més petites que, gràcies als emulsificants que disminueixen la tensió superficial i es col·loquen en la interfase, esdevenen més estables. S'han emprat llits empaquetats de 8 mm (2 grams d'esferes de silici hidròfiles d'uns 100 μm de diàmetre) o de 4 mm (1 gram d'esferes de silici hidròfiles d'uns 100 μm de diàmetre). Un cop s'ha afeïgit la pre-emulsió al tanc, es tanca hermèticament i es connecta l'entrada de nitrogen a la part superior, que permet pressuritzar el sistema. A l'obrir-se la clau de pas, l'emulsió passa a través del llit d'esferes de silici, i per una membrana de 120 porus que mesuren 300 μm de llarg per 20 μm d'ample. L'emulsió que ha passat una vegada pel llit empaquetat s'anomena emulsió cicle 1 (C1). Es repeteix el procediment del llit fins a tres vegades obtenint un cicle 2 (C2) i un cicle 3 (C3). Aquests cicles entremitjos també s'estudiaran. La massa d'emulsió recollida de cada cicle es mesura mitjançant la balança electrònica.

4.2.2. Flux

En els tres cicles de llit empaquetat es mesura la massa d'emulsió recuperada enfront del temps. D'aquesta manera, s'obté una cinètica de flux que pot variar depenent del número de cicle de llit empaquetat i de l'emulsificant que s'estigui emprant.

Cal tenir en compte que s'està parlant d'emulsions inestables i que és precisament per això que es sotmeten al llit empaquetat. Les emulsions inestables tenen tendència a separar-se per fases i aquest fet influeix en els fluxos que s'obtenen en el pas del llit empaquetat. Sobretot en el primer cicle de llit empaquetat, quan l'emulsió és menys estable, la fase aquosa és la que surt en primer lloc i la

crema de l'emulsió, més tard. La fase aquosa és la més densa i surt de manera ràpida perquè és la menys viscosa. La fase cremosa és menys densa i molt més viscosa, de manera que es recupera més lentament: les seves propietats físiques li impedeixen avançar amb rapidesa a través del llit empaquetat. Això suposarà un pendent molt positiu en la fase aquosa i després, un decrement en el pendent quan s'estigui recuperant la crema. Pot passar, fins i tot, que no es recuperi tota la crema perquè s'ha quedat dins els llits, col·lapsant-lo, perquè no és capaç d'avançar. En aquest cas és possible que en el segon cicle l'emulsió que es torna a passar arrossegui la crema retinguda i s'acabi recuperant o bé que la viscositat sigui tant alta que no es pugui dur a terme un segon cicle.

En els tercers cicles normalment s'obtenen valors de flux més alts, amb uns pendents molt positius. La recta ideal és la que té un pendent constant i que, per tant, no té separació de fases.

4.3. Seguiment de la mostra

S'avaluaran els paràmetres llistats en la Taula 3 en uns temps concrets per a cada emulsificant:

Dia d'anàlisi	Dia 0	Dia 1	Dia 3	Dia 7	Dia 14
Mostra	C₀, C₁, C₂, C₃*	C₃	C₃	C₃	C₃
Anàlisi microscòpic	X	X	X	X	X
Mida de gota	X	X	X	X	X
Anàlisi d'encapsulació polifenols	X	X	X	X	X
Anàlisi macroscòpic	X	X	X	X	X

Taula 3: Tipus d'anàlisi i seguiment de les mostres comú per a totes les emulsions que es presenten en el treball

** C₃ equival a "mostra Dia 0" quan es fa referència a l'evolució de les emulsions durant 14 dies.*

Les anàlisis d'estabilitat al llarg del temps consistiran sempre (dia 0 a 14) en l'estudi de l'emulsió final obtinguda, és a dir, C₃. El dia 0 serà l'únic que s'analitzarà, a més del cicle 3, la pre-emulsió abans de passar-la pel llit empaquetat (C₀), i els cicles 1 i 2. Les mostres es guardaran a temperatura ambient al laboratori (al voltant de 25°C) i protegides de la incidència de la llum amb paper d'alumini. Cal matisar que els experiments amb cada emulsificant es realitzen per duplicat i que les emulsions s'anomenen segons l'emulsificant que duguin.

4.4. Anàlisi macroscòpica

Es realitza una anàlisi macroscòpica de l'emulsió durant 14 dies. Aquesta anàlisi consisteix en observar i prendre imatges per avaluar visualment si hi ha separació de fases o alliberament de polifenols.

4.5. Anàlisi microscòpica

L'anàlisi per microscopia òptica és important per a comprovar si les emulsions W_1/O es mantenen. Per tant, tal com mostra la Figura 4, se'n avalua la mida de gota d'oli (càpsula d'oli) i la mida i presència de les gotetes de fase W_1 que conté. Es realitza aquesta anàlisi de les diferents mostres al llarg del temps, observades en el microscopi òptic a 1000 augments.



Figura 4: Exemple d'emulsió estable.

Les mostres estan diluïdes 1:10 per a tenir les gotes d'oli més disperses i poder-les distingir millor en el microscopi. Aquesta dilució es fa el mateix dia d'anàlisi, uns minuts abans de realitzar-lo. La mida de les gotes es pot obtenir mitjançant una imatge d'una escala de dimensions conegudes i la utilització d'un programa de tractament d'imatges.

Cal comentar que possibles variacions o interferències en l'aspecte de les mostres poden ser fruit d'administrar massa o massa poca quantitat de mostra en el portaobjectes, de manera que, en el moment de posar el cobreobjectes, les gotes d'oli s'han pogut distorsionar.

4.6. Anàlisi de mida de gota per difracció làser

Es mesura la mida de gota de la fase oli per avaluar l'evolució de l'emulsió. Aquesta anàlisi es durà a terme des del dia de preparació de l'emulsió fins al dia 14 per cada mostra tal com mostra la Taula 3.

L'anàlisi de la mida de gota es realitza per difracció làser mitjançant l'equip *Mastersizer 2000*, proporcionat per Malvern Instruments. Aquest equip és capaç de mesurar la mida de gota de la mostra que s'introdueix per difracció làser: un làser incideix en les partícules, que en difracten la llum; diferents sensors capten aquesta llum i el software de l'equip en calcula la mida. L'equip assimila a esferes les partícules que s'hi introdueixen, ja que l'esfera és la única forma geomètrica que es pot descriure amb un sol número (Teoria de l'Esfera equivalent).

L'equip consta de diverses parts, tal com es mostra en la Figura 5. El mòdul d'introducció de la mostra (*Hydro 2000 SM*) està connectat per tubs de goma fins una cel·la de mesura, que conté dues lents per on passa la mostra. La font de llum és làser vermell de 633nm i un de blau de 470nm de longitud d'ona que incideixen en la mostra de manera separada. Cinquanta-quatre detectors a tot el voltant de la cel·la de mesura i a diferents distàncies recullen la llum difractada per les partícules de mostra.



Figura 5: Fotografia de l'equip Mastersizer 2000 i del mòdul d'introducció de la mostra (*Small Volume Sample Dispersion Unit*) i el mòdul per a controlar la velocitat (en rpm) d'agitació i recirculació de la fase mòbil.

En una fase mòbil, que ha de ser la mateixa que la fase contínua de l'emulsió, és on s'introdueix la mostra. En aquest assaig, es fa servir aigua ja que es tracta d'una emulsió doble on la fase contínua és aigua. La quantitat ha de ser suficient per ser detectada i que sigui alhora prou petita com per a que no es produeixi el fenomen de *back scattering* (distorsió de la del feix de llum a causa de la presència de moltes molècules). Es fa recircular la mostra en la fase mòbil passant per les lents de mesura. Cal tenir en compte que la velocitat de recirculació modifica la mostra de dues maneres: provocant col·lisions entre partícules o provocant-ne el trencament i això pot donar un resultat erroni. La velocitat en què es treballa són 1400 rpm.

El software de l'equip es pot adaptar a cada mostra modificant paràmetres com el rang esperat de mida de gota, el nombre de lectures de cada mostra o el lapse de temps entre mesures. Per cada mostra es faran servir els mateixos paràmetres.

S'analitza la mida de les gotes d'oli (partícules) de l'emulsió per difracció làser mitjançant l'equip *Mastersizer 2000*. En els apartats 5.1.2. i 5.2.3. de resultats es presenten de forma gràfica les evolucions de mida de gota al llarg del temps i en forma de taula es recullen els valors mitjans de l'*span* (amplitud del gràfic entre els punts en què $y=0$), i diàmetre de gota ($D[3,2]$ i $D[4,3]$). Aquests paràmetres són dos valors que representen el diàmetre de partícula calculat per l'equip de dues maneres diferents: $D[3,2]$ és el diàmetre d'una esfera que té la mateixa relació volum/àrea superficial que la partícula d'interès i el $D[4,3]$ és el diàmetre mitjà calculat a assumint que la partícula té el mateix volum que la partícula d'interès i seguint l'Equació 1. L'*span* es calcula mitjançant l'Equació 2.

$$\text{Equació 1: } D[m, n] = \left[\frac{\sum V_i d_i^{m-3}}{\sum V_i d_i^{n-3}} \right]^{\frac{1}{m-n}}$$

$$\text{Equació 2: } Span = \frac{d(x, 0.9) - d(x, 0.1)}{d(x, 0.5)}$$

4.7. Anàlisi d'encapsulació/alliberament de polifenols

Els polifenols estan encapsulats en petites gotes de W_1 dins de les gotes d'oli (Figura 6.a). És possible, però, que el contingut aquestes càpsules s'alliberi a la fase contínua externa de manera espontània per difusió quan s'apropen a la superfície de la gota d'oli (Figura 6.b). Aquest fet pot passar de manera espontània però s'espera que passi amb més freqüència quan l'emulsió passa pel llit empackat, ja que pateix trencament de les càpsules d'oli. En el pas pel llit empackat també hi pot haver alliberament de polifenols per trencament mecànic de les càpsules (Figura 6.c).

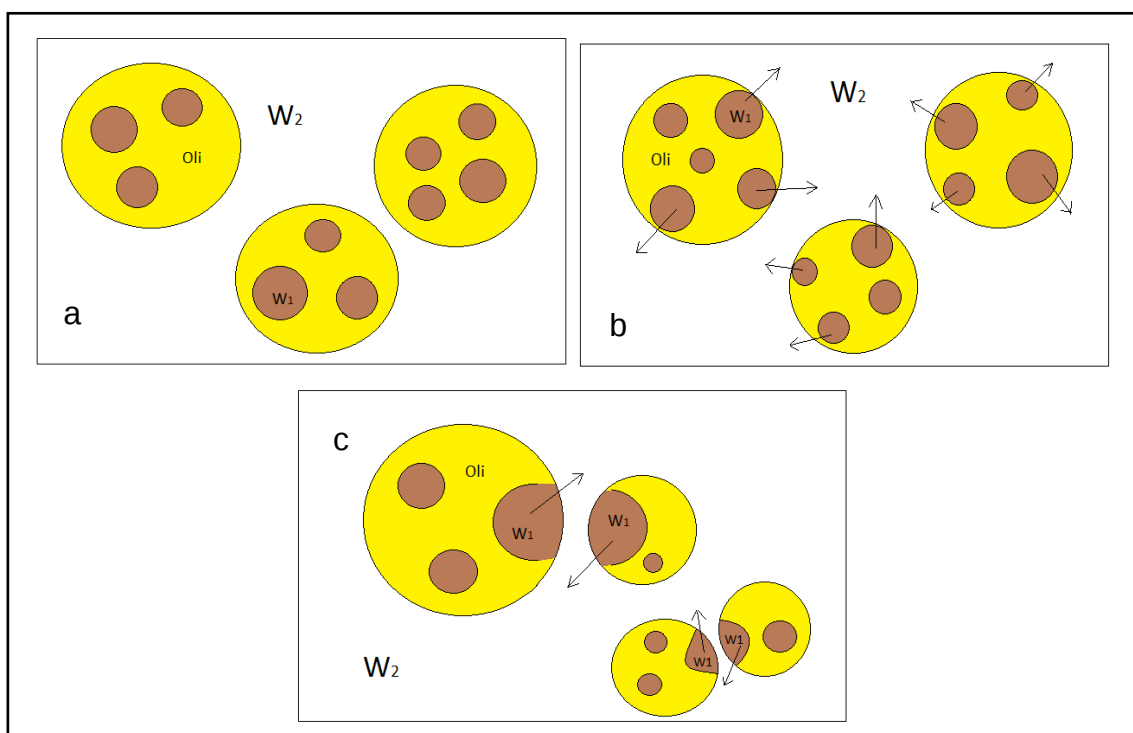


Figura 6: a) Microestructures estables de l'emulsió doble ($W_1/O/W_2$). b) Càpsules d'oli amb les microcàpsules de W_1 properes a la superfície i polifenols alliberant-se per difusió a causa de la diferència de pressió osmòtica. c) Trencament de les microcàpsules de W_1 i alliberament de polifenols a W_2 .

4.7.1. Determinació de polifenols en W_2

La recuperació de polifenols en la fase aquosa W_2 serveix per avaluar la quantitat de polifenols que han passat de la fase W_1 (on eren inicialment) a la fase W_2 . Aquesta anàlisi es realitza al llarg del temps per avaluar l'eficiència d'encapsulació de polifenols i controlar en quina/es etapa/es se n'alliberen més.

Per tant, mostres d'emulsions es sotmeten a una centrifugació de 3000 rpm i 10 minuts. Se'n descarta la fase superior i es recupera la fase aquosa (inferior) amb una agulla i una xeringa. S'han provat diferents estratègies per obtenir la mostra de la fase W2 després de la centrifugació i no hi ha hagut diferències significatives de recuperació, per tant, s'ha triat el mètode esmentat perquè és el més segur, ràpid i eficient (Annex 4).

4.7.2. Anàlisi de polifenols totals per reactiu Folin-Ciocalteu

S'ha utilitzat el reactiu de Folin-Ciocalteu (C-F) per a determinar la concentració de polifenols en W₂ ja que reaccionen fàcilment amb els grups hidroxil (Blainski, Lopes, & De Mello, 2013).

El mètode consisteix en afegir 0,1 mL de mostra diluïda i la mateixa quantitat de reactiu Folin per a que reaccioni. El Na₂CO₃ reacciona amb el Folin fent aparèixer un color blau. S'ajusta el volum a 5mL amb aigua destil·lada i es deix reaccionar durant una hora, evitant el contacte amb la llum a temperatura ambient. Es mesuren les mostres per espectrofotometria a longitud d'ona de 750 nm enfront a un blanc (Durazzo et al., 2014).

i) Eficiència d'encapsulació

Es calcula l'eficiència d'encapsulació (EE%), en forma de percentatge de polifenols encapsulats. Els càlculs per a EE% s'han fet seguint la següent l'Equació 3 (Berendsen, Güell, & Ferrando, 2015):

$$\text{Equació 3: } EE\% = \frac{m_{poly W_1}^0 - C_{poly W_2}^n \times (m_{W_1}^0 + m_{W_2}^0)}{m_{poly W_1}^0 - C_{poly W_2}^n \times m_{W_1}^0} \times 100$$

On $m_{poly W_1}^0$ és la massa de polifenols inicial en la W₁; $C_{poly W_2}^n$ representa la concentració de polifenols final a la W₂, $m_{W_1}^0$ representa la massa inicial de W₁ i $m_{W_2}^0$ la massa inicial de W₂.

ii) Cinètica d'alliberament de polifenols

Es calcula l'alliberament de polifenols en el temps d'emmagatzematge (R), utilitzant l'Equació 4.

$$\text{Equació 4: } R = \frac{C_{poly W_2}^t \times m_{W_2}}{m_{poly W_{1+2}}}$$

On $C_{poly\ W_2}^t$ és la concentració de polifenols al temps t ; m_{W_2} és la massa de la fase W_2 i $m_{poly\ W_{1+2}}$ és la massa total de polifenols en les dues fases aquoses. Es pot expressar la fracció R com el percentatge alliberat després de la producció de l'emulsió aplicant l'Equació 5.

$$\text{Equació 5: } \%Alliberament = \%R = \frac{R - R_0}{1 - R_0} \times 100$$

On R_0 és la fracció fenòlica alliberada al dia 0 causada per la producció de l'emulsió doble, és a dir, el cicle 3 del dia 0.

4.8. Ajust de pressió osmòtica

S'han realitzat tres experiments diferents igualant la pressió osmòtica de la fase W_2 a la de W_1 per a controlar millor l'alliberament de polifenols. S'ha mesurat el contingut de sucres del reconcentrat de garrofa en graus brix i s'ha obtingut el valor de 24.86 brix. Aquest valor és molt més alt del que s'esperava, de manera que s'ha compensat la fase W_2 primer posant-hi els mateixos brix de sacarosa (28,86 brix) i després calculant-ne la pressió osmòtica i igualant-la amb glucosa (16,10%) o NaCl (3,15%). Les osmolaritats de les diferents solucions es recullen en la Taula 27 de l'Annex 3. En els tres experiments es va utilitzar WPI 1% com a emulsificant i un llit empaquet de 4 mm.

5. RESULTATS

5.1. Procés d'emulsificació

En aquest apartat es recullen les anàlisis dels cicles 0 a 3 per a avaluar els canvis de les emulsions en el seu pas pel llit empaquetat.

5.1.1. Flux

Tal com es recull en la Figura 7, el primer cicle s'aprecia una marcada separació de fases ja que té una pendent constant i molt positiva en els primers 140 grams de recuperació i després es veu la corba de recuperació de la crema de l'emulsió, més lenta. El cicle 2 no mostra separació ja que no té variació de pendent i el cicle 3 és el més lent encara que és prou constant i no denota separació de fases. El temps llarg que tarda en sortir pot ser degut a la viscositat que confereix la proteïna de sèrum a l'emulsió.

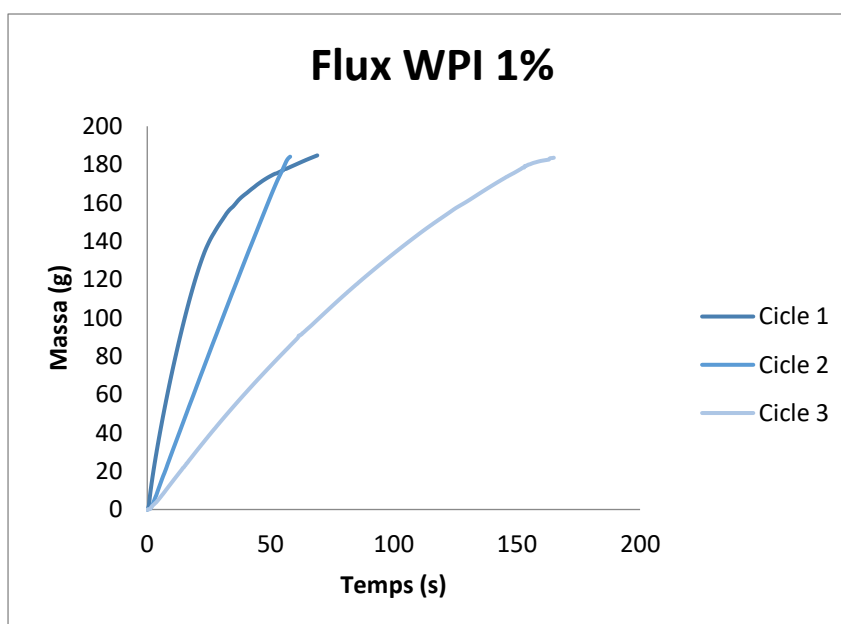


Figura 7: Gràfic del flux dels cicles de llit empaquetat en l'emulsió amb l'emulsificant WPI 1%.

Tal com es recull en la Figura 8, el cicle 1 presenta una petita separació de fases, ja que es recuperen 60 grams d'una fase més ràpida (aquosa) i després, una fase més lenta. De totes maneres, és molt més estable que el cicle 1 de la WPI 1%. En general, és l'emulsió menys viscosa de les tres ja que no tarda més d'un minut en ser recuperada.

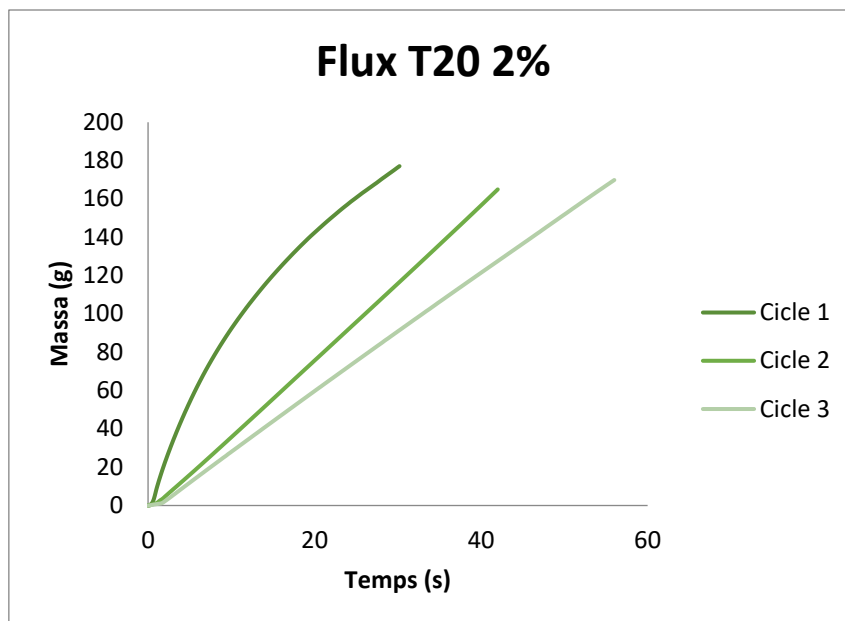


Figura 9: Gràfic del flux dels cicles de llit empackat en l'emulsió amb l'emulsificant Tween 20 2%.

El cicle 1 del pas de l'emulsió amb NaCas 1%, tal com mostra la Figura 9, pateix una gran separació de fases: els primers 100 grams es recuperen amb un flux més o menys constant però després el pendent disminueix de manera dramàtica i la fase superior de l'emulsió es recupera molt lentament. El segon cicle és constant fins els últims 20 grams, que surten de l'equip més lentament. El tercer cicle és prou constant fins també els últims 20 grams, més viscosos.

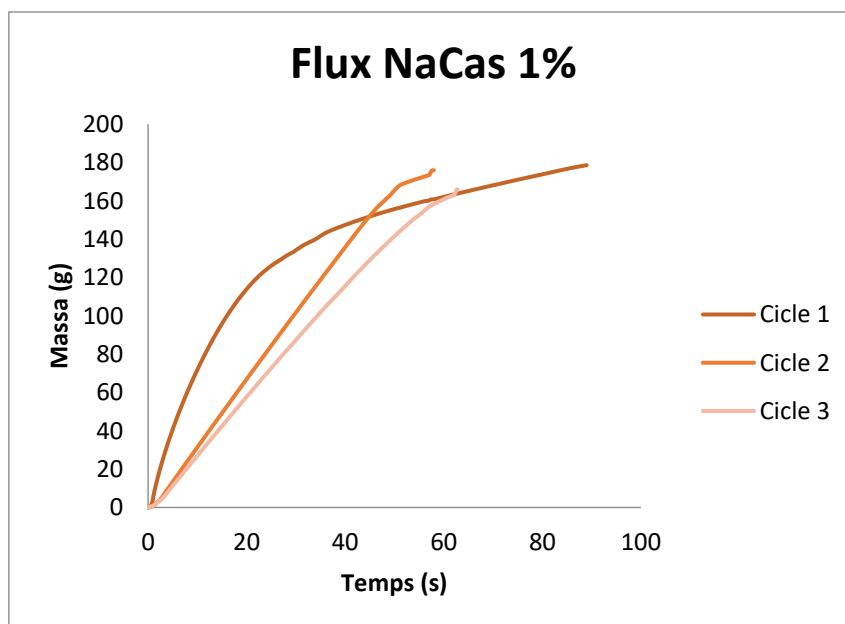


Figura 8: Gràfic del flux dels cicles de llit empackat en l'emulsió amb l'emulsificant NaCas 1%.

5.1.2. Evolució de la mida de gota

En les Figures 10, 11 i 12 s'hi representa la població de partícules (o gotes d'oli) de cada mida. El punt màxim del pic representa el grup més gran de partícules de la mateixa mida, i a mesura que ens allunyem cap a dreta i esquerra les poblacions amb la mateixa mida de gota són més petites; cap a la dreta tenen un diàmetre més gran i cap a l'esquerra, menor.

Veient les Taules 7, 8 i 9 complementen els gràfics de mida de gota recollint les dades de diàmetre de partícula. A més pot avaluar si l'emulsió és més o menys monodispersa mitjançant els valors d'span: un pic (span petit) estret suposarà que les partícules tindran mides molt semblants, un pic més ample (span gran) comportarà més poblacions amb mides de gota més disperses. Una emulsió monodispersa ideal, doncs, hauria de tenir un pic el més estret possible (inferior a 1).

El valor numèric de la mida de gota és important, però és molt més rellevant apreciar si incrementa o disminueix al llarg del temps, ja que aquest aspecte ajudarà en la determinació de l'objectiu principal del treball és avaluar l'estabilitat de l'emulsió. El mateix passa amb l'span: és desitjable que sigui el més petit possible (inferior a 1) però també és interessant comparar com varia en el pas del temps.

En les Figures 10 a 12 es pot veure com ha disminuït la mida de gota des del primer cicle de llit empaquetat. El cicle 0 té un span i uns diàmetres de gota notablement més gran que la resta tal com es pot apreciar tant a les figures com a les Taules 4 a 6.

Cal veure que en el primer cicle de llit empaquetat és on hi ha el major trencament de l'emulsió i, sobretot, és on s'obté l'emulsió monodispersa ja que l'span disminueix ja no varia a partir de llavors. En els cicles 2 i 3 s'aconsegueix una lleugera disminució de mida de gota.

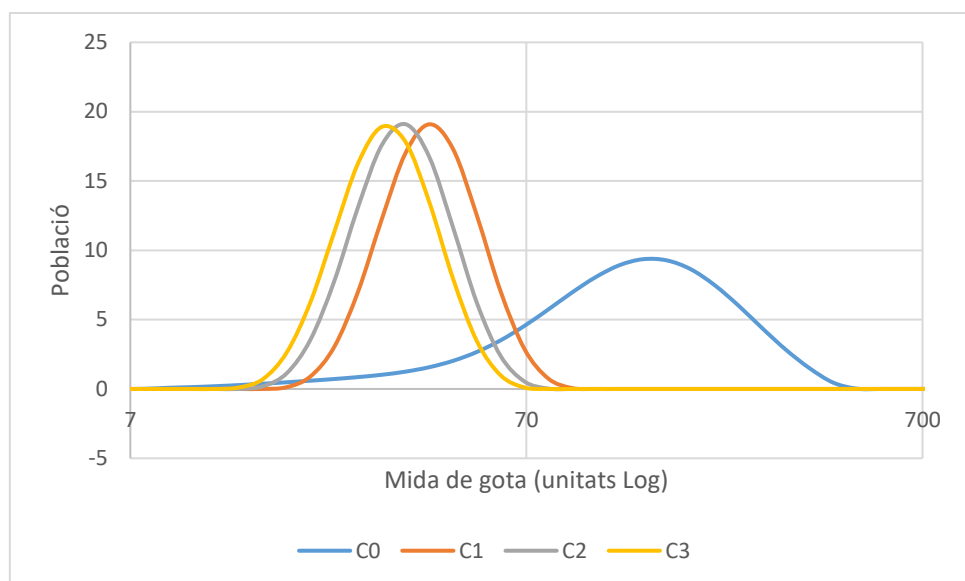


Figura 10: Gràfic de l'evolució de la mida de gota en la mostra WPI on es representa la població (y) de les diferents mides de gota (x) en els cicles de llit empacat (C0 a C3)

	Span	D[3,2]	D [4,3]
C₀	1.55±0.01	129.87±1.63	83.28±0.82
C₁	0.73±0.01	37.22±1.80	34.49±1.63
C₂	0.73±0.00	32.48±1.06	30.10±1.00
C₃	0.73±0.00	29.73±0.77	27.51±0.72

Taula 4: Spans, D [3,2] i D [4,3] de l'emulsió WPI 1% abans i durant els cicles de llit empacat.

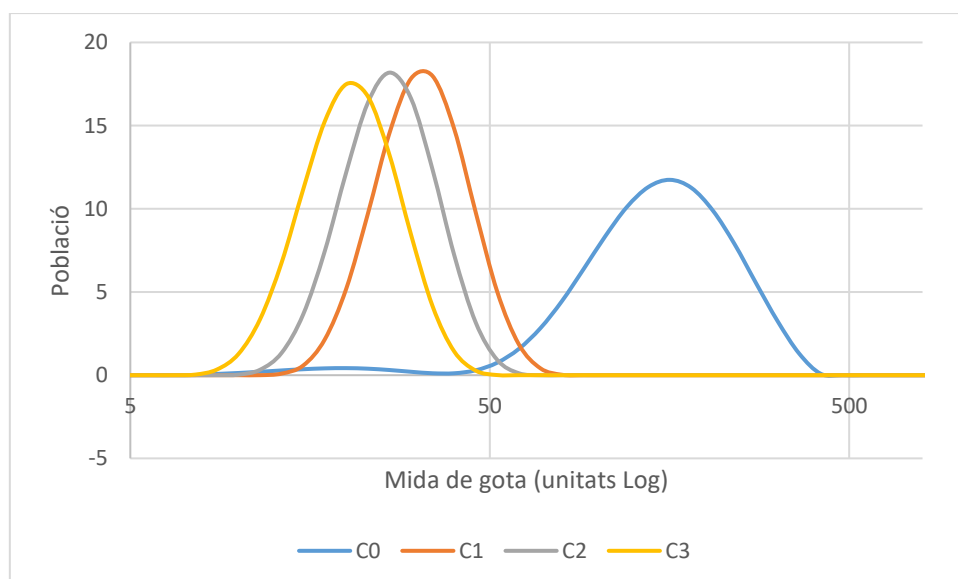


Figura 11: Gràfic de l'evolució de mida de gota de la mostra T20 on es representa la població (y) de les diferents mides de gota (x) en els cicles de llit empacat (C0 a C3)

	Span	D[3,2]	D [4,3]
C₀	1.19±0.07	146.88±2.12	105.13±4.44
C₁	0.74±0.02	32.03±1.20	29.56±1.15
C₂	0.77±0.02	25.86±1.64	23.73±1.52
C₃	0.79±0.03	21.83±2.13	19.93±1.93

Taula 5: Spans, D [3,2] i D [4,3] de l'emulsió T20 2% abans i durant els cicles de llit empackat

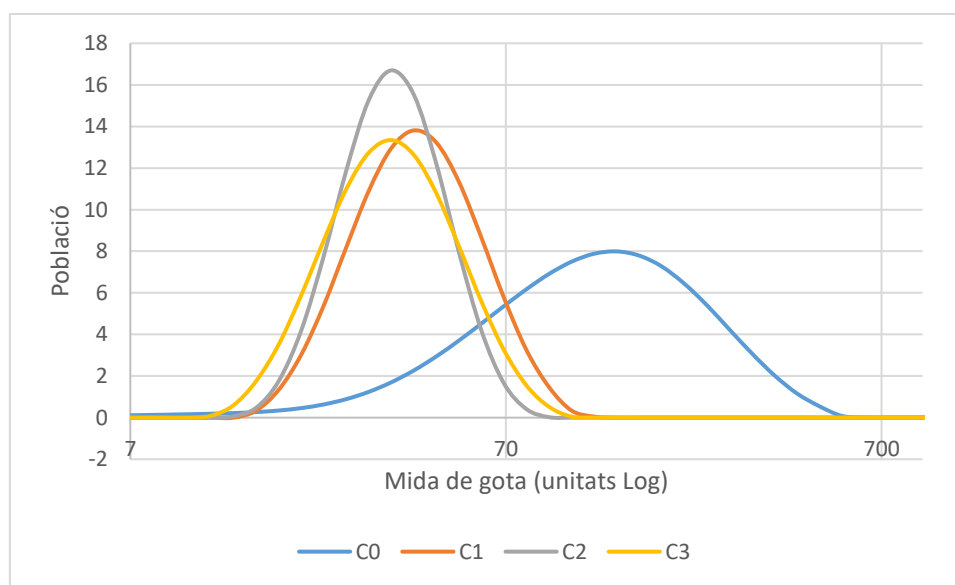


Figura 12: Gràfic de l'evolució de la mida de gota en la mostra NaCas on es representa la població (y) de les diferents mides de gota (x) en els cicles de llit empackat (C0 a C3).

	Span	D[3,2]	D [4,3]
C₀	1.84±0.09	135.20±16.45	79.48±7.00
C₁	0.93±0.22	40.37±3.93	35.64±1.56
C₂	0.88±0.14	34.16±2.45	30.62±1.71
C₃	0.98±0.1	33.18±2.05	29.03±0.97

Taula 6: Spans, D [3,2] i D [4,3] de l'emulsió NaCas 1% abans i durant els cicles de llit empackat

5.1.3. Anàlisi d'encapsulació/alliberament de polifenols

Tant sols es van avaluar les pèrdues de polifenols en el procés d'emulsificació en la mostra de NaCas. Tanmateix, els resultats són extrapolables a les emulsions WPI i T20.

La Taula 7 mostra que abans de passar l'emulsió pel llit empackat es manté un percentatge d'encapsulació molt alt (del 93,61%). Després, però, el EE% cau en picat fins uns valors semblants als que s'havien obtingut en la preparació de les

emulsions WPI i Tween 20. Referent a la cinètica d'alliberament, s'obté un valor molt petit en C_0 , de 0.06 comparat amb el 0.83 del C_1 del llet empaquet. A més, es mostra el màxim alliberament de polifenols (81,73%). Per tant es pot afirmar que després del primer cicle de l'emulsió en el llet empaquet és quan hi ha la pèrdua més gran de polifenols. En els següents cicles, els percentatges no varien de manera notòria.

	EE%	R	%R
C_0	93.61	0.06	
C_1	11.62	0.83	81.73
C_2	7.50	0.87	85.58
C_3	9.20	0.85	83.99

Taula 7: Eficiència d'encapsulació i alliberament de polifenols durant el procés d'emulsió

5.2. Evolució de les emulsions durant 14 dies

En aquest apartat s'avalua l'evolució de les emulsions durant 14 dies. Analitzant-les tal com s'ha comentat a la Taula 3.

5.2.1. Anàlisi macroscòpica

5.2.1.1. Emulsions estabilitzades amb proteïna de sèrum de llet (WPI)

En l'evolució de les emulsions amb 1% WPI a la W_2 s'aprecia una estabilitat notable durant tot el procés. La Figura 13 mostra un exemple de l'emulsió WPI en el dia 7 i en la Figura 22 de l'Annex 1 es recullen les imatges de tot l'anàlisi macroscòpic. Mostren una petita separació de fases des del dia 1 i la separació augmenta fins el dia 3, que es pot considerar estable. De totes maneres, la fase W_2 té un color fosc, fet que fa sospitar que hi ha hagut un gran alliberament de polifenols de la W_1 a la W_2 .

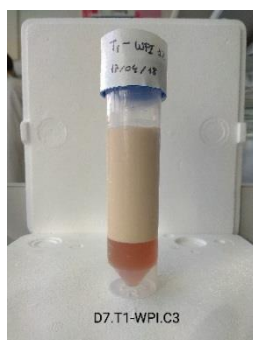


Figura 13: Imatge del dia 7 de l'emulsió WPI.

5.2.1.2. Emulsions estabilitzades amb Tween 20

La Figura 14 presenta l'aspecte macroscòpic de la mostra de Tween 20 al dia 7. A la Figura 23 de l'Annex 1 s'hi recullen totes les imatges de l'anàlisi macroscòpica de l'emulsió T20. Des del dia 1 ja s'ha format gairebé un 50% de separació de fases. A partir del tercer dia ja hi ha més de la meitat de W_2 (fase inferior) separada de la fase de crema d'emulsió. Aquesta condició es manté fins el dia 14. A més, el color fosc de la fase W_2 denota que des del primer dia hi un gran alliberament de polifenols.

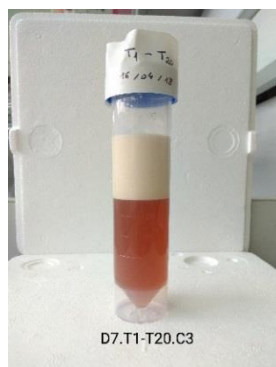


Figura 14: Imatge del dia 7 de l'emulsió T20.

5.2.1.3. Emulsions estabilitzades amb caseïnat de sodi (NaCas)

En les emulsions realitzades amb caseïnat de sodi com a emulsificant l'alliberament de polifenols i la separació d fases té lloc gairebé completament el primer dia (Figura 24 de l'Annex 1), encara que pugui augmentar lleugerament a partir del tercer. Es pot considerar que té una bona estabilitat, ja que hi ha molt poca separació de ha fases. De totes maneres, el color fosc de la W_2 denota que s'han alliberat una gran quantitat de polifenols en aquesta fase. La Figura 15 mostra l'aspecte de l'emulsió el dia 7 on es poden observar la separació de fases i el color fosc de la W_2 .

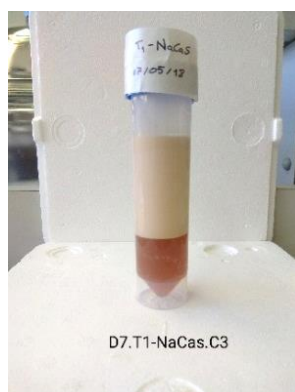


Figura 15: Imatge del Dia 7 de l'emulsió NaCas.

5.2.2. Anàlisi microscòpica

En les fotografies de microscopia òptica a 1000 augments es pot apreciar la forma i la mida de les càpsules d'oli de l'emulsió. Aquesta anàlisi permet veure l'estabilitat microscòpica de les càpsules al llarg del temps. Cal no confondre l'estabilitat de les càpsules amb l'estabilitat d'encapsulació/alliberament de polifenols, que s'avalua amb el reactiu Folin-Ciocalteu. Les Taules 13 a 15 de l'Annex 2 recullen les imatges de l'anàlisi microscòpica al llarg del temps.

5.2.2.1. Emulsions estabilitzades amb proteïna de sèrum de llet (WPI)

Tal com mostra la Figura 25 de l'Annex 2, l'emulsió és estable tant en mida de gota d'oli com pel que fa referència a les gotes de W_1 (visibles i de mida semblant en tot el procés). De totes maneres, les gotes d'oli després d'un cicle de llet empaquetat (C_1) són més grans que la resta, tal com s'esperava. En el dia 7 les gotes d'oli han minvat una mica tal com mostra la Figura 16. Aquest fet pot ser causat per una major agitació en el moment de la dilució 1:10.

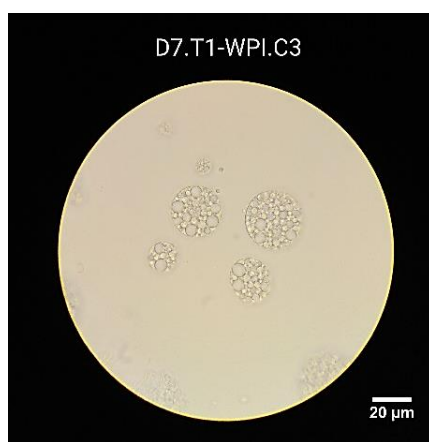


Figura 16: Imatge de microscopia òptica a 1000 augments de la mostra del dia 7 de l'emulsió WPI.

5.2.2.2. Emulsions estabilitzades amb Tween 20

En la Figura 26 de l'Annex 2 es veuen les gotes d'oli intactes durant tot el procés, rodones (esferes aixafades) i amb gotes de W1 a l'interior. En la Figura 17 es mostra la imatge de microscopia del dia 7. El major trencament i homogeneïtzació té lloc en el cicle 2 de l'lit empaquetat. A partir de llavors s'aprecia una emulsió monodispersa fins el dia 14.



Figura 17: Imatge de microscopia òptica a 1000 augments de la mostra del dia 7 de l'emulsió T20.

5.2.2.3. Emulsions estabilitzades amb caseïnat de sodi (NaCas)

En les mostres amb caseïnat de sodi com a emulsificant s'aprecien tant gotes de mida normal com grans aglomeracions d'emulsió de forma indefinida durant tot el procés. A la Figura 27 de l'Annex 2 es mostren tant sols les encapsulacions aïllades i desitjables al llarg del temps. Cap al dia 3 les grans aglomeracions s'han trencat una mica però no han desaparegut. La Figura 18 mostra la imatge de microscopia òptica del dia 7 d'aquesta mostra.



Figura 18: Imatge de microscopia òptica a 1000 augments de la mostra del Dia 7 de l'emulsió NaCas

5.2.3. Evolució de mida de gota

Tenint en compte tots els paràmetres comentats en l'apartat 5.1.2., en aquest apartat s'avalua l'evolució de la mida de gota de les emulsions durant 14 dies.

5.2.3.1. Proteïna de sèrum de llet (WPI)

La mida de gota en l'emulsió WPI es recull en la Figura 19. La mida de gota disminueix lleugerament des del Dia 0 però el dia 3 s'estabilitza.

La Taula 8 recull els spans i diàmetres de partícula al llarg del temps: combinant aquesta taula i la Figura 19 es pot apreciar que la mostra és molt estable ja que l'span és constant i la mida de gota també. A més els diàmetres tant sols disminueixen molt poc, tal com es pot esperar en mostra la Figura 19.

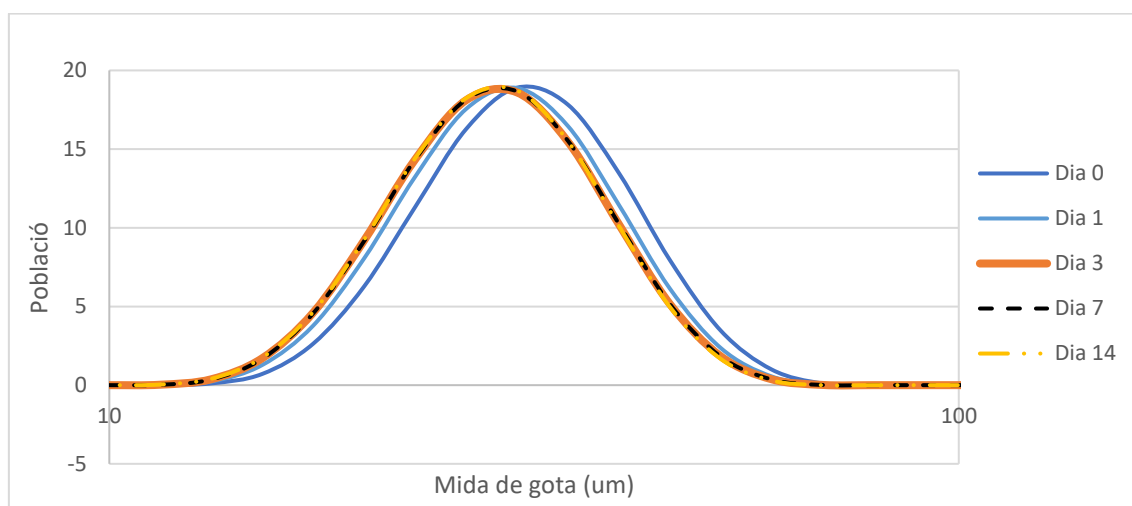


Figura 19: Gràfic de l'evolució de la mida de gota en l'emulsió WPI on es representa la població (y) de les diferents mides de gota (x) al llarg del temps.

	Span	D[3,2]	D[4,3]
Dia 0	0.73±0.00	29.73±0.77	27.51±0.72
Dia 1	0.75±0.03	28.23±0.99	26.05±0.86
Dia 3	0.74±0.01	27.70±0.99	25.62±0.94
Dia 7	0.73±0.00	27.58±0.65	25.51±0.62
Dia 14	0.75±0.04	27.38±0.89	25.23±0.81

Taula 8: Spans, D [3,2] i D [4,3] de les partícules de l'emulsió WPI al llarg del temps

5.2.3.2. Tween 20

La mida de gota en la mostra de T20 es recull en la Figura 20. La mida de gota disminueix entre el dia 0 i 1; després, s'estabilitza. La Taula 9 recull els spans i diàmetres de partícula al llarg del temps: combinant aquesta taula i la Figura 20 es pot apreciar que la mostra és molt estable. L'span és constant i el diàmetre de partícula disminueix lleugerament, d'acord amb la Figura 20.

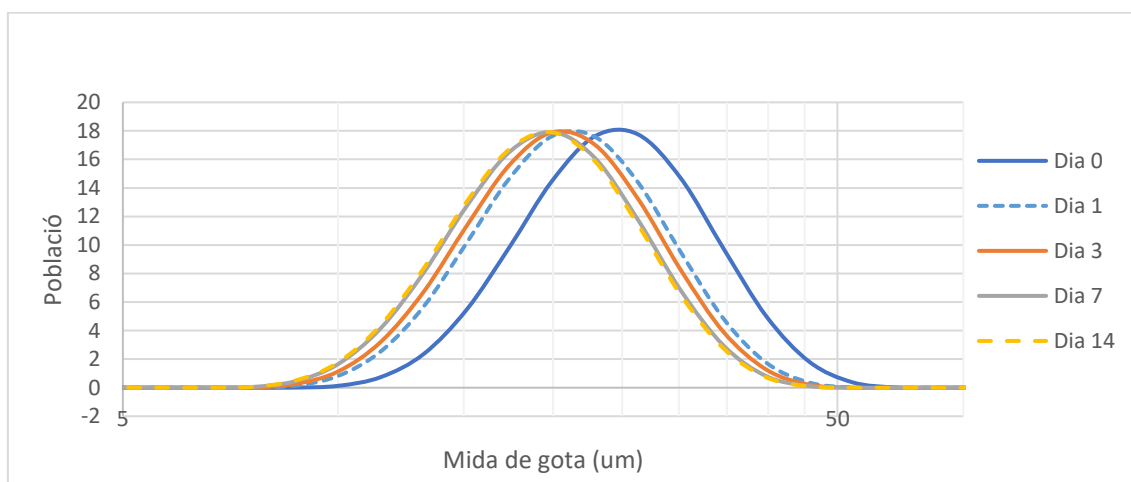


Figura 20: Gràfic de l'evolució de la mida de gota en l'emulsió T20 on es representa la població (y) de les diferents mides de gota (x) al llarg del temps

	Span	D[3,2]	D[4,3]
Dia 0	0.79±0.03	21.83±2.13	19.93±1.93
Dia 1	0.79±0.02	19.29±1.44	17.64±1.38
Dia 3	0.79±0.01	18.67±1.43	17.09±1.36
Dia 7	0.79±0.01	18.10±1.00	16.56±0.95
Dia 14	0.81±0.05	18.04±0.95	16.42±0.93

Taula 9: Spans, D [3,2] i D [4,3] de les partícules de l'emulsió T20 al llarg del temps

5.2.3.3. Casseïnat de Sodi (NaCas)

L'evolució de la mida de gota en la mostra de NaCas es recull en la Figura 21. La mida de gota disminueix molt lleugerament del el Dia 0 al Dia 1, que passa a ser més o menys estable. Els pics de poblacions són cada vegada més alts, per tant, cada dia hi ha més gotes de la mida mitjana.

La Taula 10 recull els spans i diàmetres al llarg del temps: combinant aquesta taula i la Figura 21 es poden veure els canvis de distribució de la mida de gota. L'span varia lleugerament a mesura que avança el temps encara que no segueix cap tendència. Els valors de diàmetre segueixen una tendència a la baixa, encara

que el dia 7 tingui uns valors més grans. La mostra, doncs, és estable però no tant com les anteriors i té més poblacions de diferents mides de gota (span major).

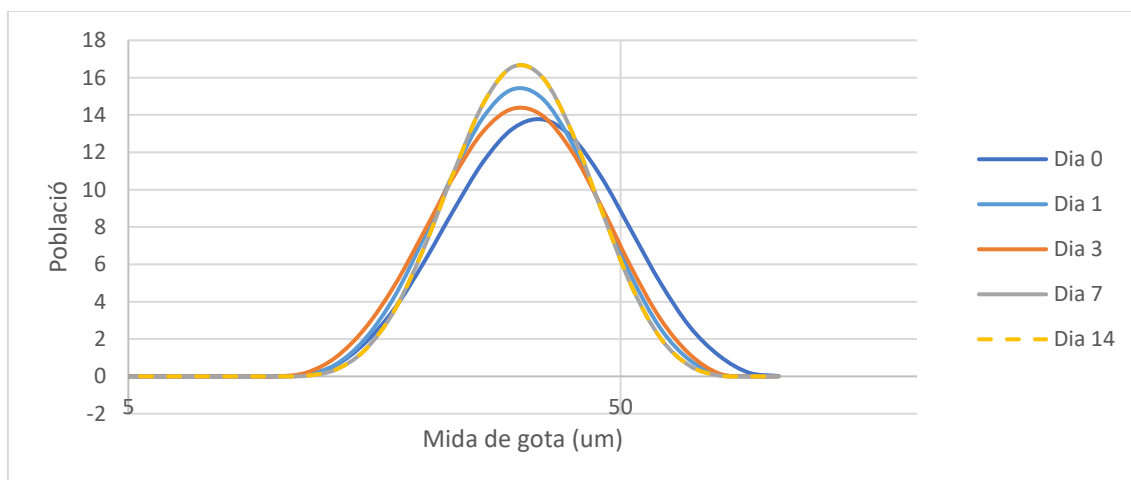


Figura 21: Gràfic de l'evolució de la mida de gota en l'emulsió NaCas on es representa la població (y) de les diferents mides de gota (x) al llarg del temps

	Span	D[3,2]	D [4,3]
Dia 0	0.98±0.13	33.18±2.05	29.03±0.97
Dia 1	0.87±0.07	30.24±0.95	27.16±0.41
Dia 3	0.99±0.04	29.94±0.61	26.22±0.43
Dia 7	0.93±0.09	30.42±0.99	26.95±0.75
Dia 14	0.90±0.00	28.27±0.19	25.24±0.17

Taula 10: Spans, D [3,2] i D [4,3] de les partícules de l'emulsió NaCas al llarg del temps.

5.2.4. Evolució d'encapsulació/alliberament de polifenols

En les Taules 11 a 13 es recullen els valors d'encapsulació i alliberament de polifenols en l'emmagatzematge (Dia 1 a Dia 14). Es mostren els percentatges d'encapsulació (EE%), l'alliberament de polifenols (R) i el percentatge alliberat de polifenols després de la producció de l'emulsió (%R), és a dir, el percentatge alliberat a partir del C₃ del Dia 0. Els càlculs s'han dut a terme seguint les equacions 3 a 5 de l'apartat 4.7.2. de materials i mètodes.

Els tres experiments presenten una eficiència d'encapsulació molt baixa amb un percentatge inferior al 20%. Aquests resultats reflecteixen que s'han alliberat pràcticament tots els polifenols. A més, percentatge d'encapsulació s'espera que o bé es mantingui constant o que disminueixi en el temps, però mai que augmenti ja que aquesta opció significaria que es reencapsulen polifenols, fet que és

impossible. Això es podria explicar perquè, al tenir uns nivells tant baixos d'encapsulació, qualsevol petit error de manipulació o dels equips representaria un gran canvi.

La cinètica d'alliberament de polifenols i el tant per cent d'alliberament es mantenen entre 80 i 100%, fet que denota que des del Dia 0, un cop s'ha acabat de preparar l'emulsió, ja s'ha alliberat aquest percentatge del contingut fenòlic.

Els percentatges d'encapsulació que tenen valors negatius es poden justificar tenint en compte que les concentracions de polifenols són tant baixes en aquestes mostres, que s'apropen als valors d'absorbància del background que s'hi ha restat. A més, els valors són tant petits que qualsevol error pot provocar grans canvis en els resultats. Anàlogament, el tant per cent d'alliberament és major que 100 per la mateixa raó.

	EE%	R	%R
Dia 0	-7.34	0.99	
Dia 1	-1.74	0.95	94.53
Dia 3	6.06	0.88	87.76
Dia 7	6.45	0.87	87.42
Dia 14	12.59	0.82	82.03

Taula 11: Eficiència d'encapsulació i alliberament de polifenols per a la emulsió WPI.

	EE%	R	%R
D0	1.44	0.92	
D1	0.38	0.93	92.69
D3	1.77	0.91	91.49
D7	2.76	0.91	90.63
D14	4.41	0.89	89.19

Taula 12: Eficiència d'encapsulació i alliberament de polifenols per a la emulsió Tween20.

	EE%	R	%R
Dia 0	9.20	0.85	
Dia 1	-19.64	1.10	165.28
Dia 3	-14.52	1.05	136.42
Dia 14	-2.24	0.95	66.37

Taula 13: Eficiència d'encapsulació i alliberament de polifenols per a la emulsió T1-NaCas.

5.3. Emulsió amb la pressió osmòtica de W_2 ajustada

Dels resultats obtinguts se'n va extreure una nova hipòtesi. Tal com s'ha explicat a l'apartat 4.7., la gran diferència de pressió osmòtica entre les dues fases aquoses pot ser un factor decisiu en l'alliberament de polifenols. És per això que es va decidir augmentar la pressió osmòtica de la W_2 afegint-hi diferents substàncies: sacarosa, glucosa o clorur de sodi. L'emulsificant que es va usar en els tres experiments va ser proteïna de sèrum de llet 1% ja que és la que s'ha fet servir en la majoria d'articles d'emulsions dobles publicats.

El primer experiment es va fer calculant els graus brix de sucre que contenia la mostra de reconcentrat de polifenols, i es va obtenir 24.86 brix. Per tant, es van igualar els brix en la W_2 afegint-hi sacarosa comercial. També es van emprar solucions de glucosa (16,10%) i clorur de sodi (3,15%). Les concentracions són les necessàries per a igualar la pressió osmòtica de la W_1 . Totes les pressions osmòtiques estan recollides en l'Annex 3 a la Taula 27.

5.3.1. Procés d'emulsificació

5.3.1.1. Flux del llet empackat

En l'emulsió amb sacarosa i amb glucosa tant sols es va poder dur a terme un cicle de llet empackat a causa de l'alta viscositat de les solucions.

En l'emulsió ajustada amb NaCl, en canvi, es van poder tenir els tres cicles perquè la sal comuna té una viscositat molt menor. Concretament, el tercer cicle va tenir un pendent molt positiu ja que l'emulsió va ser recuperada en 16 segons.

5.3.1.2. Anàlisi d'encapsulació/alliberament de polifenols

En els tres experiments s'han obtingut unes altes eficiències d'encapsulació abans del primer cicle de llet empackat, igual que en les emulsions amb la pressió osmòtica no ajustada (Taules 14 a 16). És interessant, però, veure que el percentatge d'encapsulació després del primer cicle es manté per sobre del 80% en tots els casos. Els percentatges d'alliberament són valors baixos.

En el cas de l'emulsió estabilitzada amb clorur de sodi es van assolir els tres cicles de llet empackat i el percentatge d'encapsulació es manté per sobre del 85% en tots els casos. L'alliberament més gran té lloc després del primer cicle.

1%WPI+sacarosa Brix 24.86			
	EE%	R	R%
C0(1:5)	92.53	0.07	
C1(1:5)	84.03	0.16	9.02

Taula 14: Eficiència d'encapsulació i alliberament de polifenols per a l'emulsió Sacarosa+1%WPI Brix 24.86

1%WPI+Glucosa 16.10%			
	EE%	R	R%
C0	92.29	0.08	
C1	87.37	0.13	5.49

Taula 15: Eficiència d'encapsulació i alliberament de polifenols per a l'emulsió 1%WPI+Glucosa 16.10%

1%WPI+ NaCl 3.15%			
	EE%	R	R%
C0	100.00	0.12	
C1	85.88	0.14	2.04
C2	85.53	0.14	2.44
C3	85.05	0.15	2.98

Taula 16: Eficiència d'encapsulació i alliberament de polifenols per a l'emulsió 1%WPI+NaCl 3.15%

5.3.2. Evolució de les emulsions durant 14 dies

5.3.2.1. Evolució d'encapsulació/alliberament de polifenols

En les emulsions amb la pressió osmòtica de la fase W₂ ajustada parteixen de al voltant d'un 85% d'encapsulació tal com es veu a les Taules 17 a 19. Hi ha alliberament important de polifenols entre cada dia de mesura fins a arribar a una eficiència d'encapsulació que ronda el 50% en tots els casos.

1%WPI+Sacarosa Brix 24.86			
	EE%	R	R%
Dia 0	84.03	0.16	
Dia 1	70.93	0.28	15.04
Dia 3	67.81	0.31	18.58
Dia 7	70.02	0.29	16.08
Dia 14	48.25	0.50	40.41

Taula 17: Eficiència d'encapsulació i alliberament de polifenols per a l'emulsió 1%WPI+Sacarosa 24.86 brix

1%WPI+16.10% Glucosa			
	EE%	R	R%
Dia 0	87.37	0.13	
Dia 1	72.39	0.27	16.62
Dia 3	49.48	0.49	41.34
Dia 7	48.32	0.50	42.57
Dia 14	43.27	0.54	47.90

Taula 18: Eficiència d'encapsulació i alliberament de polifenols per a l'emulsió 1%WPI+Glucosa 3.15%

1%WPI+3.15% NaCl			
	EE%	R	R%
Dia 0	85.05	0.15	
Dia 1	63.43	0.36	24.42
Dia 3	60.20	0.39	28.00
Dia 7	52.68	0.46	36.27
Dia 14	70.33	0.29	16.71

Taula 19: Eficiència d'encapsulació i alliberament de polifenols per a l'emulsió 1%WPI+NaCl 3.15%

El valor incongruent del dia 14 pensem que és un error de l'operador. Es farà una repetició de l'experiment més endavant. S'han presentat tant sols els resultats del primer experiment ja que per motius de volum de feina i temps disponible feia falta continuar amb l'experimentació.

6. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

Si es comparen les anàlisis macroscòpiques dels tres emulsificants es pot extreure que WPI i NaCas tenen una separació de fases semblant i T20 té una separació major. Per altra banda, l'alliberament de polifenols és molt semblant, ja que la fase W_2 té un color molt fosc. Això fa sospitar que hi ha hagut un gran alliberament de polifenols en els tres casos. La separació de fases no suposa un problema important: és desitjable que sigui petita, però un cop es torna a agitar l'emulsió, desapareix. Les gotes d'oli es mantenen plenes de les microcàpsules de W_1 al llarg del temps tal com s'ha pogut demostrar amb l'anàlisi microscòpic. Per tant, l'emulsió és estable en aquest sentit. Seguint les dades de mides de gota analitzades per difracció làser, la mostra de NaCas és ha tingut la mida de gota més petita, seguida per T20 i WPI. No hi ha diferències rellevants entre els tres emulsificants ja que el fet que s'alliberin tots els polifenols des d'un estadi tant primerenc del procés provoca que la resta de resultats no siguin rellevants.

Veient l'encapsulació i a l'alliberament de polifenols durant l'emulsificació, es confirma que s'ha encapsulat al voltant del 80% dels polifenols però en el cicle 1 de llit empaquetat és on hi ha hagut el major trencament i s'ha alliberat tot el contingut fenòlic. Les altres etapes també han comportat un petit alliberament, ínfim, comparat amb el que s'obté en el cicle 1. El problema, doncs, recau en el procés de trencament de l'emulsió en el llit empaquetat, ja que a priori, té un bon percentatge d'encapsulació. També cal tenir en compte que en l'extracte no hi ha tant sols polifenols sinó que també conté fibres solubles i sucres. Aquestes altres molècules es poden unir als compostos fenòlics i tenen una afinitat molt alta per a la fase aquosa. Per tant, el contingut fenòlic es pot alliberar a causa d'aquesta afinitat de les molècules a què s'ha relacionat (Ydjedd et al., 2017). La pressió osmòtica, tal com s'ha comentat, també hi juga un paper important. Es van mesurar les pressions osmòtiques (Annex 3) i es va poder verificar que el reconcentrat de polifenols de garrofa té una pressió osmòtica molt gran (de 1073.00 mOsmol/kg) mentre que la de les solucions de W_2 sense ajustar era molt petita.

En els experiments en què es van ajustar les pressions osmòtiques de la W_2 amb sacarosa i glucosa es van obtenir emulsions amb una alta eficiència

d'encapsulació i amb una mida de gota semblant a la dels experiments anteriors. El problema va ser que la viscositat va augmentar molt i tant sols va ser possible realitzar un cicle de llit empackat. En aquest cas, però, hi va haver més separació de fases que en d'altres experiments. Quan es va fer servir clorur de sodi es van poder assolir tres cicles de llit empackat i amb molt bons fluxos. Ens els tres casos va obtenir una eficiència d'encapsulació molt bona i una bona estabilitat al llarg del temps, encara que hi hagués més d'un 50% de separació de fases.

7. CONCLUSIONS

El llit empackat és un bon mètode per a mantenir l'estabilitat de les emulsions ja que proporciona emulsions monodisperses i amb de gota estables durant 14 dies.

D'entre els tres emulsificants, no es pot dir que un destaquí per sobre dels altres, ja que les eficiències d'encapsulació han estat dolentes en els tres casos. El que sí que aporta resultats desitjables és el conjunt d'emulsions amb la pressió osmòtica ajustada, que permet encapsular un alt percentatge de polifenols. Cal tenir en compte, però, que aquests polifenols s'alliberen al llarg del temps d'emmagatzematge. Aquest és un punt a millorar i en què el grup segueix treballant.

També fa falta buscar noves substàncies que augmentin la pressió osmòtica i tinguin viscositat baixa i que, amb petites concentracions puguin assolir la pressió osmòtica desitjada. Les substàncies serien desitjablement sacàrids o endolçants, que concordin amb les característiques del producte alimentari.

En definitiva, no és feina fàcil estabilitzar les emulsions dobles com a forma d'encapsulació de polifenols, ja que s'han de tenir en compte molts paràmetres. Sobretot si el concentrat de polifenols no és pur sinó que conté altres substàncies com ara sucres o fibres solubles, que poden relacionar-se amb els polifenols i interferir en la viscositat, solubilitat i pressió osmòtica.

8. BIBLIOGRAFIA

- Benković, M., Belščak-Cvitanović, A., Bauman, I., Komes, D., & Srečec, S. (2017). Flow properties and chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua* L.) flours as related to particle size and seed presence. *Food Research International*, 100(July), 211–218.
- Berendsen, R., Güell, C., & Ferrando, M. (2015). A procyanidin-rich extract encapsulated in water-in-oil-in-water emulsions produced by premix membrane emulsification. *Food Hydrocolloids*, 43, 636–648.
- Blainski, A., Lopes, G. C., & De Mello, J. C. P. (2013). Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852–6865.
- Durazzo, A., Turfani, V., Narducci, V., Azzini, E., Maiani, G., & Carcea, M. (2014). Nutritional characterisation and bioactive components of commercial carobs flours. *Food Chemistry*, 153, 109–113.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols - A review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(10), 510–523.
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2005). Increasing the oxidative stability of liquid and dried tuna oil-in-water emulsions with electrostatic layer-by-layer deposition technology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4561–6.
- Lu, W., Kelly, A. L., & Miao, S. (2016). Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. *Trends in Food Science and Technology*, 47, 1–9.
- Mao, L., Roos, Y. H., O'Callaghan, D. J., & Miao, S. (2013). Volatile release from whey protein isolate-pectin multilayer stabilized emulsions: effect of pH, salt, and artificial salivas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(26), 6231–9.
- McClements, D. J. (2010). Emulsion Design to Improve the Delivery of Functional Lipophilic Components. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 241–269.
- McClements, D. J. (2012). Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(5), 235–245.
- Nazir, A., Boom, R. M., & Schroën, K. (2013). Droplet break-up mechanism in

- premix emulsification using packed beds. *Chemical Engineering Science*, 92, 190–197.
- Norton, J. E., Gonzalez Espinosa, Y., Watson, R. L., Spyropoulos, F., & Norton, I. T. (2015). Functional food microstructures for macronutrient release and delivery. *Food & Function*, 6(3), 663–78.
- Onwulata, C. I. (2013). Microencapsulation and functional bioactive foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37(5), 510–532.
- Prajapati, V. D., Jani, G. K., Moradiya, N. G., Randeria, N. P., & Nagar, B. J. (2013). Locust bean gum: A versatile biopolymer. *Carbohydrate Polymers*, 94(2), 814–821.
- Sahin, S., Sawalha, H., & Schroën, K. (2014). High throughput production of double emulsions using packed bed premix emulsification. *Food Research International*, 66, 78–85.
- Schuch, A., Deiters, P., Henne, J., Köhler, K., & Schuchmann, H. P. (2013). Production of W/O/W (water-in-oil-in-water) multiple emulsions: Droplet breakup and release of water. *Journal of Colloid and Interface Science*, 402, 157–164.
- Sęczyk, Ł., Źwieca, M., & Gawlik-Dziki, U. (2016). Effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) flour on the antioxidant potential, nutritional quality, and sensory characteristics of fortified durum wheat pasta. *Food Chemistry*, 194, 637–642.
- Wang, X., Jiang, Y., Wang, Y.-W., Huang, M.-T., Ho, C.-T., & Huang, Q. (2008). Enhancing anti-inflammation activity of curcumin through O/W nanoemulsions. *Food Chemistry*, 108(2), 419–424.
- Ydjedd, S., Bouriche, S., López-Nicolás, R., Sánchez-Moya, T., Frontela-Saseta, C., Ros-Berruezo, G., Kati, D. E. (2017). Effect of in vitro gastrointestinal digestion on encapsulated and nonencapsulated phenolic compounds of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp extracts and their antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(4), 827–835.

Annex 1

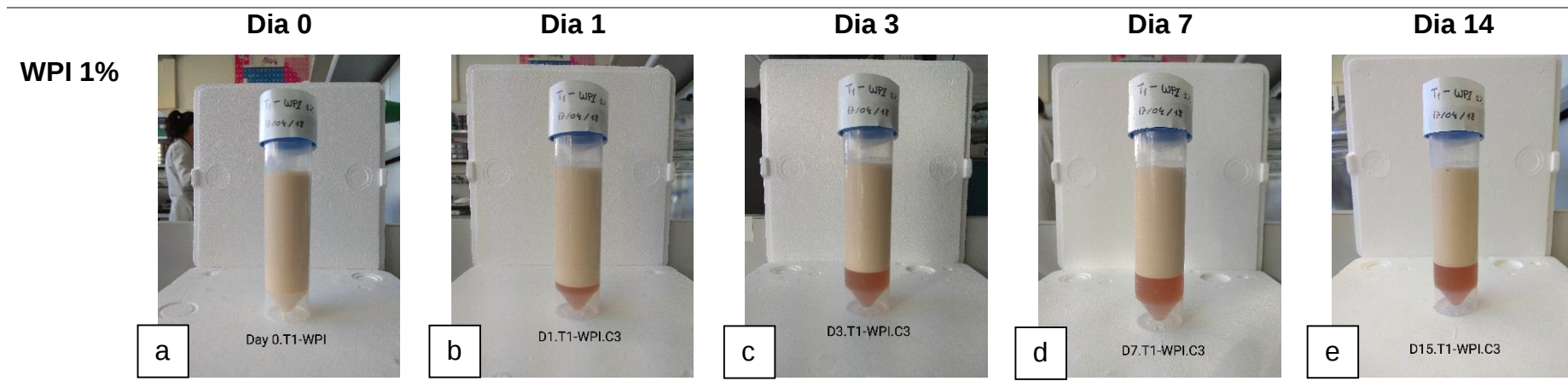


Figura 1: Fotografies del seguiment de l'estabilitat de l'emulsió WPI al llarg del temps. a) Dia 0 de l'emulsió WPI; b) Dia 1 de l'emulsió WPI; c) Dia 3 de l'emulsió WPI; d) Dia 7 de l'emulsió WPI; e) Dia 14 de l'emulsió WPI.

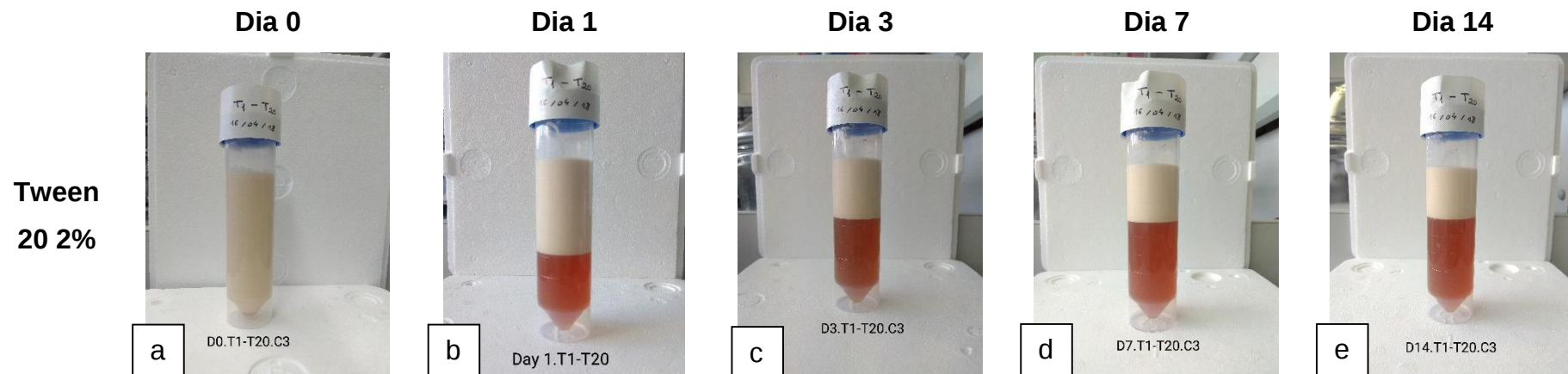


Figura 2: Fotografies del seguiment de l'estabilitat de l'emulsió T20 al llarg del temps. a) Dia 0 de l'emulsió T20; b) Dia 1 de l'emulsió T20; c) Dia 3 de l'emulsió T20; d) Dia 7 de l'emulsió T20; e) Dia 14 de l'emulsió T20.

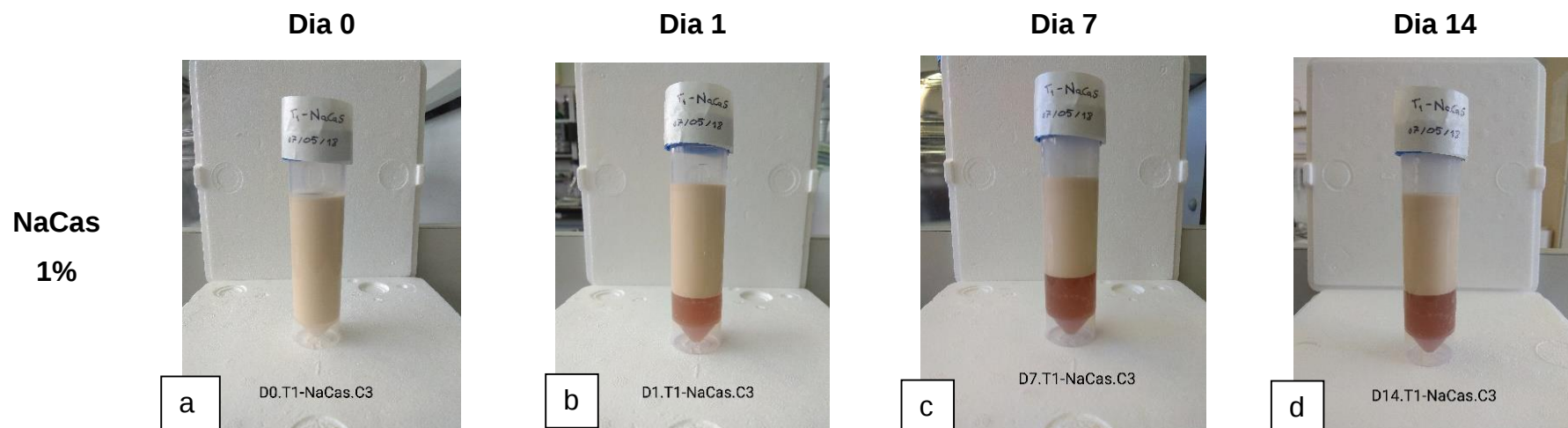


Figura 3: Fotografies del seguiment de l'estabilitat de l'emulsió NaCas al llarg del temps. a) Dia 0 de l'emulsió NaCas; b) Dia 1 de l'emulsió NaCas; c) Dia 7 de l'emulsió NaCas; d) Dia 14 de l'emulsió NaCas.

Sacarosa 24.86 brix



Glucosa 16.10%



NaCl 3.15%

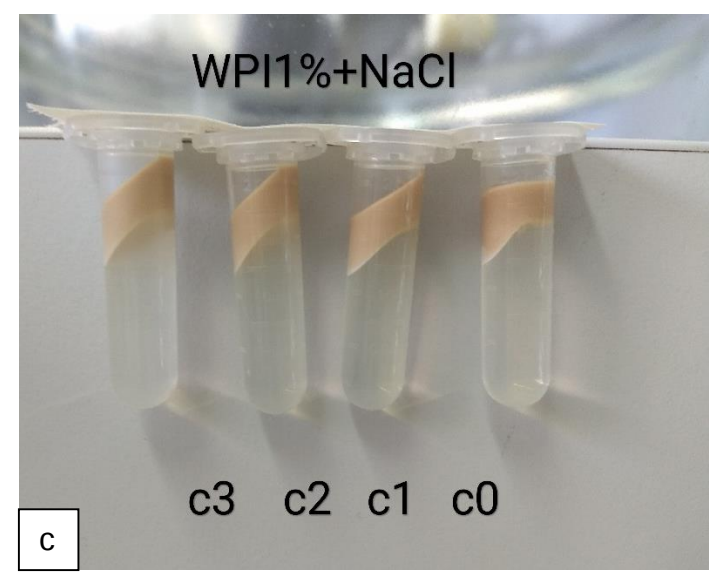


Figura 4: Fotografies del dia 7 de a) l'emulsió 1%WPI+sacarosa 24.86 brix; b) 1%WPI+glucosa 16,10% i dia 0 c) 1%WPI+NaCl 3,15%.

Annex 2

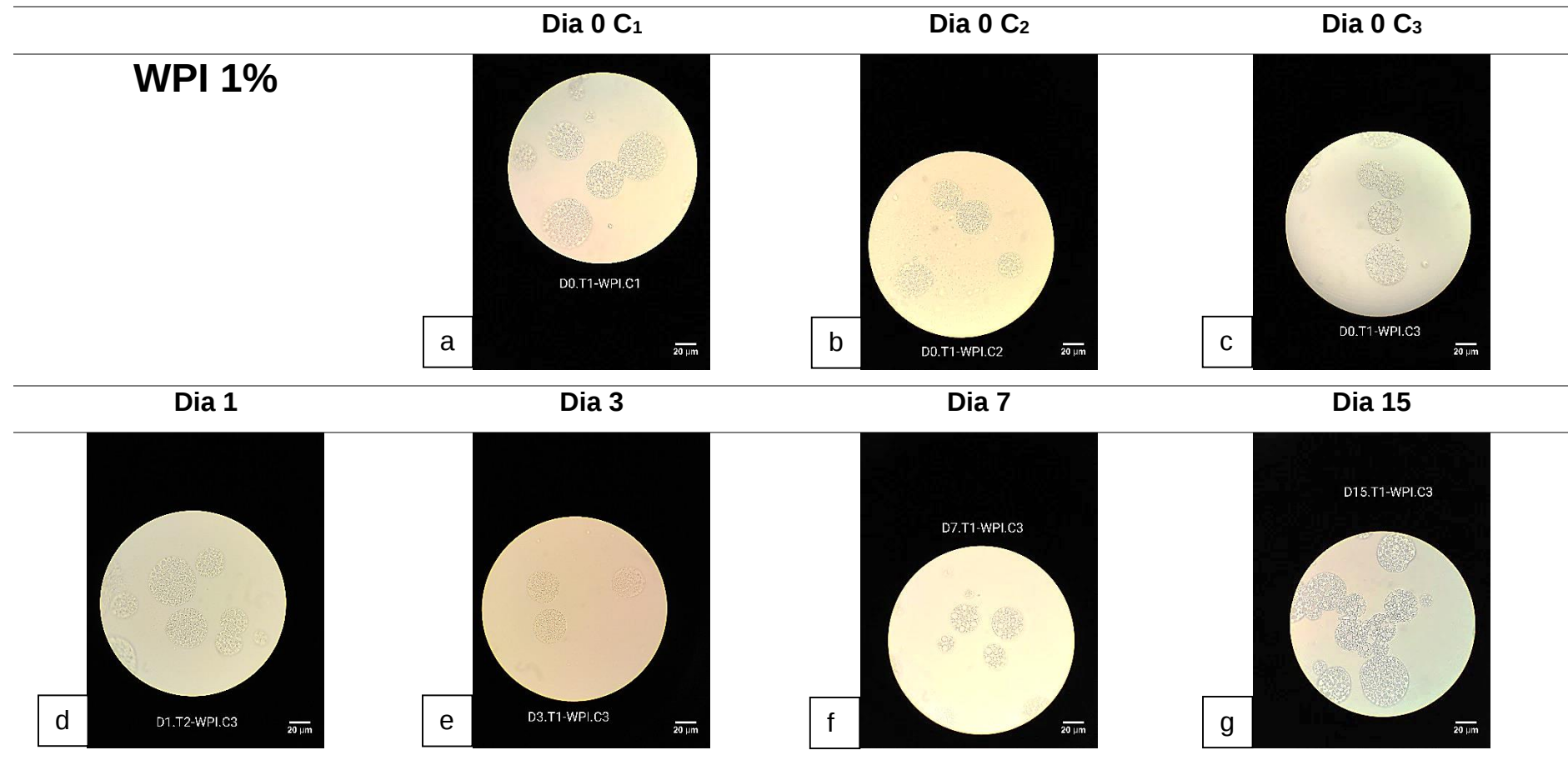


Figura 5: Fotografies de microscopia òptica a 1000 augments de la mostra 1%WPI en el procés d'emulsió llarg del temps. a) Dia 0 cicle 1; b) Dia 0 cicle 2; c) Dia 0 cicle 3; d) Dia 1; e) Dia 3; f) Dia 7; g) Dia 14

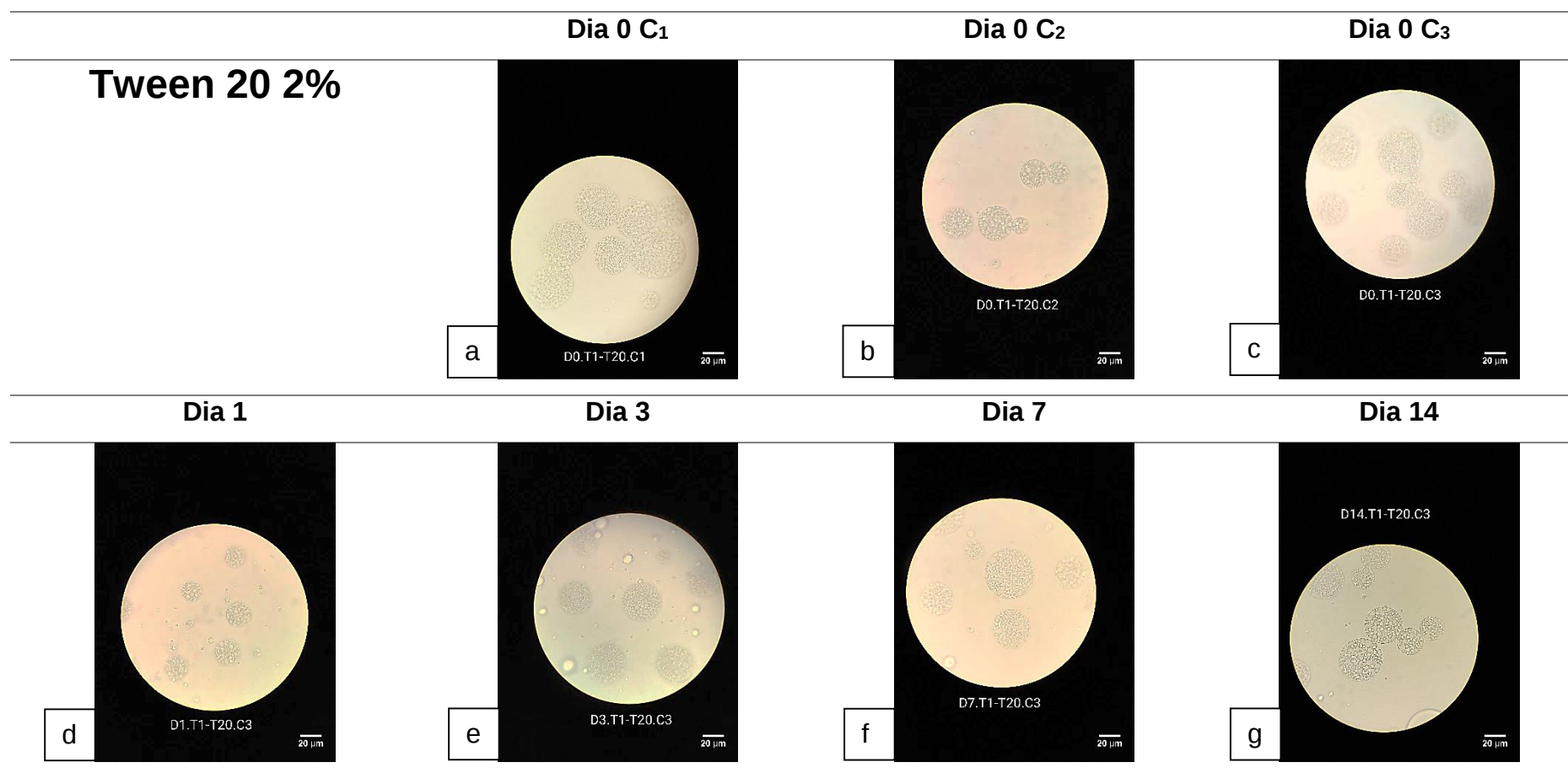


Figura 6: Fotografies de microscopia òptica a 1000 augments de la mostra 2% Tween20 en el procés d'emulsió i al llarg del temps. a) Dia 0 cicle 1; b) Dia 0 cicle 2; c) Dia 0 cicle 3; d) Dia 1; e) Dia 3, f) Dia 7; g) Dia 14.

NaCas 2%

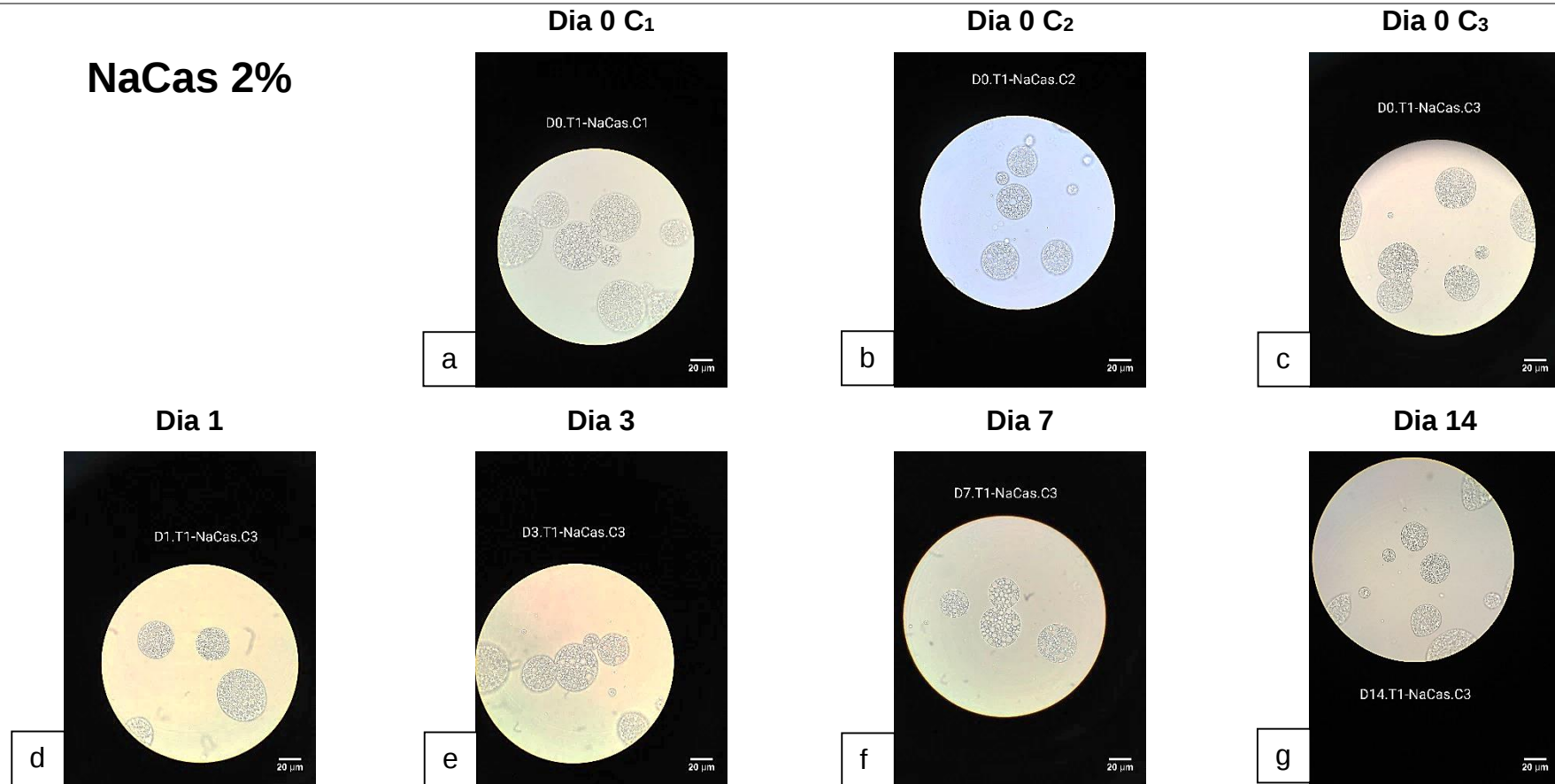


Figura 7: Fotografies de microscopia òptica a 1000 augments de l'emulsió NaCas en el procés d'emulsió i al llarg del temps a) Dia 0 cicle 1; b) Dia 0 cicle 2; c) Dia 0 cicle 3; d) Dia 1; e) Dia 3; f) Dia 7; g) Dia 14.

Annex 3

Solucions	Osmolaritat (mOsmol/kg)
Reconcentrat de polifenols de garrofa	1102.67 ± 0.01
WPI 1%	14.43 ± 0.31
Tween 20 2%	26.70 ± 0.05
NaCas 1%	35.50 ± 0.05
Sacarosa 24,86 brix	820.33 ± 0.03
Glucosa 16,10%	1073.00 ± 0.02
NaCl 3,15%	982.33 ± 0.02

Taula 1: Taula resum dels valors d'osmolaritat de les diferents solucions.

Annex 4

El mètode anomenat “xinxeta” consisteix en fer un forat al forns tub eppendorf amb l'ajuda d'una xinxeta de papereria per a poder extreure la fase inferior de W₂. I “pipeta” i “agulla” consisteixen en aspirar la fase W₂.

ANOVA xinxeta - pipeta

Variança	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Entre grups	1.5E-06	1	1.5E-06	0.00974	0.92613	7.708647
Dins dels grups	0.000616	4	0.000154			
Total	0.000618	5				

Taula 2: Taula estadística Anova entre la tècnica xinxeta i pipeta

ANOVA xinxeta - agulla

Variança	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Entre grups	1.5E-06	1	1.5E-06	0.00974	0.92613	7.708647
Dins dels grups	0.000616	4	0.000154			
Total	0.000618	5				

Taula 3: Taula estadística Anova entre la tècnica xinxeta i agulla

Annex 5

Aquest treball ha estat el recull i l'anàlisi de la feina duta a terme en el grup d'investigació FoodIE. Per a poder desenvolupar-me correctament en el laboratori i poder dur a terme l'experimentació de manera conscient i independent he rebut diverses formacions, que comento a continuació:

Nom de l'equip	Característiques
Mòdul de llit empackat	Un sistema termodinàmic compacte, travessat per un flux de líquid o gas. Aquest sistema es conforma de d'esferes sòlides amb propietats físiques i químiques semblants situat a sobre d'una membrana de níquel. Entre les esferes quedaran uns canals micromètrics per on passarà l'emulsió i les gotes d'oli es trencaran de tal manera que en resultarà una emulsió monodispersa (amb mides de gota molt semblants) i, per tant, homogènia i desitjablement més estable.
Equip d'anàlisi de mida de partícula <i>Mastersizer 2000</i>	Equip d'anàlisi de mida de partícula per difracció làser, basat en la Teoria de l'Esfera Equivalent.
Equip Turbiscan	Mesura l'estabilitat de les emulsions i la velocitat de desestabilització de fases. Avalua els fenòmens de desestabilització com la floculació, coalescència, <i>creaming</i> o sedimentació de manera quantitativa.
Agitador <i>Ultra turrax</i>	Homogeneïtzador dispersador d'alta velocitat per a la preparació de les emulsions.
Equip d'osmosi directa	Equip per a concentrar la solució de polifenols.
Osmòmetre	Equip per a mesurar la pressió osmòtica de les solucions.
Digestió "In vitro" dinàmica amb simulació de dialisi	Simulació de la digestió de matrius alimentàries per sistema "in vitro" dinàmic de dialització.

Taula 4: Quadre resum sobre les formacions d'equips i tecnologies adquirides en l'estada de pràctiques al grup FoodIE