

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## ***ENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE CAFÉ TOSTADO MEDIANTE EMULSIONES DE PICKERING ESTABILIZADAS CON PARTÍCULAS DE QUITOSANO***

TRABAJO FINAL DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS  
ALIMENTOS

AUTOR: ENRIQUE SANTAFOSTA CERDÁ

TUTORA: AMPARO QUILES CHULIÁ

COTUTORA: ISABEL HERNANDO HERNANDO

DIRECTORA EXPERIMENTAL: ELISA FRANCO RIBEIRO

*Curso académico: 2017/2018*  
VALENCIA, JULIO 2018



## **Encapsulación de aceite de café tostado mediante emulsiones de Pickering estabilizadas con partículas de quitosano.**

**Autor:** Enrique Santafosta Cerdá

**Tutora:** Amparo Quiles Chuliá

**Cotutora:** Isabel Hernando Hernando

**Directora experimental:** Elisa Franco Ribeiro

Valencia, julio 2018

### **RESUMEN:**

Las emulsiones estabilizadas por una capa de partículas sólidas adsorbidas en la interfase aceite-agua son conocidas como emulsiones de Pickering. Estos sistemas han sido motivo de muchos estudios debido a su amplia posibilidad de aplicación para cremas corporales, productos agroquímicos, alimentos, fármacos, etc. en diferentes industrias. Las emulsiones de Pickering son interesantes desde el punto de vista del procesado, pues la capa de partículas adsorbida en la interfase representa una fuerte barrera estérica, previniendo la floculación y coalescencia de las gotas. El objetivo de este trabajo es valorizar excedentes y desríos de café tostado mediante la investigación y el desarrollo de emulsiones de Pickering de aceite de café tostado estabilizadas con nanopartículas coloidales de quitosano elaboradas a partir de dos métodos distintos (gelificación iónica y deprotonación). Con la encapsulación del aceite mediante estas emulsiones de Pickering se pretende mejorar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos, que están presentes de forma natural en el aceite de café tostado. Los resultados muestran en general que el uso de la técnica de gelificación iónica genera emulsiones desestructuradas y que las emulsiones elaboradas con bajo contenido en aceite son las más digeridas y las que presentan mayor bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y mayor capacidad antioxidante en la fase intestinal.

**Palabras clave:** aceite de café tostado, quitosano, tripolifosfato, emulsión, nanopartículas de Pickering, digestión *in vitro*, bioaccesibilidad, capacidad antioxidante.

## **Encapsulació d'oli de cafè torrat mitjançant emulsions de Pickering estabilitzades amb partícules de quitosan.**

**Autor:** Enrique Santafosta Cerdá

**Tutora:** Amparo Quiles Chuliá

**Cotutora:** Isabel Hernando Hernando

**Directora experimental:** Elisa Franco Ribeiro

València, juliol 2018

### **RESUM:**

Les emulsions estabilitzades mitjançant una capa de partícules sòlides adsorbides en la interfase oli-aigua son conegudes com a emulsions de Pickering. Aquests sistemes han sigut motiu de molts estudis donada la seua ampla possibilitat d'aplicació per a cremes corporals, productes agroquímics, aliments, fàrmacs, etc. en diferents indústries. Les emulsions de Pickering són interessants des del punt de vista del processat, puix la capa de partícules adsorbides a la interfase representa una forta barrera estèrica, prevenint la floculació y coalescència de les gotes. El objectiu d'aquest treball és valoritzar excedents i destries de cafè torrat mitjançant la investigació i el desenvolupament d'emulsions de Pickering d'oli de cafè torrat estabilitzades amb nanopartícules col·loïdals de quitosan elaborades a partir de dos mètodes diferents (gelificació iònica i deprotonació). Amb la encapsulació de l'oli mitjançant aquestes emulsions de Pickering es pretén millorar la bioaccessibilitat dels compostos bioactius, que estan presents de manera natural a l'oli de cafè torrat. Els resultats mostren, en general, que l'ús de la tècnica de gelificació iònica genera emulsions desestructurades i que les emulsions elaborades amb un baix contingut en oli són les més digerides i les que presenten major bioaccessibilitat de compostos fenòlics i major capacitat antioxidant a la fase intestinal.

**Paraules clau:** oli de cafè torrat, quitosan, tripolifosfato, emulsió, nanopartícules de Pickering, digestió *in vitro*, bioaccessibilitat, capacitat antioxidant.

## **Encapsulation of roasted coffee oil by Pickering emulsions stabilized with chitosan particles.**

**Author:** Enrique Santafosta Cerdá

**Tutor:** Amparo Quiles Chuliá

**Cotutor:** Isabel Hernando Hernando

**Experimental director:** Elisa Franco Ribeiro

Valencia, July 2018

### **ABSTRACT:**

Emulsions stabilized by a layer of solid particles adsorbed on the interface oil-water are known as Pickering emulsions. These systems have been reason of numerous studies due to its wide possibility of application on body creams, agrochemical products, aliments, drugs, etc. in different industries. Pickering emulsions are interesting from the processing point of view, as the particle layer adsorbed on the interface represents a strong steric barrier, preventing flocculation and coalescence of drops. The objective of this dissertation is to valorise surpluses and waste of toasted coffee by investigating and developing Pickering emulsions out of toasted coffee oil stabilized by colloidal nanoparticles of chitosan elaborated from two different methods (ionic gelation and deprotonation). With oil encapsulation with this Pickering emulsions it is pretended to improve bioaccessibility of bioactive compounds, which are present in a natural way on toasted coffee oil. Results show, in general, that using the ionic gelation technique generates unstructured emulsions and that emulsions elaborated with a low oil content are the most digested and the ones that present more bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant capacity on intestinal phase.

**Key words:** toasted coffee oil, chitosan, tripolyphosphate, emulsion, Pickering nanoparticles, *in vitro* digestion, bioaccessibility, antioxidant capacity.

## Agradecimientos

Aprovecho estas líneas para agradecer a todas las personas que han sido fundamentales en la realización de este trabajo.

En primer lugar, agradecer a todo el grupo MIQUALI el trato recibido durante todo el año y su entera disponibilidad en cualquier momento, habéis conseguido que me sienta uno más del laboratorio, pero en especial agradecer a mi tutora Amparo por haber accedido a que realizara el trabajo con ella y por ayudarme en todo lo que he necesitado, hasta cuando menos tiempo tenía y por hacerlo siempre con una sonrisa. También a mi cotutora Isabel, por ser un apoyo incondicional y por todo su tiempo dedicado.

A todo el grupo de doctorandos, por hacer las horas de laboratorio más amenas y divertidas, pero sobre todo a Jenny por su incansable paciencia y ayuda en absolutamente todo lo que he necesitado. Y como no, a Elisa, por dejarme formar parte de su proyecto, por explicarme todo lo que hiciera falta, por enseñarme a desenvolverme en un laboratorio, por confiar en mí, por ayudarme con este trabajo y por un sinfín más de cosas, pero, sobre todo, por ser la mejor directora experimental que podía haber tenido.

A mis abuelos, Inmaculada, Tere y Enrique, por hospedarme estos cuatro años de carrera en sus casas, y a mi abuelo Rafa, porque allá donde esté, espero que esté orgulloso de mí. A mis padres y hermana, por aguantar mis momentos de agobio durante la carrera y el TFG. Y no me puedo olvidar de mi pareja, por tener siempre una sonrisa y una palabra de motivación cada vez que levantaba la vista de los apuntes o del ordenador y por hacer siempre que los momentos duros, lo hayan sido menos.

# Índice

<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Objetivos y plan de trabajo</b> .....	<b>6</b>
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	<b>7</b>
<b>3.1 Preparación de las emulsiones</b> .....	<b>7</b>
3.1.1 Ingredientes .....	7
3.1.2 Preparación .....	7
<b>3.2 Digestión <i>in vitro</i> de las emulsiones para la determinación de la digestibilidad lipídica mediante el método pH stat.</b> .....	<b>8</b>
3.2.1 Fase oral .....	8
3.2.2 Fase gástrica .....	8
3.2.3 Fase intestinal.....	8
3.2.4 Determinación de AGL .....	8
<b>3.3 Digestión <i>in vitro</i> de las emulsiones para la determinación de la bioaccesibilidad en el aceite de café tostado</b> .....	<b>10</b>
3.3.1 Fase oral, gástrica e intestinal.....	10
3.3.2 Fase micelar.....	11
<b>3.4 Determinación de fenoles solubles totales</b> .....	<b>11</b>
<b>3.5 Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH</b> .....	<b>12</b>
<b>3.6 Microestructura de las emulsiones por Microscopía Láser Confocal de Barrido (CLSM)</b> .....	<b>13</b>
<b>3.7 Determinación del tamaño de partícula</b> .....	<b>13</b>
<b>3.8 Análisis estadístico</b> .....	<b>14</b>
<b>4. Resultados</b> .....	<b>15</b>
<b>4.1 Digestibilidad <i>in vitro</i> de las emulsiones</b> .....	<b>15</b>
<b>4.2 Efecto de la digestión <i>in vitro</i> de las emulsiones sobre los compuestos fenólicos y su bioaccesibilidad (fenoles solubles totales)</b> .....	<b>17</b>
<b>4.3 Capacidad antioxidante de las emulsiones iniciales y del aceite por DPPH</b> .....	<b>19</b>
<b>4.4 Microestructura de las emulsiones</b> .....	<b>20</b>
<b>4.5 Tamaño de partícula</b> .....	<b>23</b>
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>25</b>
<b>6. Bibliografía</b> .....	<b>26</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de las condiciones en cada fase de la digestión y cambios comunes que pueden ocurrir para los glóbulos de una emulsión (Singh <i>et al.</i> , 2009).....	<b>4</b>
<b>Figura 2.</b> Valorador automático Mettler-Toledo DL50.....	<b>9</b>
<b>Figura 3.</b> Funcionamiento del método pH stat con valorador automático (Li & McClements, 2010).....	<b>10</b>
<b>Figura 4.</b> Carousel 6 Plus Reaction Station™ con Tech Stirring Hotplate.....	<b>10</b>
<b>Figura 5.</b> Tubo de centrifuga donde se observan las tres fases.....	<b>11</b>
<b>Figura 6.</b> Microscopio láser confocal de barrido.....	<b>13</b>
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de AGL en función del tiempo de digestión intestinal in vitro. Los valores representados corresponden a la media de tres repeticiones por emulsión. CS_33: Emulsión con 33% de aceite y quitosano; CS-TPP_33: Emulsión con 33% de aceite, quitosano y TPP; CS_50: Emulsión con 50% de aceite y quitosano; CS-TPP_50: Emulsión con 50% de aceite, quitosano y TPP. Las diferentes letras para cada muestra indican valores con una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) según la prueba de rangos múltiples LSD de Fisher.....	<b>15</b>
<b>Figura 8.</b> Gráfica donde se muestra el índice de concentración que causa un 50% de reducción de DPPH (IC50) de las emulsiones. Los valores representados corresponden a la media de tres repeticiones por emulsión. CS_33 (emulsión con un 33% de aceite de café tostado y quitosano), CS-TPP_33 (emulsión con un 33% de aceite de café tostado, quitosano y TPP), CS_50 (emulsión con un 50% de aceite de café tostado y quitosano) y CS-TPP_50 (emulsión con un 50% de aceite de café tostado, quitosano y TPP) y del aceite de café tostado. Las diferentes letras minúsculas indican valores con una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) según la prueba de rangos múltiples LSD de Fisher.....	<b>19</b>
<b>Figura 9.</b> Imágenes tomadas con microscopio confocal láser de barrido (CLSM) con escala de 60 $\mu\text{m}$ de las emulsiones CS_50, CS-TPP_50, CS_33 y CS-TPP_33 antes y durante la digestión in vitro al finalizar las fases oral, gástrica e intestinal y a tiempo 0. CS_50: Emulsión con un 50% de aceite de café tostado y estabilizada con quitosano (CS); CS-TPP_50: Emulsión con un 50% de aceite de café tostado y estabilizada con quitosano (CS) y tripolifosfato (TPP). CS_33: Emulsión con un 33% de aceite de café tostado y estabilizada con CS. CS-TPP_33: Emulsión con un 33% de aceite de café tostado y estabilizada con CS y TPP.....	<b>20</b>
<b>Figura 10.</b> Representación gráfica del tamaño de partícula de las emulsiones iniciales y a tiempo 0. A: emulsión CS_50; B: emulsión CS-TPP_50; C: emulsión CS_33 y D: emulsión CS-TPP_33.....	<b>23</b>

## Índice de tablas

**Tabla 1.** Cantidad de compuestos para la preparación de las emulsiones y concentración final de los mismos.....**8**

**Tabla 2.** Contenido en fenoles solubles totales de las cuatro emulsiones en su fase inicial, al final de la digestión y en su fase micelar, y bioaccesibilidad de las emulsiones.....**17**

## Listado de abreviaturas

TGI: tracto gastrointestinal.

O/W: emulsión aceite en agua.

W/O: emulsión agua en aceite.

AG: ácidos grasos.

CS: quitosano.

TPP: tripolifosfato.

ID: intestino delgado.

IG: intestino grueso.

CLSM: microscopía láser confocal de barrido.

CS\_50: emulsión con un 50% de aceite de café tostado y estabilizada con CS.

CS-TPP\_50: emulsión con un 50% de aceite de café tostado y estabilizada con CS y TPP.

CS\_33: emulsión con un 33% de aceite de café tostado y estabilizada con CS.

CS-TPP\_33: emulsión con un 33% de aceite de café tostado y estabilizada con CS y TPP.

AGL: ácidos grasos libres.

TG: triglicéridos.

MG: monoglicérido.

BC: bioactivos

FST: fenoles solubles totales.

FRAP: ferric reducing antioxidant power.

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

IC50: índice de concentración que causa un 50% de reducción de DPPH.

FITC: isotiocianato de fluoresceína.



# 1. Introducción

El café es uno de los principales cultivos agrícolas y uno de los productos más comercializados en el mundo. Se sabe que el café tiene capacidad antioxidante (Sánchez-González *et al.*, 2005). El concepto de capacidad antioxidante se originó primero en química y se adaptó después a la biología, medicina, epidemiología y nutrición (Floegel *et al.*, 2011). Describe la habilidad redox que tienen las moléculas en los alimentos y sistemas biológicos para atraer los radicales libres (Floegel *et al.*, 2011; Kuskoski *et al.*, 2005; Brand-Williams *et al.*, 1994). En los alimentos, el concepto de capacidad antioxidante es más amplio pues considera los efectos aditivos y sinérgicos que se generan entre todos los antioxidantes presentes, en vez del efecto que tienen estos antioxidantes como compuestos aislados; por ello es interesante, pero también complejo, estudiar los beneficios potenciales, sobre ciertas enfermedades mediadas por el estrés oxidativo, que tienen estos compuestos (Floegel *et al.*, 2011). La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solamente por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, sino que también depende del microambiente en el que se encuentra el compuesto (Kuskoski *et al.*, 2005). Además, los antioxidantes naturales, como por ejemplo algunos metabolitos secundarios de naturaleza fenólica (polifenoles), han ganado un creciente interés tanto entre los consumidores como entre la comunidad científica, debido a que además del papel que ejercen como nutrientes esenciales y micronutrientes, también se les atribuyen algunos efectos beneficiosos, como: i) frente a enfermedades cardiovasculares o cancerígenas, entre otras, ii) capacidad antialérgica y iii) capacidad antimicrobiana (Thaipong *et al.*, 2005).

Brasil es el mayor productor de café del mundo; el aceite de café representa un importante subproducto de la industria cafetera y tiene diferentes aplicaciones, por ejemplo, se usa para incrementar el potencial aromático del café soluble y de otras bebidas que contienen café, así como para saborizar caramelos, tartas y postres (Frascareli *et al.*, 2011).

En Brasil, el aceite de café tostado se obtiene prensando los granos tostados antes de la extracción del café soluble (Frascareli *et al.*, 2011). Durante el proceso de tostado del café se generan algunos compuestos volátiles, responsables del sabor y aroma característicos del café tostado (Esquivel & Jiménez, 2011), y también pigmentos, que proporcionan un aspecto marrón oscuro al café (Frascareli *et al.*, 2011). Además, se ha observado que el aceite de café tostado tiene actividad antibacteriana contra algunos microorganismos, como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* y diversas cepas de enterobacterias, probablemente debido a la actividad antibacteriana de algunos de los componentes del café, como el ácido cafeico, la trigonelina, la cafeína, el ácido clorogénico, el ácido protocatequico, y las melanoidinas generadas durante el proceso de tostado (Esquivel & Jiménez, 2011).

El proceso de tostado parece tener poco efecto sobre la fracción lipídica, ya que el aceite de café tostado y el de café verde conservan más o menos la misma composición y propiedades (Esquivel & Jiménez, 2011). Además de los compuestos volátiles del aroma y de los pigmentos responsables del color, el aceite de café tostado está compuesto por un 75% de triacilglicéridos

(Speer & Speer, 2016) lo que lo hace susceptible a la oxidación lipídica y como consecuencia a la generación de olores y sabores indeseables (Frascareli *et al.*, 2011).

Para evitar procesos degradativos, como la oxidación lipídica, una alternativa puede ser la emulsificación del aceite, para formar glóbulos recubiertos (encapsulados) por algún material que ofrezca protección frente al oxígeno, calor, humedad, luz, etc.

Una emulsión es una mezcla homogénea de dos líquidos inmiscibles entre sí. Uno actúa como fase dispersa y el otro se encuentra en suspensión en forma de pequeñas gotitas o partículas. La mayoría de las grasas que se consumen terminan en forma de emulsión en su paso por el tracto gastrointestinal (TGI), debido a las fuerzas mecánicas que actúan en el proceso de digestión, como el masticado o los movimientos de contracción estomacales (Mun *et al.*, 2006). La presencia de moléculas surfactantes en los alimentos y en el cuerpo humano, como los fosfolípidos y las sales biliares, respectivamente, contribuyen a la formación de estas emulsiones en el TGI, es por esto que normalmente el sustrato para la digestión de las grasas se encuentra en forma de pequeños glóbulos de grasa dispersos en un medio acuoso (McClements *et al.*, 2000).

Las emulsiones constan de tres partes, la fase continua, la fase dispersa y la interfase entre estos dos medios. Asimismo, son termodinámicamente inestables debido a la energía libre positiva que requieren para aumentar el área superficial total de los glóbulos dispersos. Por lo tanto, la emulsión tenderá a reducir esta área superficial disminuyendo el número de gotas y aumentando el tamaño de éstas. También afectan a esta inestabilidad las sustancias hidrofílicas y lipofílicas, que presentan diferentes densidades, por lo que se hace necesario la presencia de moléculas anfifílicas o emulsionantes que se ubiquen en la interfase entre las dos sustancias de diferente naturaleza, la acuosa y la lipídica, haciendo así más estable el sistema. Los principales tipos de emulsiones se tratan de aceite en agua (O/W) o de agua en aceite (W/O), dependiendo estas de factores como el porcentaje de cada sustancia o el tipo de emulsionante. Aunque también hay formas más complejas como O/W/O o W/O/W (McClements *et al.*, 2000).

Los emulsionantes más utilizados por la industria alimentaria son las proteínas, en su mayoría provenientes de la leche, como pueden ser la proteína de suero o las caseínas. También son ampliamente utilizados como emulsionantes los mono y diglicéridos de ácidos grasos (AG) y la lecitina de soja. Recientemente están ganando protagonismo los derivados de la celulosa para su utilización como emulsionantes (Sanz *et al.*, 2015).

Las emulsiones de Pickering se estabilizan mediante partículas sólidas coloidales (Berton-Carabin & Schroën, 2015), tienen unas propiedades fisicoquímicas semejantes a las emulsiones convencionales y pueden usarse para sustituirlas, específicamente, cuando no conviene utilizar un surfactante (Mao & Miao, 2015). Las partículas sólidas empleadas, como sílice coloidal, nanopartículas de polisacáridos o proteínas, pueden interaccionar con la fase acuosa u oleosa, lo que permite un fuerte anclaje de estas partículas en la interfase aceite-agua. La interfase de una emulsión de Pickering es mecánicamente más fuerte que la de una emulsión convencional

y puede aportar la suficiente fuerza de repulsión estérica como para inhibir la coalescencia de las gotas. Para que se produzca una estabilización efectiva, es preferible que las partículas sólidas sean pequeñas (Mao & Miao, 2015).

El quitosano (CS) es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa; deriva del exoesqueleto de gambas y otros crustáceos y es uno de los pocos biopolímeros cargados positivamente que existen en el mundo. Debido a sus características únicas de biodegradabilidad, biocompatibilidad, bioadhesión y no toxicidad, las nanopartículas de quitosano se emplean como sistemas de liberación de medicamentos, nanofibras, biosensores y películas comestibles (Shah *et al.*, 2015). Se utilizan una serie de métodos para producir nanopartículas de quitosano estables para diferentes aplicaciones. Uno de los métodos más empleados es la técnica de gelificación iónica mediante el uso de tripolifosfato (TPP). Esta técnica se basa en interacciones iónicas entre las cargas positivas de los grupos amino primarios del quitosano y las cargas negativas del tripolifosfato (TPP), que es el agente de entrecruzamiento de iones más utilizado dado su no toxicidad y propiedades multivalentes. Esta interacción solamente requiere condiciones suaves en lo que respecta a la temperatura y pH, y el tamaño de las nanopartículas puede ser controlado variando el ratio quitosano : TPP, el pH y la masa molar del quitosano. El proceso de entrecruzamiento entre el CS y el TPP no solo evita el uso del entrecruzamiento químico y los agentes emulsificantes, que en muchos casos son tóxicos para los organismos, sino que también previene de la posibilidad de que se produzcan daños en los medicamentos, particularmente agentes biológicos (Shah *et al.*, 2015). Otro método, se basa en la formación de nanopartículas de quitosano agregadas mediante la deprotonación del quitosano. El quitosano es soluble en disoluciones acuosas ácidas diluidas debido a la protonación de los grupos amino libres del quitosano, dando lugar a un comportamiento policatiónico (Asfour *et al.*, 2017). De esta forma, el quitosano posee el grupo amino catiónico ( $\text{NH}_3^+$ ) el cual se une al grupo hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) de la disolución, lo que da lugar a una baja actividad superficial del quitosano, pues no es un buen emulsionante por naturaleza. A un pH elevado, superior a su  $\text{pK}_a$  (6,5), se produce la deprotonación del grupo  $\text{NH}_3^+$  a  $\text{NH}_2$ , la cual produce una reducción en la carga neta de las moléculas de quitosano, aumentando la atracción intermolecular que intensifica la hidrofobicidad del agregado de partículas de quitosano. De este modo, el quitosano mediante interacciones interpoliméricas da lugar a la formación de un gel de nanopartículas (Asfour *et al.*, 2017).

Las digestiones *in vivo* son las que mejor representan la digestión de un alimento en condiciones reales, estas pueden variar dependiendo del sexo, edad, estado de salud y momento en que se realizan (Hur *et al.*, 2011), por no mencionar otros inconvenientes como la dificultad y los costes de realizar estas digestiones, así como los problemas éticos que pueden presentar (Kong & Singh, 2008). Es por este motivo por el que las digestiones *in vitro* son una alternativa más barata, reproducible y rápida para la obtención de primeras hipótesis en lo que respecta a la digestión de un determinado alimento o nutriente (Minekus *et al.*, 2014). Es importante saber que la digestión es un proceso secuencial que va desde la boca al intestino, pasando por el estómago y que la comida que llega al intestino ya ha sido parcialmente digerida por la saliva o los jugos gástricos, entre otros. Es por ello por lo que muchos modelos *in vitro* que simulan las

condiciones de digestión de un órgano específico pueden no revelar los cambios exactos de la digestión (Mao & Miao, 2015).

La digestión es el proceso mediante el cual se produce la ruptura de la comida a formas más simples (glucosa, aminoácidos, ácidos grasos, etc.) que el cuerpo puede absorber y utilizar para obtener energía, crecer y reparar células. El tracto gastrointestinal (TGI) está formado por la boca (cavidad oral), la garganta (faringe), el esófago, estómago, intestino delgado (ID) e intestino grueso (IG), tal y como se puede ver en la figura 1. En cada parte del TGI, la comida pasa por una digestión tanto mecánica, como química, antes de que los nutrientes sean liberados y absorbidos (Mao & Miao, 2015).

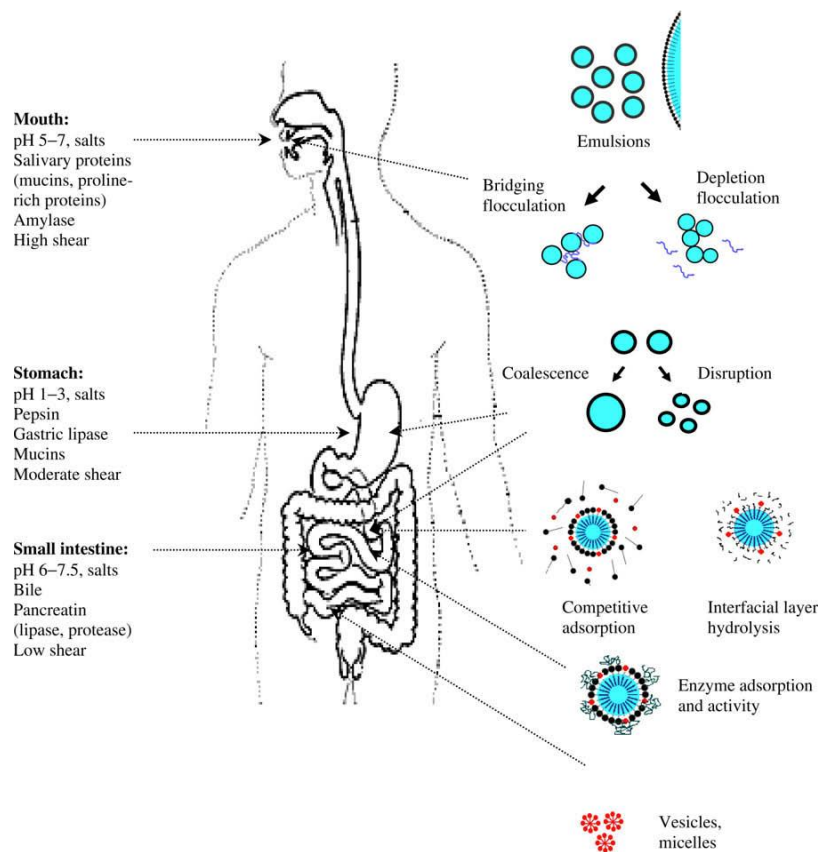


Figura 1. Representación esquemática de las condiciones en cada fase de la digestión y cambios comunes que pueden ocurrir para los glóbulos de una emulsión (Singh *et al.*, 2009).

La digestión comienza en la boca cuando los dientes trituran y mastican las emulsiones en combinación con el movimiento de la lengua y diversas reacciones químicas, mezclándose con la saliva, un fluido biológico formado por agua, proteínas, electrolitos y enzimas; por ello las emulsiones verán sus estructuras modificadas antes de llegar al estómago (Mao & Miao, 2015). Al llegar al estómago se mezcla con los fluidos digestivos y se rompen en partículas más pequeñas que permanecen en el estómago durante mucho más tiempo que en la boca, donde se encuentran en un medio altamente ácido y con movimiento peristáltico, durante este tiempo se mezclan con los fluidos gástricos que contienen enzimas proteolíticas y lipolíticas, mucinas y electrolitos. Después, en el ID se vuelve a un medio con un pH neutro que contiene diferentes

enzimas y coenzimas, sales inorgánicas y sales biliares. El paso al ID estimula la contracción de la vesícula biliar, y las sales biliares, las cuales desempeñan un papel importante en la digestión y adsorción de los lípidos, se liberan en el duodeno (Mao & Miao, 2015).

En este trabajo se diseñan diferentes emulsiones de Pickering de aceite de café tostado encapsulándolo con nanopartículas de quitosano, que han sido preparadas empleando dos técnicas diferentes: i) la gelificación iónica con TPP y ii) la deprotonación del CS. El objetivo de este trabajo es evaluar la eficacia que tienen estas nanopartículas coloidales de quitosano en la encapsulación de aceite de café tostado mediante el estudio de la microestructura, tamaño de partícula, bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos y digestibilidad lipídica *in vitro* de las emulsiones.

## 2. Objetivos y plan de trabajo

El principal objetivo de este trabajo es valorizar excedentes y destríos de café tostado, mediante el desarrollo de nuevas emulsiones de Pickering de aceite de café tostado estabilizadas con nanopartículas coloidales de quitosano elaboradas a partir de dos métodos (gelificación iónica y deprotonación).

Para alcanzar estos objetivos se han establecido los siguientes objetivos parciales:

- Investigar la formación/diseño de emulsiones tipo O/W a partir de diferentes proporciones de aceite de café tostado, utilizando nanopartículas de quitosano como estabilizante obtenidas por el método de deprotonación.
- Investigar la formación/diseño de emulsiones tipo O/W a partir de diferentes proporciones de aceite de café tostado, utilizando nanopartículas de quitosano como estabilizante obtenidas por el método de la gelificación iónica utilizando TPP como agente de entrecruzamiento.
- Estudiar la digestibilidad lipídica *in vitro* de las emulsiones y relacionarla con las modificaciones en la microestructura y en el tamaño de partícula que sufren las emulsiones durante el proceso de digestión *in vitro*.
- Evaluar la bioaccesibilidad *in vitro* de los compuestos bioactivos presentes en las emulsiones.

Para alcanzar los objetivos, se programa el siguiente plan de trabajo:

- Búsqueda y estudio bibliográfico, de manera sistemática, durante la realización del Trabajo Final de Grado. Estudio de la normativa y protocolos a seguir en la parte experimental.
- Diseño de los experimentos.
- Diseño, desarrollo y obtención de las emulsiones de Pickering a partir de diferentes concentraciones de aceite de café tostado (33% y 50%) utilizando nanopartículas de quitosano elaboradas por dos métodos diferentes (gelificación iónica y deprotonación).
- Determinación de la digestibilidad lipídica *in vitro* de las emulsiones.
- Determinación de la microestructura por Microscopia Láser Confocal de Barrido (CLSM) y del tamaño de partícula (Mastersizer) de las emulsiones, durante la digestión oral, gástrica, e intestinal *in vitro*.
- Determinación de la bioaccesibilidad *in vitro* de los compuestos bioactivos mediante el estudio de la capacidad antioxidante y fenoles totales.
- Análisis de los resultados.
- Redacción del documento de Trabajo Fin de Grado.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1 Preparación de las emulsiones

#### 3.1.1 Ingredientes

Las emulsiones de Pickering se preparan con aceite de café tostado (*Coffea arabica L.*, donado por la empresa Cia., Iguazu, Brasil) y se estabilizan mediante nanopartículas de quitosano de bajo peso molecular (Sigma-Aldrich,) o mediante una mezcla de nanopartículas de quitosano (CS) y tripolifosfato (TPP). Variando la concentración de estos ingredientes se preparan cuatro tipos diferentes de emulsiones: emulsión con un 50% de aceite de café tostado y estabilizada con CS (CS\_50); emulsión con un 50% de aceite de café tostado y estabilizada con CS y TPP (CS-TPP\_50); emulsión con un 33% de aceite de café tostado y estabilizada con CS (CS\_33) y emulsión con un 33% de aceite de café y estabilizada con CS y TPP (CS-TPP\_33) (Tabla 1).

#### 3.1.2 Preparación

Para obtener las emulsiones O/W (20 g) estabilizadas con quitosano (CS\_50 y CS\_33), se elabora primero la disolución de quitosano según la metodología propuesta por Mwangi et al., (2016). Para ello, se prepara una disolución acuosa de ácido acético (1% v/v) y se disuelve en ella el biopolímero (CS) (0,9% g/v); esta disolución se mantiene en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. A continuación, se ajusta el pH a 6,7 utilizando NaOH.

Para obtener las emulsiones (20 g) estabilizadas con CS y TPP (CS-TPP\_50 y CS-TPP\_33) mediante la técnica de gelificación iónica, primero se prepara una disolución de CS al 1,8% (p/p) siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado anterior, pero sin ajustar el pH. Por otro lado, para que la disolución final de CS con TPP tenga un ratio 5:1 respectivamente, se prepara una disolución de TPP en agua bidestilada (0,36%, p/v) que se deja en agitación durante 10 min y posteriormente se guarda en nevera a 4 °C. Finalmente, la disolución de TPP (5 g para la emulsión CS-TPP\_50 ó 6,7 g para la emulsión CS-TPP\_33) se añade a 5 g ó 6,7 g de la disolución de CS y se homogeneiza. De esta manera se produce una gelificación iónica entre las cargas positivas de los grupos amino primarios del quitosano y las cargas negativas de los grupos del TPP (Shah *et al.*, 2016) y se forman las nanopartículas de CS y TPP.

Posteriormente, se dispersa el aceite de café tostado (50% o 33% g/v) en la disolución de nanopartículas de quitosano o de quitosano y TPP mediante un agitador Ultra Turrax (T-18, IKA, Alemania) a 12.000 r.p.m. durante 5 min. En la Tabla 1 se presentan los 4 tipos distintos de emulsiones estudiados en este trabajo. Todas las emulsiones se elaboran por triplicado.

Tabla 1. Cantidad de compuestos para la preparación de las emulsiones y concentración final de los mismos.

Muestra	Cantidad emulsión (g)	Aceite (%)	Disolución CS al 0,9% (%)	Disolución CS al 1,8% (%)	[CS] final (%)	Disolución de TPP al 0,36% (%)	[TPP] final (%)
CS_50	20	50	50	-	0,45	-	-
CS-TPP_50	20	50	-	25	0,45	25	0,09
CS_33	20	33	67	-	0,60	-	-
CS-TPP_33	20	33	-	33,5	0,60	33,5	0,12

CS\_50: Emulsión con un 50% de aceite de café tostado y estabilizada con quitosano (CS); CS-TPP\_50: Emulsión con un 50% de aceite de café tostado y estabilizada con quitosano (CS) y tripolifosfato (TPP). CS\_33: Emulsión con un 33% de aceite de café tostado y estabilizada con CS. CS-TPP\_33: Emulsión con un 33% de aceite de café tostado y estabilizada con CS y TPP.

### 3.2 Digestión *in vitro* de las emulsiones para la determinación de la digestibilidad lipídica mediante el método pH stat.

#### 3.2.1 Fase oral

La preparación de la saliva se lleva a cabo según el método propuesto por Morell *et al.*, (2014) con algunas modificaciones, empleando un ratio saliva : muestra = 1:1. Esta se mezcla con la muestra (5 g) agitando durante 5 s.

#### 3.2.2 Fase gástrica

Una vez añadida la muestra a la celda de digestión, donde el fluido gástrico, preparado según el estudio de Sanz *et al.* (2007) con modificaciones, se ha atemperado durante 5 min a 37 °C, se ajusta el pH a 2 con HCl 6 M. Cuando se alcanza el valor deseado, se añade 1 mg de pepsina (Sigma-Aldrich, P7125) y se deja en agitación durante 1 h a 37 °C.

#### 3.2.3 Fase intestinal

Para la realización de la fase intestinal se sigue el protocolo propuesto por el estudio de Li *et al.* (2011) con algunas modificaciones. Se añaden 5 mL de sales biliares (Sigma Aldrich, B8631) (58 mg/mL) y 1 mL de disolución de electrolitos (NaCl y CaCl<sub>2</sub>) (254,2 mg/mL y 32,2 mg/mL, respectivamente). A continuación, se ajusta el pH a 7 con NaOH 2 M y se añade lipasa de páncreas porcino (Sigma Aldrich, L3126) (ratio 1:2,5, enzima : sustrato). Inmediatamente tras la adición de la enzima se inicia el método pH stat en el valorador para medir la liberación de ácidos grasos.

#### 3.2.4 Determinación de AGL

El seguimiento con el método pH stat se realiza sobre la fase intestinal, para medir la liberación de los ácidos grasos (AGL) (Aarak *et al.*, 2013; Bauer *et al.*, 2005). Este método, se lleva a cabo con un valorador automático Mettler-Toledo DL50 (Mettler-Toledo International, Greifensee, Suiza) (Figura 2) con un vaso de 50 mL de capacidad encamisado, conectado a un baño termostatado a 37 °C, bureta de capacidad 10 mL y agitador. Para monitorizar el proceso en la celda de digestión se emplea un electrodo de pH de vidrio combinado DG115-SC (Mettler-Toledo



International, Greifensee, Suiza). El manejo del valorador automático se realiza desde ordenador por medio del software LabX (Versión 1.1).

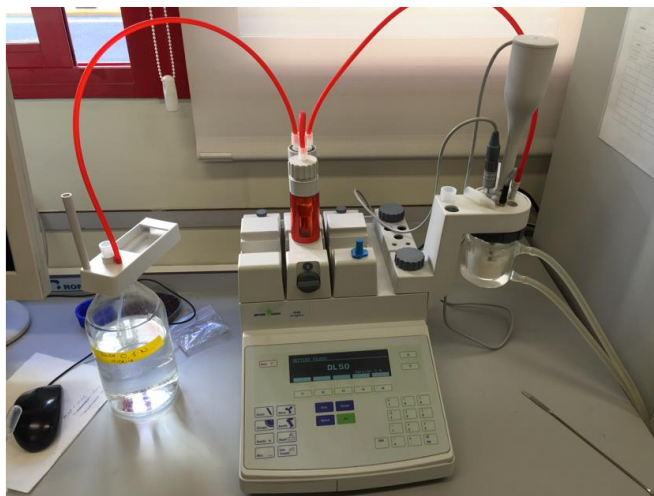


Figura 2. Valorador automático Mettler-Toledo DL50.

Se determinan los AG liberados con el método pH stat por triplicado. Cada molécula de triglicéridos (TG) genera dos ácidos grasos libres (AGL) y un monoglicérido (MG) debido a la acción de la lipasa, como se puede ver en la figura 3. Por lo tanto, conociendo la cantidad de TG presentes inicialmente en la muestra, y los AGL que se liberan durante la digestión, se puede obtener el porcentaje de estos AGL que han sido digeridos por la lipasa (Li & McClements, 2010). Este porcentaje de AGL se calcula (ecuación 1) mediante el número de moles de álcali (NaOH) necesarios para neutralizar los ácidos grasos liberados, dividido por el número de moles de AGL que podrían ser producidos asumiendo una digestión del 100% (Li & McClements, 2010):

$$\%AGL = 100 * \frac{V_{NaOH} * M_{NaOH} * PM_{lipido}}{m_{lipido} * 2} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde  $V_{NaOH}$  es el volumen (L) de hidróxido sódico utilizado para neutralizar los AGL producidos y mantener el pH estático en 7,  $M_{NaOH}$  es la molaridad ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) de la disolución de NaOH utilizada (0,5 M),  $PM_{lipido}$  es el peso molecular del aceite ( $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) y  $m_{lipido}$  es la masa total del aceite presente en la celda de digestión. Los datos generados en este método pH stat consisten en una gráfica que muestra una curva de %AGL frente al tiempo (Li & McClements, 2010).

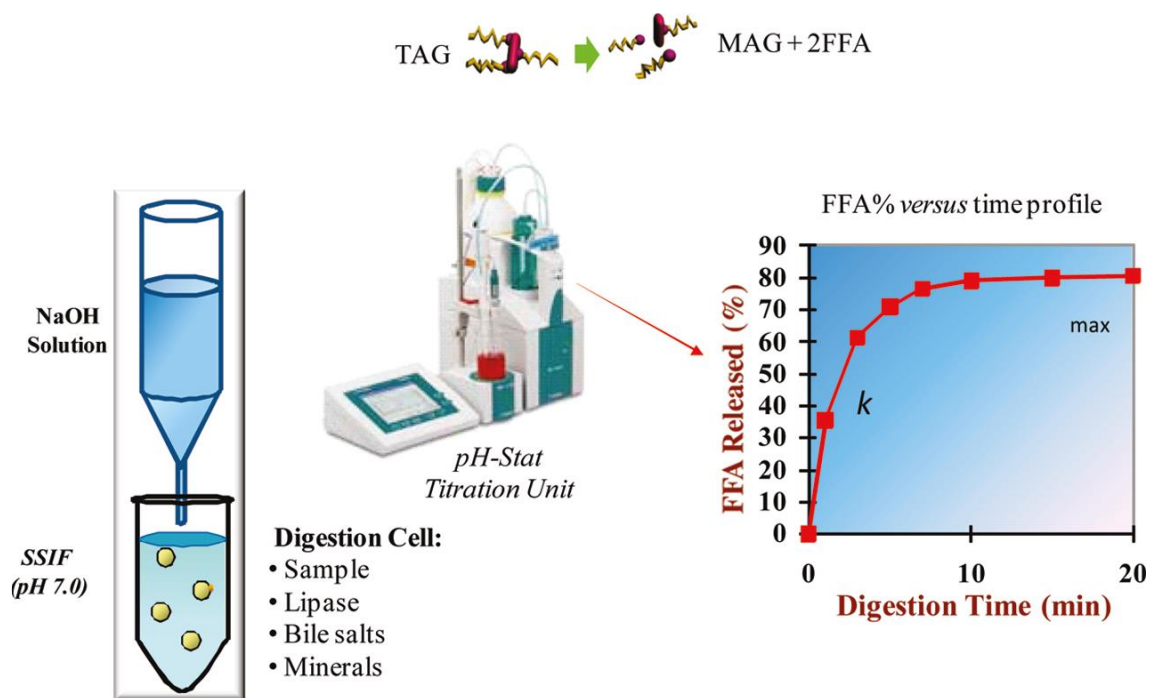


Figura 3. Funcionamiento del método pH stat con valorador automático (Li & McClements, 2010).

### 3.3 Digestión *in vitro* de las emulsiones para la determinación de la bioaccesibilidad en el aceite de café tostado

#### 3.3.1 Fase oral, gástrica e intestinal

Se sigue el mismo protocolo que para la determinación de AGL, con algunas modificaciones. En este caso la digestión se realiza con el Carousel 6 Plus Reaction Station™ con Tech Stirring Hotplate (Radleys, Essex, Reino Unido) (Figura 4) en ausencia de oxígeno utilizando una atmósfera modificada con N<sub>2</sub> y aislado de la luz con la finalidad de determinar los polifenoles totales y la capacidad antioxidante de las emulsiones iniciales, tras su digestión intestinal y en la fase micelar.



Figura 4. Carousel 6 Plus Reaction Station™ con Tech Stirring Hotplate.

### 3.3.2 Fase micelar

Una vez terminada la digestión se utiliza el método de Qian *et al.* (2012) con algunas modificaciones para obtener la fase micelar. Se realiza una centrifugación (Centrifuge 5804 R., Hamburgo, Alemania) a 8.000 r.p.m., 4 °C, 30 min. Tras la centrifugación se obtienen tres fases: una fase superior oleosa, una fase intermedia acuosa (la fase micelar) o fracción bioaccesible y una fase inferior orgánica (Figura 5). A continuación, se separa la fase micelar con papel de filtro.

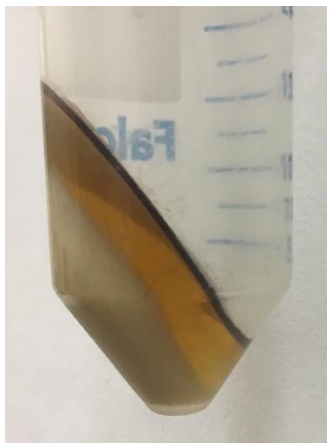


Figura 5. Tubo de centrifuga donde se observan las tres fases.

La bioaccesibilidad se define como la porción de compuestos bioactivos (BC) que se libera desde la matriz alimentaria al tracto gastrointestinal de forma que se encuentra disponible para la absorción intestinal, la cual se determina en la fase micelar utilizando la siguiente ecuación y expresándola como porcentaje

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = \frac{\text{BC fase micelar}}{\text{BC aceite}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Siendo:

BC fase micelar = Concentración de BC en la fracción soluble de la muestra digerida.

BC aceite = Concentración de BC en el aceite de café tostado= 17,21 mg de ácido gálico/g aceite

### 3.4 Determinación de fenoles solubles totales

El contenido en fenoles solubles totales (FST) de las muestras se determina utilizando el método colorimétrico Folin-Denis, según la metodología indicada por Arnal & del Río (2004) con un espectrofotómetro Helios Zeta UV-Visible (Thermo Fisher Scientific Inc., Cambridge, Reino Unido). Previamente se obtiene un extracto de cada muestra realizando dos centrifugaciones (Centrifuge 5415 R., Hamburgo, Alemania) con etanol al 96% a 10.000 r.p.m. durante 10 min. En un tubo de ensayo se coloca 1 mL de extracto, 6 mL de agua bidestilada y 0,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y se agita brevemente, después se guarda en oscuridad. A los 3 min, se añade 1 mL de carbonato sódico saturado (20%). Finalmente se adiciona 1,5 mL de agua bidestilada y se deja reposar en oscuridad durante 90 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se mide la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 765 nm. La curva de calibrado

se realiza utilizando diferentes concentraciones de ácido gálico en etanol al 96%. Los resultados se expresan como miligramos de ácido gálico por gramo de aceite.

### 3.5 Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH

La determinación de la capacidad antioxidante se realiza mediante el método DPPH. La preparación del extracto para la determinación de la capacidad antioxidante se realiza de la misma forma que para la determinación de fenoles totales, realizando dos centrifugaciones con etanol al 96% a 10.000 r.p.m. durante 10 min.

Para la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método DPPH se sigue el método propuesto por Shah *et al.* (2016). Para calcular el índice de concentración que causa un 50% de reducción de DPPH (IC50) se preparan disoluciones de diferentes concentraciones (desde 0,5 hasta 5 mg/mL) a partir del extracto. Se añade en un tubo de ensayo 1 mL del extracto o de la disolución y 4 mL de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (40 µg/mL); se agita en vortex durante 10 s y a continuación, se guarda en oscuridad 30 min. Se realiza también un control con 1 mL de etanol (96%) y 4 mL de DPPH; y un blanco con 1 mL de extracto y 4 mL de etanol (96%). Se mide la absorbancia a 517 nm en cubetas de plástico.

Para los cálculos se utiliza la ecuación 3:

$$\% \text{Actividad Antioxidante} = \% \text{ de inhibición de DPPH} = \frac{Abs_{control} - Abs_{muestra} - Abs_{blanco}}{Abs_{control}}$$

Donde  $Abs_{control}$  es la absorbancia del control;  $Abs_{muestra}$  es la absorbancia de cada muestra y  $Abs_{blanco}$  es la absorbancia del blanco para cada muestra.

Se obtiene un gráfico donde se representa el %AA vs. concentración de muestras. Los resultados se expresan como mg de muestra por mL de etanol. Se realizan todas las mediciones por triplicado.

La actividad antioxidante está relacionada con el contenido natural en compuestos antioxidantes que tiene el producto, como esteroides, tocoferoles o diterpenos (Raba *et al.*, 2015). El valor de IC50 es inversamente proporcional a la actividad antioxidante de los productos, en este caso del aceite de café tostado. Los radicales libres generados durante el tostado reaccionan en primer lugar con los compuestos antioxidantes de las muestras de aceite de café y el remanente de antioxidantes reacciona con el DPPH. Cuando las muestras de aceite se han agotado en compuestos antioxidantes, los radicales libres formados a partir de la oxidación lipídica reaccionan con el DPPH e inducen un incremento en el porcentaje de inhibición de DPPH. Así, los cambios en la absorbancia del DPPH pueden ser utilizados para determinar el grado de oxidación lipídica y de actividad antioxidante en los sistemas lipídicos (Raba *et al.*, 2015).

### 3.6 Microestructura de las emulsiones por Microscopía Láser Confocal de Barrido (CLSM)

Para la observación de las diferentes emulsiones por CLSM, se utiliza un microscopio Nikon Eclipse E800 acoplado a una unidad C1 Confocal (Nikon, Tokyo, Japón) (Figura 6). Para la excitación de los agentes de tinción fluorescentes FITC (isotiocianato de fluoresceína) y Nile red (rojo nilo), se emplean como fuente de luz dos láseres, un láser Ar (488 nm) y un láser He-Ne (543 nm); y se recoge la emisión con un detector a 515 y 570 nm, respectivamente. El FITC (Electronic Microscopy Sciences, Hatfield, EEUU), se disuelve en etanol a una concentración de 0,05%. Este agente de tinción se utiliza para teñir polisacáridos. El Nile red (Fluka, Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU), se disuelve en polietilenglicol 4000 (PEG) a una concentración de 0,01% y se utiliza para teñir la grasa. Para observar la muestra por CLSM, se coloca una gota de la emulsión sobre un portaobjetos de vidrio y se le añaden 10  $\mu$ L de disolución de Nile red y 10  $\mu$ L de disolución de FITC. Las observaciones se realizan 15 minutos después de añadir cada agente de tinción empleando una lente objetiva de 40x (Nikon, Japón). Las imágenes se obtienen y se almacenan con una resolución de 1024 x 1024 píxel utilizando el software del microscopio (EZ-C1 v.3.40, Nikon, Tokyo, Japón).

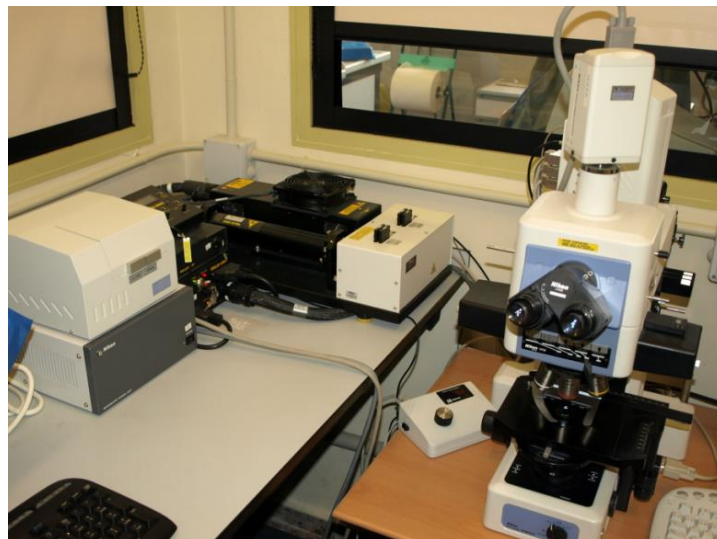


Figura 6. Microscopio láser confocal de barrido.

### 3.7 Determinación del tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partícula se determina mediante dispersión de luz láser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido). Las condiciones de trabajo empleadas son: índice de refracción del aceite de café 1,47 (López-Fontal & Castaño-Castrillón, 1999); índice de refracción del dispersante (agua) 1,33; asumiendo una absorbancia de 0,01. Las medidas se efectúan por duplicado.

### **3.8 Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se lleva a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA simple) y las mínimas diferencias significativas de Fischer se calcularon con un nivel de significación del 95% ( $P < 0,05$ ). Para ello se emplea el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI (versión 16.2.04).

## 4. Resultados

### 4.1 Digestibilidad *in vitro* de las emulsiones

En la figura 7 se muestra el porcentaje de ácidos grasos liberados (AGL), de las emulsiones estudiadas en este trabajo (CS\_33, CS-TPP\_33, CS\_50 y CS-TPP\_50), durante el proceso de la digestión intestinal *in vitro*. Las emulsiones CS\_33, CS-TPP\_33 y CS\_50 presentan un comportamiento similar al principio de la digestión (10 min) con una velocidad de liberación de ácidos grasos notablemente más rápida que en la emulsión CS-TPP\_50.

Como se puede apreciar, no existen diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en la proporción de ácidos grasos liberados durante el transcurso del proceso digestivo, entre las dos emulsiones elaboradas con un 33% de aceite de café tostado (CS\_33 y CS-TPP\_33). Sin embargo, sí existen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las dos emulsiones elaboradas con un 50% de aceite (CS\_50 y CS-TPP\_50). Si se comparan las cuatro emulsiones estudiadas, las más digeridas ( $P < 0,05$ ) son las elaboradas con una menor concentración de aceite, independientemente de la presencia o no de TPP. Tal y como se puede observar, la emulsión de menor digestibilidad lipídica es la CS-TPP\_50 la cual presenta un 24% de AGL al final de la digestión, seguida de la emulsión CS\_50 con un 31% de AGL. Las emulsiones más digeridas presentan un 32% (CS-TPP\_33) y 37% (CS\_33) de AGL al final de la digestión.

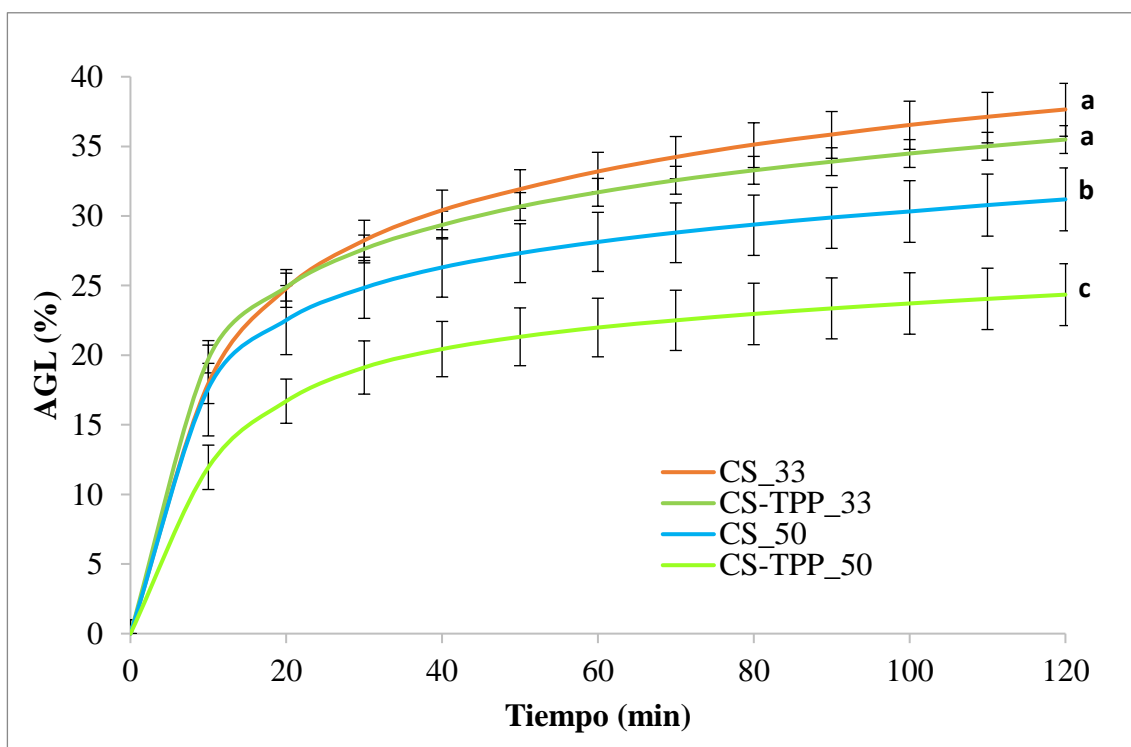


Figura 7. Porcentaje de AGL en función del tiempo de digestión intestinal *in vitro*. Los valores representados corresponden a la media de tres repeticiones por emulsión. CS\_33: Emulsión con 33% de aceite y quitosano; CS-TPP\_33: Emulsión con 33% de aceite, quitosano y TPP; CS\_50: Emulsión con 50% de aceite y quitosano; CS-TPP\_50: Emulsión con 50% de aceite, quitosano y TPP. Las diferentes letras para cada muestra indican valores con una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) según la prueba de rangos múltiples LSD de Fisher.

Según Hu *et al.* (2010) los recubrimientos de quitosano, tanto reticulado como no reticulado, son capaces de ralentizar la digestión lipídica en condiciones de simulación de digestión en el intestino delgado. La habilidad del quitosano para retardar este proceso puede ser debida a: i) su capacidad para formar capas poliméricas, relativamente gruesas, alrededor de las gotas lipídicas, encapsulándolas e impidiendo el acceso de la lipasa y ii) a la capacidad que tiene para unirse a las sales biliares, lo que puede reducir la cantidad de sales biliares disponibles para absorberse a las superficies de las gotas lipídicas o solubilizar los productos de la digestión lipídica. En este trabajo, las emulsiones elaboradas con TPP, en general, presentan menor digestibilidad lipídica *in vitro* si se comparan con las emulsiones elaboradas con la misma cantidad de aceite de café tostado, pero sin TPP. Parece que la reticulación de la capa de quitosano con TPP dificulta la liberación de ácidos grasos durante la digestión, magnificando el efecto inhibitorio que presenta el propio quitosano (Hu *et al.*, 2010). Sin embargo, cuando la emulsión se elabora con baja concentración de aceite (33%) no se aprecia un efecto sinérgico, retardador de la liberación de ácidos grasos, entre el quitosano y el TPP, por lo que la presencia del TPP no parece afectar la digestibilidad lipídica *in vitro*.



## 4.2 Efecto de la digestión *in vitro* de las emulsiones sobre los compuestos fenólicos y su bioaccesibilidad (fenoles solubles totales)

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de fenoles solubles totales (FST) y bioaccesibilidad, a partir de las distintas emulsiones en diferentes etapas de la digestión intestinal *in vitro* (emulsión al final de la digestión y fase micelar).

Tabla 2. Contenido en fenoles solubles totales de las cuatro emulsiones en su fase inicial, al final de la digestión y en su fase micelar, y bioaccesibilidad de las emulsiones.

<b>Fenoles totales (mg ácido gálico/ g aceite)</b>	<b>CS_50</b>	<b>CS-TPP_50</b>	<b>CS_33</b>	<b>CS-TPP_33</b>
<b>Emulsión no digerida</b>	13,3 ± 2,7 <sup>a</sup>	14,7 ± 2,8 <sup>a</sup>	16,9 ± 2,6 <sup>a</sup>	13,7 ± 1,5 <sup>a</sup>
<b>Fase intestinal</b>	28,9 ± 4,2 <sup>a</sup>	30,0 ± 5,1 <sup>a</sup>	45,4 ± 5,4 <sup>b</sup>	42,7 ± 6,4 <sup>b</sup>
<b>Fase micelar</b>	8,1 ± 0,7 <sup>a</sup>	7,8 ± 0,9 <sup>a</sup>	9,3 ± 0,4 <sup>ab</sup>	10,8 ± 1,7 <sup>b</sup>
<b>%Bioaccesibilidad</b>	47,2 ± 4,1 <sup>a</sup>	45,5 ± 5,6 <sup>a</sup>	53,7 ± 2,4 <sup>ab</sup>	62,8 ± 9,9 <sup>b</sup>

CS\_50: Emulsión con un 50% de aceite de café tostado y estabilizada con quitosano (CS); CS-TPP\_50: Emulsión con un 50% de aceite de café tostado y estabilizada con quitosano (CS) y tripolifosfato (TPP). CS\_33: Emulsión con un 33% de aceite de café tostado y estabilizada con CS. CS-TPP\_33: Emulsión con un 33% de aceite de café tostado y estabilizada con CS y TPP. Diferentes letras minúsculas en la misma fila para cada muestra indican valores con una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) según la prueba de rangos múltiples LSD de Fisher.

En primer lugar, no aparecen diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en el contenido en fenoles solubles totales (FST), entre ninguna de las emulsiones sin digerir; esto es lo esperado ya que todas las emulsiones están elaboradas con el mismo tipo de aceite de café tostado y los resultados están expresados por gramo de aceite. El que el quitosano que encapsula el aceite esté entrecruzado o no con TPP, no parece influir en el contenido en FST.

En la fase intestinal *in vitro*, es decir, al final de la digestión, no aparecen diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), por un lado, entre las emulsiones con un 50% de aceite y, por otro lado, entre las emulsiones con un 33% de aceite. Así pues, la presencia de TPP no parece influir tampoco en esta etapa en el contenido en FST. Sí que aparecen diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre las emulsiones con diferente concentración de aceite, independientemente del tipo de encapsulación, siendo las emulsiones con menor cantidad de aceite (CS\_33 y CS-TPP\_33), las que mayor contenido en polifenoles presentan, probablemente debido a que, tal y como se ha comentado en el apartado de digestibilidad lipídica, son precisamente estas emulsiones las que presentan la mayor digestibilidad y por lo tanto, la mayor liberación de FST.

En lo que respecta a la fase micelar, la cual contiene los compuestos con más disponibilidad para pasar a sangre, se observa que son las emulsiones con un 33% de aceite de café tostado las que mayor cantidad de FST contienen, no habiendo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre la emulsión CS\_33 y las emulsiones con un 50% de aceite. Tampoco en esta etapa, la forma de encapsulación del aceite parece influir en la liberación de compuestos fenólicos durante la digestión.

Por último, en cuanto a la bioaccesibilidad, en general son las emulsiones con menor cantidad de aceite de café tostado las que presentan mayor bioaccesibilidad, manteniéndose una relación directamente proporcional con los resultados obtenidos en el apartado de digestibilidad lipídica *in vitro*. Cuanto mayor es la digestión del aceite encapsulado de la emulsión, mayor es la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos.

En general, todas las moléculas que están formando la interfase de emulsiones tienen una actividad específica que afecta a los procesos de la digestión *in vitro* y por tanto a la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos, siendo los principales mecanismos implicados: i) la coalescencia de los glóbulos y ii) la competición por la interfase con otras moléculas, incluyendo aquellas que se encuentran en los fluidos de la digestión o en la interfase de la emulsión de forma que estos mecanismos tienden a reducir la bioaccesibilidad (Marze, 2015). En el caso de las emulsiones estudiadas en este trabajo, el método de encapsulación empleado (quitosano o quitosano + TPP) no parece influir en la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos. La presencia de TPP no parece aumentar los efectos específicos que presenta el propio quitosano.

### 4.3 Capacidad antioxidante de las emulsiones iniciales y del aceite por DPPH

A continuación, en la figura 8 se muestra el índice de concentración que causa un 50% de reducción de DPPH (IC50) de las emulsiones iniciales y del aceite.

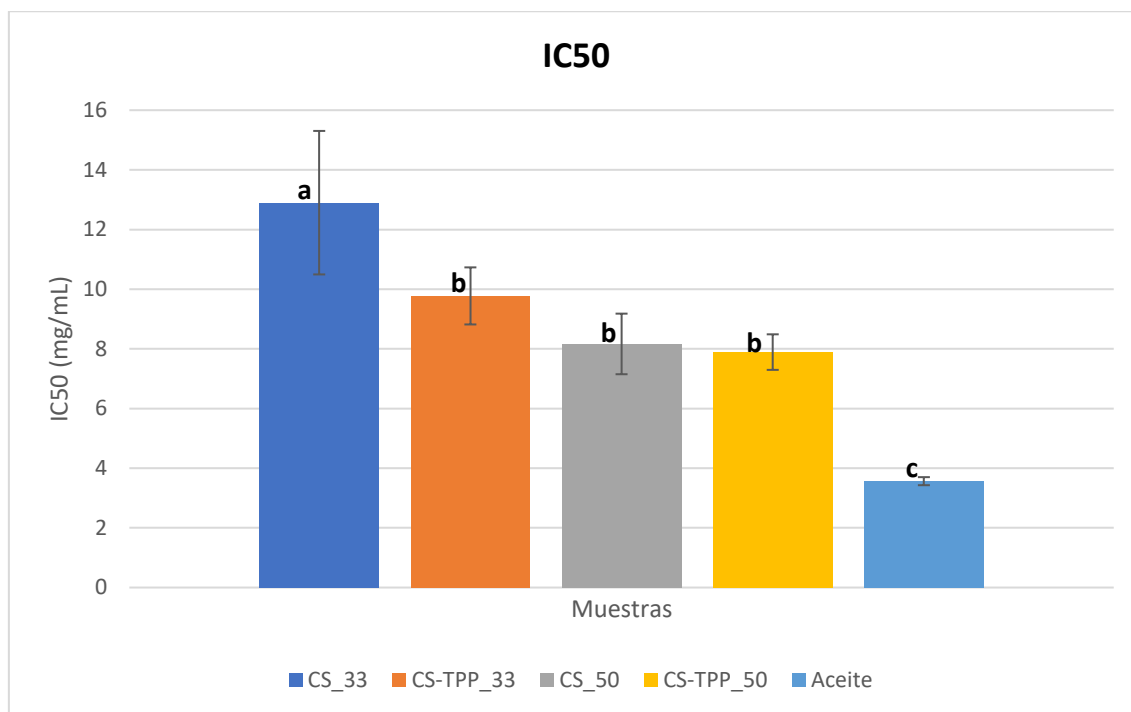


Figura 8. Gráfica donde se muestra el índice de concentración que causa un 50% de reducción de DPPH (IC50) de las emulsiones. Los valores representados corresponden a la media de tres repeticiones por emulsión. CS\_33 (emulsión con un 33% de aceite de café tostado y quitosano), CS-TPP\_33 (emulsión con un 33% de aceite de café tostado, quitosano y TPP), CS\_50 (emulsión con un 50% de aceite de café tostado y quitosano) y CS-TPP\_50 (emulsión con un 50% de aceite de café tostado, quitosano y TPP) y del aceite de café tostado. Las diferentes letras minúsculas indican valores con una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) según la prueba de rangos múltiples LSD de Fisher.

De todas las muestras estudiadas, la emulsión CS\_33 es la que presenta un valor de IC50 significativamente ( $P < 0,05$ ) más alto y el aceite sin encapsular un valor significativamente más bajo. Las emulsiones CS-TPP\_33, CS\_50 y CS-TPP\_50 presentan valores intermedios sin que haya diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre ellas. Sí que existen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre esas emulsiones, el aceite y la emulsión CS\_33.

Probablemente el aceite de café tostado sin emulsionar es el que menos protegido se encuentra por lo tanto es el que menor concentración necesita para alcanzar el valor de IC50. Por el contrario, la emulsión CS\_33 es la que presenta un mayor valor de IC50, probablemente el aceite de esta emulsión presenta una encapsulación reforzada en comparación con las otras emulsiones. La presencia de TPP no parece influir en los valores de IC50 en las emulsiones elaboradas con un 50% de aceite. Sin embargo, cuando la emulsión está formulada con bajo contenido en aceite el quitosano ya parece protegerlo sin que sea necesaria la presencia de TPP.

#### 4.4 Microestructura de las emulsiones

En la figura 9 se pueden observar las imágenes obtenidas de las diferentes emulsiones en las distintas etapas de la digestión *in vitro*, mediante microscopía confocal láser de barrido (CLSM).

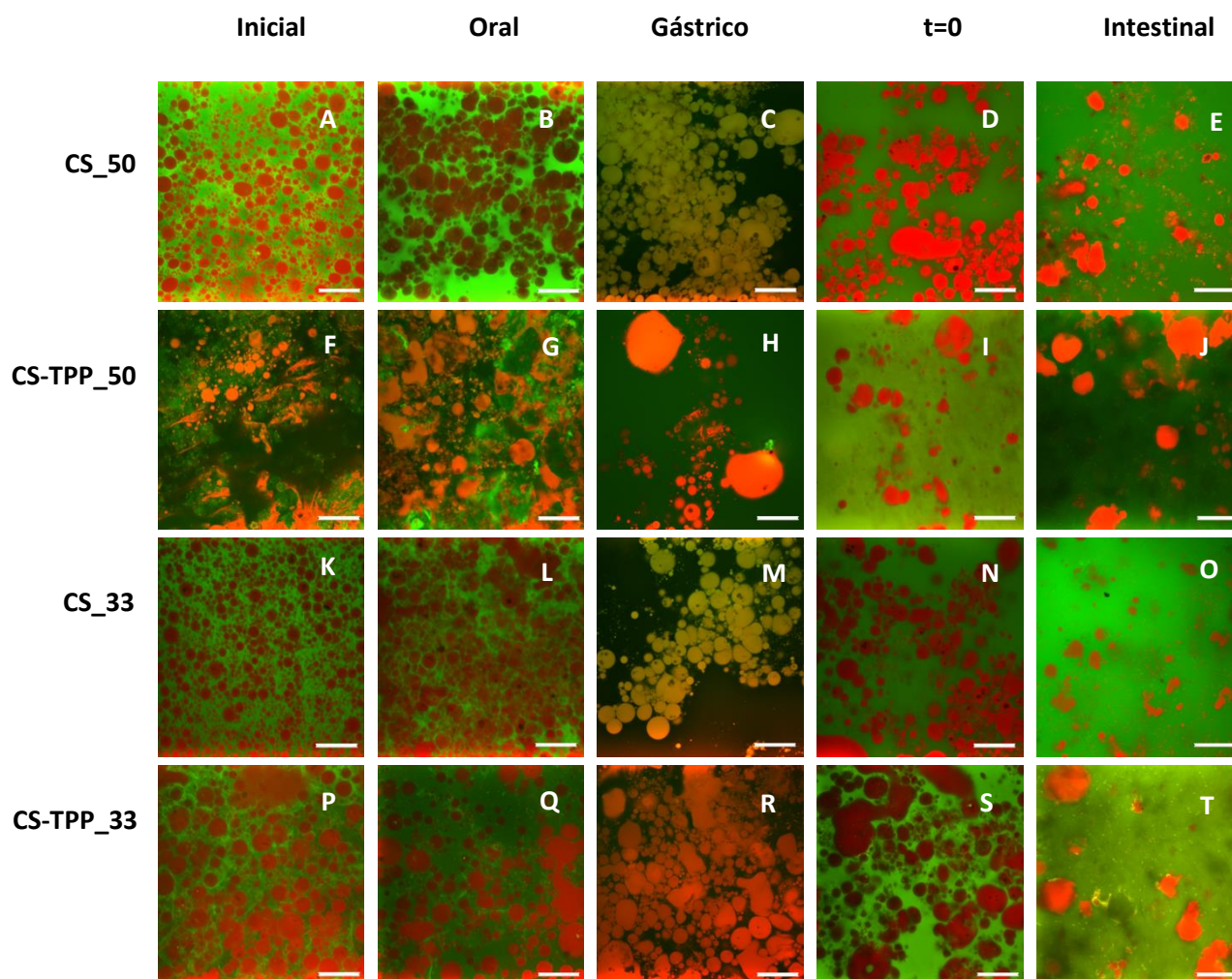


Figura 9. Imágenes tomadas con microscopio confocal láser de barrido (CLSM) con escala de 60  $\mu\text{m}$  de las emulsiones CS\_50, CS-TPP\_50, CS\_33 y CS-TPP\_33 antes y durante la digestión *in vitro* al finalizar las fases oral, gástrica e intestinal y a tiempo 0. CS\_50: Emulsión con un 50% de aceite de café tostado y estabilizada con quitosano (CS); CS-TPP\_50: Emulsión con un 50% de aceite de café tostado y estabilizada con quitosano (CS) y tripolifosfato (TPP). CS\_33: Emulsión con un 33% de aceite de café tostado y estabilizada con CS. CS-TPP\_33: Emulsión con un 33% de aceite de café tostado y estabilizada con CS y TPP.

La emulsión inicial (sin digerir) elaborada con un 50% de aceite de café tostado y quitosano (CS\_50) aparece formada por glóbulos, que se observan de color rojo, de estructura ovalada, íntegros, con los límites bien definidos y de distintos tamaños. Estos glóbulos se observan dispuestos en la emulsión de forma homogénea. Los glóbulos de mayor tamaño parecen estar interconectados por glóbulos de pequeño tamaño, de manera que todos juntos constituyen una red repartida por la fase continua (Figura 9A). Cuando esta emulsión contiene TPP (CS-TPP\_50) (Figura 9F), aparecen menos glóbulos y más redondeados que los anteriores. Además, una parte del aceite de café no se encuentra encapsulado, sino que está libre y disperso. El TPP, en el ratio 5:1 (quitosano y TPP, respectivamente) utilizado en la formulación de estas emulsiones, de alto

contenido en aceite, no parece mejorar la encapsulación del aceite y la estabilidad de la emulsión. Es posible que la cantidad de aceite (50%) sea demasiado elevada para que las partículas CS-TPP puedan adherirse adecuadamente en la interfase y estabilizar la emulsión, o que se produzcan interacciones entre las dos moléculas (quitosano y TPP) que disminuyan la capacidad de actuar como partículas de Pickering, y, por tanto, en estas emulsiones aparecen zonas donde la grasa está libre.

En la emulsión CS\_50 la digestión oral (Figura 9B) y gástrica (Figura 9C) influye de forma sustancial en el aspecto de los glóbulos de grasa con respecto a la emulsión inicial, debido a los fenómenos físicos simulados a los que se somete la muestra en estas etapas. En la etapa oral, esta emulsión presenta una apariencia más fluida, con glóbulos de mayor tamaño que en la emulsión inicial (Figura 9A), probablemente debido a fenómenos incipientes de coalescencia. El efecto de la digestión gástrica *in vitro* (Figura 9C) sí produce una modificación importante en la forma de los glóbulos, pues aparecen notablemente más redondeados que antes de comenzar la digestión y se aprecian fenómenos de coalescencia y floculación. En la emulsión CS-TPP\_50, la digestión oral (Figura 9G), produce cambios en la estructura ya que se observan fenómenos de coalescencia y mayores cantidades de grasa libre que está dispersa por toda la fase continua. Sin embargo, es durante la fase gástrica (Figura 9H) dónde se observa un mayor cambio estructural. La emulsión se reestructura y aparecen tanto glóbulos de gran tamaño como pequeños y de forma más redondeada que en las fases anteriores.

En la emulsión CS\_50, a tiempo 0 de la fase intestinal (cuando se han añadido las sales biliares y los electrolitos, pero antes de añadir la enzima lipasa) ya se producen importantes fenómenos de coalescencia y floculación de los glóbulos, debido seguramente a la acción de las sales biliares y de los electrolitos. Durante el transcurso de la fase intestinal, una vez adicionada la lipasa, se siguen apreciando estos fenómenos y también una importante reducción en el contenido de grasa, debido a la acción enzimática. En la emulsión con TPP (CS-TPP\_50), tanto a tiempo 0 (Figura 9I) como en la fase intestinal (Figura 9J), continúa observándose una parte del aceite de café en forma de dispersión libre. En el apartado de digestibilidad lipídica es precisamente la emulsión CS-TPP\_50 la menos digerida, probablemente la apariencia desestructurada que presenta con parte del aceite sin encapsular, es decir libre y disperso, dificulta la digestibilidad de la grasa.

La emulsión elaborada con un 33% de aceite de café tostado y quitosano (CS\_33) aparece formada por glóbulos de estructura redondeada y de distintos tamaños, pero más homogéneos que en las emulsiones anteriores (Figura 9K). El rango de tamaños de los glóbulos es bastante amplio y dispar y cabe destacar, que presentan una estructura íntegra con límites bien definidos. La emulsión con un 33% de aceite de café, quitosano y TPP (CS-TPP\_33) presenta menor número de glóbulos que la anterior, siendo estos de mayor tamaño y de estructura redondeada tal y como se observa en la figura 9P. También se aprecia una parte del aceite libre, sin encapsular. En la emulsión CS\_33 inicial (Figura 9K) no aparecen fenómenos de floculación o coalescencia, mientras que en la emulsión CS-TPP\_33 inicial (Figura 9P) aparece coalescencia de glóbulos.

En ambas emulsiones con un 33% de aceite de café tostado, tanto los procesos de digestión oral (Figuras 9L y 9Q) como gástrica (Figuras 9M y 9R) influyen en el aspecto de los glóbulos de grasa.

En la emulsión CS\_33 durante la fase oral (Figura 9L) se producen fenómenos de coalescencia que dan lugar a cambios sobre todo en el tamaño de los glóbulos, que son mayores que los de la emulsión inicial (Figura 9K) y aún mayores en la fase gástrica (Figura 9M). En cuanto a la emulsión CS-TPP\_33, en la fase oral (Figura 9Q), se produce por una parte un aumento de la coalescencia de los glóbulos y, por otra parte, también se observan glóbulos de tamaño más pequeño. En la fase gástrica (Figura 9R) la emulsión aparece más desestabilizada y se observan los mismos efectos que en la oral pero magnificados, con una mayor cantidad de grasa libre.

A tiempo 0, ambas emulsiones (Figuras 9N y 9S) presentan las mismas características, es decir, se observa un menor número de glóbulos como consecuencia de la dilución producida al añadir los fluidos intestinales, alguno de ellos de mayor tamaño debido a fenómenos de coalescencia. El tamaño de los glóbulos es mayor en la emulsión CS-TPP\_33 (Figura 9S) que en la CS\_33 y en ambos casos los glóbulos presentan tanto formas irregulares como redondeadas. Al final de la digestión intestinal ambas emulsiones (Figuras 9O y 9T) aparecen notablemente digeridas.

La presencia de TPP en la elaboración de las emulsiones no parece reforzar su estabilidad estructural antes ni durante el proceso de la digestión *in vitro*. Sin embargo, la encapsulación solo con quitosano (deprotonación) sí mantiene la estructura de la emulsión hasta la fase gástrica y en la fase intestinal es donde se produce la mayor degradación estructural.

## 4.5 Tamaño de partícula

En la figura 10 se pueden observar las gráficas obtenidas del tamaño de partícula de las diferentes emulsiones, en la muestra inicial y a tiempo cero.

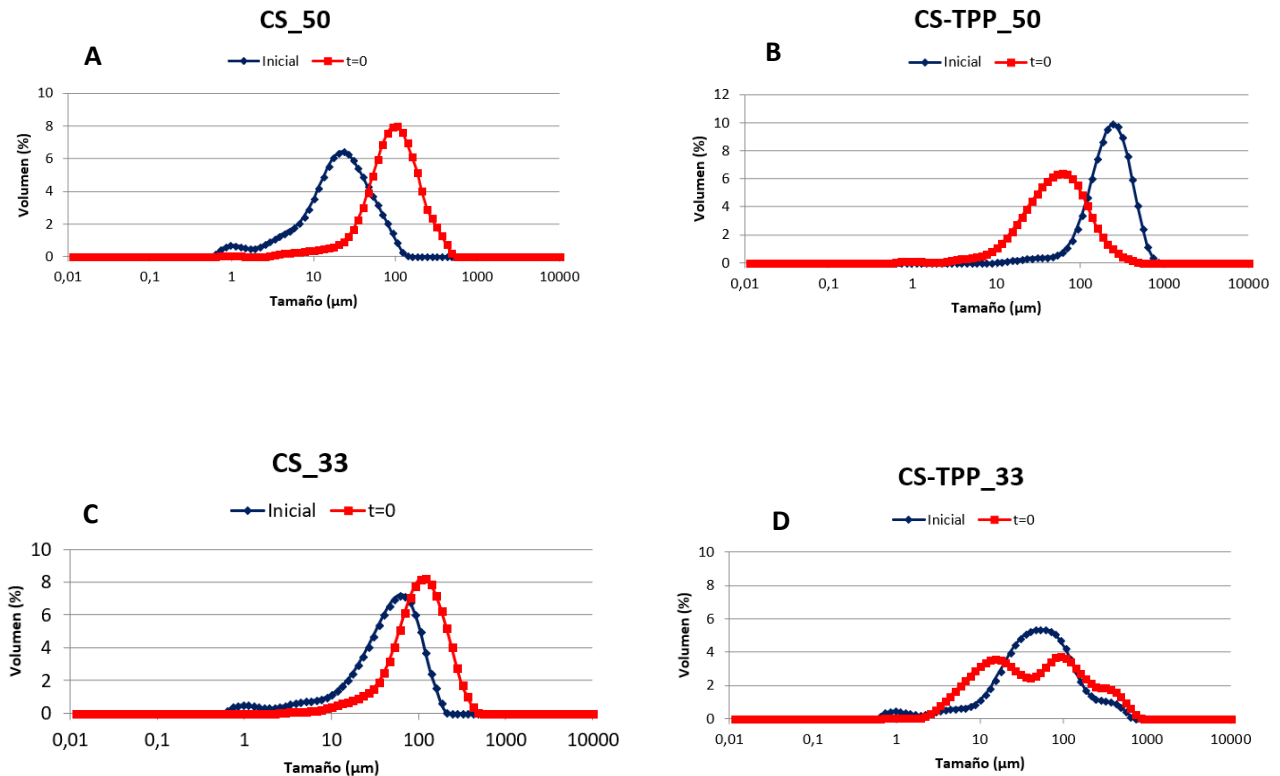


Figura 10. Representación gráfica del tamaño de partícula de las emulsiones iniciales y a tiempo 0. A: emulsión CS\_50; B: emulsión CS-TPP\_50; C: emulsión CS\_33 y D: emulsión CS-TPP\_33.

En la emulsión CS\_50 (Figura 10A), se observa que, en la muestra inicial, las partículas son de un tamaño menor que a tiempo 0 (momento previo a la adición de la enzima lipasa), siendo esto lo opuesto a lo que ocurre en la emulsión CS-TPP\_50 (Figura 10B). Probablemente porque tal y como se observa en la microestructura (Figuras 9F y 9I), la emulsión con TPP presenta en su fase inicial un alto grado de desorganización, que se magnifica en las posteriores etapas de la digestión en las que se aprecia una alta proporción de aceite libre y disperso por la emulsión junto con pequeños glóbulos. Además, en la emulsión CS\_50, en la gráfica, se puede observar un pequeño pico que indica la presencia de glóbulos de pequeño tamaño. Esto se puede relacionar con las imágenes observadas en el apartado de microestructura en las que se aprecia una red de glóbulos interconectados entre sí por pequeños glóbulos (figura 9A).

Por otro lado, las emulsiones con un 33% de aceite, en comparación con las que contienen un 50%, presentan tamaños de partícula más similares entre la emulsión inicial y a tiempo cero, tal y como se puede observar en las figuras 10C y 10D. En concreto, en la emulsión CS\_33, el tamaño de los glóbulos antes de la digestión es ligeramente inferior al de aquellos que se encuentran a

tiempo cero, esto se puede observar en la figura 10C. Por otro lado, se aprecia claramente que la emulsión con un 33% de aceite y TPP (CS-TPP\_33) presenta dos tamaños distintos de glóbulos, siendo estos muy semejantes en la emulsión inicial y a tiempo cero pues, en la figura 10D se puede apreciar un solape entre los picos de ambas curvas, hecho observable también a través de la microestructura (figuras 9P y 9S).



## 5. Conclusiones

El tipo de encapsulación (gelificación iónica a partir de la deprotonación de quitosano o entrecruzamiento de quitosano con TPP) y la concentración de aceite de la emulsión influye en el potencial de inhibición de radicales libres de las emulsiones. Las emulsiones elaboradas con bajo contenido en aceite (33%) y únicamente con quitosano presentan mayores valores de IC50, por lo que el aceite encapsulado de esta forma se encuentra más protegido. En general, las emulsiones con bajo contenido en aceite, independientemente del tipo de encapsulación, presentan mayor bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, probablemente debido a la mayor digestibilidad lipídica *in vitro* que favorece la liberación del aceite que es el que contiene los compuestos bioactivos. Cuando la concentración de aceite de café tostado es elevada (50%) la presencia de TPP disminuye la digestibilidad lipídica *in vitro* del aceite de la emulsión.

En las emulsiones estudiadas en este trabajo, la presencia del agente de entrecruzamiento TPP en las formulaciones, lejos de aportar una mayor estabilidad, genera emulsiones más inestables a nivel estructural, con una mayor coalescencia y con grasa libre y dispersa por la emulsión. Esta inestabilidad continúa durante las etapas de la digestión. El método de deprotonación de quitosano para formar nanopartículas de Pickering capaces de encapsular el aceite y formar emulsiones estables, resulta por tanto más adecuado.

## 6. Bibliografía

- [1] Aarak, K. E., Kirkhus, B., Holm, H., Vogt, G., Jacobsen, M., & Vegarud, G. E. (2013). Release of EPA and DHA from salmon oil - a comparison of in vitro digestion with human and porcine gastrointestinal enzymes. *The British Journal of Nutrition*, 110(8), 1402–10. doi:10.1017/S0007114513000664
- [2] Arnal, L. and Del Río, M. (2004). Effect of cold storage and removal astringency on quality of persimmon fruit (*Diospyros kaki*, L.) cv. Rojo Brillante. *Food Science and Technology International*, 10(3), pp.179-185. doi: 10.1177/1082013204044824
- [3] Asfour, M., Elmotasem, H., Mostafa, D. and Salama, A. (2017). Chitosan based Pickering emulsion as a promising approach for topical application of rutin in a solubilized form intended for wound healing: In vitro and in vivo study. *International Journal of Pharmaceutics*, 534(1-2), pp.325-338. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.10.044
- [4] Bauer, E., Jakob, S., & Mosenthin, R. (2005). Principles of physiology of lipid digestion. *Asian- Australasian Journal of Animal Sciences*, 18(2), 282–295. doi:10.5713/ajas.2005.282
- [5] Benzie, I. and Strain, J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), pp.70-76. doi:10.1006/abio.1996.0292
- [6] Berton-Carabin, C. and Schroën, K. (2015). Pickering emulsions for food applications: background, trends, and challenges. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), pp.263-297. doi:10.1146/annurev-food-081114-110822
- [7] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), pp.25-30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- [8] Esquivel, P. and Jiménez, V. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2), pp.488-495. doi:10.1016/j.foodres.2011.05.028
- [9] Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S. and Chun, O. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), pp.1043-1048. doi:10.1016/j.jfca.2011.01.008

- [10] Frascareli, E., Silva, V., Tonon, R. and Hubinger, M. (2012). Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), pp.413-424. doi:10.1016/j.fbp.2011.12.002
- [11] Hu, M., Li, Y., Decker, E., Xiao, H. and McClements, D. (2010). Influence of tripolyphosphate cross-linking on the physical stability and lipase digestibility of chitosan-coated lipid droplets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), pp.1283-1289. doi:10.1021/jf903270y
- [12] Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1–12. doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.036
- [13] Kong, F., & Singh, R. P. (2008). Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of Food Science*, 73(5), 67–80. doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x
- [14] Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini-Filho, J. and Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4), pp.726-732. doi:10.1590/S0101-20612005000400016
- [15] Li, Y., Hu, M. and McClements, D. (2011). Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model: Proposal for a standardised pH-stat method. *Food Chemistry*, 126(2), pp.498-505. doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.027
- [16] Li, Y., & McClements, D. J. (2010). New mathematical model for interpreting pH-stat digestion profiles: Impact of lipid droplet characteristics on in vitro digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 8085–8092. doi:10.1021/jf101325m
- [17] López F., E.M.; Castaño C., J.J. (1999). Extracción de aceite a partir de subproductos de la trilla de café pergamino. *Cenicafé* 50(1):66-77
- [18] Marze, S. (2015). Bioaccessibility of lipophilic micro-constituents from a lipid emulsion. *Food & Function*, 6(10), pp.3218-3227. doi: 10.1039/c5fo00441a
- [19] 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. *Journal of Food Science*, 65(8), 1270–1282. doi:10.1111/j.1365-2621.2000.tb10596.x
- [20] Mao, L. and Miao, S. (2015). Structuring food emulsions to improve nutrient delivery during digestion. *Food Engineering Reviews*, 7(4), pp.439-451. doi: 10.1007/s12393-015-9108-0

- [21] Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodkorb, a. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113–24. doi:10.1039/c3fo60702j
- [22] Morell, P., Fiszman, S., Varela, P. and Hernando, I. (2014). Hydrocolloids for enhancing satiety: Relating oral digestion to rheology, structure and sensory perception. *Food Hydrocolloids*, 41, pp.343-353. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.04.038
- [23] Mun, S., Decker, E. a., & McClements, D. J. (2007). Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Research International*, 40(6), 770–781. doi:10.1016/j.foodres.2007.01.007
- [24] Mwangi, W., Ho, K., Ooi, C., Tey, B. and Chan, E. (2016). Facile method for forming ionically cross-linked chitosan microcapsules from Pickering emulsion templates. *Food Hydrocolloids*, 55, pp.26-33. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.10.022
- [25] Qian, C., Decker, E., Xiao, H. and McClements, D. (2012). Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on  $\beta$ -carotene bioaccessibility. *Food Chemistry*, 135(3), pp.1440-1447. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.047
- [26] Raba, D., Poiana, M., Borozan, A., Stef, M., Radu, F. and Popa, M. (2015). Investigation on crude and high-temperature heated coffee oil by ATR-FTIR spectroscopy along with antioxidant and antimicrobial properties. *PLOS ONE*, 10(9), p.e0138080. doi:10.1371/journal.pone.0138080
- [27] Sánchez-González, I., Jiménez-Escrig, A. and Saura-Calixto, F. (2005). In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chemistry*, 90(1-2), pp.133-139. doi:10.1016/j.foodchem.2004.03.037
- [28] Sanz, T., Falomir, M., & Salvador, A. (2015). Reversible thermal behaviour of vegetable oil cellulose ether emulsions as fat replacers. Influence of glycerol. *Food Hydrocolloids*, 46, 19–27. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.11.030
- [29] Sanz, T., Handschin, S., Nuessli, J. and Conde-Petit, B. (2007). Effect of thickening agent and fat in custard microstructure upon in vitro enzymatic digestion. *Food Science and Technology International*, 13(5), pp.381-388. doi:10.1177/1082013207086094
- [30] Shah, B., Li, Y., Jin, W., An, Y., He, L., Li, Z., Xu, W. and Li, B. (2016). Preparation and optimization of Pickering emulsion stabilized by chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for curcumin encapsulation. *Food Hydrocolloids*, 52, pp.369-377. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.07.015

- [31] Shah, B., Zhang, C., Li, Y. and Li, B. (2015). Bioaccessibility and antioxidant activity of curcumin after encapsulated by nano and Pickering emulsion based on chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Food Research International*, 89, pp.399-407. doi:10.1016/j.foodres.2016.08.022
- [32] Singh, H., Ye, A., & Horne, D. (2009). Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Progress in Lipid Research*, 48(2), 92–100. doi:10.1016/j.plipres.2008.12.001
- [33] Speer, K. and Kölling-Speer, I. (2006). The lipid fraction of the coffee bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), pp.201-216. doi:10.1590/S1677-04202006000100014
- [34] Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. and Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), pp.669-675. doi:10.1016/j.jfca.2006.01.003