

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL
MEDI NATURAL



Emulsiones aceite/agua diseñadas con diferentes tamaños de gota. Relación estructura y digestibilidad *in vitro*.

TRABAJO FINAL DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

AUTOR: Héctor Vargas Fraile

TUTORA: Amparo Quiles Chuliá

COTUTORA: Isabel Hernando Hernando

Curso académico 2016/2017

VALENCIA, JULIO 2017



Emulsiones aceite/agua diseñadas con diferentes tamaños de gota. Relación estructura y digestibilidad *in vitro*.

Autor: Héctor Vargas Fraile

Tutora: Amparo Quiles Chuliá

Cotutora: Isabel Hernando Hernando

Valencia, julio 2017

Resumen:

En la sociedad actual existe un interés creciente por disminuir el consumo de grasas. La reformulación de alimentos de consumo tradicional y el desarrollo de nuevos alimentos mediante el empleo de emulsiones, con bajo contenido en grasa y de digestibilidad controlada, capaces de mimetizar las propiedades de la grasa en el alimento, son opciones que están tomando importancia en investigación. En este trabajo se diseñan emulsiones aceite en agua (O/W), de diferente tamaño de glóbulo, utilizando como emulsionantes la lecitina de soja y el tween 20. El empleo de los ultrasonidos (US) permite obtener emulsiones con diferentes tamaños de glóbulo. El objetivo es estudiar cómo influye el tipo de emulsionante y el tamaño del glóbulo en la estructura y en la digestibilidad *in vitro* de la grasa de las emulsiones. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento por US mantiene el tamaño y la estructura del glóbulo, y disminuye los fenómenos de floculación y coalescencia durante el proceso de digestión intestinal *in vitro*, lo que favorece la digestibilidad de la grasa de la emulsión.

Palabras clave: Grasa, emulsión, glóbulo, emulsionante, lecitina, tween 20, ultrasonidos, digestibilidad *in vitro*, floculación, coalescencia

Resum:

En la societat actual existeix un interès creixent per reduir el consum de greix. La reformulació d'aliments de consum tradicional i el desenvolupament de nous aliments mitjançant emulsions, amb baix contingut gras i digestibilitat controlada, capaços de mimetitzar les propietats del greix als aliments, son opcions que estan guanyant importància en investigació. En aquest treball es dissenyen emulsions oli en aigua (O/W), amb diferent mesura de glòbul, utilitzant com a emulsionant tween 20 i lecitina de soja. L'ús dels ultrasons (US) ens permet obtindre emulsions amb diferents mesures de glòbul. L'objectiu es estudiar com influeix l'emulsionant i la mida del glòbul en l'estructura i la digestibilitat *in vitro* del greix de les emulsions. Els resultats obtinguts mostren que el tractament per US manté la mesura i estructura del glòbul, i disminueix els fenòmens de floculació i coalescència durant el procés de digestió intestinal *in vitro*, el que afavoreix la digestibilitat del greix de les emulsions.

Paraules clau: Greix, emulsió, glòbul, emulsionant, lectina, tween 20, ultrasons, digestibilitat *in vitro*, floculació, coalescència

Abstract:

A growing interest in lowering the fat ingest on food is gaining importance in the actual society. The reformulation of traditional food and the development of new food using emulsions, with lower fat content, controlled digestibility and able to mimic fat properties, are options which are taking importance in food research. In this work, oil and water emulsions (O/W) with different droplet size are designed, using tween 20 and soy lecithin as emulsifiers. The use of ultrasounds (US) permits to obtain emulsions with different droplet size. The objective is to study how the emulsifier and the droplet size influence the structure and the *in vitro* digestibility of the fat in the emulsions. The results show that the US treatment maintains the size and structure of the fat droplet and lowers the flocculation and coalescence phenomena during the intestinal *in vitro* digestion, which stimulates the fat digestion of the emulsions.

Keywords: fat, emulsion, droplet, emulsifier, lecithin, tween 20, ultrasounds, *in vitro* digestibility, flocculation, coalescence

Índice

1. Introducción.....	1
2. Objetivos y plan de trabajo.....	7
3. Materiales y métodos	8
3.1 Ingredientes de las emulsiones.....	8
3.2 Preparación de las emulsiones.....	8
3.3 Microscopia laser confocal de barrido.....	10
3.4 Microscopia Óptica	11
3.5 Determinación de tamaño y distribución de los glóbulos	11
3.6 Digestión <i>in vitro</i> de las emulsiones	11
3.7 Análisis estadístico	13
4. Resultados y discusión	14
4.1 Microestructura de las emulsiones	14
4.2 Tamaño y distribución de los glóbulos de grasa en las emulsiones	17
4.3 Digestibilidad <i>in vitro</i> de la grasa de las emulsiones	18
5. Conclusiones	21
6. Bibliografía	22

Índice de figuras

Figura I- Composición química de un triglicérido, formado por tres ácidos grasos y una molécula de glicerol (McClements y Decker, 2007).....	2
Figura II- Distintos fenómenos de desestabilización de emulsiones (Mao y Miao, 2015).....	3
Figura III- Homogenizador Ultraturrax.....	8
Figura IV- Equipo de ultrasonidos.....	10
Figura V- Microscopio láser confocal de barrido.....	10
Figura VI- Microscopio óptico.....	11
Figura VII- Funcionamiento del método pH stat con valorador automático (Li y McClements, 2010).....	12
Figura VIII- Valorador automático Mettler-Toledo DL50.....	13
Figura IX- Imágenes tomadas con CSLM de las distintas formulaciones de emulsión en las distintas fases de la digestión.....	15
Figura X- Imágenes tomadas por LM de las distintas formulaciones de la emulsión en las distintas fases de la digestión.....	16
Figura XI- Distribución de tamaños de los glóbulos de grasa.....	17
Figura XII- Representación de los ácidos grasos liberados a lo largo de la digestión para las distintas formulaciones de las emulsiones.....	20

Índice de tablas

Tabla I- Proporción de ingredientes en las emulsiones y tratamiento por ultrasonidos realizados para cada formulación.....	9
Tabla II- Análisis estadístico de los datos obtenidos en la digestión.....	18

1. Introducción

Los lípidos son componentes muy importantes dentro de la dieta humana; proporcionan una gran cantidad de energía, nutrientes esenciales (ácidos grasos y vitaminas) y componentes bioactivos, todos ellos necesarios para el correcto funcionamiento del organismo (McClements & Decker, 2007). Los lípidos presentes en los alimentos suelen proporcionar una sensación agradable, cremosa u oleosa en boca, son capaces de solubilizar muchos de los constituyentes del sabor y aroma de los alimentos y además, algunos, al degradarse generan componentes aromáticos. Otros son indispensables como emulsionantes o como pigmentos colorantes solubles en medio graso.

Los lípidos están formados por unidades estructurales que presentan una pronunciada hidrofobicidad. Se pueden clasificar en saponificables e insaponificables. La fracción saponificable comprende a los llamados acil lípidos o acilglicéridos porque derivan de los ácidos grasos (AG); estos mayoritariamente están en forma de ésteres y en menor medida en forma de amidas. La fracción insaponificable comprende a los llamados lípidos simples y no derivan de los AG, aunque los ácidos grasos libres se incluyen dentro de esta fracción. En general, los lípidos comestibles, es decir las grasas y los aceites comestibles, están constituidos mayoritariamente por triacilglicéridos (TAG) con diferentes ácidos grasos saturados o insaturados en su composición, formando parte de la fracción saponificable (Figura 1). La fracción insaponificable (p. ejem. ácidos grasos libres) y otros acil lípidos como los mono y diacilglicéridos suelen representar menos del 3% del total de la grasa o aceite. El término grasa generalmente se utiliza para designar a un lípido sólido a temperatura ambiente, y el término aceite, a un líquido. Sin embargo, esta designación es bastante imprecisa puesto que el grado de firmeza del lípido va a depender del clima. Además existen lípidos que no son ni sólidos ni líquidos, sino semi-sólidos.

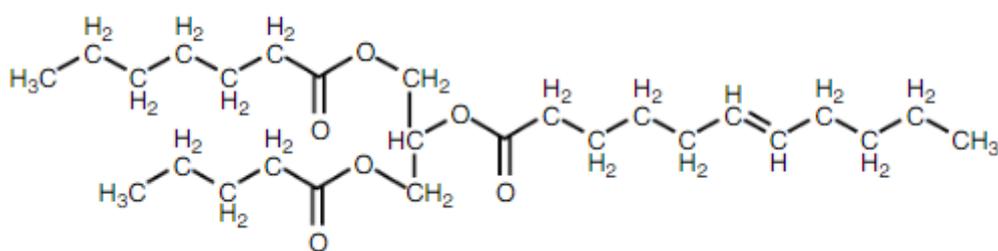


Figura I- Composición química de un triacilglicérido, formado por tres ácidos grasos y una molécula de glicerol (McClements & Decker, 2007).

Como ya se ha comentado, los lípidos (grasas o aceites) son componentes fundamentales en la mayoría de los alimentos que consumimos, entre otros aspectos porque son responsables directos de la percepción sensorial de los alimentos al estar implicados en una gran cantidad de atributos como la viscosidad, la cremosidad, el sabor, etc. (Scholten, 2016). Sin embargo, el consumo de grasas, especialmente saturadas, también se relaciona con un aumento en el riesgo de padecer determinadas enfermedades, como la cardiaca coronaria, la obesidad y muchas otras enfermedades relacionadas con esta, como la diabetes tipo 2 (DiNicolantonio *et al.*, 2016). Debido a los hábitos de consumo actuales en la sociedad, se estima que para el año 2020, en el mundo desarrollado, el 75% de las muertes se deberá a esta clase de enfermedades (Micha *et al.*, 2014). Es por ello, que en los últimos años en la sociedad existe un interés creciente por disminuir el consumo de grasas. Este interés exige que las empresas del sector de la alimentación se planteen como objetivo la reformulación de alimentos ó el diseño de nuevos alimentos. Como apoyo fundamental para cumplir estas expectativas, la investigación está llevando a cabo diferentes estrategias, como por ejemplo, el reemplazo de la grasa de la formulación, ó bien por compuestos no grasos (fibra, proteínas,...) ó bien por emulsiones con bajo contenido en grasas que mimeticen las propiedades de las grasas en el alimento (Borreani *et al.*, 2017; Alejandro *et al.*, 2016). Sin embargo, es muy difícil lograr este reemplazo sin producir cambios en las propiedades del alimento y en su percepción sensorial (Scholten, 2016).

Una emulsión es una dispersión coloidal de gotas líquidas en un medio continuo líquido. Está compuesta por 2 fases inmiscibles, la fase dispersa y la fase continua, y el espacio entre ambas, llamado interfase. Existen distintos tipos de emulsiones según la naturaleza de la fase continua y la fase dispersa. Las emulsiones agua/aceite (W/O), están formadas por gotas de agua

dispersas en una fase continua de aceite, un ejemplo es la margarina. Las emulsiones aceite/agua (O/W), están formadas por gotas/glóbulos de aceite dispersas en una fase acuosa continua, un ejemplo de esta emulsión es la leche. Existen sistemas más complejos como las emulsiones agua/aceite/agua (W/O/W) o las emulsiones aceite/agua/aceite (O/W/O) que suelen usarse en farmacia para lograr una liberación controlada de determinados principios activos en los medicamentos (Cavalcanti *et al.*, 2017; Mutaliyeva *et al.*, 2017). Actualmente también existe un cierto interés por el uso de las nanoemulsiones, con tamaños de glóbulo, de la fase dispersa, muy pequeños, del orden de entre 100-1000 nm (Jafari *et al.*, 2008). Las nanoemulsiones se usan para liberar compuestos beneficiosos en los alimentos funcionales (Karthik & Anandharamkrishnan, 2016). Las emulsiones no son completamente estables, y los glóbulos de la fase dispersa pueden desestabilizarse por fenómenos de floculación y de coalescencia que pueden acabar con la separación de la emulsión en dos fases (Figura II). La floculación ocurre cuando las fuerzas de repulsión intermoleculares, como las de van der Waals, son lo suficientemente intensas como para mantener los glóbulos separados a una distancia muy pequeña pero manteniendo, cada glóbulo, su película interfacial, es decir, los glóbulos se asocian mutuamente formando agregados pero sin fusionar sus contenidos (Ivanov *et al.*, 1998). Cuando por el contrario las películas interfaciales se rompen, se da el fenómeno de la coalescencia. En este caso, al romperse las películas de cada uno de los glóbulos, estos mezclan sus contenidos, formándose un glóbulo más grande. Estos tienen tendencia a moverse hacia la parte alta del sistema y colisionan con otros formando glóbulos cada vez más grandes, lo que acaba resultando en el cremado y la separación de fases de la emulsión (Mao & Miao, 2015).

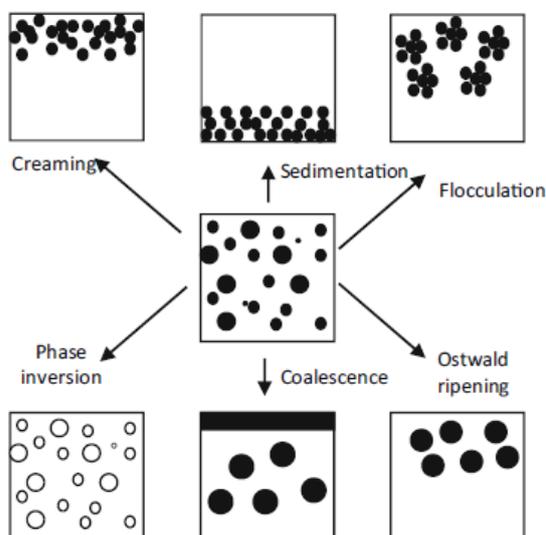


Figura II- Distintos fenómenos de desestabilización de emulsiones (Mao & Miao, 2015)

Los emulsionantes son moléculas anfifílicas de bajo peso molecular que se establecen en la interfase, es decir entre la fase continua y la dispersa, controlando el estado de dispersión y aglomeración de los glóbulos de grasa y estabilizando el sistema debido a una serie de interacciones estéricas y electroestáticas. Para ello, se adsorben en la interfase y forman ahí una capa, lo que reduce la tensión interfacial entre las dos fases. La estabilización que proporciona el emulsionante depende de la velocidad con la que se adsorbe, lo que a su vez depende de su peso molecular, su concentración y las condiciones del flujo, que vendrá determinado por la viscosidad de la fase continua y dispersa, la naturaleza del emulsionante, sus interacciones, etc... (Costa *et al.*, 2017; Jafari *et al.*, 2008; Brosel & Schubert, 1999). Por esta razón cada emulsionante será más adecuado para un tipo u otro de sistema o condiciones determinadas. Algunos emulsionantes como los polisacáridos pueden estabilizar el sistema cambiando las propiedades reológicas de la fase continua, por ejemplo incrementando su viscosidad para inmovilizar las gotas de grasa, lo que también afecta a la vida media, la textura y las propiedades reológicas del producto (Costa *et al.*, 2017). En ocasiones, si la concentración de moléculas de emulsionante es suficiente, estas se pueden agrupar formando distintas estructuras como las micelas, que reducen la energía libre del sistema al orientar los fragmentos de las moléculas según su máxima afinidad, contribuyendo a estabilizar más el sistema.

En la industria alimentaria se usan una gran variedad de emulsionantes. Entre ellos algunas proteínas, especialmente las procedentes de la leche, como las caseínas y las proteínas del suero, también lípidos, como los mono y diglicéridos de los ácidos grasos, y la lecitina de soja, y polisorbatos como el tween. La lecitina de soja es una mezcla natural derivada de moléculas fosfolipídicas zwitteriónicas cuyo principal componente es la fosfatidilcolina, formada a su vez por una cabeza polar que contiene fosfocolina y glicerol (Shchipunov, 2001). La fosfatidilcolina también contiene una región no polar formada por 2 cadenas de ácidos grasos hidrocarbonados. En la emulsión, la lecitina forma una membrana viscoelástica fortalecida por puentes de hidrogeno entre los grupos fosfato y las moléculas adyacentes. El tween 20 o polisorbato es un tensoactivo no iónico que contiene una cabeza de polioxietileno unido a una cadena de ácido graso mediante sorbitol y que protege a las gotas de grasa del fenómeno de la coalescencia debido a la alta actividad en la superficie y a las interacciones estéricas entre el tween y la superficie de los glóbulos de grasa.

Además de diseñar emulsiones estables, con propiedades sensoriales adecuadas, un desafío a alcanzar a nivel de investigación, orientado a la menor asimilación de grasa, sería el desarrollo de emulsiones de digestibilidad controlada. La digestibilidad está influenciada por las características de los componentes lipídicos (por ejemplo, estructura química, propiedades fisicoquímicas) y por la naturaleza de la matriz alimentaria que los rodea (Araujo *et al.*, 2013).

La digestión de las grasas consta de varias etapas. Después de la ingestión, las emulsiones experimentan una serie de cambios físicos y químicos a medida que pasan por la boca, el estómago y el intestino delgado y grueso (resistencia mecánica, presencia de enzimas, cambios en el pH, etc.) que afectan a su capacidad para ser digeridas (McClements & Li, 2010). La fase oral comienza en la boca con la masticación, en la que los dientes fragmentan la comida en trozos más pequeños que se mezclan con la saliva debido a los movimientos producidos por la lengua, lo que provoca la formación de un bolo alimenticio que luego será ingerido. Las emulsiones solo están en la boca durante unos pocos segundos, pero aun así su estructura se puede ver afectada por diversos factores como el cambio de temperatura o la acción de enzimas (α -amilasa), electrolitos, proteínas (mucina) y procesos mecánicos (masticación y acción de la lengua) (Mao & Miao, 2015). En la fase gástrica, el alimento desciende por el esófago hasta el estómago, donde se encuentra con pHs ácidos, así como con la acción de enzimas, electrolitos y movimientos peristálticos. La digestión de las grasas se inicia en el estómago en un 20-30% por la presencia de la lipasa gástrica, pero es en el intestino donde tiene lugar en torno al 80% de la digestión de los lípidos (Carriere *et al.*, 1993), debido a la lipasa pancreática. En la fase intestinal, el pH asciende hasta un valor aproximado a 7 que permite la acción de esta enzima. La lipasa actúa rompiendo los enlaces entre los AG y la glicerina en los TAG, liberando dos AG, y quedando uno unido al glicerol, formándose un monoglicérido (Gallier *et al.*, 2012). Es bien conocido que la lipasa pancreática es más activa en el TAG de cadena media (hasta C10) que en el TAG de cadena larga (más de C12) (Golding *et al.*, 2011), y que su actividad también depende del número y las posiciones de las insaturaciones (Yang *et al.*, 1990). Para que la lipasa pancreática actúe, esta se debe adsorber a la superficie de los glóbulos grasos y así estar lo más cerca posible de los lípidos. Es por esto que la interfase entre los glóbulos grasos y el medio acuoso es determinante en la digestión de las grasas. El tipo de emulsionante juega un papel fundamental en la digestión (Sun & McClements, 2009). Si la interfase permanece intacta o está muy poco alterada, ó si el emulsionante impide que enzimas como la lipasa sean adsorbidas en la superficie de los glóbulos, la digestión de la grasa puede ser mínima. El grado de lipólisis también se ve afectado por el tamaño de los glóbulos de grasa, ya que a menor tamaño de glóbulos, mayor será el

área superficial dónde la enzima puede actuar (Li *et al.*, 2011). La digestión lipídica es una reacción interfacial que depende de la adsorción de la enzima lipasa sobre la superficie de los glóbulos de grasa/aceite. Por esta razón, modificar las dimensiones y la composición de los glóbulos de grasa, así como la estructura y las propiedades fisicoquímicas de la capa interfacial podría permitir diseñar emulsiones con propiedades sensoriales deseadas y de digestibilidad controlada.

Los ultrasonidos (US) están siendo empleados para reducir el tamaño del glóbulo en emulsiones estabilizadas por diferentes emulsionantes. Kaltsa *et al.*, (2014) consiguieron reducir el tamaño del glóbulo en emulsiones con aislado de proteína de suero y goma xantana aumentando la potencia ultrasónica o la duración del tratamiento con ultrasonidos. Lad y Murthy, (2012) disminuyeron el tamaño medio del glóbulo en emulsiones con proteína de leche de coco después del tratamiento con ultrasonidos. Los US es la denominación genérica que se le da a un conjunto de ondas sonoras con una frecuencia que escapa del umbral de audición humano. Estas ondas se pueden dividir según su frecuencia en ultrasonidos de baja intensidad (más potentes) y ultrasonidos de alta intensidad (menos potentes), y tienen muchas aplicaciones en la industria alimentaria (Awad *et al.*, 2012). Generalmente, los ultrasonidos de baja intensidad y alta potencia inducen cambios mecánicos, físicos, químicos y bioquímicos en los alimentos (De São José *et al.*, 2014; Cárcel *et al.*, 2012; Tiwari & Mason, 2012). Por el contrario, los ultrasonidos de alta intensidad y baja potencia se utilizan como método de análisis no destructivo y método de control de calidad (Awad *et al.*, 2012).

En este trabajo se diseñan emulsiones aceite en agua (O/W) de diferente tamaño de glóbulo, utilizando como emulsionantes la lecitina de soja y el tween 20. El objetivo es estudiar cómo influye el tipo de emulsionante y el tamaño del glóbulo en la estructura y en la digestibilidad *in vitro* de la grasa de las emulsiones.

2. Objetivos y plan de trabajo

El principal objetivo de este trabajo es estudiar el efecto del tipo de emulsionante y del tamaño de glóbulo, en emulsiones aceite en agua (O/W), sobre la estructura y digestibilidad *in vitro* de la grasa de las emulsiones. Para ello se van a utilizar como emulsionantes la lecitina de soja y el tween 20, y se van a diseñar emulsiones con tres tamaños de glóbulo diferentes mediante la aplicación de ultrasonidos (US) de baja intensidad y alta potencia.

Para alcanzar los objetivos expuestos en el apartado anterior, 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 experimentos.
- Desarrollo y obtención de las emulsiones elaboradas con diferentes emulsionantes (lecitina de soja y tween 20) y tamaños de glóbulo, mediante la aplicación de US.
- Determinación del grado de digestibilidad intestinal *in vitro* de la grasa de las emulsiones.
- Caracterización estructural de las emulsiones antes y tras la digestión *in vitro*.
- Análisis de resultados.
- Redacción del documento de Trabajo Fin de Grado.

3. Materiales y métodos

3.1 Ingredientes de las emulsiones

Los ingredientes con los que se realizaron las emulsiones fueron aceite refinado de girasol (Koipesol, Sevilla, España), agua (Bezoya, Segovia, España) y los diferentes emulsionantes, tween 20 ó monolaurato de polioxietilensorbitano (P1379, Sigma-Aldrich Co., EEUU) y lecitina (Emultop™, Cargill Texturing Solutions Deutschland GmbH & Co., Hamburgo, Alemania). Para estudiar la estructura de la grasa, el aceite de las emulsiones se tiñó con Nile red 0,3 mM (72485, Fluka, Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU).

3.2 Preparación de las emulsiones

Se prepararon 9 formulaciones de emulsiones diferentes, a partir de dos emulsionantes (tween 20 y lecitina) y tres tamaños de glóbulo (grande, mediano y pequeño) (Tabla I). Para preparar las emulsiones de tamaño de glóbulo grande, en primer lugar, el emulsionante se dispersó en el aceite con la ayuda de un agitador magnético durante 30 min. En el caso de la lecitina, se calentó el aceite a una temperatura de 35 °C para facilitar su dispersión (Mezdour *et al.*, 2008). A continuación, se adicionó el agua a temperatura ambiente mientras la muestra se sometía a una agitación de 6400 rpm en un homogenizador (Ultraturrax T18, IKA, Alemania) (Figura III). Se continuó la agitación a 14000 rpm durante 60 s y a 18000 rpm durante 60 s. De esta manera, se obtuvieron las emulsiones con tween 20 (T) y lecitina (L) de mayor tamaño de glóbulo.



Figura III -Homogenizador Ultraturrax

Las emulsiones de mayor tamaño de glóbulo (T y L) se sometieron a diferentes tratamientos por ultrasonidos (US) para obtener las emulsiones de tamaños de glóbulo mediano y pequeño (Tabla I). Para ello, 5 g de la emulsión de tamaño de glóbulo grande se colocaron en un vaso de precipitados de 25 mL, situado en un baño de hielo para evitar el sobrecalentamiento de la muestra. A continuación, se sumergió la sonda de (6 mm de diámetro) del equipo de ultrasonidos (Vibra-Cell 100 W, SONICS & MATERIALS INC., EEUU) (Figura IV) y se aplicó una potencia de intensidad media (25% de amplitud durante 3 min) para obtener las emulsiones con un tamaño de glóbulo mediano (T25 y L25) y una potencia de intensidad alta (40% de amplitud durante 3 min) para obtener las emulsiones con un tamaño de glóbulo pequeño (T40 y L40).

Tabla I- Proporción de ingredientes en las emulsiones y tratamiento por ultrasonidos realizados para cada formulación:

Ingredientes de las emulsiones	T	L	T25	L25	T40	L40
Agua (%)	88	88	88	88	88	88
Aceite (%)	10	10	10	10	10	10
Tween (%)	2	0	2	0	2	0
Lecitina (%)	0	2	0	2	0	2
Ultrasonidos (%)	0	0	25	25	40	40

T: emulsión elaborada con tween 20 y tamaño de glóbulo grande. **L:** emulsión elaborada con lecitina y tamaño de glóbulo grande. **T25:** emulsión elaborada con tween 20 y tamaño de glóbulo mediano. **L25:** emulsión elaborada con lecitina y tamaño de glóbulo mediano. **T40:** emulsión elaborada con tween 20 y tamaño de glóbulo pequeño. **L40:** emulsión elaborada con lecitina y tamaño de glóbulo pequeño

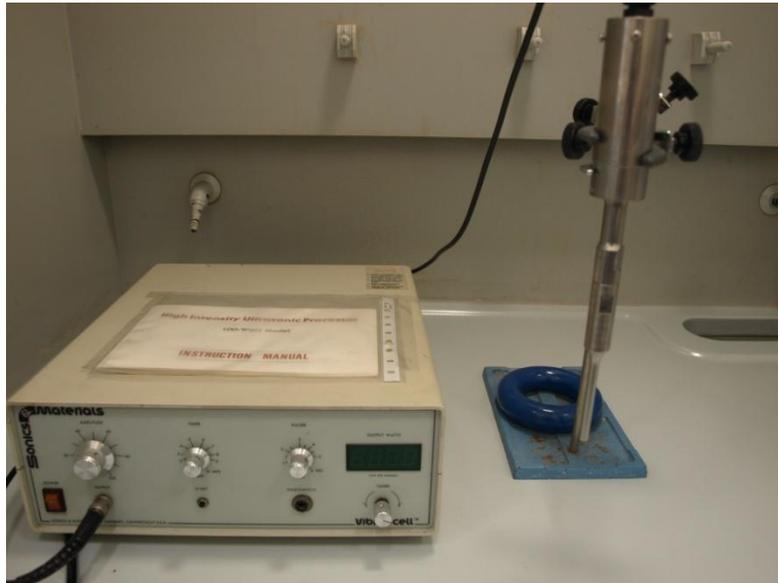


Figura IV- Equipo de ultrasonidos

3.3 Microscopía Laser Confocal de Barrido

Las observaciones por microscopía láser confocal de barrido de las emulsiones se realizaron mediante un microscopio láser confocal Nikon C1 (Nikon, Tokyo, Japan) (Figura V) acoplado a un microscopio óptico Nikon Eclipse E800 V-PS100E. Para observar la muestra, se colocó 15 μL de la emulsión en un portaobjetos de vidrio. Para excitar el agente de tinción (nile red) incorporado en las emulsiones, se utilizó un láser Ar-Kr (488 nm) y se recogió la emisión con un detector a 570 nm. Las imágenes se obtuvieron y almacenaron con una resolución de 1024 x 1024 pixel utilizando el software del equipo (EZ-C1. V.3.40; Nikon, Tokio, Japón).

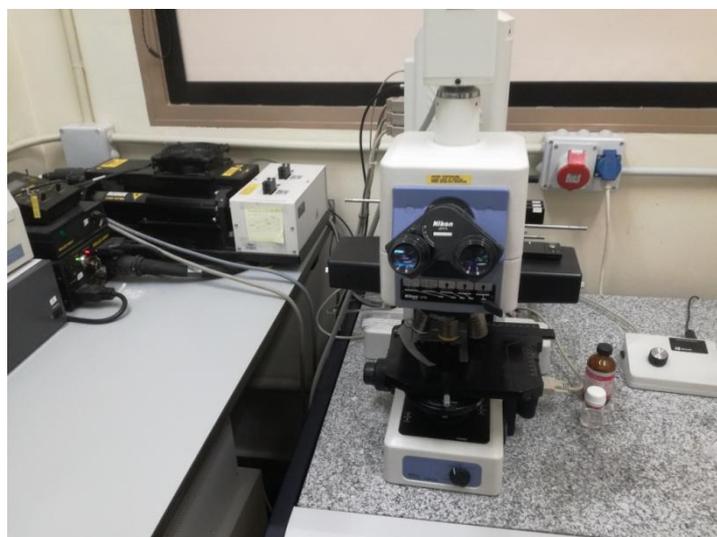


Figura V- Microscopio láser confocal de barrido

3.4 Microscopía Óptica

Para la observación de las emulsiones por microscopía óptica se utilizó un microscopio óptico Nikon Eclipse 80i (Nikon Co., Ltd., Tokio, Japón) (Figura VI) que lleva incorporada una cámara (ExwaveHAD, modelo nº. DXC-190, Sony Electronics Inc., Park Ridge, Nueva Jersey, EE.UU.). Una alícuota de 15 μ L de cada formulación se colocó sobre un portaobjetos de vidrio utilizando azul de toluidina (0,2%). Las muestras se observaron a 100 aumentos (lente de objetivo 100x / 1.45 Oil OFN2.5 DIC N2 ∞ /0.17 WD 0.13, Nikon, Tokio, Japón) y las imágenes fueron capturadas y almacenadas a 1280 x 1024 píxeles utilizando el software de microscopio (NIS-Elements M, Versión 4.0, Nikon, Tokio, Japón).



Figura VI- Microscopio óptico

3.5 Determinación del tamaño y distribución de los glóbulos

La distribución y el tamaño de los glóbulos se determinó a partir de las micrografías obtenidas con el microscopio láser confocal de barrido según Traynor *et al.* (2013) y Timgren *et al.* (2013) con algunas modificaciones. Para determinar el tamaño de los glóbulos se midió el diámetro de al menos 100 glóbulos por muestra mediante el software del microscopio (NIS-Element F, Versión 4.0, Nikon, Tokio, Japón).

3.6 Digestión *in vitro* de las emulsiones

Cada una de las distintas formulaciones de emulsiones se sometió a una simulación de digestión intestinal *in vitro* para analizar la influencia que tienen los distintos tamaños de glóbulo y los distintos emulsionantes (tween 20 y lecitina de soja) en la liberación de ácidos grasos mediante el método pH-stat (Figura VII). Cada molécula de triglicérido (TG) genera dos ácidos grasos libres (AGL) y un monoglicérido (MG) debido a la acción de la lipasa. Conociendo

la cantidad de triglicéridos (TG) que contiene la muestra originalmente y la cantidad de NaOH que se ha usado para mantener el pH a 7, se puede obtener la cantidad de AGLs que han sido consumidos por la lipasa. El porcentaje de AGLs se puede calcular (Ecuación I) con el número de moles de NaOH necesarios para neutralizar los ácidos grasos liberados, dividido por el número de moles de AGL que se producirían si se asume una digestión del 100% (Li & McClements, 2010):

$$\%AGL = 100 * \frac{(V_{NaOH} * m_{NaOH} * M_{lipido})}{w_{lipido} * 2} \quad \text{Ecuación I}$$

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), M_{lipido} es la masa molecular del aceite ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) y w_{lipido} es la masa total del aceite presente en la celda de digestión. Los datos generados en este método pH-stat se representaron en una gráfica que muestra una curva de %AGL frente al tiempo (Figura VII) (Li & McClements, 2010).

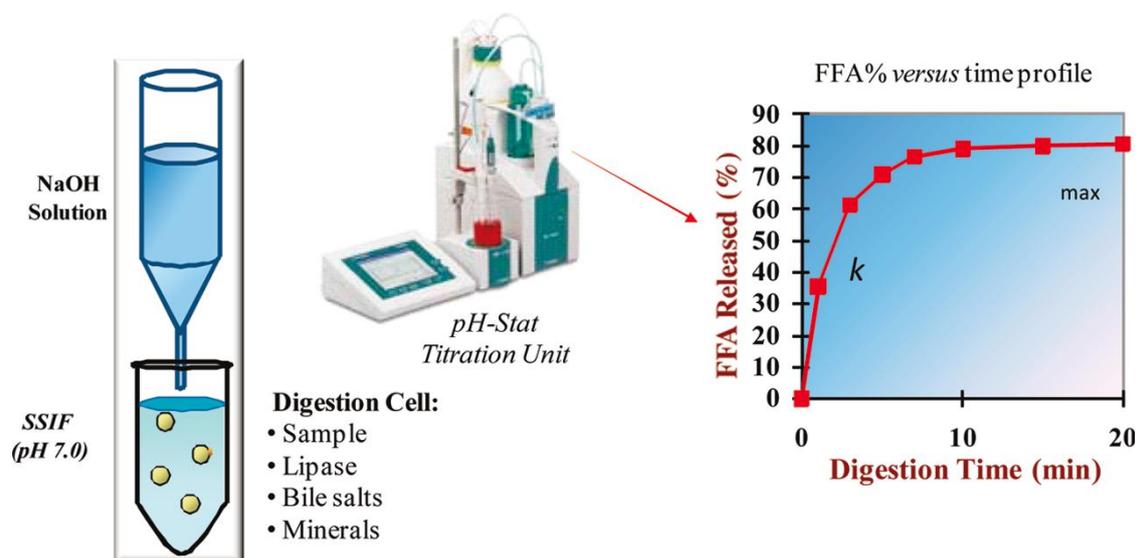


Figura VII- Funcionamiento del método pH stat con valorador automático (Li & McClements, 2010)

El método pH-stat se llevó a cabo con un valorador automático Mettler-Toledo DL50 (Mettler-Toledo International, Greifensee, Suiza) (Figura VIII), con vaso encamisado de 50 mL de capacidad, conectado a un baño termostataado a 37 °C, bureta de capacidad 10 mL y agitador. Para monitorizar el proceso en la celda de digestión se emplearon un electrodo de pH de vidrio combinado DG115-SC (Mettler-Toledo International, Greifensee, Suiza) y un sensor de temperatura DT1000 (Mettler-Toledo International, Greifensee, Suiza). El manejo del valorador automático se realizó desde el ordenador por medio del software LabX (Versión 1.1).



Figura VIII-Valorador automático Mettler-Toledo DL50.

Para la realización de la digestión intestinal *in vitro*, se siguió el protocolo propuesto por Li y McClements (2011) con algunas modificaciones. Primero, se mezcló 5 g de emulsión con 15 g de tampón fosfato (pH 7, 0,0916 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (71504, Sigma-Aldrich) y 0,0895 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (141678, Panreac Applichem) en 100 mL de agua bidestilada) y se colocó esa mezcla en la celda del digestor atemperado a 37 °C durante 10 min con una agitación del 20%, correspondiente a 776 rpm.

Transcurrido ese tiempo, se incorporaron los fluidos de digestión a la celda, añadiéndose 1 mL de una disolución de electrolitos preparada con 0,2411 g de NaCl (131659.1211, Panreac Applichem) y 0,0305 g de CaCl_2 (211221.1211, Panreac Applichem) y 5 mL de sales biliares formadas por 0,2750 g de extracto de bilis (B8631, Sigma-Aldrich), ambas disoluciones elaboradas con tampón fosfato pH 7. Se ajustó el pH a 7, en caso de que fuese necesario, y se añadió 0,2000 g de la enzima lipasa (L3126, Sigma-Aldrich) (ratio 1:2,5 enzima-sustrato) disuelta en 1,5 mL del tampón fosfato. En ese momento, se inició la valoración y se dejó durante 2 horas a 37 °C.

3.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se llevo a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial y las mínimas diferencias significativas de Fisher (LSD) se calcularon con un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$). Para ello, se empleo el programa estadístico XLSTAT (Addinsoft, Nueva York, EEUU).

4. Resultados y discusión

4.1 Microestructura de las emulsiones

Para estudiar la influencia de la digestión *in vitro* sobre la microestructura de las emulsiones elaboradas con diferentes emulgentes y tamaños de glóbulo, se tomaron muestras durante todas las fases del proceso y se observaron tanto por microscopía láser confocal de barrido (CLSM) como por microscopía óptica (LM). Así, se tomaron muestras: i) inmediatamente después de preparar la emulsión (original), ii) en la etapa de pre-digestión, es decir tras añadir el tampón fosfato y dejar la emulsión 10 min en agitación a 37°C, iii) inmediatamente después de añadir los fluidos de la digestión (tiempo 0), iv) una vez añadida la enzima lipasa, a diferentes tiempos de la digestión (30 min, 60 min) y v) al final de la digestión (120 min). En la figura IX se puede observar por CLSM las imágenes de las diferentes emulsiones estudiadas en este trabajo y en la figura X las obtenidas por LM.

Tanto las emulsiones formuladas con tween 20 como con lecitina (Figuras IX y X) presentaron, en la etapa original, si se comparan idénticos tratamientos (sin US, US de potencia media y US de potencia alta), unos tamaños de glóbulo bastante similares. Si se tiene en cuenta los distintos tratamientos, se pudo observar que en la etapa original, los glóbulos de grasa de las muestras sin tratamiento por ultrasonidos (T y L) presentaron un tamaño de glóbulo grande, las sometidas a un tratamiento de potencia media por US (T25 y L25) presentaron un tamaño mediano y las sometidas a un tratamiento de potencia alta (T40 y L40) un tamaño pequeño de glóbulo.

En la etapa de pre-digestión se apreció, en todas las emulsiones estudiadas, que el número de glóbulos de grasa se redujo con respecto a la emulsión original. Esto es debido al efecto de dilución provocado en la etapa de pre-digestión. A tiempo 0, empezaron a apreciarse algunos cambios con respecto a la emulsión original, ya que se observaron fenómenos de floculación en todos los casos; esto se relaciona con el efecto de las sales biliares, las cuales pueden desplazar a los emulsionantes de la superficie de los glóbulos de grasa, lo que puede provocar la desestabilización y los fenómenos de floculación observados (Maldonado-Valderrama *et al.*, 2011; Goldin & Wooster, 2010). Sin embargo, fue a los 30 min de la digestión intestinal *in vitro* cuando se pudieron apreciar los cambios más significativos en todas las emulsiones, ya que a este tiempo de la digestión el número de glóbulos se redujo notablemente, mientras que su tamaño aumentó, lo que indicó fenómenos de coalescencia incipientes. Esto puede deberse al efecto de la enzima lipasa, que es adsorbida en la superficie del glóbulo de grasa y ataca a los TG, provocando su lipólisis y los distintos fenómenos de desestabilización (Mun *et al.*, 2007). Los AGL y MG producidos como consecuencia de la lipólisis se adsorben en la interfase, pero son desplazados por el efecto antes mencionado de las sales biliares, por lo que resultan ineficaces estabilizando la emulsión (Goldin & Wooster, 2010; Singh *et al.*, 2009).

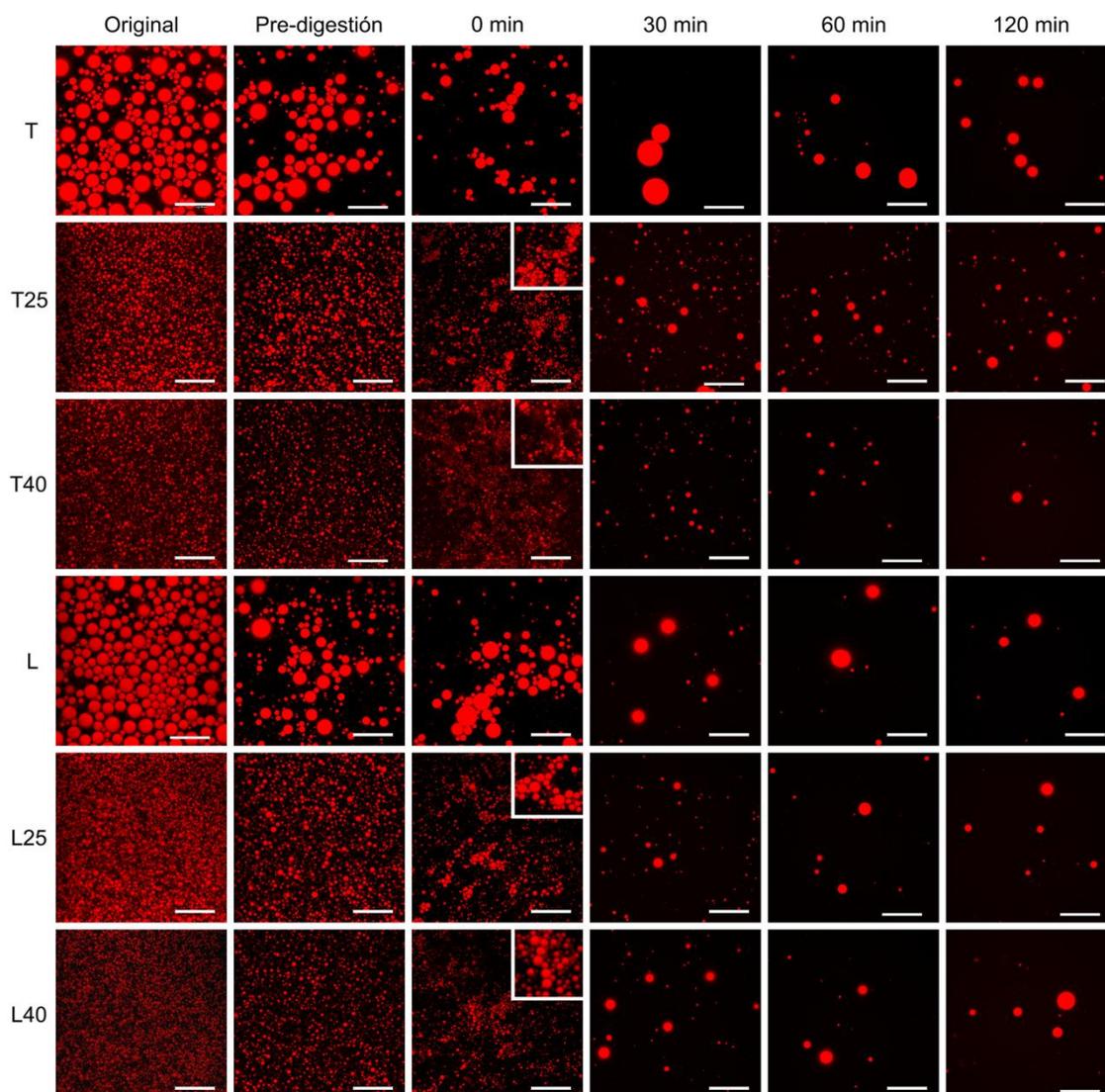


Figura IX- Imágenes tomadas con CLSM de las distintas formulaciones de emulsión en las distintas fases de la digestión. El tamaño de las barras es de 30 µm. X100 aumentos .T: emulsión con emulsionante tween 20 sin tratamiento con ultrasonidos (US); T25: emulsión con emulsionante tween 20 con tratamiento por US de potencia media; T40: emulsión con emulsionante tween 20 con tratamiento por US de potencia alta; L: emulsión con emulsionante lecitina de soja sin tratamiento por US; L25: emulsión con emulsionante lecitina de soja con tratamiento por US de potencia media; L40: emulsión con emulsionante lecitina de soja con tratamiento con US de potencia alta.

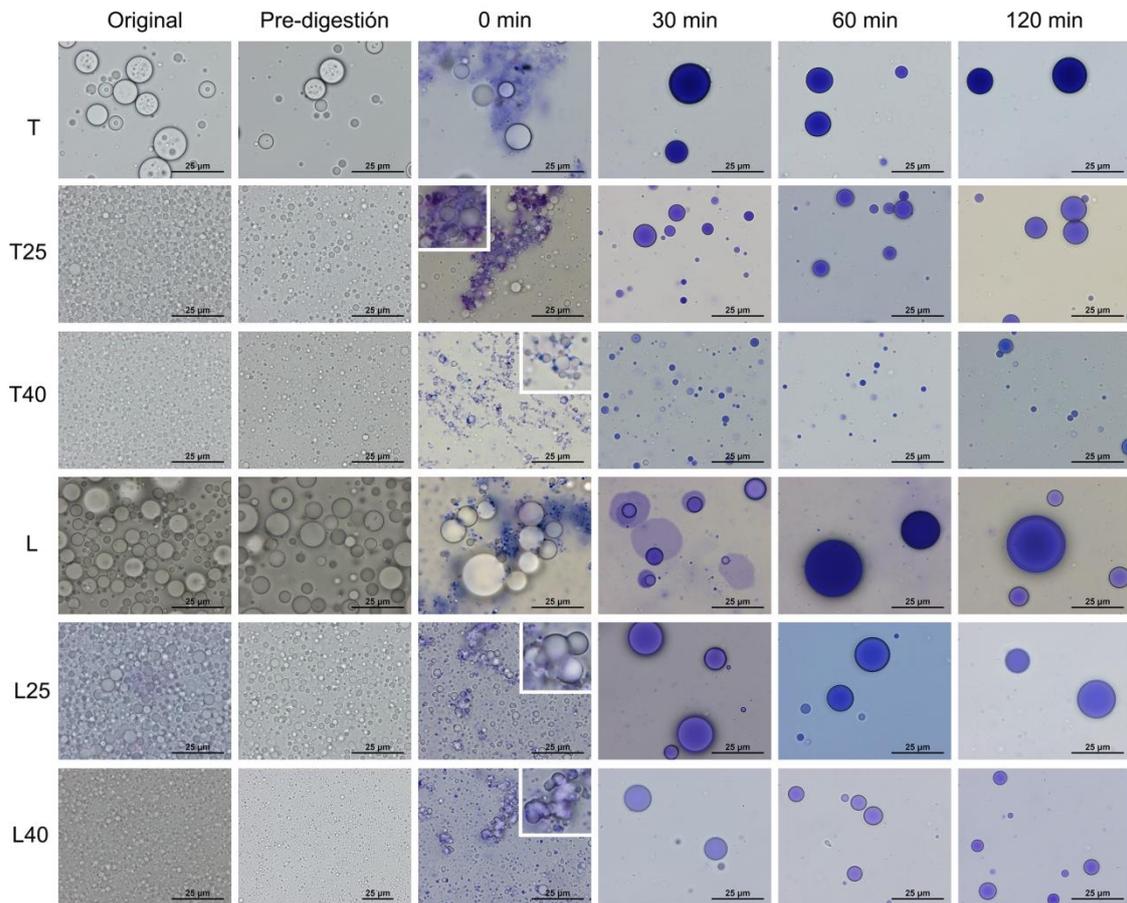


Figura X- Imágenes tomadas por LM de las distintas formulaciones de la emulsión en las distintas fases de la digestión. X100 aumentos. T: emulsión con emulsionante tween 20 sin tratamiento con ultrasonidos (US); T25: emulsión con emulsionante tween 20 con tratamiento por US de potencia media; T40: emulsión con emulsionante tween 20 con tratamiento por US de potencia alta; L: emulsión con emulsionante lecitina de soja sin tratamiento por US; L25: emulsión con emulsionante lecitina de soja con tratamiento por US de potencia media; L40: emulsión con emulsionante lecitina de soja con tratamiento con US de potencia alta.

Las emulsiones sometidas a 60 y 120 min de digestión *in vitro* no presentaron diferencias si se comparan con las emulsiones sometidas a 30 min de digestión, lo que parece indicar que la digestión de la grasa de la emulsión tiene lugar principalmente durante los 30 primeros min. A partir de los 60 min de la digestión, las emulsiones elaboradas con tween 20 (T, T25 y T40) presentaron menor número de glóbulos, aunque de mayor tamaño, posiblemente debido a fenómenos de floculación y coalescencia (Figura IX y X), si se compara con las tres etapas anteriores (pre-digestión, 0 min y 30 min). Esto se debe a los efectos antes mencionados de las sales biliares y la lipasa: las sales biliares desplazan al emulsionante y a los productos de la digestión de la interfase de los glóbulos, lo que favorece el anclaje de la lipasa y por lo tanto la digestión de la grasa (Mun *et al.*, 2007). Los glóbulos tienden entonces a flocular y después a coalescer, aumentando su tamaño, de ahí que a tiempos de digestión más avanzados (60 y 120 min) el tamaño de los glóbulos observados fuera mayor que en las tres etapas anteriores.

En las imágenes de las emulsiones elaboradas con lecitina (L, L25, L40) se pudieron observar glóbulos de grasa de gran tamaño a partir de los 60 min de la digestión *in vitro*. Esto indica que también en estas emulsiones podrían haber tenido lugar fenómenos de coalescencia tal y como ocurre con las emulsiones elaboradas con tween 20.

4.2 Tamaño y distribución de los glóbulos de grasa de las emulsiones

A partir de las imágenes obtenidas de las muestras por CLSM se realizó un análisis de la distribución y tamaño de los glóbulos de grasa (Figura XI).

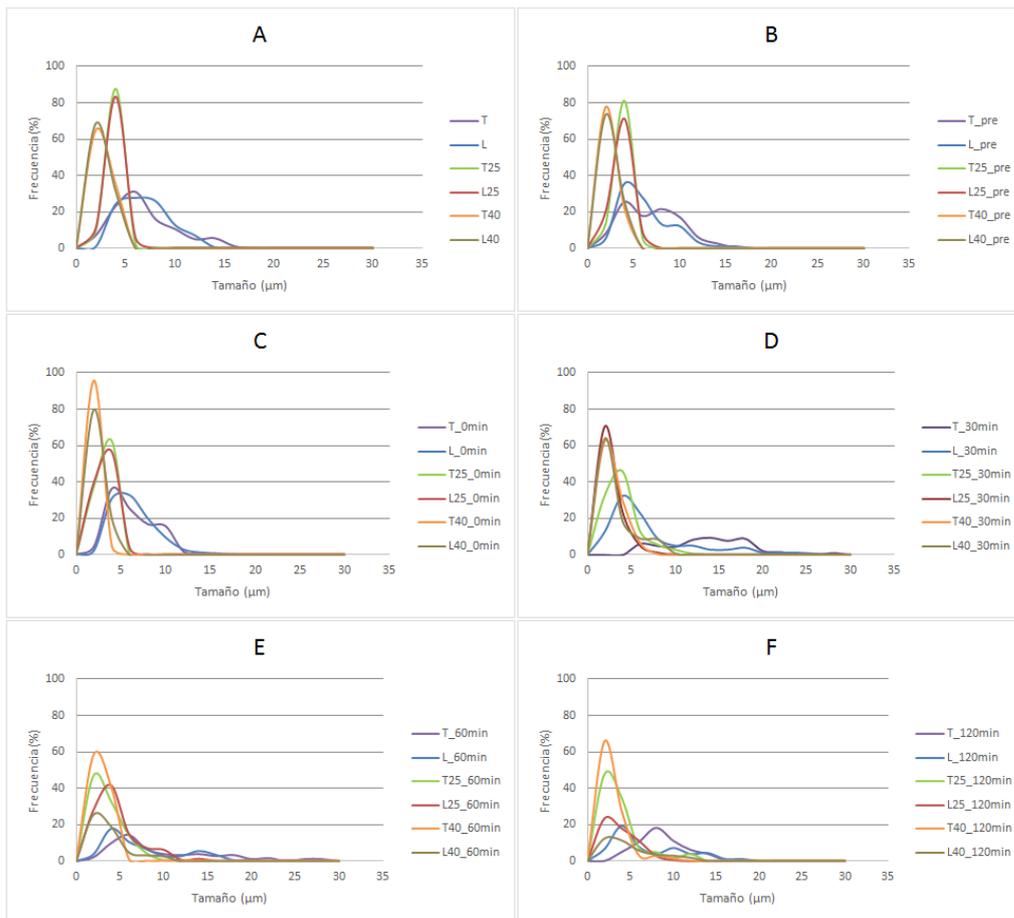


Figura XI-Distribución de tamaños de los glóbulos de grasa. A: en las emulsiones originales (recién preparadas). **B:** en la etapa de pre-digestión. **C:** en las emulsiones a tiempo 0. **D:** en las emulsiones a los 30 min de digestión. **E:** en las emulsiones a los 60 min de digestión. **F:** en las emulsiones a los 120 min (al finalizar la digestión). **T:** emulsión con emulsionante tween 20 sin tratamiento con ultrasonidos (US); **T25:** emulsión con emulsionante tween 20 con tratamiento por US de potencia media; **T40:** emulsión con emulsionante tween 20 con tratamiento por US de potencia alta; **L:** emulsión con emulsionante lecitina de soja sin tratamiento por US; **L25:** emulsión con emulsionante lecitina de soja con tratamiento por US de potencia media; **L40:** emulsión con emulsionante lecitina de soja con tratamiento con US de potencia alta.

Para un mismo tratamiento, las emulsiones originales elaboradas con tween 20 y lecitina presentaron el mismo tamaño de glóbulos de grasa (Figura XI A) como también se ha observado en el apartado de microestructura (Figura IX y X). En las muestras originales y en las etapas de pre-digestión y tiempo 0 (Figura XI A, B y C) se observó una mayor frecuencia de tamaños pequeños de glóbulos (1-5 μm de diámetro), en las emulsiones tratadas por US que en las no tratadas (2-15 μm de diámetro). Estos resultados indican que los glóbulos de grasa mantienen su tamaño original hasta el comienzo de la digestión.

Después de 30 min de digestión *in vitro*, ya se observaron cambios significativos en la distribución del tamaño de los glóbulos, ya que en general en todas las emulsiones disminuyó la frecuencia de tamaños pequeños debido a que aparecieron tamaños grandes de glóbulos (en las gráfica se aprecia en forma de cola). Esto confirmó la aparición de fenómenos de coalescencia ya observados en el apartado de microestructura. Los cambios más importantes parecieron producirse en las muestras no tratadas por US, ya que en ellas se apreció glóbulos que llegaron a alcanzar tamaños de hasta 20 μm de diámetro aproximadamente. Tal y como se ha observado en el estudio microestructural, tampoco se apreciaron diferencias importantes en los tamaños de los glóbulos de las emulsiones digeridas durante 30, 60 y 120 min (Figura XI D, E y F), esto confirma que los principales cambios ocurren en los primeros 30 min de la digestión.

El tratamiento por US de las emulsiones sí parece conferir cierta estabilidad y mantener el tamaño de glóbulo en las emulsiones a lo largo de la digestión *in vitro*.

4.3 Digestibilidad *in vitro* de la grasa de las emulsiones

Para el tratamiento de los datos obtenidos en este apartado primero se realizó un análisis estadístico multifactorial (Tabla II). Como se puede observar en la Tabla II aunque el factor emulgente no fue significativo, sí lo fue el factor tamaño y la interacción entre ambos factores. Por esta razón se decidió realizar un análisis ANOVA multifactorial.

Tabla II- Análisis estadístico de los datos obtenidos en la digestión:

Fuente	GDL	Suma de los cuadrados	Media de los cuadrados	F	Pr > F
Emulsionante	1	18,6823	18,6823	3,6745	0,0794
Tamaño	2	715,1027	357,5513	70,3250	< 0,0001
Emulsionante*Tamaño	2	261,4535	130,7268	25,7120	< 0,0001

La cantidad de AGL durante la digestión intestinal *in vitro*, para cada una de las emulsiones diseñadas en este trabajo, se representa en la Figura XII. La mayor parte de la digestión ocurrió durante los primeros 20 min, a partir de este tiempo el porcentaje de AGL se estabilizó y siguió

aumentando muy lentamente hasta el final de la digestión (120 min). Esto confirma los resultados obtenidos en el estudio de la microestructura y de la distribución de tamaños de los glóbulos, donde se observaron los principales cambios estructurales a los 30 minutos de la digestión. De todas las emulsiones, la que presentó una digestibilidad significativamente ($p < 0,05$) menor fue la elaborada con tween 20 y no sometida a ningún tratamiento por US (T). Las emulsiones elaboradas con lecitina, L y L25 también mostraron bajos valores de digestibilidad lipídica sin presentar diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ellas al final de la digestión. Sin embargo, la velocidad de lipólisis inicial (que se puede deducir a partir de la pendiente en el inicio de la digestión) sí fue superior en la L25 que en la L. Esto indica que al comienzo de la digestión, L25 libera ácidos grasos a mayor velocidad que L, sin embargo durante el transcurso de la digestión ambas emulsiones alcanzan valores similares. Las emulsiones T25 y L40 mostraron valores de digestibilidad intermedios, sin presentar diferencias significativas entre ellas ($p > 0,05$). La emulsión que presentó la digestibilidad significativamente ($p < 0,05$) mayor fue la elaborada con tween 20 y sometida a un tratamiento por US de alta potencia (T40).

Las emulsiones tratadas por US, en general, presentaron una mayor digestibilidad lipídica, probablemente porque al presentar glóbulos de menor tamaño que las no tratadas por US, aumentó la superficie efectiva sobre la que puede actuar la lipasa (Gallier *et al.*, 2012).

En cuanto al tipo de emulsionante, el tween 20 pareció ejercer un mayor efecto protector frente a la lipólisis que la lecitina, en las muestras no tratadas por US. Por una parte porque el tween 20 tiene una mayor actividad en la interfase que la lipasa, lo que impide que esta se ancle a la superficie de los glóbulos de grasa (Mun *et al.*, 2007), por otra parte porque no parece impedir los fenómenos de desestabilización y la aparición de glóbulos de mayor tamaño. Sin embargo las emulsiones de tween 20 tratadas por US presentaron niveles de digestibilidad más elevados incluso que las elaboradas con lecitina. Esto parece indicar que el tratamiento por US podría afectar de alguna manera al tween 20 favoreciendo su papel estructurante/emulsionante de manera que es capaz de mantener un tamaño reducido de glóbulo durante el proceso de la digestión, favoreciendo por lo tanto la digestibilidad de la grasa.

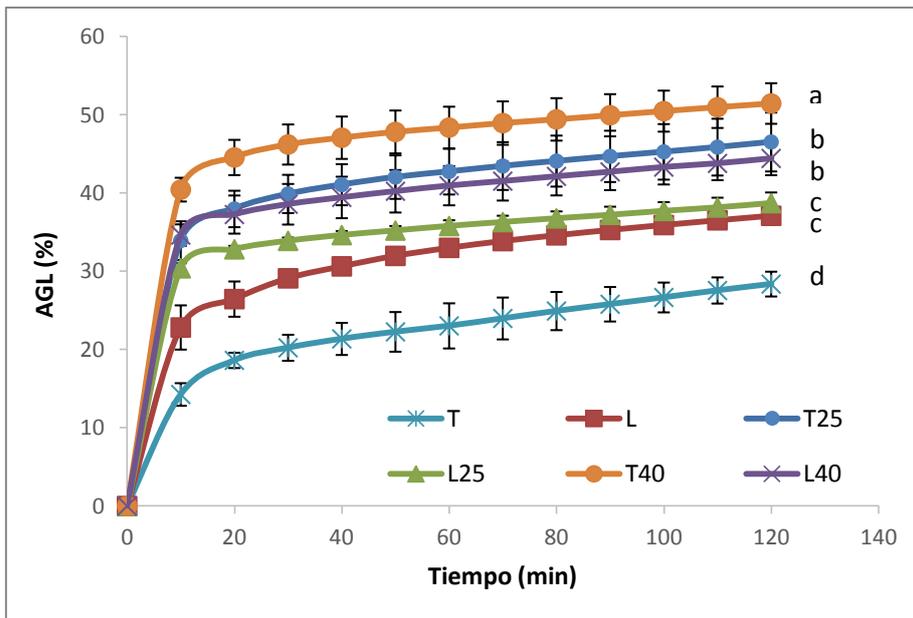


Figura XII- Representación de los ácidos grasos liberados a lo largo de la digestión para las distintas formulaciones de las emulsiones. T: emulsión con emulsionante tween 20 sin tratamiento con ultrasonidos (US); T25: emulsión con emulsionante tween 20 con tratamiento por US de potencia media; T40: emulsión con emulsionante tween 20 con tratamiento por US de potencia alta; L: emulsión con emulsionante lecitina de soja sin tratamiento por US; L25: emulsión con emulsionante lecitina de soja con tratamiento por US de potencia media; L40: emulsión con emulsionante lecitina de soja con tratamiento con US de potencia alta.

5. Conclusiones

El tratamiento por US confiere estabilidad estructural a las emulsiones elaboradas con tween 20 y lecitina, ya que mantienen un tamaño de glóbulo reducido durante el proceso de digestión intestinal *in vitro*. Esta estabilidad estructural parece tener lugar a nivel interfase e influye en la digestibilidad de la grasa de la emulsión, aumentándola. El tratamiento por US de las emulsiones elaboradas con tween 20 y lecitina disminuye los fenómenos de floculación y coalescencia durante el proceso de digestión intestinal *in vitro*. Cuando la emulsión se prepara sin tratamiento por US, el emulsionante tween 20 ejerce un mayor efecto protector frente a la lipasa que la lecitina. La digestión de la grasa de todas las emulsiones elaboradas con tween 20 y lecitina independientemente del tamaño de glóbulo inicial tiene lugar principalmente durante los primeros 20-30 min de digestión intestinal *in vitro*. El uso de distintos emulsionantes y su tratamiento o no con ultrasonidos permite modificar la digestibilidad lipídica de las emulsiones, lo que puede ser útil para el diseño de alimentos con digestibilidad grasa controlada.

6. Bibliografía

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), 1402–1410. doi:10.1017/S0007114513000664

Alejandre, M., Poyato, C., Ansorena, D., & Astiasaran, I. (2016). Linseed oil gelled emulsion: A successful fat replacer in dry fermented sausages. *Meat Science*, 121, 107–113. doi:10.1016/j.meatsci.2016.05.010

Araujo, R., Fazani A. L., Nettoc, F.M., & Lopes R. (2013). Stability and in vitro digestibility of emulsions containing lecithin and whey proteins. *Food Funct*, 4, 1322-1331. doi: 10.1039/c3fo60156k

Awad, T., Moharram, H., Shaltout, O., Asker, D., & Youssef, M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48, 410-427. doi:10.1016/j.foodres.2012.05.004

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

Borreani, J., Hernando, I., Salvador, A., & Quiles, A. (2017). New hydrocolloid-based emulsions for replacing fat in panna cottas: a structural and sensory study. *Sci Food Agric* (wileyonlinelibrary.com) doi:10.1002/jsfa.8373

Brösel, S., & Schubert, H. (1999). Investigations on the role of surfactants in mechanical emulsification using a high-pressure homogenizer with an orifice valve. *Chemical Engineering and Processing*, 38, 533–540. doi:10.1016/S0255-2701(99)00050-1

Cárcel, J. A., García-Pérez, J. V., Benedito, J., & Mulet, A. (2012). Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 200-207. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.05.038

Cavalcanti, M.T.S., Nunes, C., Lima, S.A.C., Soares-Sobrinho, J.L., & Reis, S. (2017). Multiple Lipid Nanoparticles (MLN), a New Generation of Lipid Nanoparticles for Drug Delivery Systems: Lamivudine-MLN Experimental Design. *Pharm Res*, 34, 1204-1216. doi:10.1007/s11095-017-2136-0

Chemat, F., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813-835. doi:10.1016/j.ultsonch.2010.11.023

Costa, A.R.L., Gomes, A., Andrade, C.C.P., & Cunha, R.L. (2017). Emulsifier functionality and process engineering: Progress and challenges. *Food Hydrocolloids*, 68, 69-80. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.10.012

De São José, J. F. B., de Andrade, N. J., Ramos, A. M., Vanetti, M. C. D., Stringheta, P. C., & Chaves, J. B. P. (2014). Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. *Food Control*, 45, 36-50. doi:10.1016/j.foodcont.2014.04.015

DiNicolantonio, J.J.; Lucan, S.C.; & O'Keefe, J.H. (2016). The Evidence for Saturated Fat and for Sugar Related to Coronary Heart Disease. *Progress in cardiovascular diseases*, 58, 464-472. doi:10.1016/j.pcad.2015.11.006

Floury, J., Desrumaux, A., Axelos, M.A.V., & Legrand, J. (2003). Effect of high pressure homogenisation on methylcellulose as food emulsifier. *Journal of Food Engineering*, 58, 227-238. doi:10.1016/S0260-8774(02)00372-2

Gallier, S., & Singh, H. (2012) The physical and chemical structure of lipids in relation to digestion and absorption. *Lipid Technology*, 24(12), 271-273. doi:10.1002/lite.201200240

Golding, M., & Wooster, T.J. (2010). The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, 90-101. doi:10.1016/j.cocis.2009.11.006

Ivanov, I.B.; Danov, K.D., & Kralchevsky, P.A. (1998) Flocculation and coalescence of micron-size emulsion droplets *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152, 161-182. doi:10.1016/S0927-7757(98)00620-7

Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids*, 22, 1191-1202. doi:10.1016/j.foodhyd.2007.09.006

Kaltsa, O., Gatsi, I., Yanniotis, S., & Mandala, I. (2014). Influence of ultrasonication parameters on physical characteristics of olive oil model emulsions containing xanthan. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 2038-2049. doi:10.1007/s11947-014-1266-1

Karthik, P. & Anandharamakrishnan, C. (2016). Enhancing omega-3 fatty acids nanoemulsion stability and in-vitro digestibility through emulsifiers. *Journal of Food Engineering*, 187, 92-105. doi:10.1016/j.jfoodeng.2016.05.003

Lad, V. N., & Murthy, Z. V. P. (2012). Enhancing the stability of oil-in-water emulsions emulsified by coconut milk protein with the application of acoustic cavitation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51, 4222-4229. doi:10.1021/ie202764f

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

Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P., Macierzanka, A., & Mackie, A. (2012). The role of bile salts in digestion. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165, 36-46. doi:10.1016/j.cis.2010.12.002

Mao, L., & Miao, S. (2015). Structuring Food Emulsions to Improve Nutrient Delivery During Digestion. *Food Eng Rev*, 7, 439–451. doi:10.1007/s12393-015-9108-0

McClements, D. J., & Decker, E. A. (2007). Lipids, in: *Fennema's Food Chemistry*, 4^a Ed. CRC Press. Boca Ratón, 155–216.

Mezdour, S., Lepine, A., Erazo, P., Ducept, F., & Michon, C. (2008). Oil/water surface rheological properties of hydroxypropyl cellulose (HPC) alone and mixed with lecithin: Contribution to emulsion stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 331: 76–83. doi:10.1016/j.colsurfa.2008.07.023

Micha, R., Khatibzadeh, S., Shi, P., Fahimi, S., Lim, S., Andrews, K. G., ... Mozaffarian, D. (2014). Global, regional, and national consumption levels of dietary fats and oils in 1990 and 2010: a systematic analysis including 266 country-specific nutrition surveys. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 348(apr14_18), g2272. doi:10.1136/bmj.g2272

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, 770–781. doi:10.1016/j.foodres.2007.01.007

- Mutaliyeva, B., Grigoriev, D., Madybekova, G., Sharipova, A., Aidarova, S., Saparbekova, A., & Miller, R. (2017). Microencapsulation of insulin and its release using w/o/w double emulsion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 521, 147-152. doi:10.1016/j.colsurfa.2016.10.041
- Scholten, E. (2016). Composite foods: from structure to sensory perception. *Food Funct*, 8, 481-497. doi:10.1039/c6fo01099g
- Shchipunov, Y.A. (2001). Lecithin organogel A micellar system with unique properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 183-185, 541-554. doi:10.1016/S0927-7757(01)00511-8
- Signh, H., Ye, A., & Horne, D. (2009). Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Progress in Lipid Research*, 48, 92-100. doi:10.1016/j.plipres.2008.12.001
- Sun, J. H., Decker, E.A. & McClements, D.J. (2009). Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during in vitro digestion. *Food Chemistry*, 114, 253-262. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.069
- Timgren, A., Marilyn, R., Dejmek, P., Marku, D., & Sjöö, M. (2013). Emulsion stabilizing capacity of intact starch granules modified by heat treatment or octenyl succinic anhydride. *Food Science & Nutrition*, 1(2), 157-171. doi: 10.1002/fsn3.17
- Tiwari, B. K. & Mason, T.J. (2012). Ultrasound processing of fluid foods. *Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods*, 6, 135-165. doi: 10.1016/B978-0-12-381470-8.00006-2
- Traynor, M.P., Burke, R., Frias, J.M., Gaston, E., & Barry-Ryan, C. (2013). Formation and stability of an oil in water emulsion containing lecithin, xanthan gum and sunflower oil. *International Food Research Journal*, 20(5), 2173-2181.
- Yaoguang, C., & McClements, D.J. (2016). Influence of emulsifier type on the in vitro digestion of fish oil-in-water emulsions in the presence of an anionic marine polysaccharide (fucoidan): Caseinate, whey protein, lecithin, or Tween 80. *Food Hydrocolloids*, 61, 92-101. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.04.047