

Tesis Doctoral

Comportamiento de interfases y emulsiones submicrónicas estabilizadas por biopolímeros en simulaciones de procesos de digestión gastroduodenal in vitro

Bellesi, Fernando Alberto

2016-11-24

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bellesi, Fernando Alberto. (2016-11-24). Comportamiento de interfases y emulsiones submicrónicas estabilizadas por biopolímeros en simulaciones de procesos de digestión gastroduodenal in vitro. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Bellesi, Fernando Alberto. "Comportamiento de interfases y emulsiones submicrónicas estabilizadas por biopolímeros en simulaciones de procesos de digestión gastroduodenal in vitro". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-11-24.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Industrias

Comportamiento de interfases y emulsiones submicrónicas estabilizadas por biopolímeros en simulaciones de procesos de digestión gastroduodenal *in vitro*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Química Industrial

Lic. Bellesi Fernando A.

Director de tesis: Dra. Pilosof, Ana M. R.

Director Asistente: Dr. Pizones Ruiz-Henestrosa, Víctor M.

Consejero de Estudios: Dra. Pilosof, Ana M. R.

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biopolímeros, Nanopartículas y Coloides Alimentarios,
Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Buenos Aires, 2016.

Fecha de defensa: 24/11/2016

COMPORTAMIENTO DE INTERFASES Y EMULSIONES SUBMICRÓNICAS ESTABILIZADAS POR BIOPOLÍMEROS EN SIMULACIONES DE PROCESOS DE DIGESTIÓN GASTRODUODENAL *IN VITRO*

Resumen

En años recientes un gran número de trabajos se han enfocado a estudiar la forma de reducir la elevada absorción de lípidos, asociada a numerosos problemas de salud, tales como obesidad y problemas cardiovasculares. Si bien las metodologías para abordar el tema son variadas, al ser la lipólisis una reacción interfacial (la lipasa debe adsorberse a la interfase para llevar a cabo la digestión de los lípidos), las interfases aceite/agua (tanto la estructura como el área interfacial) resultan un punto crítico a estudiar. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo consiste en evaluar el impacto que presentan diferentes estructuras interfaciales en el proceso digestivo con el propósito de encontrar aquella que retarde (o inhiba) la acción digestiva llevada a cabo por la lipasa pancreática. Se analizaron estructuras interfaciales y emulsiones estabilizadas por: proteínas (β -lactoglobulina (β lg) y aislado proteico de soja (SPI)) y polisacáridos (hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)). Se desarrolló un modelo de digestión *in vitro* constituido por dos etapas: gástrica (1h, pH 2,5) y duodenal (1h, pH 7), que contemplan la presencia de las principales enzimas y biopolímeros a concentraciones fisiológicas. El estudio se realizó en dos niveles: **(1)** Estudios de digestión de interfases aceite/agua (tensiómetro interfacial de gota) para obtener información sobre cómo los fluidos característicos de la digestión perturban tales películas interfaciales, caracterizándolos mediante los parámetros: tensión interfacial y módulo dilatacional interfacial; **(2)** Estudios de digestión de emulsiones estabilizadas por los mismos emulsionantes obtenidas mediante la técnica de ultrasonidos de alta intensidad. Se analizaron los cambios microestructurales de las gotas de aceite (microscopía óptica y técnicas de dispersión de luz) y se monitoreó el porcentaje de ácidos grasos liberados (% AGL) por acción de la lipasa pancreática.

Se comprobó que tanto las estructuras interfaciales como las emulsiones presentan diferencias en cuanto a la resistencia a la acción digestiva llevada a cabo por la lipasa. Estas vienen determinadas por la naturaleza de cada estructura y las características

interfaciales de cada una. Las emulsiones estabilizadas por SPI y HPMC mostraron los menores % AGL en comparación con las emulsiones de β lg. El comportamiento observado no presentó relación con el área interfacial expuesta a la lipasa, sino más bien a la capacidad que presenta cada emulsionante en dificultar la acción de las sales biliares (SB), agentes indispensables para la acción de la lipasa. De esta manera, los resultados permitieron identificar a las SB como un factor clave en la regulación del proceso.

En términos generales, los resultados contribuyen al mayor entendimiento sobre los mecanismos involucrados en la digestión de emulsiones y del rol crucial que juegan las estructuras interfaciales en el control de la lipólisis.

Palabras claves: proteína; polisacárido; emulsión; digestión

BEHAVIOUR OF INTERFACES AND SUBMICRON EMULSIONS STABILIZED BY BIOPOLYMERS UNDER *IN VITRO* GASTRODUODENAL DIGESTION

Abstract

In recent years an important number of works have been focused on modulating the lipid digestion, since the high lipid absorption has been associated with an important number of health problems, such as obesity and cardiovascular diseases. Although different methodologies exist to evaluate the lipolysis process that is an interfacial reaction (pancreatic lipase has to bind to the oil-water (o/w) interface), o/w interfaces (both structure and interfacial area) suppose a critical issue to study. So, the objective of the present work is to evaluate the impact of different interfacial structures in the digestion in order to find the interfacial film that could retard (or inhibit) the pancreatic lipase activity. Different interfacial structures and proteins (β -lactoglobulin (β lg) and soy protein isolate (SPI)) and polysaccharides (hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)) stabilized emulsions were analyzed. An *in vitro* digestion protocol was developed consisting of two stages: gastric (1h, pH 2.5) and duodenal phase (1h, pH 7.0), in the presence of the main enzymes and biopolymers at physiological concentrations. The investigation was carried out at two levels: **(1)** interfacial digestion of the different interfacial films formed (using a pendant drop tensiometer) to understand the way the digestive fluids affect the interfacial films, thus analyzing the evolution of interfacial tension and the dilatational interfacial modulus; **(2)** analysis of the behavior of emulsion (formed by using ultrasound techniques) stabilized by each emulsifier under *in vitro* gastrointestinal digestion. The microstructural changes of the oil droplets (optical microscopy and light scattering techniques) were analyzed and it was also monitored the free fatty acid release (% FFA) due to the pancreatic lipase activity.

Both the interfacial structures as well as the o/w emulsions showed different resistance to the lipolysis. These differences depended on the nature of the interfacial structure and the interfacial properties formed by the emulsifiers. SPI and HPMC stabilized o/w emulsions presented the lowest % FFA values in comparison to β lg stabilized emulsions. No correlation did exist with the interfacial available area for the lipase adsorption. It was the capacity of the different emulsifiers to reduce the bile salts (BS) activity (essential

molecules for the lipase activity) the reason of the existing differences. The results allowed to identify the BS as the key molecules in the lipolysis modulation.

These results have contributed to a better understanding of the mechanisms affecting the digestion of the emulsions and the important role of the interfacial structures in the vitro lipolysis control.

Keywords: protein; polysaccharide; emulsion; digestion

Agradecimientos

Aprovecho estas líneas para agradecer a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta tesis, quienes directa o indirectamente, han formado parte de este período.

A la Dra. Ana Pilosof, por brindarme la posibilidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su gran aporte en las tareas de investigación y en el análisis de resultados, por transmitirme su confianza para desarrollar las tareas que nos proponemos.

A Víctor, mi gran compañero de tesis, por su constante apoyo tanto en lo profesional como en lo personal, por su dedicación y sus valiosos aportes durante la investigación y redacción de la tesis.

A mis padres, Stella y Tito, por apoyarme en todo lo que me propongo y darme la confianza para seguir cumpliendo los objetivos. A mi hermana Araceli, por ser un sostén fundamental en mis decisiones y acompañarme siempre. A Camila y Anita, por transmitirme una inmensa alegría y darle un motivo más a mis visitas a Saladillo. A la abuela Maruca por apoyarme siempre sin importar cuán lejos esté.

A mis compañeros de grupo de trabajo, los que están y los que estuvieron, con quienes compartí innumerables buenos momentos. A Julia por su gran ayuda en los protocolos de digestión, a Caro por su infinita paciencia, sus consejos y apoyo desinteresado. A Rocío, Paula, Federico, Julieta, Inés, Karina y Mariana con quienes comparto el día a día, haciendo posible que ir a trabajar sea aún más divertido.

A todos mis amigos de Saladillo y La Plata, que a pesar de la distancia los siento cerca. Por los momentos que compartimos y porque es imposible no divertirme con ustedes. A Lola y Fausto, mis sobrinos de corazón, fruto de esta amistad.

Al grupo de Física de Fluidos y Biocoloides de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, que me dieron la posibilidad de desarrollar tareas de investigación en sus laboratorios. A la Dra. Julia Maldonado-Valderrama, por sus valiosos aportes sobre digestión interfacial. A Teresa, por su gran ayuda con el uso de los equipos. A todos los

chicos de “la Sala” que me hicieron sentir como en mi casa, por los viajes y las innumerables noches de tapeo por Granada, que seguro algún día se repetirán.

A la Jefatura de Gabinete de Ministros de la Nación, que en el marco del programa BEC.AR financió mi estancia en la ciudad de Granada.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, que me otorgó la beca para realizar el doctorado y porque junto con la Universidad de Buenos Aires brindaron el financiamiento necesario para llevar a cabo las tareas de investigación.

A todos los integrantes del Departamento de Industrias, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, con quienes compartí estos años de trabajo.

Listado de ilustraciones

Figura 1. Mapa mundial de obesidad determinado en la población mundial adulta a partir del índice de masa corporal (IMC) según la OMS.....	3
Figura 2. Diferentes tipos de emulsiones: (a) O/W, (b) W/O, (c) W/O/W, (d) O/W/O según la naturaleza de sus fases. O: fase oleosa, W: fase acuosa.....	5
Figura 3. Proceso de homogeneización para una emulsión O/W: Homogeneización primaria y Homogeneización secundaria.....	6
Figura 4. (a) Homogeneizador de alta velocidad. (b) Sistema rotor/estator por el cual circulan los fluidos para su homogeneización	8
Figura 5. Molino coloidal.....	9
Figura 6. Homogeneizador de alta presión.....	10
Figura 7. Homogeneizador de membranas.....	10
Figura 8. Homogeneizador ultrasónico.....	11
Figura 9. Origen de la tensión interfacial (γ).....	12
Figura 10. Diferencia entre estabilidad termodinámica y estabilidad cinética.....	14
Figura 11. Mecanismos de desestabilización de emulsiones: Sedimentación y Cremado.....	15
Figura 12. Mecanismos de desestabilización de emulsiones: Floculación y Coalescencia.....	15
Figura 13. (a) Interfase aceite/agua. (b) Acumulación de tensioactivo en la interfase.....	17
Figura 14. (a) Molécula de tensioactivo de bajo peso molecular. (b) Monocapa de tensioactivo de bajo peso molecular en la interfase O/W.....	19
Figura 15. Regiones estructurales en el proceso de adsorción de un tensioactivo: determinación de la concentración micelar crítica.....	20
Figura 16. Configuración de un polímero en la interfase O/W.....	21
Figura 17. Adsorción de los polímeros en la interfase O/W: período de inducción, período de penetración, período de saturación y reordenamiento.....	23
Figura 18. Ejemplo de deformaciones en la interfase en dos dimensiones.....	24
Figura 19. Respuesta de una película interfacial a la aplicación de un esfuerzo.....	25
Figura 20. Esquema del aparato digestivo y resumen de las principales condiciones fisiológicas de los órganos que lo componen.....	26
Figura 21. Estructura de un triglicérido.....	27
Figura 22. Esquema general de la hidrólisis de un triglicérido.....	28
Figura 23. Esquema de los cambios fisicoquímicos y biológicos que puede experimentar una emulsión durante su recorrido por el sistema digestivo.....	29

Figura 24. Representación de los movimientos peristálticos que empujan el quimo hacia el píloro.....	33
Figura 25. Principales órganos involucrados en el proceso de digestión.....	34
Figura 26. Representación esquemática de la emulsificación llevada a cabo por las SB sobre las gotas de aceite. Incremento de la interfase O/W expuesta a la lipasa pancreática.....	37
Figura 27. Las SB remueven los productos de la digestión para transportarlos al epitelio intestinal.....	38
Figura 28. Factores que impactan en el proceso de lipólisis e involucran a la película interfacial.....	46
Figura 29. Molécula de Tween 20.....	63
Figura 30. Equipo de ultrasonido de alta intensidad utilizado para la obtención de emulsiones O/W.....	65
Figura 31. Analizador de partículas Mastersizer 2000.....	66
Figura 32. Esquema del recipiente utilizado para llevar a cabo el proceso de digestión <i>in vitro</i>	68
Figura 33. Representación esquemática del tensiómetro interfacial OCTOPUS.....	72
Figura 34. (a) Dispositivo de intercambios múltiples de la subfase del tensiómetro interfacial OCTOPUS. (b) Fotografía del cabezal rotatorio	73
Figura 35. Respuesta de γ ante una deformación del área interfacial.....	74
Figura 36. Representación esquemática del dispositivo de intercambio de la subfase.....	76
Figura 37. Esquema general del proceso de intercambio de la subfase.....	77
Figura 38. Esquema del tensiómetro interfacial PAT-1.....	79
Figura 39. Esquema del sistema de doble capilar con el que se realiza el intercambio de la subfase.....	81
Figura 40. Equipo de dispersión dinámica de luz Nano Zetasizer (Marlvern Instruments).....	82
Figura 41. Distribución de tamaño en número (a), volumen (b) e intensidad (c) de una muestra bimodal de partículas de 5 y 50 nm, presentes en igual cantidad.....	84
Figura 42. Celda para la determinación del potencial Z	84
Figura 43. Esquema de una partícula cargada y de la doble capa que la rodea.....	86
Figura I.1. Distribución de tamaño de gota en volumen y número para emulsiones O/W (10/90) estabilizadas por β Ig, SPI y E5LV.....	94
Figura I.2. Imágenes obtenidas por microscopía óptica (objetivo de 400X) de las emulsiones iniciales estabilizadas por: β Ig, SPI y E5LV.....	96

Figura I.3. Variación del diámetro de gota promedio ($D_{3,2}$) a lo largo del tiempo para las emulsiones estabilizadas por SPI y E5LV.....	97
Figura I.4. Distribución de tamaño de gota de las emulsiones estabilizadas por β lg, SPI y E5LV iniciales y mezcladas con el FGS durante 1 h a 37 °C	99
Figura I.5. Variación de la distribución de tamaño de gota para emulsiones estabilizadas por β lg, SPI y E5LV a lo largo del proceso de digestión gastroduodenal <i>in vitro</i>	103
Figura I.6. Cambio del diámetro promedio ($D_{3,2}$) durante el proceso de digestión gastroduodenal <i>in vitro</i> para emulsiones estabilizadas por β lg, SPI y E5LV.....	105
Figura I.7. Imágenes de microscopía óptica (objetivo: 400X) antes y durante el proceso de digestión gastroduodenal <i>in vitro</i> de emulsiones estabilizadas por β lg, SPI y E5LV.....	107
Figura I.8. Distribución del tamaño de partícula correspondiente a la fase micelar de la emulsión estabilizada por SPI.....	108
Figura I.9. Liberación de los ácidos grasos (% AGL) en el tiempo durante la fase duodenal de la digestión <i>in vitro</i> de las emulsiones estabilizadas por β lg, SPI y E5LV.....	110
Figura I.10. Correlación entre la velocidad inicial del proceso de lipólisis (K_0^{AGL}) y el área interfacial específica (AEI) obtenida para las emulsiones iniciales.....	113
Figura II.1. Perfil electroforético para una solución de β lg 2% p/p durante la digestión gastroduodenal <i>in vitro</i> : (a) Etapa gástrica y (b) Etapa duodenal.....	123
Figura II.2. Perfil electroforético para una solución de SPI 2% p/p durante la digestión gastroduodenal <i>in vitro</i> : (a) Etapa gástrica y (b) Etapa duodenal.....	124
Figura II.3. Variación de la tensión interfacial (γ) en el tiempo a 37 °C durante el proceso de digestión gastroduodenal <i>in vitro</i> de la película formada por β lg en la interfase O/W.....	126
Figura II.4. Variación de la tensión interfacial (γ) en el tiempo a 37 °C durante el proceso de digestión gastroduodenal <i>in vitro</i> de la película formada por SPI en la interfase O/W.....	130
Figura II.5. Variación de la tensión interfacial (γ) en el tiempo a 37 °C durante el proceso de digestión gastroduodenal <i>in vitro</i> de la película formada por E5LV en la interfase O/W.....	135
Figura II.6. Variación del módulo dilatacional interfacial (E) durante el proceso de digestión gastroduodenal <i>in vitro</i> a 37 °C de la película formada por β lg, SPI y E5LV en la interfase O/W.....	137
Figura III.1. Variación de la presión interfacial (π) con el tiempo a 37 °C durante la adsorción de las SB a distintas concentraciones comprendidas en el rango fisiológico (5 - 25 mg/ml).....	148
Figura III.2. Variación del módulo dilatacional interfacial (E) con el tiempo a 37 °C durante la adsorción de SB a distintas concentraciones comprendidas en el rango fisiológico (5 – 25 mg/ml).....	149

Figura III.3. Variación de la presión interfacial (π) con el tiempo a 37 °C para la adsorción de SPI y β lg a una concentración de 1% p/p.....	150
Figura III.4. Variación del módulo dilatacional interfacial (E) con el tiempo a 37 °C para películas de SPI y β lg a una concentración de 1% p/p.....	152
Figura III.5. Variación de la presión interfacial (π) con el tiempo a 37 °C para la adsorción de E5LV a una concentración de 0,5% p/p.....	153
Figura III.6. Variación del módulo dilatacional interfacial (E) con el tiempo a 37 °C para la adsorción de E5LV a una concentración de 0,5% p/p.....	154
Figura III.7. Variación de la presión interfacial (a) y del módulo dilatacional interfacial (b) con el tiempo a 37 °C para β lg 1% p/p, SB 5mg/ml y sistema mixto.....	156
Figura III.8. Variación de la presión interfacial (a) y del módulo dilatacional interfacial (b) con el tiempo a 37 °C para SPI 1% p/p, SB 5mg/ml y sistema mixto.....	157
Figura III.9. Variación de la presión interfacial (a) y del módulo dilatacional interfacial (b) con el tiempo a 37 °C para E5LV 0,5% p/p, SB 5 mg/ml y sistema mixto.....	158
Figura III.10. Variación de la presión interfacial (π) con el tiempo tras la adición secuencial de una solución de SB a 37 °C sobre: (a) películas proteicas (1% p/p) de β lg y SPI, (b) película de E5LV 0,5 % p/p.....	161
Figura III.11. Aumento de π tras la introducción de las SB a 37 °C para: β lg, SPI y E5LV.....	162
Figura III.12. Variación del módulo dilatacional (E) con el tiempo tras la adición secuencial de una solución de SB a 37 °C sobre películas proteicas (1% p/p) de β lg y SPI, y sobre película de E5LV 0,5% p/p.....	164
Figura III.13. Variación del módulo dilatacional interfacial (E) con el tiempo luego de la adición de una solución de SB a 37 °C sobre películas proteicas (1% p/p) de β lg y SPI, y sobre película de E5LV 0,5% p/p.....	166
Figura III.14. Variación de la presión interfacial (π) con el tiempo a 37 °C para la adsorción de Tween 20 a una concentración de 0,1 mM.....	171
Figura III.15. Variación del módulo dilatacional interfacial (E) con el tiempo a 37 °C para la película interfacial formada por Tween 20 a una concentración de 0,1 mM.....	172
Figura III.16. Variación de la presión interfacial (a) y del módulo dilatacional (b) con el tiempo a 37 °C para Tween 20 (0,1 mM), SB 5mg/ml y sistema mixto.....	173
Figura III.17. Variación de la presión interfacial (π) con el tiempo a 37 °C tras la adición de una solución de SB sobre películas interfaciales de Tween 20 (0,1 mM).....	174
Figura III.18. Variación del módulo dilatacional interfacial (E) con el tiempo a 37 °C tras la adición secuencial de una solución de SB sobre películas de interfaciales de Tween 20 (0,1 mM).....	175

Figura IV.1. Liberación de ácidos grasos en el tiempo durante la fase duodenal de la digestión <i>in vitro</i> de emulsiones (10/90) de HPMC al 2% p/p: E5LV y E4M.....	185
Figura IV.2. Distribución de tamaño de gota en volumen para emulsiones O/W de HPMC (E5LV (a) y E4M (b)) iniciales y luego de mezclarse con SB (en el momento de la mezcla y una hora después) bajo condiciones de digestión duodenal a 37 °C.....	187
Figura IV.3. Variación de la presión interfacial (π) con el tiempo a 37 °C para la adsorción de E5LV y E4M a 0,5 % p/p.....	189
Figura IV.4. Variación del módulo dilatacional interfacial (a) y la viscosidad dilatacional interfacial (b) con el tiempo a 37 °C para la adsorción de E5LV y E4M a 0,5% p/p.....	190
Figura IV.5. Variación de la presión interfacial (π) con el tiempo a 37 °C tras la adición secuencial de una solución de SB sobre películas interfaciales de E5LV y E4M a 0,5% p/p	192
Figura IV.6. Variación del módulo dilatacional (a) y la viscosidad dilatacional interfacial (b) con el tiempo a 37 °C tras la adición secuencial de una solución de SB sobre películas interfaciales de E5LV y E4M a 0,5 % p/p.....	193
Figura IV.7. Distribución de tamaño de partícula expresada en volumen para una solución de SB (5 mg/ml).....	196
Figura IV.8. Distribución de tamaño de partícula expresada en volumen para una solución de E5LV (a) y E4M (b). Ambos a una concentración de 0,5% p/p.....	197
Figura IV.9. Distribución de tamaño de partícula expresada en volumen para soluciones de HPMC (0,5% p/p) mezcladas con solución de SB (5 mg/ml): E5LV (a) y E4M (b).....	199
Figura IV.10. Representación esquemática de la asociación entre cadenas de HPMC en solución durante la gelificación por calor.....	201
Figura IV.11. Cloud point determinado para cada HPMC y sus mezcla con SB.....	202
Figura IV.12. Representación esquemática del modelo propuesto: Las SB producen mayor desarreglo en E4M aumentando los sitios disponibles para la adsorción de la lipasa en mayor medida que en E5LV, lo que resulta en un mayor grado de lipólisis.....	206

Listado de Tablas

Tabla 1. Resumen de trabajos que han utilizado modelos de digestión <i>in vitro</i> en emulsiones O/W.....	42
Tabla 2. Composición de la β Ig utilizada.....	63
Tabla 3. Etapas de la digestión gastroduodenal interfacial y composición de los fluidos empleados.....	75
Tabla I.1. Diámetros promedio ($D_{3,2}$ y $D_{4,3}$), área interfacial específica (AIE), e índice de polidispersidad (IP) de las emulsiones estabilizadas por β Ig, SPI y E5LV.....	94
Tabla I.2. Diámetros promedio ($D_{3,2}$ y $D_{4,3}$) y área interfacial específica (AIE) obtenidos para las emulsiones de β Ig, SPI y E5LV a lo largo de la digestión gastroduodenal <i>in vitro</i>	101
Tabla I.3. Parámetros cinéticos que describen la liberación de AG durante la fase duodenal de la digestión <i>in vitro</i> para las emulsiones de β Ig, SPI y E5LV.....	111
Tabla II.1: Tensión interfacial (γ) y módulo dilatacional interfacial (E) obtenidos al final de cada una de las etapas de la digestión interfacial (mN/m).....	133
Tabla III.1. Parámetros que describen la adsorción de SB en las películas interfaciales de β Ig, SPI y E5LV.....	163
Tabla III.2. Variación del módulo dilatacional interfacial (E) a partir de la adsorción de las SB en las películas interfaciales de β Ig, SPI y E5LV.....	166
Tabla IV.1. Características fisicoquímicas de las HPMC: E5LV y E4M.....	184
Tabla IV.2. Parámetros cinéticos que describen la liberación de AG durante la fase duodenal de la digestión <i>in vitro</i> para las emulsiones de E4M y E5LV.....	185
Tabla IV.3. Diámetros promedio ($D_{3,2}$ y $D_{4,3}$) y área interfacial específica (AIE) obtenidos para las emulsiones iniciales (E5LV y E4M) y luego de mezclarlas con SB: al momento de la mezcla y una hora después bajo condiciones de digestión duodenal a 37 °C.....	188
Tabla IV.4. Potencial Z de las emulsiones iniciales (E5LV y E4M) y luego de mezclarlas con SB bajo condiciones de digestión duodenal.....	194

Índice

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Lípidos y Salud.....	2
2. Emulsiones Alimentarias.....	5
2.1. Definición de emulsión.....	5
2.2. Proceso de formación de emulsiones.....	6
2.3. Fuerzas involucradas en el proceso de homogeneización.....	7
2.4. Equipos utilizados para la formación de emulsiones.....	8
2.4.1. Homogeneizadores de alta y baja velocidad.....	8
2.4.2. Molino coloidal.....	9
2.4.3. Homogeneizadores de válvula de alta presión.....	9
2.4.4. Homogeneizadores de membrana.....	10
2.4.5. Homogeneizadores ultrasónicos.....	11
2.5. Factores termodinámicos involucrados en la formación de una emulsión.....	11
2.6. Estabilidad de las emulsiones.....	13
2.7. Mecanismos de desestabilización de las emulsiones.....	14
2.7.1. Cremado y Sedimentación.....	14
2.7.2. Floculación y Coalescencia.....	15
2.7.3. Desproporción de Ostwald.....	15
2.7.4. Inversión de fase.....	16
2.8. Agentes interfaciales.....	16
2.9. Tensioactivos de bajo peso molecular.....	18
2.9.1. Cinética de adsorción interfacial de un tensioactivo de bajo peso molecular.....	19
2.10. Propiedades interfaciales de las proteínas y polisacáridos.....	20
2.10.1. Cinética de adsorción interfacial de un polímero.....	21

2.11. Propiedades reológicas de las películas interfaciales.....	23
3. Proceso de digestión.....	26
3.1. Aspectos generales de la digestión de lípidos.....	27
3.2. Etapas del proceso de digestión.....	28
3.2.1. Inicio de la digestión: <i>La boca</i>	29
3.2.2. Estómago.....	31
3.2.3. Intestino delgado.....	33
3.2.4. Intestino grueso.....	35
3.3. El rol de las sales biliares en la digestión de los lípidos.....	36
3.4. Aspectos generales de la simulación del proceso digestivo: <i>La digestión in vitro</i>	38
4. Impacto de la composición interfacial en el proceso de lipólisis.....	44
5. Referencias.....	51
OBJETIVOS.....	59
MATERIALES Y MÉTODOS.....	62
1. Materiales.....	63
1.1. Aislado proteico de soja (SPI).....	63
1.2. β -lactoglobulina (β lg).....	63
1.3. Hidroxipropilmetilcelulosas (HPMC).....	63
1.4. Polisorbato 20 (Tween 20).....	63
1.5. Aceite vegetal.....	64
2. Métodos.....	64
2.1. Preparación de soluciones de emulsionantes.....	64
2.2. Obtención de emulsiones O/W por tratamiento con ultrasonidos de alta intensidad.....	64
2.3. Caracterización de las emulsiones O/W.....	65
2.3.1. Dispersión estática de luz.....	65

2.3.2. Microscopía óptica.....	66
2.4. Digestión gastroduodenal <i>in vitro</i> de las emulsiones O/W.....	67
2.4.1. Fluidos que simulan las condiciones de digestión gástrica y duodenal.....	67
2.4.2. Proceso de simulación de la digestión gastroduodenal <i>in vitro</i> de las emulsiones O/W.....	67
2.5. Caracterización de las emulsiones O/W durante la digestión gastroduodenal <i>in vitro</i>	69
2.5.1. Cambios en el tamaño de partícula.....	69
2.5.2. Caracterización del grado de lipólisis.....	69
2.6. Digestión <i>in vitro</i> de solución de los emulsionantes.....	70
2.6.1. Análisis de los digeridos por electrofresis SDS-PAGE.....	71
2.7. Digestión <i>in vitro</i> de la película interfacial en la interfase O/W.....	71
2.7.1. Tensiómetro interfacial de gota (OCTOPUS).....	72
2.7.2. Proceso de intercambios de la subfase: digestión interfacial.....	75
2.8. Comportamiento interfacial de los emulsionantes en presencia de las sales biliares.....	78
2.8.1. Tensiómetro interfacial de gota PAT-1.....	78
2.9. Caracterización de las interacciones entre HPMC y las sales biliares.....	82
2.9.1. Distribución de tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS).....	82
2.9.2. Determinación del potencial zeta (Z).....	84
2.9.3. Distribución de tamaño de partícula por dispersión estática de luz.....	86
2.9.4. Determinación del punto gel (<i>Cloud point</i>).....	86
3. Referencias.....	89
RESULTADOS.....	90
Capítulo I- Digestión gastroduodenal <i>in vitro</i> de emulsiones estabilizadas por proteínas y HPMC.....	91

I.1. Introducción.....	92
I.2. Caracterización inicial de emulsiones O/W estabilizadas por proteínas y HPMC.....	92
I.3. Comportamiento de las emulsiones O/W estabilizadas por proteínas y HPMC durante el proceso de digestión gastroduodenal <i>in vitro</i>	97
I.3.1. Evolución del tamaño de las gotas de aceite durante la digestión gastroduodenal <i>in vitro</i>	98
I.3.2. Cinética de lipólisis: Liberación de ácidos grasos en el tiempo.....	109
I.4. Análisis de la relación existente entre el tamaño de partícula/área interfacial con el grado de lipólisis.....	112
I.5. Conclusiones.....	115
I.6. Referencias.....	116
Capítulo II- Digestión gastroduodenal <i>in vitro</i> de las películas formadas por proteínas y HPMC.....	119
II.1. Introducción.....	120
II.2. Digestión de los emulsionantes proteicos en solución.....	121
II.3. Digestión interfacial de la película formada por cada emulsionante.....	125
II.3.1. Etapa control: <i>Formación de la película interfacial con el emulsionante</i>	125
II.3.2. Etapa FGS: <i>Digestión gástrica de la película interfacial</i>	128
II.3.3. Etapa FIS 1 de digestión duodenal de la película interfacial: <i>Proteólisis duodenal</i>	132
II.3.4. Etapa FIS 2 de digestión duodenal de la película interfacial: <i>Lipólisis duodenal</i>	133
II.3.5. Etapa DES: <i>Desorción interfacial</i>	136
II.4. Conclusiones.....	139
II.5. Referencias.....	141
Capítulo III- Adsorción de las sales biliares en condiciones de digestión duodenal sobre películas formadas por proteínas y HPMC.....	145
III.1. Introducción.....	146

III.2. Comportamiento interfacial de las sales biliares.....	147
III.2.1. Cinética de adsorción interfacial.....	147
III.2.2. Propiedades dilatacionales interfaciales de la película interfacial.....	148
III.3. Comportamiento interfacial de las proteínas y la HPMC.....	150
III.3.1. Cinética de adsorción interfacial de las proteínas.....	150
III.3.2. Propiedades dilatacionales interfaciales de las proteínas.....	151
III.3.3. Cinética de adsorción interfacial de la HPMC.....	152
III.3.4. Propiedades dilatacionales interfaciales de la HPMC.....	153
III.4. Efecto de las sales biliares en las películas interfaciales formadas por proteínas y HPMC	154
III.4.1. Adsorción competitiva entre las moléculas de emulsionante y las sales biliares.....	154
III.4.1.1. Adsorción competitiva entre las proteínas y las sales biliares.....	155
III.4.1.2. Adsorción competitiva entre la HPMC y las sales biliares.....	157
III.4.2. Estudios de adsorción secuencial.....	159
III.4.2.1. Efecto de las sales biliares en la presión interfacial.....	159
III.4.2.2. Efecto de las sales biliares en las propiedades dilatacionales interfaciales.....	163
III.5. Efecto de las sales biliares sobre la película interfacial formada por un tensioactivo de bajo peso molecular.....	169
III.5.1. Comportamiento interfacial de un tensioactivo de bajo peso molecular.....	169
III.5.1.1. Cinética de adsorción interfacial.....	170
III.5.1.2. Propiedades dilatacionales interfaciales de la película interfacial.....	171
III.5.2. Adsorción competitiva entre el Tween 20 y las sales biliares.....	172
III.5.3. Estudios de adsorción secuencial de las sales biliares en la película interfacial de Tween 20.....	173
III.6. Conclusiones.....	176

III.7. Referencias.....	178
Capítulo IV- Impacto de la estructura de HPMC en la modulación del proceso de lipólisis: rol de las sales biliares.....	182
IV.1. Introducción.....	183
IV.2. Cinética de lipólisis: Liberación de ácidos grasos en el tiempo.....	184
IV.3. Impacto de la presencia de sales biliares sobre emulsiones O/W estabilizadas por HPMC.....	186
IV.4. Impacto de la presencia de sales biliares sobre películas interfaciales de HPMC.....	189
IV.4.1. Comportamiento interfacial de las HPMC.....	189
IV.4.2. Estudios de adsorción secuencial de las sales biliares sobre películas interfaciales de HPMC.....	191
IV.5. Impacto de la adsorción de las sales biliares en la carga superficial de emulsiones de HPMC.....	194
IV.6. Interacciones entre las HPMC y las sales biliares en solución acuosa.....	195
IV.6.1. Análisis del grado de interacción entre las HPMC y las sales biliares por dispersión dinámica de luz.....	195
IV.6.2. Análisis del grado de interacción entre las HPMC y las sales biliares por determinación del cloud point.....	200
IV.7. Conclusiones.....	204
IV.8. Referencias.....	207
CONCLUSIONES.....	210
1. Conclusiones generales.....	211
2. Referencias.....	214

INTRODUCCIÓN

1. Lípidos y salud

De los tres principales macronutrientes presentes en los alimentos, los de mayor densidad calórica son los lípidos, con 9 Kcal/g, siendo esta densidad de 4 kcal/g para carbohidratos y proteínas. Pero los lípidos juegan un papel importante en la dieta humana, no solo por proveer energía, sino también por ser fuentes de nutrientes esenciales y componentes bioactivos (Leray, 2014; McClements y Decker, 2007). La funcionalidad de estos depende de sus estructuras, propiedades fisicoquímicas y naturaleza de la matriz del alimento que los soporta. Por consiguiente, en algunas situaciones resulta una ventaja aumentar la biodisponibilidad de los lípidos por contener componentes bioactivos, tales como carotenoides o fitoesteroles, mientras que en otras situaciones resultará beneficioso reducir su biodisponibilidad al tratarse de grasas saturadas o colesterol que, cuando se presentan en exceso, tienen un impacto negativo en la salud humana (McClements, Decker y Yeonhwa, 2009; Shefer y Shefer, 2003).

En los últimos años, el incremento en el consumo de dietas hipercalóricas en combinación con una vida sedentaria, se ha asociado a numerosos problemas de salud tales como diabetes, problemas cardiovasculares, sobrepeso, obesidad e hipertensión, entre otros (Bray, Paeratakul y Popkin, 2004; Golay y Bobbioni, 1997; Hlebowicz y col, 2009; Kim y col, 2015; McClements, 2015). La obesidad es una enfermedad crónica que se caracteriza por un aumento de peso corporal originado por el incremento de las reservas energéticas en forma de grasa. Uno de los parámetros más empleados para medir y clasificar el estado ponderal de una persona es el índice de masa corporal (IMC), que se define como la relación entre el peso de un individuo (Kg) y su altura elevada al cuadrado (m^2), de modo que si el IMC es superior a $30 \text{ Kg}/m^2$, se considera que una persona padece obesidad.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los problemas de sobrepeso y obesidad se han más que duplicado en los últimos años, alcanzándose durante el año 2014 un incremento récord de estos índices, convirtiendo a la obesidad en el quinto factor principal de riesgo de defunción a nivel mundial, y en una enfermedad que ha alcanzado niveles de epidemia a lo largo de todo el mundo.

El último “mapa mundial de obesidad” (Figura 1), divulgado por la OMS, que se elaboró a partir de la determinación del IMC en más de 190 países, determinó que, en los tres países más australes del Cono Sur (Argentina, Chile y Uruguay), más del 60% de la

población tiene sobrepeso, algo idéntico a lo que ocurre en Venezuela. Hace cinco años, cuando fue la última medición de este tipo, Argentina estaba por debajo de esa cifra, lo cual indica cómo ha empeorado el panorama en estos últimos años.

Para el año 2020 se prevé que el número de muertes debidas a enfermedades crónicas no contagiosas, que incluyen diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares, obesidad y cáncer, representarán el 75% de las muertes totales (Micha, Khatibzadeh, Shi, Andrews y Engell, 2015).

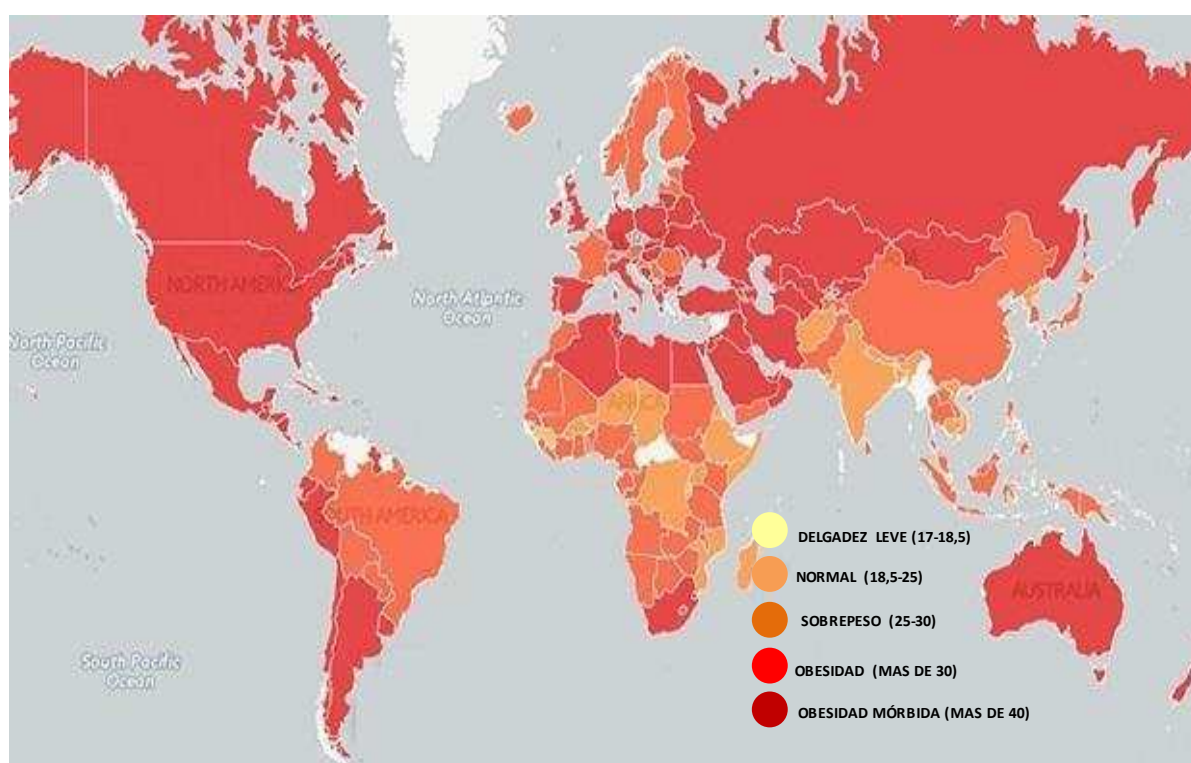


Figura 1. Mapa mundial de obesidad determinado en la población mundial adulta a partir del índice de masa corporal (IMC) según la OMS.

Por este motivo, la industria de los alimentos se ha esmerado en la obtención de nuevas formulaciones alimentarias con menor contenido lipídico que el de las formulaciones tradicionales (alimentos light o bajos en calorías) a modo de cubrir la demanda creciente por parte de los consumidores más exigentes (Gao y col, 2014; Ma y Boye, 2013). Con este fin, se han desarrollado formulaciones donde los lípidos son sustituidos por otros macronutrientes como las proteínas y los polisacáridos de menor porte calórico, o bien las grasas utilizadas para la fabricación son reemplazadas por grasas de mejor calidad, por ejemplo el reemplazo de grasas trans por otras insaturadas (Sanz, Falomir y Salvador, 2015; Wu, Degner y McClements, 2013). Sin embargo, dada la elevada contribución de los

lípidos a las propiedades organolépticas del alimento (textura cremosa, sabor y aroma agradable, etc.), la reducción de su contenido impacta de forma significativa en las propiedades sensoriales de la formulación. Algunos alimentos, de hecho, necesitan un determinado tipo de lípidos para su fabricación debido, por ejemplo, a que los lípidos de mayor índice de insaturación se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente o por el contrario, los saturados están en estado sólido (Sanz y col, 2015). En consecuencia la elaboración de alimentos con bajo contenido lipídico continua siendo una tarea complicada para la industria alimentaria (Saravacos y col, 2011).

Por esto último, uno de los grandes desafíos para la ciencia y tecnología de alimentos consiste en la búsqueda de estrategias para la creación de alimentos funcionales innovadores que mantengan la calidad sensorial del producto original, por lo cual son elegidos por los consumidores, pero disminuyendo el impacto negativo en la salud humana. Para todo esto se hace necesario un entendimiento preciso sobre la fisicoquímica que afecta a los alimentos ricos en lípidos y, sobre todo, sobre su comportamiento en el sistema digestivo, en especial durante la digestión lipídica.

2. Emulsiones alimentarias

2.1. Definición de emulsión

A partir de diferentes definiciones de diversos autores puede establecerse un concepto general según el cual “una emulsión es un sistema coloidal consistente en, al menos, un líquido íntimamente disperso en forma de gotas (fase dispersa), en el seno de otro inmiscible con él (fase continua)” (Angelo, 1989; Khan, Talegaonkar, Iqbal, Ahmed y Khar, 2006; Mason, Wilking, Meleson, Chang y Graves, 2006; McClements, 1999, 2015). En la mayoría de las emulsiones alimentarias los diámetros de las gotas que conforman la fase dispersa se encuentran entre los 100 nm y 100 μ m, aunque en los últimos años se ha mostrado un interés creciente en la obtención de emulsiones con diámetros de gotas inferiores a los 200 nm (nanoemulsiones), debido a sus novedosas propiedades fisicoquímicas, como su estabilidad y apariencia (Alzorqi, Ketabchi, Sudheer y Manickam, 2016; Hu, Gerhard, Upadhyaya, Venkitanarayanan y Luo, 2016; Teo y col, 2016). Las emulsiones se pueden clasificar de acuerdo a la naturaleza de las fases que la conforman (Figura 2). Así, un sistema que consiste en gotas de aceite distribuidas en un medio acuoso continuo se denomina emulsión aceite en agua (O/W), como es el caso de la leche, las cremas, algunas bebidas, mayonesas y salsas. Por otra parte, si la emulsión consiste en gotas de agua distribuidas en un medio oleoso continuo recibe el nombre de emulsión agua en aceite (W/O), como son por ejemplo, la margarina o la manteca (McClements, 2015). Además de las emulsiones O/W y W/O tradicionales, existe otro grupo de emulsiones algo más complejas, denominadas emulsiones múltiples, como las emulsiones O/W/O (es decir, aceite-agua-aceite) o bien las W/O/W (agua-aceite-agua). Esta última emulsión, consiste en gotas de agua dispersas en gotas de aceite mayores, que a su vez están dispersas en un medio acuoso continuo (McClements y Li, 2010).

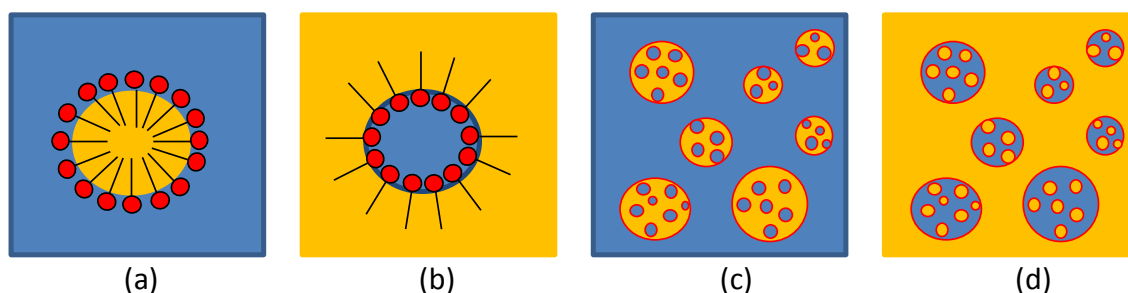


Figura 2. Diferentes tipos de emulsiones: (a) O/W, (b) W/O, (c) W/O/W, (d) O/W/O según la naturaleza de sus fases. Fase oleosa (■), fase acuosa (■), emulsionante (■).

A pesar de ser los coloides más importantes y encontrarse en numerosas aplicaciones, las emulsiones son sistemas generalmente inestables con respecto a la separación de las dos fases fluidas que las forman, y su grado de inestabilidad está íntimamente relacionado con las características interfaciales (Adamson, 1990; Dickinson, 2015). Los requerimientos para que una emulsión sea estable en el tiempo deseado son que no haya cambios en la distribución de tamaños de las gotas o en su estado de agregación (Karlberg, Thuresson y Lindman, 2005). Esto puede obtenerse por un control adecuado de los procesos de desestabilización como el cremado, floculación y coalescencia, que muchas veces se presentan simultáneamente y pueden retardarse mediante un aumento en la barrera de energía que hace que las gotas se acerquen e interactúen (Tadros y Vincent, 1985).

2.2. Proceso de formación de emulsiones

El proceso de convertir dos líquidos inmiscibles en una emulsión se denomina homogeneización (McClements, 2015). De acuerdo al proceso involucrado en la obtención de una emulsión, la homogeneización suele clasificarse en dos categorías: la *homogeneización primaria*, que consiste en la creación de una emulsión a partir de dos fases líquidas separadas; mientras que el proceso de reducir el tamaño de las gotas de una emulsión ya existente o pre-emulsión se denomina *homogeneización secundaria* (Figura 3). La creación de un tipo particular de emulsión puede involucrar una homogeneización primaria, secundaria o una combinación de ambas (McClements, 1999).

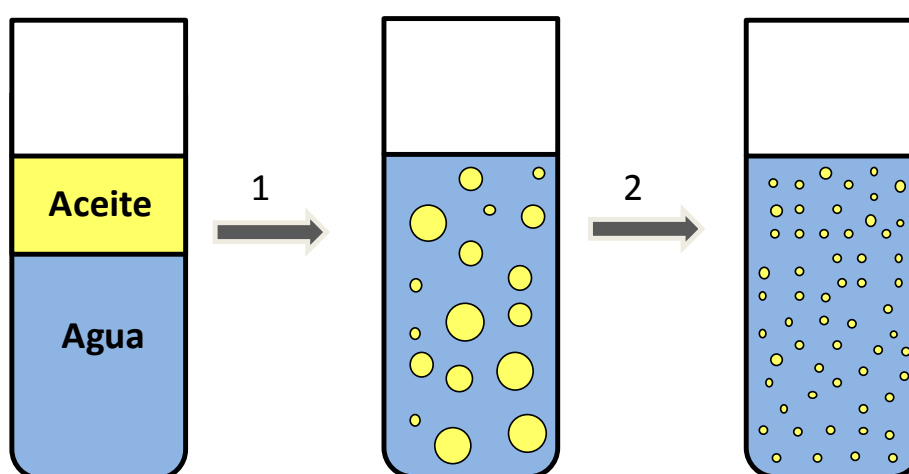


Figura 3. Proceso de homogeneización para una emulsión aceite/agua (O/W): Homogeneización primaria (1), Homogeneización secundaria (2).

2.3. Fuerzas involucradas en el proceso de homogeneización

El proceso de homogeneización, se logra mediante la aplicación de fuerzas de ruptura, que pueden ser clasificadas en *fuerzas viscosas* y *fuerzas inerciales*. Las primeras generan esfuerzos de corte normal y tangencial en la superficie de la gota, mientras que las fuerzas inerciales generan diferencias de presión en el seno de un fluido. En la práctica es útil distinguir tres situaciones que pueden darse durante la homogeneización: *flujo laminar*, *flujo turbulento* y *flujo cavitacional* (Walstra, 1983).

Durante el *flujo laminar* predominan las fuerzas viscosas, las cuales actúan sobre la superficie de las gotas y producen su deformación y ruptura (en gotas más pequeñas). La extensión de la deformación se caracteriza por un parámetro adimensional conocido como número de Weber, W^L_e , el cual se define como el cociente entre el esfuerzo de corte producido por las fuerzas viscosas y las fuerzas interfaciales conservativas que tienden a restablecer la forma esférica de las gotas (Ford, Borwankar, Martin y Holcomb, 1997; McClements, 1999; Seekkuarachchi, Tanaka y Kumazawa, 2006).

El movimiento global del líquido en un *flujo turbulento* se caracteriza por la presencia de remolinos de gran tamaño que tienen asociada una energía cinética, la cual puede transferirse a remolinos de menor tamaño en el seno del líquido sujeto a la agitación mecánica. Si las gotas de aceite tienen un tamaño menor que los remolinos seguirán el movimiento de los mismos sin ruptura. En cambio, si el tamaño de las gotas es mayor que el de los remolinos, los gradientes fluctuantes de velocidad en la superficie de las gotas pueden deformarlas lo suficiente como para producir su ruptura (Ford y col, 1997).

La *cavitación* es un fenómeno que ocurre en fluidos sometidos a cambios bruscos de presión y consiste en la formación y colapso de pequeñas burbujas de vapor en un líquido (Hakansson y col, 2010). Un fluido se contrae cuando la presión crece y se expande cuando la presión decrece, pero cuando la presión en un líquido cae por debajo de una presión crítica (la presión de vapor), se produce una cavidad, la cual crece por expansión y evaporación del fluido. Durante una nueva compresión la cavidad colapsa repentinamente generando una onda de choque que se propaga en el líquido circundante, causando deformación y ruptura de las gotas (Walstra, 1983). La efectividad de la cavitación, también depende de la frecuencia con la cual se produce la fluctuación de la presión, disminuyendo con la disminución de la frecuencia (Gopal, 1968).

2.4. Equipos utilizados para la formación de emulsiones

Existen diferentes tipos de homogeneizadores para la producción de emulsiones alimentarias. La elección de un homogeneizador particular dependerá del volumen de emulsión que se desea preparar, de la naturaleza de los materiales a emulsificar, del tamaño de gota deseado y del costo (McClements, 1999).

Es importante tener en cuenta que la mayor parte de la energía suministrada a un líquido para su emulsificación actúa en un tiempo muy corto y localmente, disipándose como calor, por lo que se vuelve importante el control de la temperatura del sistema durante la homogeneización.

A continuación se describen algunos de los equipos homogeneizadores más utilizados en la obtención de emulsiones alimentarias a escala industrial.

2.4.1. Homogeneizadores de alta y baja velocidad

Los homogeneizadores de baja (~ 3000 r.p.m.) y de alta velocidad (hasta 25000 r.p.m.) son adecuados para producir emulsiones a partir de las fases líquidas separadas (Figura 4a). El mecanismo de ruptura es un efecto combinado de fuerzas viscosas bajo un régimen de flujo laminar y turbulento.

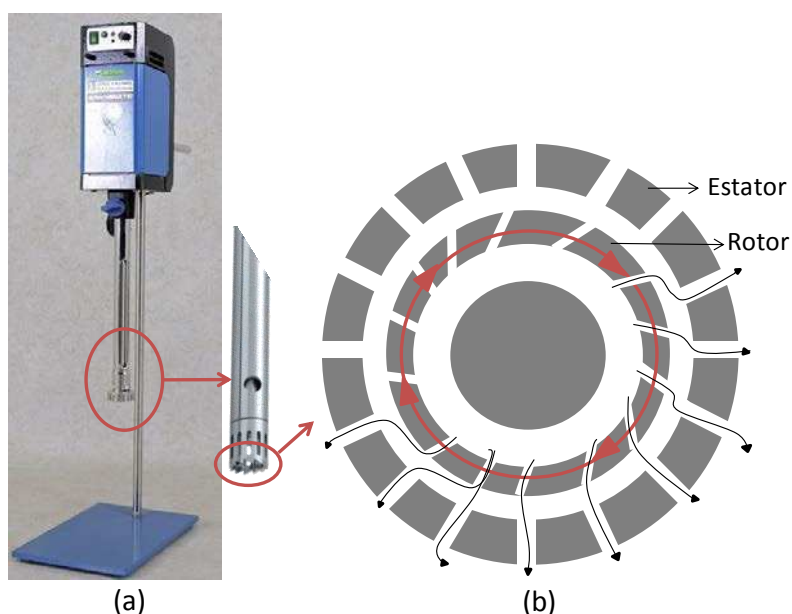


Figura 4. (a) Homogeneizador de alta velocidad. (b) Sistema rotor/estator por el cual circulan los fluidos para su homogeneización.

Al tener baja densidad de energía, estos homogeneizadores producen emulsiones de tamaño de gota relativamente grande. Se presentan con un diseño rotor/estator, donde debido al número elevado de revoluciones de un rotor interno, las fases líquidas a homogeneizar se aspiran axialmente y son forzadas a circular por diminutas ranuras a través del estator (Figura 4b). El movimiento de alta velocidad que se produce a través de las ranuras produce el esfuerzo de corte responsable de la ruptura de las gotas.

2.4.2. Molino coloidal

Son adecuados para la homogeneización de emulsiones de alta viscosidad y tienen un diseño rotor/estator al igual que los homogeneizadores de alta velocidad (Figura 5). La intensidad del esfuerzo de corte en este dispositivo se puede regular por la variación de la distancia entre el rotor y el estator. Aunque se pueden homogeneizar fases separadas son más eficientes para la reducción del tamaño de gota.



Figura 5. Molino coloidal.

2.4.3. Homogeneizadores de válvula de alta presión

Estos equipos son eficaces para reducir el tamaño de gota de una emulsión preexistente (homogeneización secundaria). La pre-emulsión es forzada, mediante una bomba, a pasar a través de una válvula ajustable a presión elevada (entre 10 y 50 MPa). De esta forma las gotas de gran tamaño se rompen por un efecto combinado de flujo turbulento y cavitación (Figura 6).

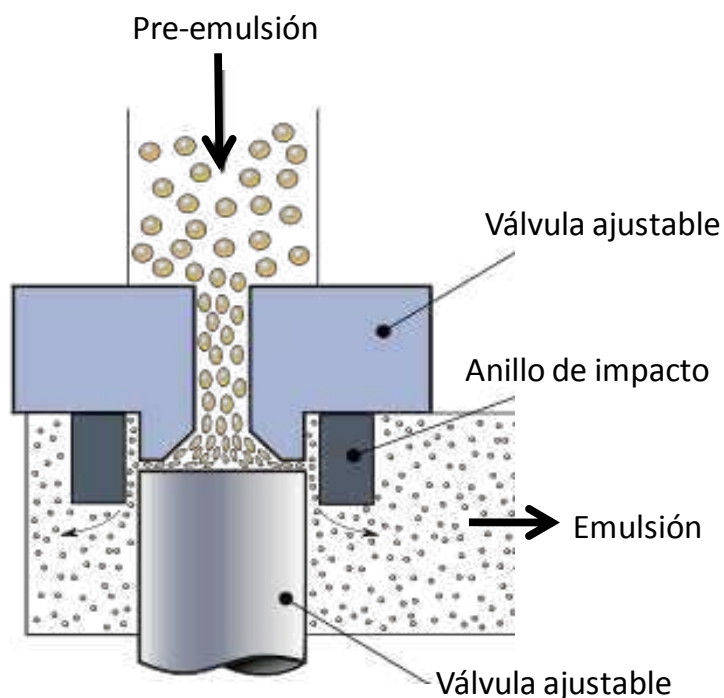


Figura 6. Homogeneizador de alta presión.

2.4.4. Homogeneizadores de membrana

En estos homogeneizadores (Figura 7), la fase dispersa se hace pasar forzosamente a través de una membrana porosa de vidrio o cerámica. El pasaje forzado a través de los pequeños orificios de la membrana produce el esfuerzo de corte necesario, permitiendo la obtención de emulsiones con una distribución de tamaño uniforme. Según la naturaleza de la membrana utilizada (hidrofóbica o hidrofílica) se podrán preparar emulsiones O/W o bien emulsiones W/O.

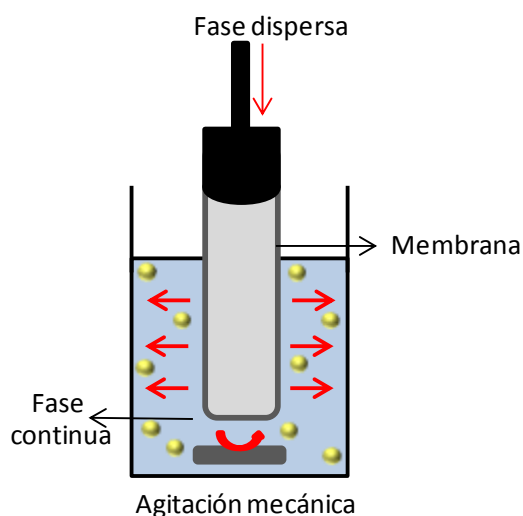


Figura 7. Homogeneizador de membranas.

2.4.5. Homogeneizadores ultrasónicos

En los homogeneizadores ultrasónicos (Figura 8) existe una fuente que convierte el voltaje suministrado (energía eléctrica) en ondas ultrasónicas (hasta 20 kHz) que se transmiten al seno del líquido y producen millones de cavidades microscópicas. El colapso de estas cavidades genera ondas de choque que producen la deformación y ruptura de las gotas. La temperatura dentro de las cavidades es extremadamente alta y la presión es superior a 500 atmósferas. Sin embargo, los tiempos de vida media de las cavidades están en el orden de los microsegundos, con lo cual la energía liberada por cada cavidad es mínima. La alta densidad de energía de este dispositivo de homogeneización se atribuye al efecto acumulativo del gran número de cavidades generadas (McClements, 1999).

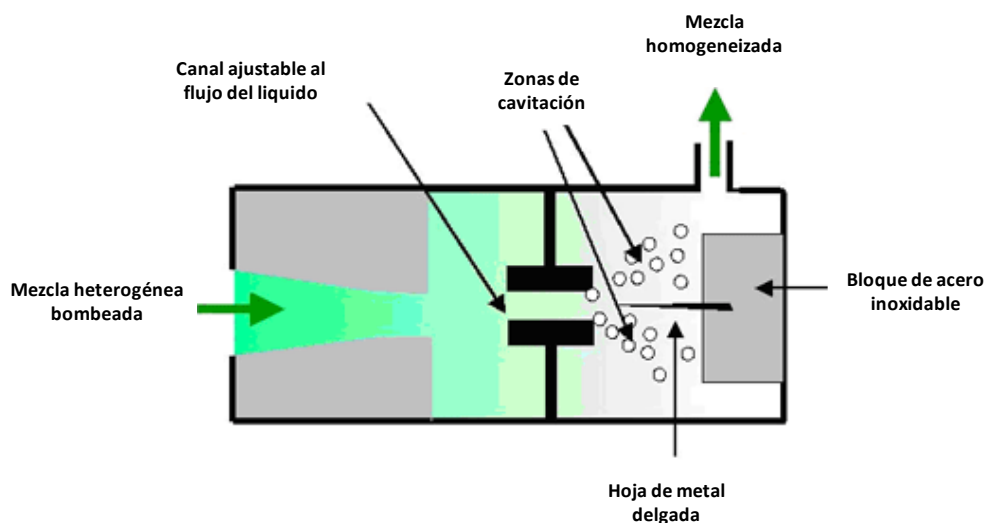


Figura 8. Homogeneizador ultrasónico.

2.5. Factores termodinámicos involucrados en la formación de una emulsión

Las moléculas presentes en el seno de un líquido al estar rodeadas por otras de su misma especie, están sometidas entre sí a fuerzas de atracción casi simétricas, que van a llevar a que la resultante de estas sea nula. En el caso de las moléculas que se encuentran próximas a la interfase, al estar solo parcialmente rodeadas por moléculas de su misma especie, experimentan una atracción neta hacia el líquido, que va a ser más intensa cuanto más próximas estén a la interfase (Figura 9). A la fuerza, tangente a dicha interfase, necesaria para separar a dos moléculas se la denomina tensión interfacial (γ), y es el efecto responsable de la resistencia que un líquido presenta a la penetración superficial (Maron y Prutton, 1975). Esta tiene unidades de trabajo (o energía) dividido por unidad de superficie (las unidades en el Sistema Internacional son $J/m^2 = N/m$).

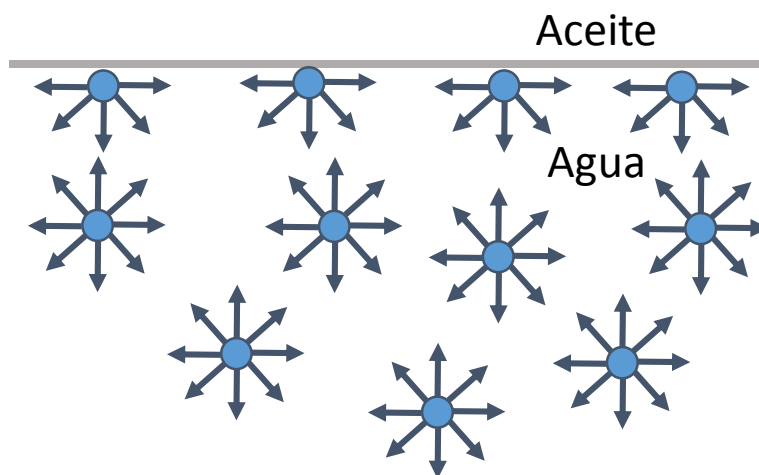


Figura 9. Origen de la tensión interfacial (γ).

El hecho de que las moléculas de aceite sean incapaces de formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua hace que la mezcla de aceite y agua sea muy desfavorable desde el punto de vista energético (McClements, 1999). Es así que las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables tendiendo hacia la separación de las fases con el tiempo.

El origen de la inestabilidad termodinámica se explica estudiando la variación de la energía libre que experimentan estos sistemas antes y después de la homogeneización (Hunter, 1989). La variación de energía libre (Ecuación 1) queda expresada de la siguiente forma:

$$\Delta G_{\text{formación}} = \gamma \cdot \Delta A - T \cdot \Delta S_{\text{configuracional}} \quad [\text{Ecuación 1}]$$

donde ΔG es la energía libre requerida para aumentar el área (A) de contacto entre ambos líquidos inmiscibles (a temperatura y presión constantes), γ es la tensión interfacial y $\Delta S_{\text{configuracional}}$ es la entropía configuracional.

En la mayoría de las emulsiones alimentarias, la entropía configuracional ($\Delta S_{\text{configuracional}}$) es mucho menor que la energía libre interfacial, por lo que el término en el que aparece dicha entropía podría ser despreciado en la Ecuación 1 (Hunter, 1989). De esta forma, la energía libre total asociada con la formación de una emulsión podría expresarse como (Ecuación 2):

$$\Delta G_{\text{formación}} = \gamma \cdot \Delta A \quad [\text{Ecuación 2}]$$

es decir, la energía libre que se debe suministrar al sistema para aumentar el área interfacial (relacionado con el número y tamaño de gotas de la fase oleosa) es proporcional a dicha área, siendo la constante de proporcionalidad la tensión interfacial (Hiemenz y Rajagopalan, 1997). Por lo tanto, de la Ecuación 2, resulta claro deducir que una reducción de la tensión interfacial favorecerá la formación de la emulsión desde el punto de vista energético.

2.6. Estabilidad de las emulsiones

El cambio de energía libre asociado con la formación de una emulsión determina si el proceso es o no termodinámicamente desfavorable, pero no da ninguna indicación sobre la velocidad a la cual las propiedades de la emulsión cambian con el tiempo, ni del (los) mecanismo(s) responsables de estos cambios. Si la velocidad a la cual se produce el cambio es lenta y la emulsión no presenta cambios significativos dentro de la escala de tiempo de interés, se podría decir que el coloide es estable, desde el punto de vista cinético, a pesar de no serlo desde el punto de vista termodinámico. El hecho de que las emulsiones permanezcan en un estado cinéticamente estable (o metaestable) puede atribuirse a la existencia de una energía de activación (ΔG^*), la cual debe superarse para alcanzar la separación total de las fases, que como se indicó antes, sería el estado termodinámico más estable, donde el área interfacial es mínima (Figura 10) (McClements, 2015).

La estabilidad cinética de las emulsiones se atribuye a la naturaleza dinámica de estos sistemas. Las gotas de una emulsión, lejos de permanecer estáticas, están en continuo movimiento y colisionan unas con otras debido al movimiento browniano, la gravedad o fuerzas externas aplicadas. El que las gotas se alejen o se fusionen después de una colisión va a depender de la naturaleza de las interacciones coloidales que se produzcan entre ellas. Por lo tanto, la estabilidad cinética de las emulsiones está determinada por la dinámica y las interacciones de las gotas que contienen (McClements, 2015).

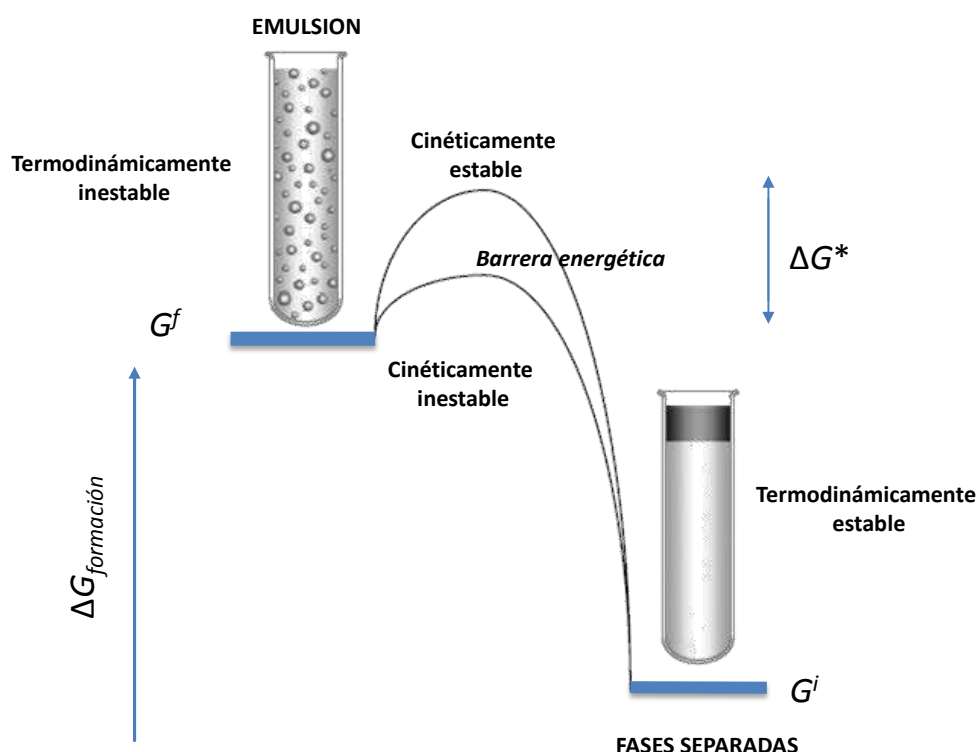


Figura 10. Diferencia entre estabilidad termodinámica y estabilidad cinética. Un sistema puede permanecer en un estado de inestabilidad termodinámica por un determinado tiempo si existe una barrera energética suficiente (ΔG^*).

2.7. Mecanismos de desestabilización de las emulsiones

Desde el momento en que se forma una emulsión comienza el proceso de desestabilización, el cual tiende a disminuir el área interfacial y llegar al estado termodinámico más estable, las fases separadas. Existen distintos mecanismos que contribuyen a la desestabilización, consecuencia de la diferencia de densidad entre las fases continua y dispersa, las interacciones entre las gotas y la estructura y elasticidad del film interfacial (McClements, 1999). A continuación, se describen los principales mecanismos de desestabilización física que tienen lugar en las emulsiones alimentarias.

2.7.1. Cremado y Sedimentación

El cremado y la sedimentación son fenómenos de separación gravitacional. En el cremado se produce el movimiento ascendente de las gotas debido a la menor densidad de la fase dispersa respecto a la de la fase continua, mientras que en la sedimentación el movimiento de las gotas es descendente, también por esa diferencia de densidad. Mientras la sedimentación es característica de emulsiones W/O, el cremado ocurre en emulsiones O/W, debido a que el aceite presenta menor densidad que el agua. Durante el

proceso de cremado se forma una fase inferior o suero, empobrecida en gotas y una fase superior (fase crema), enriquecida en gotas de aceite (Figura 11).

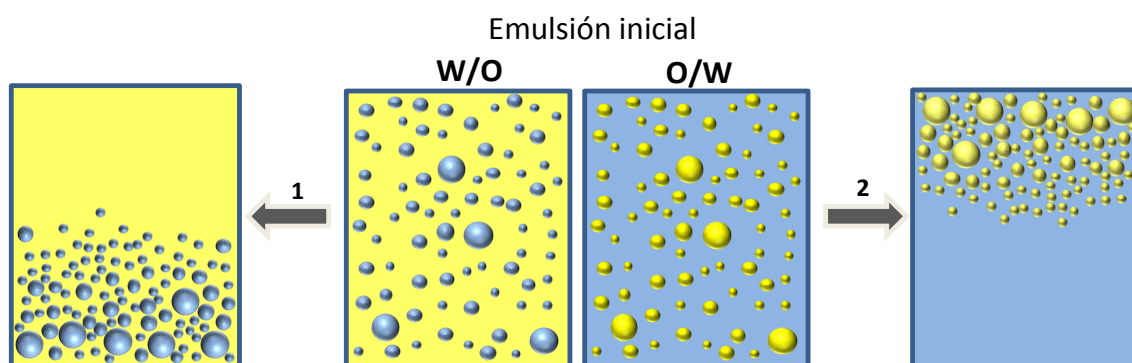


Figura 11. Mecanismos de desestabilización de emulsiones: Sedimentación (1) y Cremado (2).

2.7.2. Floculación y Coalescencia

La floculación y la coalescencia son mecanismos de desestabilización que se producen como consecuencia de un fenómeno de agregación entre las gotas. En el primer caso las gotas mantienen su integridad individual, mientras que, en la coalescencia, el proceso de agregación entre dos gotas culmina con la formación de una gota de mayor tamaño que implica la ruptura de la película interfacial (Figura 12). Si la coalescencia se da en mayor extensión puede conducir eventualmente a la formación de una capa de aceite libre en la parte superior de la emulsión (Friberg, 1997).

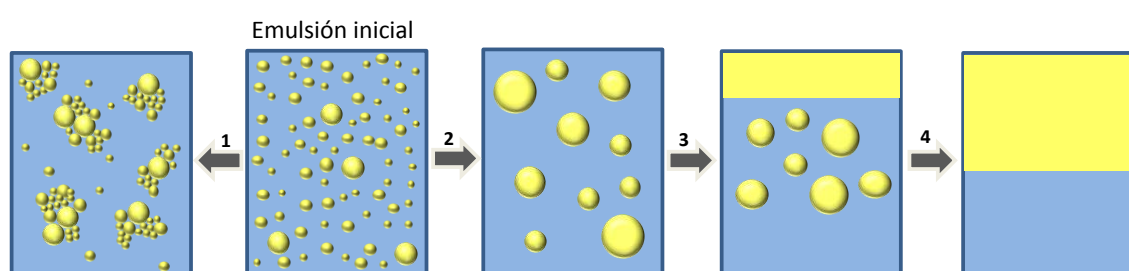


Figura 12. Mecanismos de desestabilización de emulsiones: Floculación (1) y Coalescencia (2). Si el proceso de coalescencia continua en el tiempo, se forma una capa de aceite libre en la parte superior (3), que culmina con la separación total de las fases (4).

2.7.3. Desproporción de Ostwald

La desproporción de Ostwald es causada por el transporte difusivo de la fase dispersa desde las gotas más pequeñas a las más grandes. El efecto que tiene lugar es el crecimiento de las gotas más grandes a expensas de las más pequeñas. Sin embargo, la

insolubilidad del aceite en la fase acuosa impide el transporte difusional, por lo que este mecanismo es más importante en otros sistemas dispersos, como las espumas, donde el gas de las burbujas puede difundir a través de la fase acuosa (Friberg, 1997; McClements, 1999).

2.7.4. Inversión de fase

La inversión de fase es un proceso en el cual se produce un cambio desde una emulsión O/W a una emulsión W/O y viceversa. Este mecanismo de desestabilización es muy importante en la manufactura de algunos productos alimenticios, tales como la margarina y la manteca (McClements, 1999).

Estos mecanismos de desestabilización no ocurren de manera separada o aislada, de manera que una emulsión puede desestabilizarse simultáneamente por distintos mecanismos, dependiendo de la viscosidad de la fase continua, el tipo de agente emulsificante empleado y su concentración, la adición de otros componentes, el pH y la aplicación de distintos tratamientos, como trabajo mecánico, ciclos de temperatura y congelación.

2.8. Agentes interfaciales

Como se ha comentado anteriormente, las emulsiones son termodinámicamente inestables debido a su elevada área interfacial. Para generar una elevada área interfacial en la emulsión se requiere de la incorporación de agentes capaces de reducir la tensión interfacial existente entre la fase acuosa y la fase oleosa. Estos componentes se denominan *agentes interfaciales* o tensioactivos (también emulsionantes, para productos emulsionados) y presentan en su estructura molecular zonas hidrófilas e hidrófobas que los llevan a situarse en la interfase, de manera que los grupos hidrofílicos quedan orientados hacia la fase acuosa, mientras que los grupos hidrófobos quedarán orientados hacia la fase oleosa, contribuyendo de esta forma a reducir la inestabilidad termodinámica (minimizar la energía libre) del sistema (Figura 13) (Dickinson, 1986; Friberg, 1997; McClements, 2015).

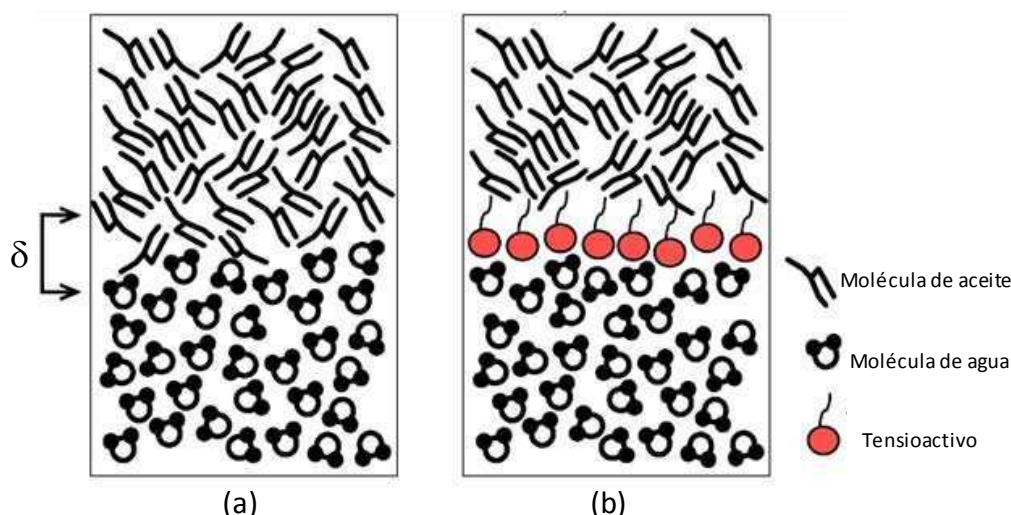


Figura 13. (a) Interfase aceite/agua: δ (espesor de la interfase). (b) Acumulación de tensioactivo en la interfase.

Cuando una molécula de un emulsionante se adsorbe en la interfase, se confina en una región considerablemente más pequeña que el volumen que ocuparía en el seno del líquido, de manera que su movimiento molecular queda restringido, originándose efectos entrópicos desfavorables (Figura 13). Cuando la energía de adsorción es mayor que la energía térmica de las moléculas, estas se adsorben fuertemente en la interfase, presentando una elevada actividad interfacial. Cuando ocurre lo contrario, las moléculas tienden a localizarse principalmente en el seno del líquido, presentando una baja actividad interfacial (Prins y van Kalsbeek, 1998).

Los emulsionantes desarrollan además otras funciones, muchas de ellas relacionadas entre sí, tales como: aumentar la estabilidad térmica, retención de la humedad, estabilidad durante los ciclos de congelación y descongelación, etc. En determinadas formulaciones puede ser necesario el empleo de dos o más emulsionantes para conseguir el efecto deseado, dependiendo de la cantidad añadida (Leadbetter, 1990).

Un emulsionante ideal será aquel que se adsorba rápidamente en la interfase durante el proceso de homogeneización, reduciendo la tensión interfacial, y evite o retarde los fenómenos de desestabilización durante la homogeneización y el almacenamiento posterior (McClements, 2015).

En la industria alimentaria están disponibles numerosos agentes emulsionantes que varían en su estructura y propiedades. Se pueden clasificar en función de diversos criterios: procedencia, peso molecular, carácter hidrófobo o hidrófilo, carga eléctrica, etc.

Según su procedencia se podrían clasificar en dos grandes grupos:

- Emulsionantes de origen natural: fosfolípidos, proteínas, polisacáridos, etc.
- Emulsionantes sintéticos: mono y diglicéridos, derivados de ácidos grasos con otros polioles, productos de condensación de óxidos de etileno sobre los compuestos anteriores, etc.

Sin embargo, con vistas a su aplicación, es más importante su clasificación por la naturaleza de la molécula:

- Emulsionantes de bajo peso molecular (surfactantes): lípidos, fosfolípidos, polisorbatos, entre otros.
- Macromoléculas (biopolímeros): proteínas y algunos polisacáridos.

En las películas interfaciales de los sistemas alimentarios suelen coexistir tensioactivos de bajo peso molecular (lípidos, fosfolípidos, etc.) y biopolímeros (proteínas y polisacáridos), presentando funciones específicas en el procesado y las propiedades del producto final y su empleo óptimo dependerá del conocimiento que se tenga de sus propiedades fisicoquímicas interfaciales (actividad interfacial, cantidad adsorbida, estructura, espesor, estabilidad, movilidad lateral, interacciones entre las moléculas adsorbidas, capacidad de cambiar la conformación, propiedades reológicas interfaciales, etc.).

2.9. Tensioactivos de bajo peso molecular

El término *tensioactivo de bajo peso molecular* se refiere a todas aquellas moléculas relativamente pequeñas con actividad interfacial y estructura química caracterizada por una cabeza polar, que presenta gran afinidad por la fase acuosa, y una cola no polar con afinidad a la fase oleosa (Figura 14a) (Hasenhuettl, 2008; Walstra, 2003). Existe una gran variedad de tensioactivos disponibles para su utilización en la industria alimentaria y las características particulares por las cuales se diferencian la mayoría, se encuentran en la naturaleza de sus partes. Por ejemplo, pueden distinguirse cabezas hidrofílicas catiónicas, aniónicas (ácidos grasos, sales de estearoil lactilato), zwitteriones (lecitinas), no iónicas (monoglicéridos, tweens, spans), etc. Las colas no polares consisten normalmente en una o más cadenas hidrocarbonadas (entre 10 y 20 átomos de carbono por cadena), las cuales pueden ser saturadas, insaturadas, lineales, no lineales, etc (McClements, 2015).

El tipo de película interfacial que forma un emulsionante se ve muy influenciada por su naturaleza y tamaño; es así que, los tensioactivos de bajo peso molecular, se caracterizan exclusivamente por la formación de monocapas, es decir capas interfaciales que tienen el espesor de una molécula (Figura 14b).

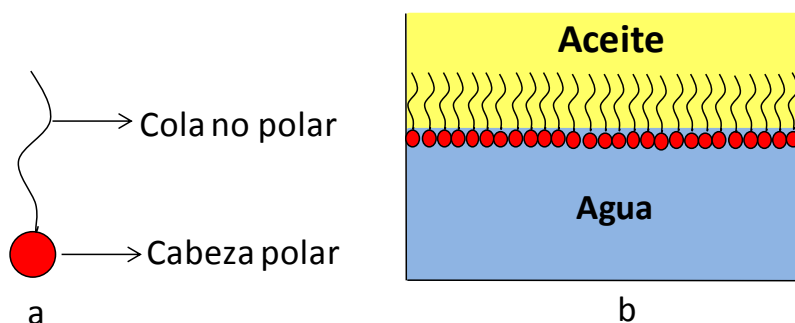


Figura 14. (a) Molécula de tensioactivo de bajo peso molecular. (b) Monocapa de tensioactivo de bajo peso molecular en la interfase O/W.

2.9.1. Cinética de adsorción interfacial de un tensioactivo de bajo peso molecular

La cinética de adsorción interfacial de un tensioactivo de bajo peso molecular, puede estudiarse a partir del cambio de la tensión interfacial con su concentración (Figura 15). Tras la adición de estas moléculas a un sistema que presenta una región interfacial (por ejemplo la interfase O/W), la tensión interfacial disminuye gradualmente a medida que aumenta su concentración. Llegado el momento en que se satura por completo la interfase, debido a la formación de una monocapa, la tensión interfacial del sistema prácticamente no varía y el exceso de tensioactivos, que no encuentra lugar en la interfase, se podrían autensamblar en el seno de la disolución formando *micelas*. Una micela es una asociación de moléculas de tensioactivos en solución que se forma espontáneamente de manera que las cabezas hidrófilas quedan en contacto con el agua y las colas hidrofóbicas quedan recludas en el interior de una entidad esférica (Hiemenz y col, 1997). Las micelas se forman a partir de una concentración de surfactante en la disolución, denominada concentración micelar crítica (*CMC*) cuyo valor se puede determinar de manera inmediata a partir de las curvas de variación de γ con la concentración de surfactante como se observa en la siguiente Figura (Figura 15).

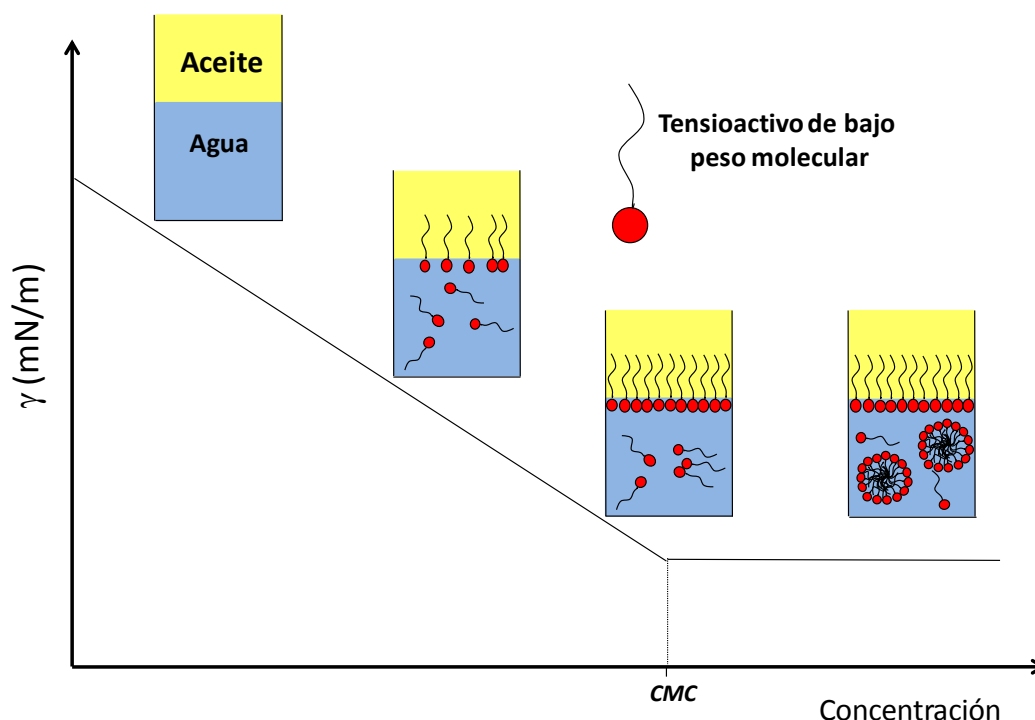


Figura 15. Regiones estructurales en el proceso de adsorción de un tensioactivo: determinación de la concentración micelar crítica.

2.10. Propiedades interfaciales de las proteínas y polisacáridos

Las películas interfaciales de macromoléculas, como las proteínas y polisacáridos, presentan algunas diferencias respecto a las monocapas formadas por sustancias de bajo peso molecular. Cuando una macromolécula alcanza la interfase, sufre un cambio conformacional mediante el cual, expone preferentemente sus grupos hidrofóbicos a la fase no polar mientras que los residuos hidrofílicos se disponen preferentemente en contacto con la fase acuosa (Maldonado-Valderrama, 2006). Este proceso constituye una diferencia básica entre las macromoléculas con actividad interfacial y los tensioactivos de bajo peso molecular. Las diferentes orientaciones que pueden presentar las macromoléculas en la interfase dependerán de la flexibilidad molecular de la cadena y de la afinidad de esta por el medio de disolución (Davies, 1953). Por ejemplo, las proteínas flexibles, como la β -caseína, cambian la conformación más fácilmente que las proteínas globulares, como la β -lactoglobulina, o como las proteínas mayoritarias de los aislados proteicos de proteínas vegetales como soja (Norde, 2011; Wilde y Clark, 1996). Las configuraciones de un polímero flexible en el plano bidimensional de la interfase pueden ser representadas como se muestra en la Figura 16.

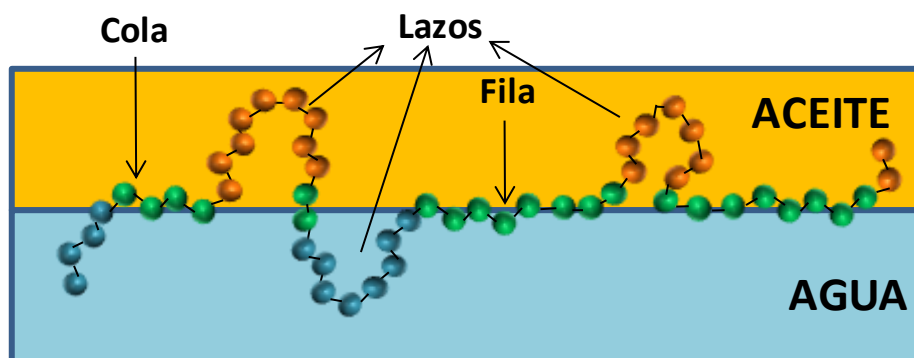


Figura 16. Configuración de un polímero en la interfase O/W.

Las diferentes disposiciones que un polímero puede adoptar en la interfase son:

- **Fila:** se refiere a los segmentos del polímero que están en contacto directo con la interfase.
- **Lazo:** hace referencia a los segmentos del polímero que están suspendidos en el seno de la fase (acuosa u oleosa), entre las filas.
- **Cola:** formada por los segmentos terminales. Si el polímero es de origen proteico, estos segmentos están inmersos en la fase acuosa, debido a que suelen ser grupos aminos y carboxilos terminales, que quedan cargados a pH neutro.

Además, pueden darse reacciones de entrecruzamiento mediante interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o covalentes (puentes disulfuro) entre cadenas de proteínas que están adsorbidas en la interfase (Pugnaroni, Dickinson, Ettelaie, Mackie y Wilde, 2004).

2.10.1. Cinética de adsorción interfacial de un polímero

Los polímeros en disolución acuosa, tienden a adoptar una configuración en la cual los grupos no polares se congregan en el centro de la molécula y los grupos polares se disponen en la superficie de manera que la energía del sistema se minimiza reduciendo la interacción entre grupos no-polares y moléculas de agua. Una vez que se han situado en la interfase los polímeros podrán adoptar una nueva configuración estructural en la cual los grupos polares interaccionan predominantemente con el agua y los no polares con la fase no polar.

El proceso de adsorción puede ser analizado a partir de la variación de la tensión interfacial de la disolución en el tiempo, al igual que lo observado para tensioactivos de bajo peso molecular. En el caso de macromoléculas con actividad interfacial la curva que relaciona la tensión interfacial con la concentración de las macromoléculas distingue tres regiones (Figura 17):

a) Período de inducción: durante los primeros instantes se produce un aumento de la densidad interfacial que no va acompañado de una disminución de la tensión interfacial. El valor de la tensión comienza a disminuir a partir de un valor mínimo que oscila entre un 10-20% del recubrimiento total. El tiempo necesario para alcanzar este recubrimiento se denomina *período de inducción*. Debido al mayor tamaño de las proteínas y polisacáridos con respecto al de los surfactantes de bajo peso molecular, este factor es varios órdenes de magnitud mayor para los primeros que para los últimos.

b) Período de penetración: una vez que se ha alcanzado un cierto recubrimiento interfacial se produce una brusca disminución de la tensión interfacial que se debe, no sólo a la difusión de las moléculas desde la solución a la interfase, sino también a la reorganización estructural que sufren las moléculas adsorbidas (reacomodamiento de grupos polares hacia la fase acuosa y de los no polares hacia la fase oleosa).

c) Período de saturación de la interfase: una vez que la interfase se encuentra saturada de polímeros se alcanza un valor de tensión constante. Sin embargo, experimentalmente se observa que la tensión entra en una fase de disminución muy lenta, debido a diversos fenómenos que tienen lugar en la región interfacial, como el desplegamiento gradual de los biopolímeros, agregación de proteínas, e incluso gelificación interfacial (Beverung, Radke y Blanch, 1999; Freer , Yim , Fuller y Radke, 2004).

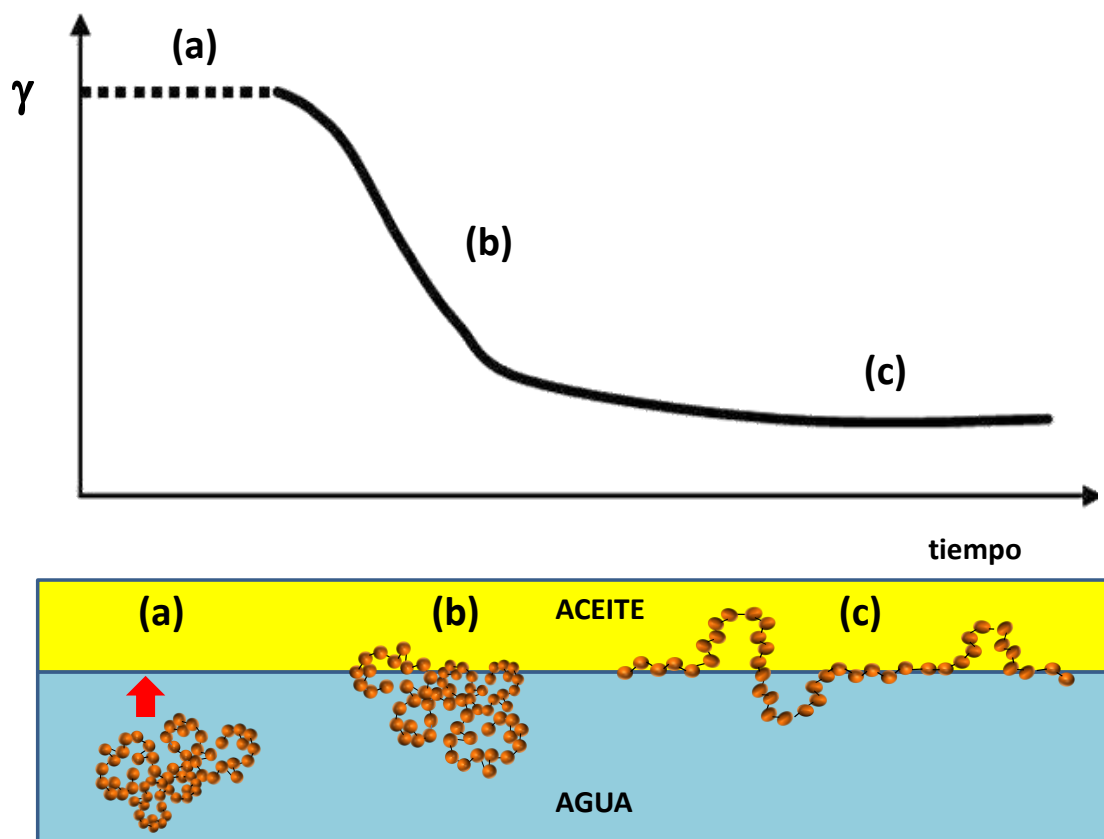


Figura 17. Adsorción de los polímeros en la interfase O/W: período de inducción (a), período de penetración (b), período de saturación y reordenamiento (c).

2.11. Propiedades reológicas de las películas interfaciales

Las propiedades reológicas describen el comportamiento dinámico de las interfases fluido-fluido. Así, dichas propiedades son, en parte, responsables de la estabilidad y la textura de las emulsiones y espumas alimentarias, y son consecuencia de las interacciones existentes entre las moléculas que hay en la interfase y entre las moléculas de la interfase y las de la subfase (Murray, 2002). La reología interfacial estudia las propiedades mecánicas y de flujo de las películas situadas en una interfase fluida.

Las propiedades reológicas que se pueden determinar de una película son, dependiendo de la deformación a que se ha sometido, de corte o dilatacionales. Las primeras se obtienen al someter la película a esfuerzos que originan distorsiones de su forma, manteniendo su tamaño, en cambio, las propiedades dilatacionales manifiestan la respuesta de la interfase a compresiones y expansiones que modifican su tamaño, pero no su forma (Figura 18).

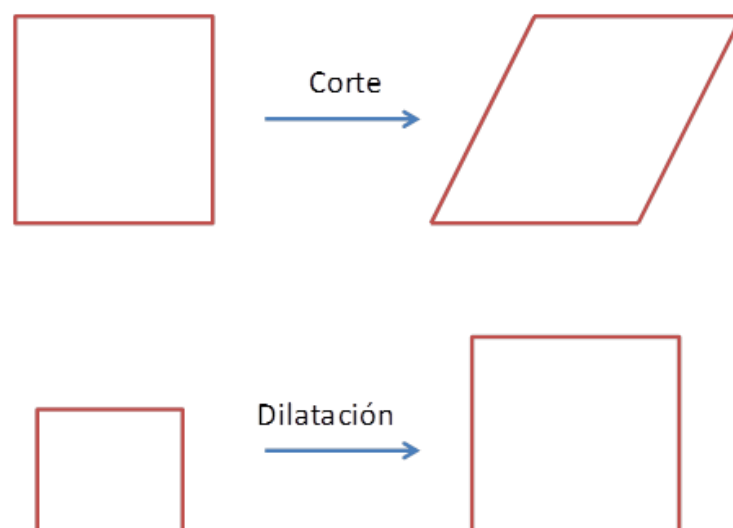


Figura 18. Ejemplo de deformaciones en la interfase en dos dimensiones.

- **Viscosidad superficial de corte**

Es la fuerza requerida para desplazar y mover las moléculas de un punto a otro y refleja la atracción neta entre los polímeros de la película interfacial y entre esta última y las capas de líquido adyacentes. Esta viscosidad superficial o resistencia a los esfuerzos de corte de la superficie de la película suele ser muy alta, refleja la resistencia mecánica de la misma y es un parámetro importante relacionado con la estabilidad de películas y emulsiones. La viscosidad superficial se incrementa con el espesor de la película y varía con el tipo de emulsionante, el tiempo y el pH (Phillips, Whitehead y Kinsella, 1994).

- **Elasticidad y viscosidad dilatacional**

Ambas propiedades pueden ser combinadas en un único parámetro, el módulo viscoelástico interfacial de la película (E), que vincula la variación de la tensión interfacial con los cambios del área interfacial ($E = -d\gamma/d(\ln A)$), tras la aplicación de un esfuerzo (Figura 19) (Kim y Kinsella, 1985). Durante la expansión de la película interfacial tras la aplicación de un esfuerzo ocurren diversos fenómenos: i) difusión del surfactante desde la subcapa en la solución hacia la interfase y ii) reordenamientos de las moléculas adsorbidas dentro de la interfase (los cuales pueden ser retardados por varios eventos: presencia de una barrera de adsorción, lentos reordenamientos moleculares, formación de complejos, transiciones de fase en la interfase y formación o destrucción de una estructura tridimensional (Lucassen-Reynders, 1993)).

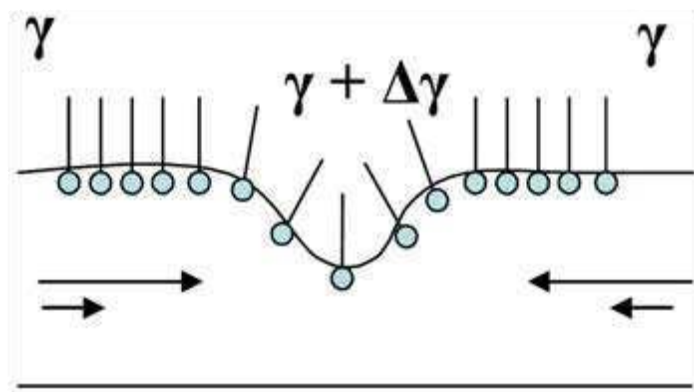


Figura 19. Respuesta de una película interfacial a la aplicación de un esfuerzo.

Las interacciones que se producen entre los polímeros adsorbidos en la interfase están altamente influenciadas por la carga del polímero. Una proteína forma una película más condensada y firme a pH cercano al punto isoeléctrico, donde la carga superficial es baja y las interacciones entre los polímeros en la interfase son fuertes. Las películas compuestas por mezclas de biopolímeros solubles con diferente carga neta y distintas relaciones entre residuos hidrofílicos/hidrofóbicos son usualmente más estables. La formación de uniones disulfuros durante la formación de la película también aumenta la estabilidad. La fuerza de las películas proteicas tiende a incrementarse con el tiempo, reflejando reordenamientos y el incremento de las interacciones entre las moléculas componentes de la película (Kinsella y Phillips, 1989).

3. Proceso de digestión

Para desarrollar un modelo de digestión *in vitro* que logre imitar los eventos fisicoquímicos y fisiológicos que tienen lugar cuando un alimento recorre el aparato digestivo, es necesario un entendimiento preciso sobre el proceso que tiene lugar en un organismo vivo. Según el Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales, la digestión puede definirse como el proceso mediante el cual el cuerpo descompone los alimentos y bebidas en sus partes más pequeñas (nutrientes) para que puedan ser absorbidos y utilizados como fuente de energía para formar y alimentar las células, permitiendo al individuo crecer y seguir viviendo.

Los alimentos experimentan, después de la ingestión, una serie de cambios complejos a medida que atraviesan el aparato digestivo desde la boca, pasando por el esófago, el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso (Figura 20) (McClements y col, 2010).

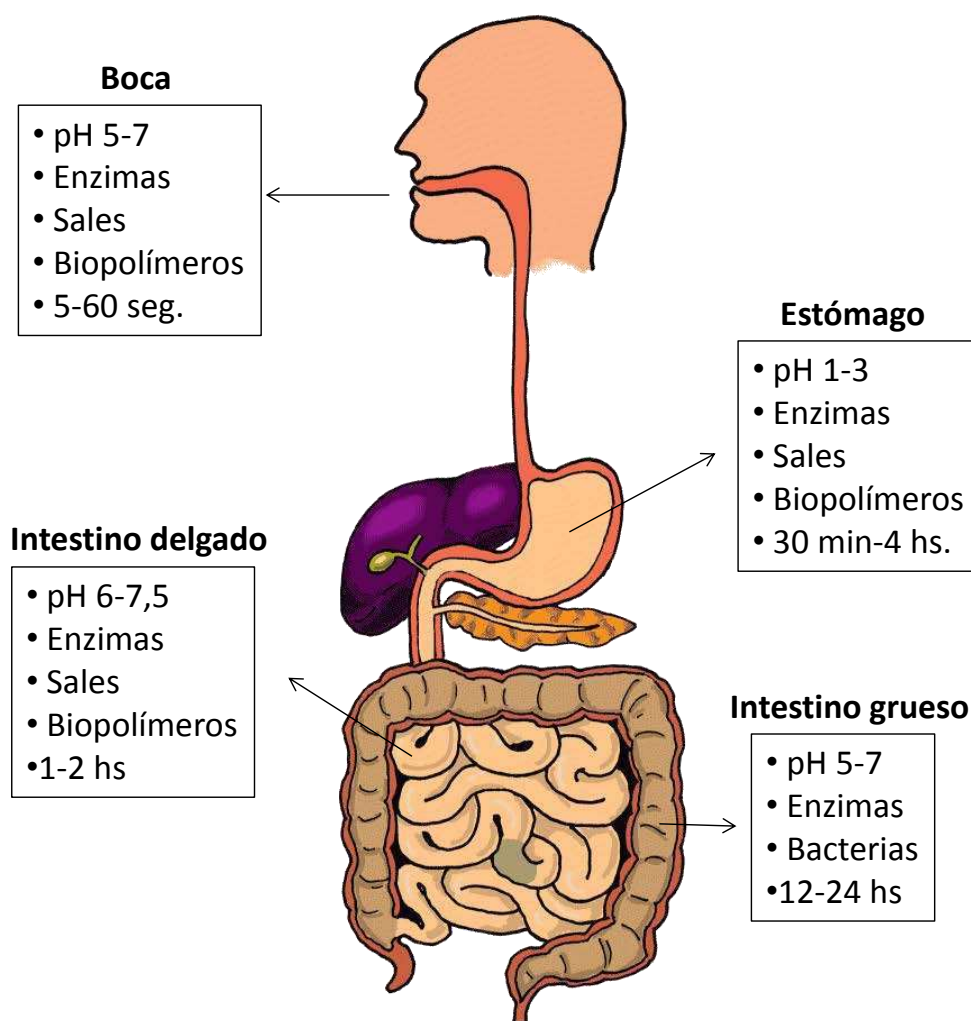


Figura 20. Esquema del aparato digestivo y resumen de las principales condiciones fisiológicas de los órganos que lo componen.

3.1. Aspectos generales de la digestión de lípidos

La digestión de los lípidos es un proceso complejo que tiene lugar en la boca y el tracto gastrointestinal del ser humano. El proceso de hidrólisis de los triglicéridos (TG) requiere de la participación de varias enzimas lipolíticas, denominadas lipasas, y de cofactores, hormonas y sales biliares, que son necesarios para la actividad específica de cada una de ellas (Carey, Small y Bliss, 1983). Las lipasas, cuya denominación bioquímica es acil-ester-hidrolasas, son enzimas relativamente específicas en su actividad catalítica y algunas de ellas se distinguen por su alta estereoespecificidad. Para comprender mejor este concepto, es necesario considerar que los triglicéridos son moléculas estructuralmente asimétricas, de modo que cada unión del glicerol con un ácido graso particular es diferente de otra, dependiendo de la posición de la unión del ácido graso con el respectivo grupo hidroxilo del glicerol. De esta forma, cada unión se designa como sn-1, sn-2 y sn-3 (sn = enumeración estereoespecífica) (Figura 21.). De esta forma, la estereoespecificidad de las lipasas se referirá a la capacidad de estas enzimas para distinguir e hidrolizar en forma específica una o algunas de las uniones éster del ácido graso con el glicerol en las posiciones sn-1, sn-2 o sn-3 (Bracco, 1994).

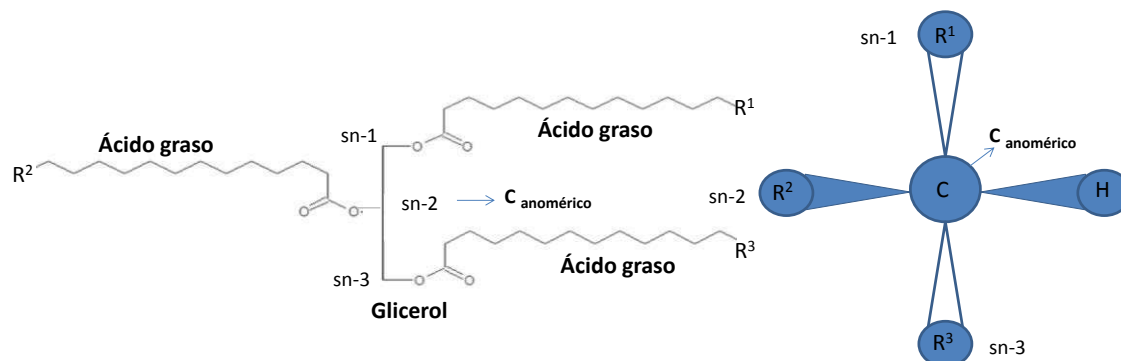


Figura 21. Estructura de un triglicérido.

En los humanos adultos, la digestión de los lípidos se inicia en el estómago por la presencia de la lipasa gástrica. No obstante, es en el intestino delgado donde se realiza la mayor parte de la digestión de los lípidos, a partir de la actividad de la lipasa pancreática (Mun, Decker y McClements, 2007). Esta enzima, hidroliza a los TG en la interfase formada entre el medio acuoso y los lípidos dispersos en el mismo, llevando a cabo su actividad en las posiciones sn-1 y sn-3, liberando en primer lugar un ácido graso (AG) y un 1,2-diglicerido (1,2-DG) por cada TG hidrolizado (Mu y Høy, 2004). El 1,2-DG será igualmente reconocido por la lipasa, siendo hidrolizado a AG y 2-monoglicerido (2-MG),

siendo estos los productos finales y mayoritarios de la digestión de los TG (Figura 22) (Tuohy y col, 2006). Adicionalmente, el ácido graso esterificado del 2-MG puede sufrir un proceso parcial de acilmigración hacia la posición sn-1 del glicerol, dando lugar a la aparición de cierto nivel de 1-monoglicerido (1-MG), el cuál puede ser hidrolizado para liberar AG y glicerol (Bermúdez, Pacheco, López, Abia y Muriana, 2004).

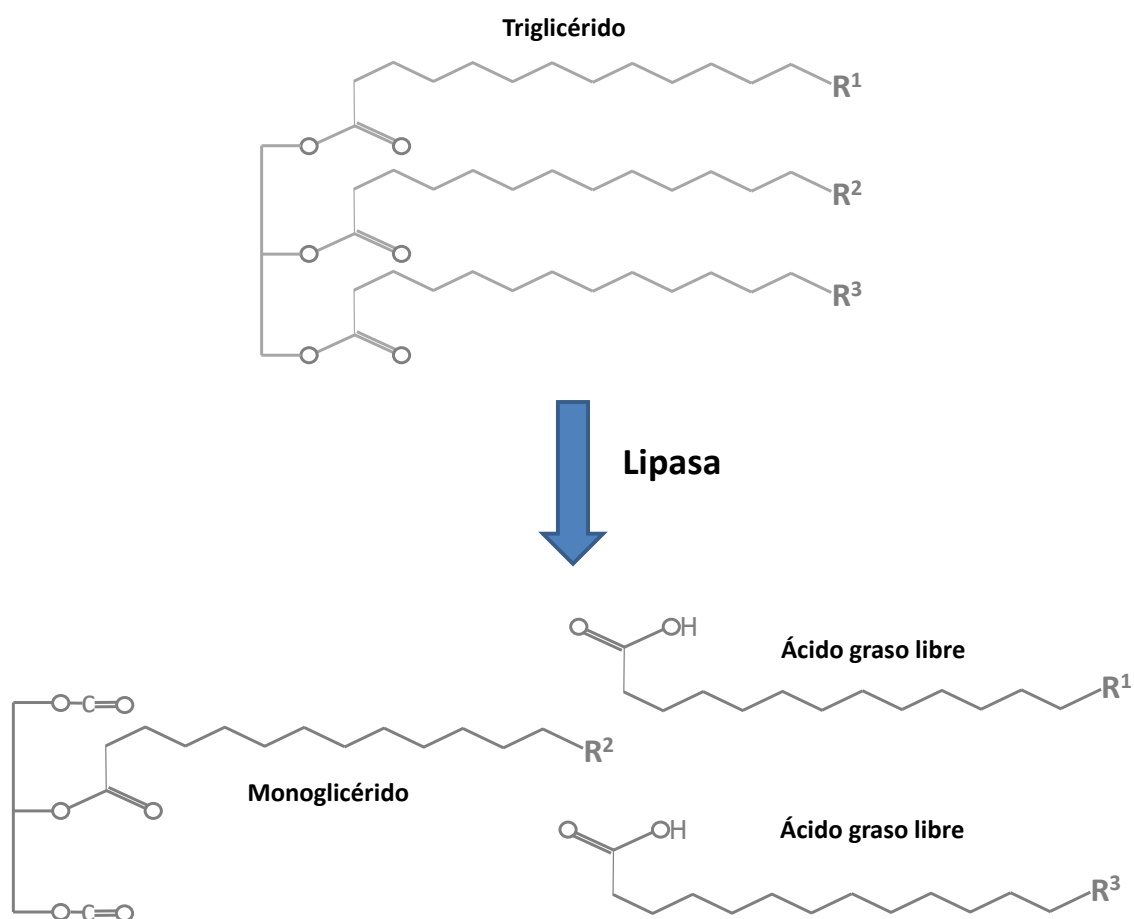


Figura 22. Esquema general de la hidrólisis de un triglicérido.

3.2. Etapas del proceso de digestión

En esta sección se describirán los principales eventos que tienen lugar en cada una de las etapas del proceso de digestión. Se hará hincapié en la digestión de los lípidos y emulsiones O/W, ya que es el tema objeto del presente trabajo.

En términos generales, las emulsiones experimentan una serie de cambios a lo largo del aparato digestivo que alteran su susceptibilidad al proceso digestivo y, en consecuencia, la disponibilidad de los productos de la digestión para su absorción. La susceptibilidad de las emulsiones a tales cambios dependerá de diversos factores, entre los que se

encuentran la naturaleza de la fase oleosa, del emulsionante utilizado, del proceso de digestión *in vitro*, etc. La siguiente figura (Figura 23) resume, a modo esquemático, los principales cambios que pueden darse en una emulsión durante su recorrido por el sistema digestivo. Entre estos cambios podemos encontrarnos: cambios en el tamaño de las gotas de aceite (ruptura, floculación o coalescencia) o bien cambios a nivel interfacial (adsorción de tensioactivos biológicos y enzimas) (McClements y col, 2009; McClements y col, 2010).

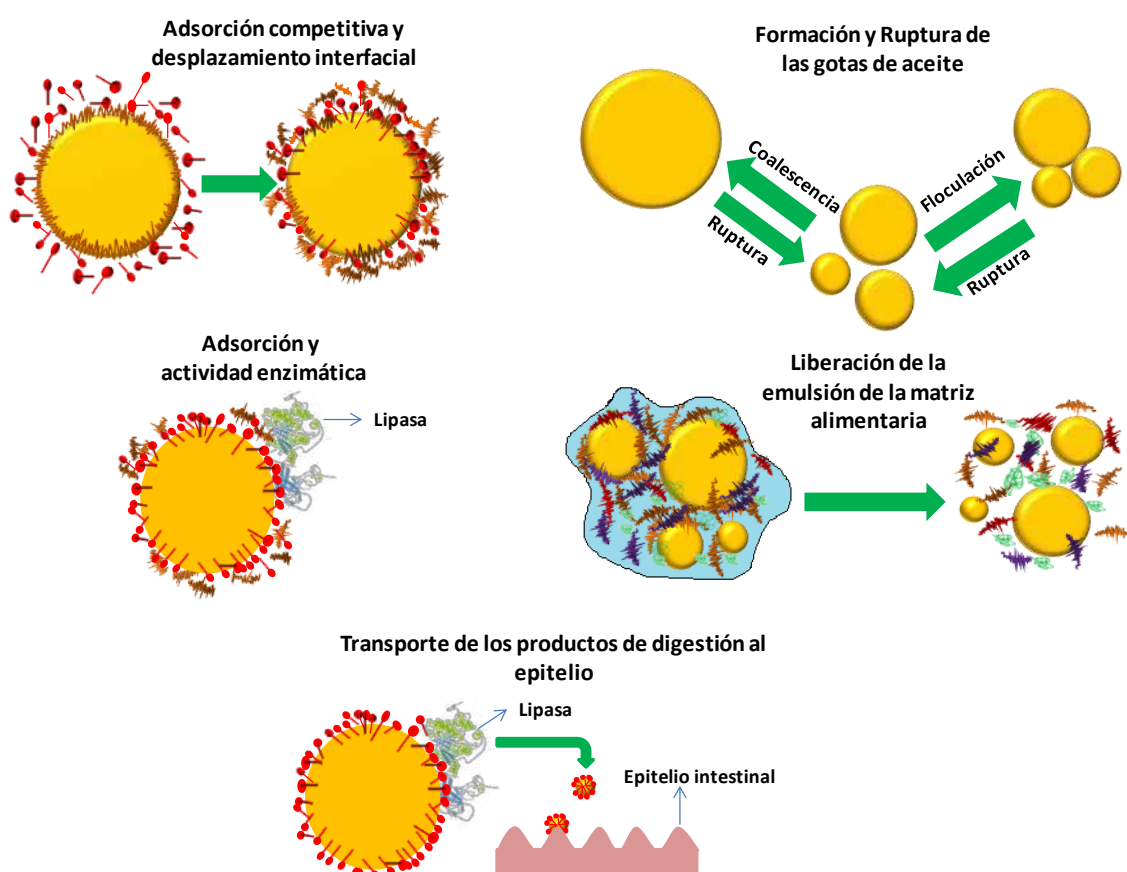


Figura 23. Esquema de los cambios fisicoquímicos y biológicos que puede experimentar una emulsión durante su recorrido por el sistema digestivo.

3.2.1. Inicio de la digestión: La boca

La boca es el órgano donde tiene lugar la ingestión de los alimentos, y es donde se lleva a cabo la formación del bolo alimenticio, donde el alimento ingerido es humedecido con la saliva mientras es amasado y fragmentado por medio de la acción llevada a cabo por la lengua y los dientes (masticación), respectivamente. Son numerosos los procesos que podrían tener lugar en este órgano y originar cambios en la estructura y propiedades de

los lípidos emulsionados, entre ellos, interacción con componentes de la saliva (ej. mucina), interacción con enzimas (ej. amilasa salival) o bien cambios estructurales originados por los cambios de pH, temperatura y fuerza iónica (Figura 23)(Sarkar, Goh y Singh, 2009; Vingerhoeds, Blijdenstein, Zoet y van Aken, 2005).

La saliva, secretada por las glándulas salivales, está constituida en su mayoría por agua (99%), que permite la humectación del alimento para la formación del bolo. Además, contiene una mezcla de minerales y proteínas, entre ellas enzimas digestivas tales como la amilasa salival, que contribuye con la degradación química de polisacáridos como el almidón. Además, contiene mucina, que es una glicoproteína que ayuda a ablandar los alimentos para favorecer la formación del bolo, y lisozima, que tiene un efecto desinfectante sobre posibles bacterias infecciosas y actúa también como lubricante, contribuyendo a la integridad del bolo formado (Amado, Vitorino, Domingues, Lobo y Duarte, 2005). Se ha reportado que el pH de la saliva se encuentra comprendido entre los valores 5,5 y 6, aunque tiende a incrementarse (hasta valores de 8) por la presencia del alimento en la cavidad oral. En lo que respecta a la integridad de las emulsiones, varios serían los procesos que podrían estar involucrados en cambios fisicoquímicos de la emulsión. Por ejemplo, Silletti, Vingerhoeds, Norde y van Aken (2007), han demostrado que la presencia de mucina en la saliva induce a la desestabilización de emulsiones lipídicas por floculación. Sin embargo, los posibles cambios que puede experimentar una emulsión en la boca están directamente relacionados con la composición y el estado físico que tiene el alimento antes de ingresar al sistema digestivo. En este punto, es importante considerar la naturaleza de los emulsionantes que rodean las gotas de lípidos y la sensibilidad de los mismos a la presencia de enzimas y/o polímeros presentes en la saliva y los efectos asociados a los cambios de pH o fuerza iónica. Ha sido descrita la presencia de una lipasa (lipasa lingual) secretada por las glándulas linguales ubicadas en la parte dorsal posterior de la lengua, responsable solo de una limitada participación en la digestión total de lípidos que tiene lugar en todo el aparato digestivo (Hamosh y Burns, 1977). Se trata de una acil-ester-hidrolasa de alta especificidad, ya que reconoce casi específicamente la posición sn-3 de los triglicéridos, siendo mucho menos efectiva para actuar en la posición sn-1 y no actúa sobre la posición sn-2. La actividad de la lipasa lingual se considera de gran importancia en los recién nacidos, ya que tiene un rol muy importante en la desestructuración del glóbulo graso lácteo (Hamosh, 1978).

Sin embargo, dada la complejidad de factores que pudieran ocasionar cambios en la integridad de las emulsiones, en numerosos trabajos que utilizan procesos de digestión *in vitro*, suelen desestimarse los efectos de la cavidad oral, justificando esto, en muchos casos, por el bajo tiempo de residencia de los alimentos en la boca, hecho que podría considerarse válido cuando se trata de alimentos líquidos, haciendo más simple de esta manera, la simulación del proceso digestivo.

3.2.2. Estómago

Una vez que el bolo alimenticio abandona la boca, es transportado por el esófago hacia el estómago. Este último puede ser considerado como una estructura con forma de saco situado en la parte superior del abdomen, donde el bolo es procesado y almacenado previo a pasar al intestino delgado por medio del píloro (Barrett, 2006). Durante la digestión gástrica se continúa con el proceso de degradación del bolo alimenticio por la acción de los jugos gástricos que contienen una mezcla compleja de enzimas, sales y sustancias con actividad interfacial, entre otros componentes biológicos. Por medio de los movimientos peristálticos, el bolo alimenticio es sometido a una agitación mecánica y obligado a tomar un contacto íntimo con los componentes gástricos, además de tener un efecto propulsor que va moviendo el contenido gástrico hacia el píloro (Figura 24) (Schulze, 2006). El tiempo de residencia del bolo en el estómago puede variar entre unos pocos minutos a unas cuantas horas, aunque, al igual que en todos los procesos que tienen lugar en los diferentes órganos que conforman el sistema digestivo, dependerá de factores externos (estado de salud del individuo, edad, características y composición del alimento, etc.). De acuerdo a las dimensiones del canal pilórico, que conecta el estómago con el intestino delgado, el tamaño mínimo que deben alcanzar las partículas para llegar el intestino delgado es de 1 o 2 mm, lo que determinará el período de residencia del alimento en la cavidad estomacal (Barrett, 2006). Según varios reportes bibliográficos, el pH del estómago humano se encuentra entre 1 y 3, aunque puede verse modificado por la presencia del bolo alimenticio (pH del alimento ingerido, su capacidad buffer, composición, etc). La elevada acidez del medio estomacal juega un rol importante entre las que se encuentran la activación de enzimas, la hidrólisis de algunos componentes y la inactivación de microorganismos presentes en el bolo (Kalantzi y col, 2006). La hidrólisis de las proteínas llevada a cabo por la pepsina se encuentra entre los eventos

fisicoquímicos característicos del estómago. La pepsina es producida por las células principales de la mucosa gástrica como una proenzima, el pepsinógeno, el cual adquiere su capacidad enzimática en condiciones ácidas. Actúa principalmente sobre los enlaces peptídicos de naturaleza hidrófoba, preferentemente aromáticos, dejando como producto principal de la catálisis a péptidos de tamaño variable y algunos aminoácidos. Sin embargo, son capaces de reducir a péptidos y aminoácidos alrededor del 15% de las proteínas ingeridas. El duodeno y el intestino delgado poseen una capacidad tan alta de digerir proteínas que la ausencia total de pepsina no altera la digestión y absorción de su contenido en la dieta.

Los efectos de la pepsina resultan de especial interés cuando el emulsionante utilizado para estabilizar las gotas de lípidos en una emulsión es de origen proteico. Se ha reportado en varios trabajos que la conformación de la proteína es un factor clave para determinar su susceptibilidad a la acción de pepsina. Por ejemplo, Sarkar, Goh, Singh y Singh (2009) han concluido que algunas proteínas, como por ejemplo la β -lg, presenta una gran resistencia a la pepsinólisis cuando se encuentra en estado nativo y, sin embargo, es fácilmente hidrolizada cuando se encuentra adsorbida en la interfase, dada la mayor exposición de sus grupos al sitio activo de la enzima, como consecuencia de su desplegamiento en la interfase.

En humanos adultos, puede considerarse al estómago como el órgano donde se inicia el proceso de la lipólisis a partir de la lipasa gástrica. Esta es una proteína globular, secretada por las células principales de la mucosa gástrica, con un peso molecular de 50 kDa y con un punto isoeléctrico entre 6,6 y 7,9, por lo que se encuentra positivamente cargada en las condiciones de pH estomacal (Kalantzi y col, 2006; Miled y col, 2005). Sin embargo, la contribución de la etapa gástrica a la digestión lipídica se considera minoritaria, habiéndose observado que se pueden alcanzar niveles de hidrólisis en torno al 10-30 % de los componentes lipídicos (Liao, Hamosh y Hamosh, 1983).

Respecto a la fuerza iónica, si bien algunos reportes sugieren una concentración de iones cercana a 100 mM, la misma se ve muy alterada debido al aporte adicional de iones provenientes del alimento (Kalantzi y col, 2006).

Finalmente, el alimento parcialmente digerido que abandona el estómago para pasar al intestino delgado se denomina *quimo* (Bauer, Jakob y Mosenthin, 2005).

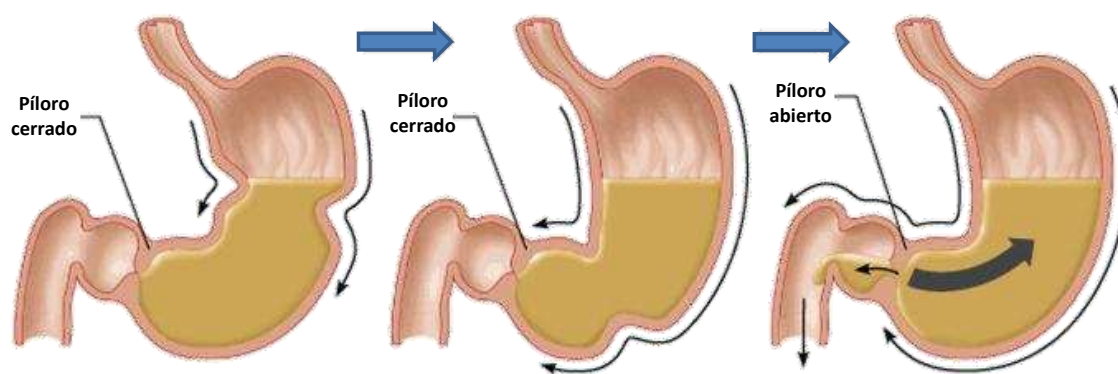


Figura 24. Representación de los movimientos peristálticos que empujan el quimo hacia el píloro.

3.2.3. Intestino delgado

El intestino delgado se corresponde con la porción del aparato digestivo donde tiene lugar en mayor extensión el proceso de lipólisis y donde se produce la absorción de los productos de la digestión que servirán de fuente energética para el crecimiento de las células. Según la bibliografía, la digestión de los lípidos se completa en el duodeno (primera porción del intestino delgado), representando casi un 80% de la lipólisis total que se da en el organismo (Maldonado-Valderrama y col, 2008; Mun y col, 2007).

Una vez que el alimento parcialmente digerido ingresa en el intestino se mezcla con enzimas, sales biliares, fosfolípidos y bicarbonato de sodio (NaHCO_3) provenientes del páncreas, el hígado y la vesícula biliar, respectivamente (Figura 25) (Tso, 2000). La secreción de NaHCO_3 en el intestino es la responsable de que se produzca un incremento en el pH a valores cercanos a la neutralidad (5,8-6,5), donde las enzimas intestinales presentan una actividad óptima (Bauer y col, 2005). Además, con los jugos pancreáticos se libera una gran cantidad de iones que elevan la fuerza iónica del medio de digestión. Se ha reportado que la fuerza iónica en el intestino ronda los 140 mM, aunque la misma suele verse alterada por la presencia del quimo, que generalmente eleva este valor promedio debido al aporte adicional de iones (Lindahl, Ungell, Knutson y Lennernäs, 1997).

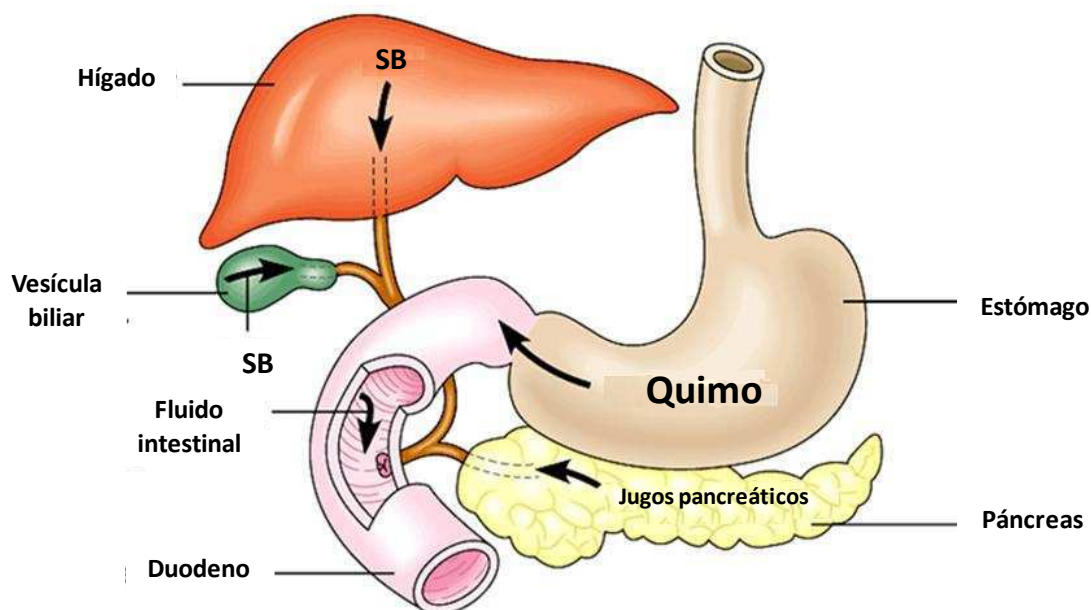


Figura 25. Principales órganos involucrados en el proceso de digestión.

El jugo pancreático secretado al intestino delgado aporta los zimógenos de las proteasas: tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas y eleastasa, que continúan con la digestión de las proteínas, iniciada en el estómago por la pepsina. Por medio de la enteropeptidasa producida por las células del duodeno, el tripsinógeno (una pro-enzima) se convierte en su forma activa, tripsina, que da lugar a una subsecuente activación en cascada de las enzimas digestivas pancreáticas (Sastre, Sabater y Aparisi, 2005). La tripsina es una enzima específica, ya que liga al péptido en las posiciones del carboxilo de residuos arginina o lisina en la cadena, ambos aminoácidos con grupos laterales cargados positivamente. Al presentar un efecto autocatalítico, la tripsina puede generar más moléculas de tripsina a partir de tripsinógeno, que a su vez, por hidrólisis del quimotripsinógeno (zimógeno de quimotripsina) da origen a moléculas de quimotripsina. La quimotripsina reconoce y corta específicamente triptófano, tirosina, fenilalanina, metionina y leucina en el extremo carbonilo de la unión peptídica (Moughan, 2016). Por su parte la eleastasa (también activada por tripsina a partir de una proeleastasa) reconoce alanina, glicina y serina en el extremo carbonilo de la unión peptídica. Las carboxipeptidasas son exopeptidasas (secretadas como pro-carboxipeptidasas y activadas por tripsina), que hidrolizan un enlace peptídico situado en el extremo carboxiterminal de una proteína o polipéptido, liberando de esta forma el aminoácido situado al final de la cadena (Koeppen y Stanton, 2009).

Como resultado de la proteólisis conjunta (entre el estómago y el intestino), las proteínas se convierten en péptidos cortos de diversos tamaños y en aminoácidos libres. Los péptidos se degradan luego para dar aminoácidos libres por acción de las peptidasas de la mucosa intestinal (amino-peptidasas), que separan los restos amino-terminales de los péptidos.

Las sales biliares y los fosfolípidos producidos en el hígado, que llegan al intestino vía vesícula biliar, se adsorben, al presentar actividad interfacial, en la superficie de las gotas de lípidos para facilitar su digestión (Tso, 2000). Las sustancias con actividad interfacial, ya sean endógenas (secretadas por el cuerpo) o exógenas (ingeridas), compiten por su adsorción en la interfase, desplazando, en forma total o parcial, al emulsionante original adsorbido en la gota de lípido, por lo que se produce una alteración de la composición interfacial y sus propiedades (Bauer y col, 2005; Favé, Coste y Armand, 2004). La digestión de los lípidos se completa por medio de las lipasas que llegan al intestino desde el páncreas (lipasas pancreáticas), para dar lugar a la liberación de AG y MG a partir de moléculas de TG (Figura 22). Los productos generados en la digestión, son transportados luego en micelas de SB y fosfolípidos para su posterior absorción por las células del epitelio (McClements y col, 2010). Para catalizar la reacción de lipólisis, la lipasa debe adsorberse en la interfase O/W para establecer contacto con el sustrato. Para lograr su óptima actividad, la lipasa debe unirse a la co-lipasa, un cofactor enzimático secretado por los jugos pancreáticos que, por medio de la formación de un complejo, permite la llegada de la lipasa a la interfase. Al igual que todas las enzimas duodenales, la colipasa es secretada como una pro-colipasa que luego es hidrolizada por la tripsina para dar lugar a la forma activa, un polipéptido de peso molecular aproximado de unos 10 kDa, que presenta en su estructura regiones hidrofóbicas que facilitan su interacción con la interfase O/W y regiones hidrofílicas para su interacción con la lipasa pancreática.

3.2.4. Intestino grueso

Finalmente, el material que no es absorbido en el intestino delgado pasa al intestino grueso. Este órgano consiste en un tubo muscular de aproximadamente un metro y medio de largo formado por el ciego, el colon, el recto y el canal anal. Las principales funciones fisiológicas del colon son la absorción de agua y electrolitos liberados por las bacterias que lo habitan, la fermentación de polisacáridos y proteínas, la re-absorción de

sales biliares y la formación, almacenamiento y eliminación de la materia fecal (Barrett, 2006; Basit, 2005).

Normalmente los lípidos son digeridos en su totalidad por las lipasas del estómago y el intestino delgado, de modo que en un individuo sano no deberían encontrarse restos de materia grasa en el intestino grueso. Sin embargo, si las gotas de aceite de una emulsión se encontraran rodeadas por una matriz no digerible, podrían no ser digeridos (al menos totalmente) durante su recorrido por el tracto gastrointestinal, enriqueciendo de esta manera al colon con lípidos (McClements y col, 2010; Yang, 2008).

Dado que diferentes reportes indican que la presencia de componentes no digeridos en el colon, podría alterar el funcionamiento normal de su microbiota (generando algunos problemas de salud en el consumidor), el diseño de alimentos funcionales de baja digestibilidad requerirá de un diseño adecuado, a modo de asegurar que su consumo resulte en un beneficio para los consumidores y no en un problema para su salud (Jacobs, Gaudier, van Duynhoven y Vaughan, 2009; Tuohy y col, 2006).

3.3. El rol de las sales biliares en la digestión de los lípidos

Las SB son producidas por los hepatocitos (células del hígado), a través de los numerosos conductos biliares que lo penetran, para luego ser almacenadas en la vesícula biliar, donde se concentran hasta cinco veces entre comidas.

Cuando el alimento es liberado desde el estómago al duodeno en forma de quimo, la vesícula biliar libera bilis (compuesta por un 98% de agua, siendo el resto sales biliares, colesterol y lecitina, entre otros) para completar la digestión de los lípidos.

Las sales biliares juegan un rol muy importante durante el proceso de digestión y absorción de los lípidos. Al ser sustancias interfacialmente activas pueden adsorberse en las interfases O/W y pueden, además, formar micelas en solución acuosa en combinación con otros coloides. Los niveles de concentración normales de SB rondan los 4-6 mM, pero tras la ingestión de un alimento sus niveles pueden incrementarse hasta 15 mM, dependiendo del tipo de alimento ingerido y, sobre todo, de su aporte en materia grasa (Kalantzi y col, 2006; Maldonado-Valderrama, Wilde, Macierzanka y Mackie, 2011).

Sin dudas, las SB promueven el proceso de digestión de los lípidos, debido a su actividad interfacial, ya que emulsionan las grasas, permitiendo generar una elevada área

interfacial para la acción de lipasa pancreática (Figura 26). De no existir las SB, el proceso de lipólisis ocurriría con menos eficiencia (Bauer y col, 2005; McClements y col, 2010).

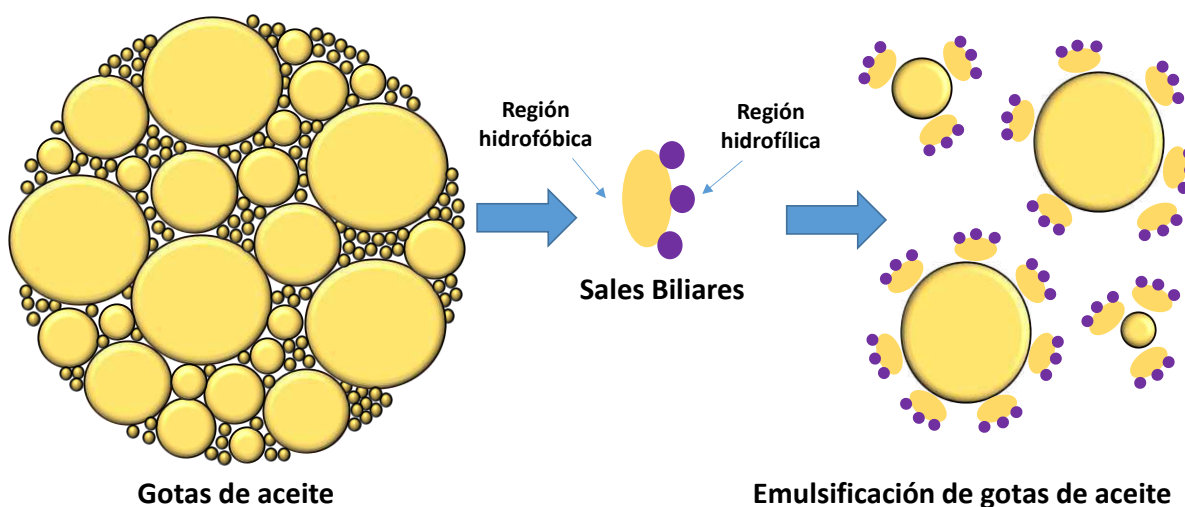


Figura 26. Representación esquemática de la emulsificación llevada a cabo por las SB sobre las gotas de aceite. Incremento de la interfase O/W expuesta a la lipasa pancreática.

Por otra parte, las SB favorecen el proceso de lipólisis dada su habilidad para solubilizar los productos lipídicos de la digestión (AG, MG y DG) y transportarlos en forma de micelas hasta el epitelio intestinal donde finalmente serán absorbidos (Figura 27), liberando la interfase para la continua actividad de la lipasa pancreática. En este sentido, de no existir las SB, los productos de la digestión de lípidos, al presentar actividad interfacial, permanecerían en la interfase teniendo un efecto inhibitorio sobre la actividad lipolítica, ya que dificultarían el acceso de la lipasa a la interfase y el contacto entre esta y los TG que constituyen las gotas de aceite (Reis, Holmberg, Watzke, Leser y Miller, 2009; Troncoso, Aguilera y McClements, 2012).

Por otra parte, si la concentración de SB fuera muy elevada, podría verse disminuida la habilidad de la lipasa para digerir los lípidos emulsionados, un efecto que podría ser atribuido a la competencia entre la lipasa pancreática y las SB por conseguir un lugar en la interfase (Chu y col, 2009).

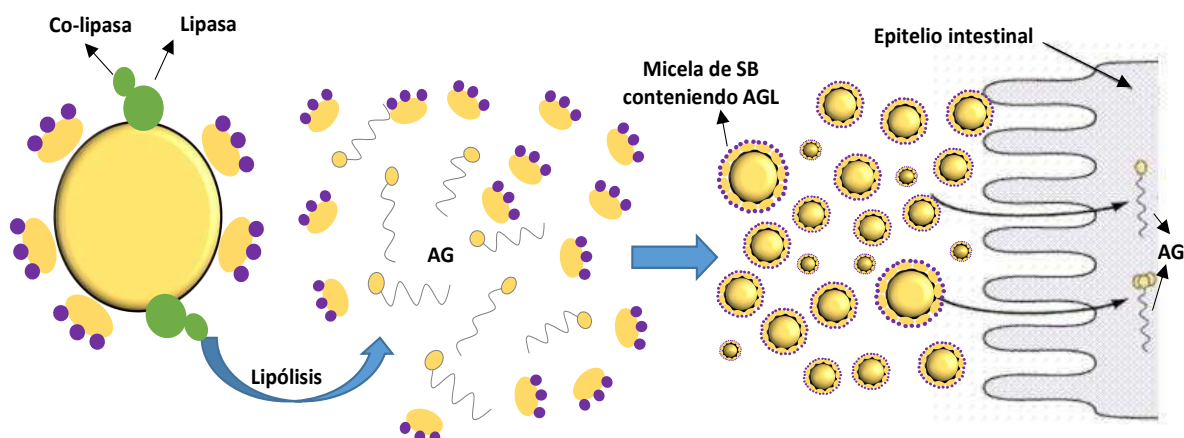


Figura 27. Las SB remueven los productos de la digestión para transportarlos al epitelio intestinal.

Desde este punto de vista, las interfases O/W se han vuelto objeto de estudio de numerosos trabajos, ya que una manipulación adecuada de tal región podría utilizarse para modular la absorción de las SB, o la adsorción directa de la lipasa pancreática y en último término modular la digestión de los lípidos (Helbig, Silletti, Timmerman, Hamer y Gruppen, 2012; Malaki Nik, Wright y Corredig, 2011; Torcello-Gómez y Foster, 2014; Ye, Cui, Zhu y Singh, 2013).

3.4. Aspectos generales de la simulación del proceso digestivo: *La digestión in vitro*

En la bibliografía se pueden encontrar numerosos trabajos asociados a la simulación del proceso de digestión de alimentos. Existe una gran variedad de modelos de digestión, cuya complejidad viene determinada por diversos factores, entre los que el tipo de alimento que se someterá al proceso de digestión será el más influyente. Aunque las digestiones *in vivo* (utilizando animales o incluso humanos) proveen información más real de la digestión de un alimento, ya que usan organismos vivos, los resultados que se obtienen con estas son más difíciles de interpretar (ya que varían con la edad, sexo y estado de salud), requieren de mucho tiempo y son muy costosos, además de verse alcanzados por numerosas implicaciones éticas (Kong y Singh, 2008). Por este motivo, es que la utilización de modelos de digestión *in vitro* resulta en una alternativa simple, barata y reproducible para simular el proceso de digestión de un alimento (Minekus y col, 2014). Dada la complejidad inherente del proceso de digestión *in vivo*, resulta casi imposible unificarlo en un único modelo *in vitro*, de modo que cada estudio deberá adaptarse a las condiciones que lo hagan lo más simple posible de acuerdo al alimento que interesa digerir. La Tabla 1 resume trabajos que se han basado en la utilización de

modelos de digestión *in vitro* para la digestión de diferentes emulsiones O/W. En general, las principales diferencias que se encuentran en los modelos pueden resumirse en base a tres criterios:

- Numero de etapas incluidas en el proceso de digestión: boca, estómago, intestino delgado y/o intestino grueso.
- Composición de los fluidos utilizados en cada una de las etapas: enzimas, buffers, sales, polímeros, etc.
- Esfuerzos mecánicos y flujos de fluidos utilizados en cada paso de la digestión: magnitud y dirección de las tensiones aplicadas, geometrías y perfiles de flujo, superficies utilizadas, etc.

Así, por ejemplo, en el caso de alimentos líquidos, como ya se ha comentado antes, suele desestimarse la fase oral por el bajo tiempo de residencia de los líquidos en la boca, o bien, también podría desestimarse el efecto de las proteasas en el caso de un alimento que carezca de proteínas. Por ejemplo, en estudios enfocados en la digestión de lípidos de emulsiones O/W, Mun y col (2007) o Porter, Wasan y Constantinides (2008), solo se han enfocado en la digestión a nivel duodenal, utilizando lipasa pancreática o pancreatina (que contiene lipasa pancreática) y desestimando el efecto de otras enzimas como las proteasas.

Más allá de la complejidad en el modelo *in vitro* utilizado, un modelo adecuado será aquel que represente una alternativa útil al modelo *in vivo*, originando resultados correctos en cortos periodos de tiempo.

Una diferencia que puede encontrarse en cada uno de los modelos tiene que ver con los parámetros experimentales que se determinan durante la digestión. Estos incluyen: *cambios químicos* (hidrólisis de proteínas, lípidos y/o polisacáridos), *cambios específicos* (liberación y encapsulación de componentes, procesos de adsorción competitiva), y *cambios estructurales* (rupturas de macromoléculas, agregación, coalescencia y disrupción de gotas).

Además de la composición enzimática, la concentración de las enzimas involucradas se convierte en un factor clave para el diseño de un modelo de digestión *in vitro*.

Normalmente, las concentraciones elevadas de enzimas aceleran el proceso degradativo (o de ruptura) de los componentes del alimento y esto influye de manera directa en el tiempo de residencia del alimento en las condiciones de digestión. Se sabe que, en las condiciones fisiológicas normales, las partículas de mayor tamaño se mueven por el estómago a velocidades menores que las más pequeñas, hasta que alcanzan un tamaño lo suficientemente pequeño (<1 mm) que les permita atravesar el píloro hacia el intestino delgado. Por lo tanto, los alimentos formados por partículas de gran tamaño requerirán un tiempo de residencia mayor.

En términos generales, las variaciones en los procesos de digestión *in vitro* utilizados, son, en parte, responsables de las diferencias encontradas en los resultados.

En muchas ocasiones, los modelos de digestión *in vitro*, suelen completarse por medio de la utilización de cultivos celulares, que simulan las células humanas, para evaluar la biodisponibilidad de un compuesto activo, es decir la cantidad real de ese compuesto que es utilizada por el organismo. En particular, las células Caco-2 son extensamente utilizadas como modelo predictivo en la absorción de los componentes de los alimentos y preparaciones farmacéuticas. Estas células dan lugar a monocapas celulares y presentan características morfológicas y bioquímicas similares a las de los enterocitos (Pignata, Maggini, Zarrilhi, Rea y Acquaviva, 1994). Por ello constituyen un buen modelo, especialmente para compuestos susceptibles de absorberse únicamente por difusión pasiva. De hecho, se ha demostrado la existencia de una excelente correlación entre los coeficientes de permeabilidad en células Caco-2 y la biodisponibilidad oral en humanos (Camenisch, Folkers y van de Waterbeemd, 1998; Chiou y Barve, 1998). Mahler, Shuler y Glahn (2009), han utilizado un modelo de digestión *in vitro* en combinación con un modelo de cultivo celular con células Caco-2 para demostrar la biodisponibilidad para la absorción de hierro, encontrando resultados que guardan muy buena correlación con los obtenidos por modelos de digestión *in vivo*.

En otras palabras, gracias a la utilización de modelos de digestión *in vitro* acoplados a modelos de cultivo celular, no solo es posible comprobar qué cantidad de compuestos presentes y/o incorporados en diferentes matrices (medicamentos, alimentos) pueden ser potencialmente absorbidos por el sistema digestivo (bioaccesibilidad), sino también cuál de ellos son realmente absorbidos y metabolizados por el organismo, llegando al plasma sanguíneo y produciendo en él el efecto buscado (biodisponibilidad).

La industria farmacéutica y la industria alimentaria, en su desarrollo de alimentos funcionales, utilizan los modelos de digestión *in vitro* para validar que los principios activos presentes y/o incorporados en sus matrices cumplan con los claims para lo cual fueron diseñados.

La comunidad científica internacional muestra mucho interés en la mejora de las propiedades saludables de los alimentos y otros productos, y se esfuerza en ampliar su conocimiento de los procesos de digestión. Para ello fue constituida en el año 2011 **INFOGEST (COST Action)**, la red internacional de expertos en nutrición, gastroenterología y tecnología de alimentos, de la cual nuestro grupo de investigación forma parte. A la fecha, INFOGEST lleva celebradas varias reuniones científicas en diferentes partes de Europa, reuniendo a grupos de investigación que se especializan en diferentes disciplinas de la digestión (especialistas en modelos de digestión *in vitro*, *in vivo*, en modelos de adsorción de nutrientes o de medicamentos, etc.). Así, por medio de INFOGEST surge la posibilidad de una mejora en la divulgación de los resultados sobre la digestión de alimentos, la posibilidad en la coparticipación entre los grupos participantes, y sobre todo reúne a sus miembros con el fin de crear una comprensión más completa del tema haciéndolo más competitivo. Uno de los objetivos generales que se plantea a lo largo de las diferentes reuniones llevadas a cabo a la fecha, se basa en la unificación y estandarización de los modelos de digestión que haga más fácil la interpretación y comparación de resultados. A fines del año 2015 ha sido publicado en la revista *Food Research International* el primer trabajo del proyecto INFOGEST, ofreciendo un protocolo estandarizado de la digestión de alimentos, con el objeto de que sea utilizado como referencia en trabajos futuros, y haga más fácil la interpretación y comparación de los resultados (Egger y col, 2015).

Tabla 1. Resumen de trabajos que han utilizado modelos de digestión *in vitro* en emulsiones O/W. En todos los casos: O (aceite), W (solución de emulsionante), β -lg (β -lactoglobulina), β -cas (β -caseína), SB (sales biliares), WPI (aislado proteico de suero lácteo), PL (fosfolípido), FSS (fluido salival simulado), FIS (fluido intestinal simulado), FGS (fluido gástrico simulado).

MUESTRA	VARIABLE EXPERIMENTAL	DETERMINACIONES	MODELO DE DIGESTIÓN	CONCLUSIONES	REFERENCIA
O: Soja W: β -lg y Lactoferrina	- [SB] - Tipo de emulsionante	- Microscopia óptica - Potencial-Z - Tamaño de gota - Proteína adsorbida	FIS: pH 7,5 (2h), SB, CaCl ₂	<i>La carga del emulsionante afecta el desplazamiento interfacial llevado a cabo por las SB.</i>	(Sarkar, Horne y Singh, 2010)
O: Girasol W: β -lg y Lecitina	- Tipo de emulsionante	- Microscopia óptica - Potencial-Z - Tamaño de gota - Lipólisis	FIS: pH 7, SB, Lipasa pancreática	<i>El entrecruzamiento proteico no tiene efecto significativo en el grado de lipólisis.</i>	(Sandra, Decker y McClements, 2008)
O: Maíz W: Tween 20	- Tipo de fibra dietaria	- Microscopia óptica - Potencial-Z - Tamaño de gota - Estabilidad al cremado	FSS: pH 7 (1h) FGS: pH 2 (1h) FIS: pH 7,5 (2h), lipasa pancreática, SB	<i>El tipo de fibra dietaria afecta el grado de agregación de las gotas de aceite durante la digestión.</i>	(Beysseriat, Decker y McClements, 2006)
O: Pescado W: Quitosano y Alginato	- Tipo de polisacárido - Formación de multicapas	- Microscopia óptica - Potencial-Z - Tamaño de gota - Estabilidad al cremado - Lipólisis	FIS: pH 7, lipasa pancreática, SB.	<i>El grado de lipólisis se ve disminuido por la presencia de capas de quitosano y alginato alrededor de las gotas de aceite.</i>	(Gudipati, Sandra, McClements y Decker, 2010)
O: Maíz, Oliva, Girasol, Canola, Pescado, etc. W: WPI	- Tipo de aceite	- Tamaño de gota - Microscopía - Lipólisis - Potencial-Z	FSS: pH 6,8 (10 min), mucina, agitación FGS: pH 2,5 (2h), pepsina, agitación FIS: pH 7 (2h), lipasa pancreática, SB.	<i>El ritmo de la lipólisis depende del tipo de aceite, pero no así la extensión del proceso.</i>	(Zhang, Zhang, Zhang, Decker y McClements, 2015b)

O: Canola W: Quitosano, Lecitina y SB	- Tipo de emulsionante	- Resonancia magnética nuclear - Lipólisis - Fluorescencia - Potencial-Z	FIS: pH 7,5, BS, lipasa pancreática	<i>Las SB producen una rápida disrupción de la película interfacial. Las multicapas en la interfase reducen la perturbación.</i>	(Pan y Nitin, 2016)
O: Ácido oleico W: WPI, Caseinato de sodio, Lecitina y Tween 20	- Tipo de emulsionante - Efecto de la presencia de Ca^{2+}	- Lipólisis. - Tamaño de gota	FIS: pH 7,5 (2h), lipasa pancreática (con tripsina), SB	<i>La presencia de Ca^{2+} afecta el grado de lipólisis pero no el perfil de liberación de los ácidos grasos.</i>	(Ye y col, 2013)
O: Soja W: WPI, SPI	- Tipo de emulsionante - Efecto de la presencia de PL	- Tamaño de gota - Potencial-Z - Lipólisis. - SDS- PAGE	FGS: pH 2 (1h), pepsina, 250 rpm FIS: pH 6,5 (2h), 250 rpm, pancreatina, BS, PL	<i>La emulsión estabilizada por WPI fue más estable que la estabilizada por SPI durante la digestión. Se observó efecto significativo de la incorporación de PL.</i>	(Malaki Nik y col, 2011)
O: Oliva W: β -lg y β -Cas	- Tipo de emulsionante	- Tensión interfacial - Reología interfacial	FGS: pH 2 (50 min), pepsina FIS 1: pH 7 (50 min) tripsina, quimotripsina FIS 2: pH 7 (50 min), lipasa, SB	<i>La pepsinólisis debilita la película de β-lg mientras fortalece la de β-cas. Ninguna de las películas interfaciales contribuye en una barrera significativa al proceso de lipólisis.</i>	(Maldonado-Valderrama, Holgado-Terriza, Torcello-Gomez y Cabrerizo-Vilchez, 2013)

4. Impacto de la composición interfacial en el proceso de lipólisis

Tradicionalmente, tanto la ciencia de las emulsiones, como la industria, se han centrado en la selección de los componentes a fin de obtener emulsiones con propiedades fisicoquímicas y sensoriales adecuadas (vida útil, textura, sabor, etc.). Sin embargo, actualmente el interés se centra en manipular la composición y la estructura de las emulsiones a fin de controlar la digestión de lípidos (Malaki Nik, Wright y Corredig, 2010; Maldonado-Valderrama, Miller, Fainerman, Wilde y Morris, 2010; McClements y col, 2010).

Básicamente, el interés por comprender el comportamiento de las emulsiones durante la digestión abarca dos objetivos principales. Por un lado, la necesidad de controlar la digestión lipídica para disminuir el consumo/adsorción de grasas y hacer frente así, a la crisis de obesidad existente en el mundo, así como también disminuir el impacto de las enfermedades crónicas asociadas. Sin embargo, la ruta hacia el desarrollo de productos alimenticios con baja digestibilidad lipídica es complicada y requiere de la comprensión sobre cómo se procesan estos en el tracto gastrointestinal.

Contrariamente, si se trata de productos ricos en lípidos bioactivos, se debe asegurar la bioaccesibilidad de los mismos (por ejemplo ácidos grasos ω -3); de igual manera, si los lípidos se utilizan como carriers de compuestos bioactivos hidrófobos (incluidos en el núcleo lipídico de la emulsión).

Es así que el diseño de emulsiones funcionales se convierte en parte de los retos actuales de la industria alimentaria. Cualquiera sea el objetivo buscado, la digestibilidad de los lípidos y la liberación de compuestos lipófilos bioactivos pueden ser controladas mediante el recubrimiento de las gotas de lípidos con emulsionantes y compuestos apropiados que garanticen su protección en el estómago, para controlar su posterior liberación en el intestino, donde finalmente serán absorbidos.

Diferentes mecanismos podrían estar involucrados en el efecto que tienen la composición y la estructura de la interfase sobre la digestión lipídica de las emulsiones. Los principales (Pilosof, 2016) mecanismos se representan de forma esquemática en la Figura 28 y se resumen a continuación:

- La floculación/coalescencia de las gotas de aceite durante su recorrido por el tracto gastrointestinal, que disminuye el área interfacial disponible para la

adsorción de la lipasa pancreática, y consecuentemente impacta en el grado de lipólisis.

- Factores estéricos que inhiben la adsorción interfacial de lipasa/colipasa (grupos polares del emulsionante que sobresalen en la fase acuosa, películas interfaciales de gran espesor, películas interfaciales rígidas, etc).
- Resistencia de la película interfacial a la adsorción de las SB, indispensables para la actividad de la lipasa pancreática.
- Acumulación interfacial de productos inhibitorios de la lipólisis (AGL, MG), debido a la menor disponibilidad de SB (necesarias para su remoción), las cuales podrían ser “secuestradas” por emulsionantes adsorbidos en la interfase o los que permanecen en la solución.
- Acumulación interfacial de productos inhibitorios de la lipólisis (AGL, MG), debido a su unión a los emulsionantes adsorbidos que forman la película interfacial.
- Disminución del calcio disponible, necesario para la actividad de la lipasa pancreática, por su unión a los emulsionantes adsorbidos en la interfase o a los que permanecen en la solución.

Resulta evidente que la región interfacial, modulada principalmente por las características de la película de emulsionante, tiene un impacto directo en el proceso de lipólisis. Por este motivo, la ingeniería interfacial resulta en una herramienta clave para su estudio y comprensión. Sin embargo, a pesar del importante rol que juegan las interfases durante la digestión de lípidos, existen relativamente pocos estudios que se enfoquen en la digestión de las estructuras interfaciales propiamente dichas. El grupo de investigación en Física de Fluidos y Biocoloides, pertenecientes a la Universidad de Granada (España), es pionero en el desarrollo de un tensiómetro interfacial específico (denominado OCTOPUS) que permite desarrollar el proceso de digestión gastroduodenal *in vitro* sobre la película interfacial de emulsionante formada sobre la interfase O/W o aire/agua (Maldonado-Valderrama y col, 2013; Maldonado-Valderrama, Torcello-Gómez, del Castillo-Santaella, Holgado-Terriza y Cabrerizo-Vílchez, 2015). El dispositivo permite medir in situ la evolución de la tensión interfacial

y las propiedades mecánicas de la película después de cada etapa de digestión (la boca, el estómago y el intestino delgado). Por ejemplo, por medio de esta tecnología Maldonado-Valderrama y col (2013) han estudiado el comportamiento de dos estructuras interfaciales diferentes (β lg y β -caseína) bajo condiciones de digestión *in vitro*. En este caso observaron que si bien las dos películas presentaron un comportamiento diferente durante la etapa gástrica de la digestión, no se encontraron diferencias en cuanto al grado de lipólisis, indicando que las proteínas no supusieron barrera alguna a la actividad de la lipasa.

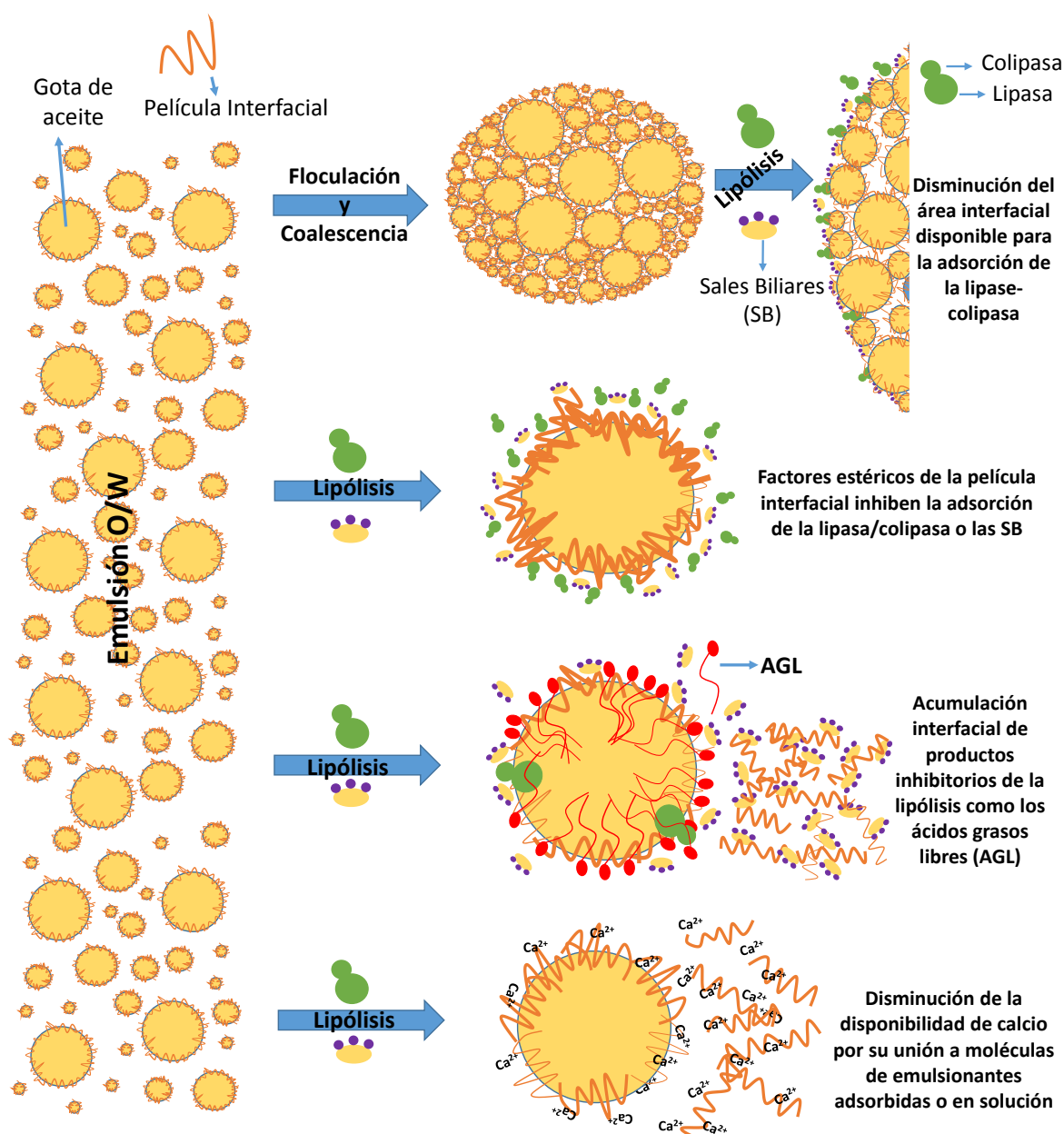


Figura 28. Factores que impactan en el proceso de lipólisis e involucran a la película interfacial.

La mayoría de los trabajos basan sus estudios sobre el comportamiento de las emulsiones (estabilizadas por uno o más emulsionante de diferentes orígenes) durante la digestión *in vitro*.

Por ejemplo, Singh y Ye (2013) estudiaron los factores que afectan la digestibilidad de los lípidos presentes en emulsiones estabilizadas por proteínas, donde concluyeron que como consecuencia de la proteólisis gástrica y duodenal, las proteínas podrían resultar en una barrera deficiente a la acción de la lipasa pancreática.

Más recientemente, Zhang, Zhang, Zhang, Decker y McClements (2015a) compararon la influencia del tipo de proteína láctea empleada como emulsionante (lactoferrina (catiónica) y caseinato (aniónico)) en el comportamiento de la emulsión durante su recorrido por el tracto gastrointestinal. Observaron que la velocidad de lipólisis dependía del tipo de proteína, pero no así la extensión del proceso, alcanzándose una digestión completa para ambos sistemas durante la fase duodenal.

Algunos autores han planteado la posibilidad de que el entrecruzamiento entre proteínas en la interfase, al aumentar el espesor y la rigidez, podría incrementar la resistencia de las películas interfaciales proteicas a la lipólisis. Por ejemplo, ha sido evaluado el entrecruzamiento de moléculas de β lg, o el de moléculas de caseína con tensioactivos de bajo peso molecular; sin embargo, no se ha evidenciado un efecto significativo en la reducción del proceso de lipólisis. Partiendo del mismo propósito, Sarkar y col (2016), recientemente probaron si las interfases estabilizadas por partículas de microgel proteicas fundidas por calor (emulsiones pickering), serían capaces de mejorar la protección de los lípidos a la acción de la lipasa en comparación con los sistemas donde las partículas de microgel no fueron tratadas térmicamente. Concluyeron que los microgeles se rompen sin importar que hubieran sido o no tratados térmicamente, resultando en una barrera pobre ante la actividad de la lipasa. Aunque varios trabajos han mostrado que los polisacáridos presentan actividad interfacial, esto se ha atribuido, en la mayoría de los casos, a la presencia de proteínas contaminantes (Dickinson, 2003). Sin embargo, algunos polisacáridos modificados químicamente pueden emplearse como emulsionantes, entre ellos, derivados de celulosa (metilcelulosas, carboximetilcelulosas, hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosas (HPMC)) o ésteres de propilenglicol de ácido algínico. Hay pocos estudios sobre la digestión de emulsiones donde se emplee a un polisacárido

como emulsionante principal. Entre estos, Torcello-Gómez y Foster (2016) en un trabajo reciente, observaron que las emulsiones estabilizadas por HPMC presentaron un menor grado de lipólisis que las emulsiones estabilizadas por Tween 20.

Algunos trabajos se han enfocado en el estudio de la lipólisis sobre emulsiones multicapas, es decir emulsiones con cubiertas nanolaminadas sobre la superficie de las gotas de aceite, donde biopolímeros con carga opuesta se atraen electrostáticamente (Marciani y col, 2009; Pinheiro, Coimbra y Vicente, 2016). Se supone que estas multicapas deberían presentar una mayor resistencia al proceso digestivo que una emulsión convencional, debido a la mayor resistencia contra la ruptura mecánica, además de formar una película interfacial más gruesa que, por impedimentos estéricos, dificulta el acceso de la lipasa a la interfase así como también retarda la liberación de los ácidos grasos producidos. Sin embargo, los resultados reportados, revelan que las multicapas de polisacáridos no representan una barrera efectiva a la acción de la lipasa debido, posiblemente, a que las multicapas se desintegran cuando las emulsiones se encuentran expuestas a las condiciones gastrointestinales (pH, fuerza iónica, etc.). Sin embargo, aunque la estructura de la película interfacial no influya en la digestión de lípidos, los polisacáridos implicados en tales películas podrían modular el área interfacial disponible para el desarrollo de la lipólisis, así como también las interacciones con las SB o el calcio, afectando de esta forma en la velocidad del proceso o el grado en que este se produce.

El ion Ca^{2+} juega un rol importante en la digestión de lípidos al intervenir en la activación de la lipasa pancreática (Golding y Wooster, 2010; Zangenberg, Mullertz, Kristensen y Hovgaard, 2001). Alvarez y Stella (1989) estudiaron el rol del Ca^{2+} en emulsiones estabilizadas por lecitina, donde observaron que en ausencia total de este ion no tiene lugar el proceso de lipólisis. Por el contrario, concluyeron que, conforme aumenta su concentración en el medio de reacción se reduce el periodo de inducción de la lipólisis, sugiriendo que en presencia de Ca^{2+} se ve favorecida la unión de la lipasa a la interfase O/W. Sin embargo, se ha reportado que, si bien el calcio favorece la actividad de la lipasa, también interactúa con los ácidos grasos producidos formando sales de calcio insolubles, principalmente con los ácidos grasos de cadena larga. Estas sales insolubles luego son difíciles de metabolizar por lo que se vería reducida la absorción lipídica. De hecho, se ha observado en dietas con alto contenido en calcio

una absorción lipídica marcadamente reducida (Bendsen, Hother, Jensen, Lorenzen y Astrup, 2008; Gueguen y Pointillart, 2008).

Sin embargo, la capacidad del ion Ca^{2+} para favorecer la actividad de la lipasa pancreática se ve influenciada por la naturaleza del emulsionante utilizado. Por ejemplo, Li, Hu, Du y McClements (2011) utilizaron un modelo de digestión intestinal *in vitro* para evaluar la lipólisis en emulsiones estabilizadas por βlg , βlg -alginato y βlg -alginato-quitosano. Estos autores concluyeron que cuando la concentración de calcio en el medio de reacción es baja (5 mM), el grado de lipólisis obtenido es independiente del número de capas de emulsionantes adsorbidas. Sin embargo, a elevadas concentraciones de calcio (> 20 mM) observaron una marcada reducción del grado de lipólisis en las emulsiones estabilizadas con alginato, sugiriendo que bajo estas condiciones este emulsionante da lugar a la formación de un gel de alginato de calcio, que restringe el acceso de las lipasas a la interfase.

Por lo tanto, modular la disponibilidad de calcio seleccionando los emulsionantes adecuados, abre otra ruta posible para el control del metabolismo lípidos.

En términos generales, los diversos trabajos han demostrado que, hasta el momento no existiría una barrera 100 % efectiva a la actividad de la lipasa pancreática; sin embargo, todo indicaría que, a partir de una selección adecuada de emulsionantes, es posible regular tanto la velocidad como la extensión a la cual ocurre el proceso. La obtención de sistemas tales que disminuyan la velocidad a la cual ocurre la lipólisis, y sobre todo el grado en el que se produce, resulta de crucial importancia para el desarrollo de alimentos funcionales y saludables, ya que impactarían de forma directa en los niveles de triglicéridos en sangre, asociados a diversos problemas de salud, que representan un factor de riesgo para la población mundial.

En este sentido, los estudios dejan claro que las interfases, y la película interfacial que rodea las gotas de aceite en la emulsión, parecen ser la clave para controlar el proceso. Una mejor comprensión sobre los mecanismos implicados en la modulación de la lipólisis es necesaria para seleccionar emulsionantes, que permitan la obtención de emulsiones con una reducida tasa de digestibilidad. Para cumplir este propósito, los siguientes aspectos, asociados a la actividad de la lipasa pancreática, deberían ser profundamente estudiados: (a) disminución en la disponibilidad de calcio necesario

para la actividad de la lipasa; (b) resistencia de las películas interfaciales a la penetración/desplazamiento de las SB; (c) disminución de la disponibilidad de las SB para la remoción de los AGL; (d) unión de los AGL a los emulsionantes/estabilizantes para dificultar su remoción interfacial por las SB o bien dificultar su posterior absorción intestinal. Aunque este último no es estrictamente considerado un modulador del proceso de lipólisis, la reducción en la tasa de absorción de los AGL (o su inhibición) reduciría el impacto negativo de la digestión de las emulsiones.

5. Referencias

- Adamson, A. W. (1990). *Physical chemistry of surfaces* (5 ed.).
- Alvarez, F. J. y Stella, V. (1989). The Role of Calcium Ions and Bile Salts on the Pancreatic Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Triglyceride Emulsions Stabilized with Lecithin. *Pharmaceutical Research*, 6(6), 449–457.
- Alzorqi, I., Ketabchi, M. R., Sudheer, S. y Manickam, S. (2016). Optimization of ultrasound induced emulsification on the formulation of palm-olein based nanoemulsions for the incorporation of antioxidant β -d-glucan polysaccharides. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 71-84.
- Amado, F. M. L., Vitorino, R. M. P., Domingues, P. M. D. N., Lobo, M. J. C. y Duarte, J. A. R. (2005). Analysis of the human saliva proteome. *Expert Rev Proteomics*, 2(4), 521-539.
- Angelo, A. (1989). A brief introduction to food emulsions and emulsifiers. In G. Charalambous y G. Doxastakis (Eds.), *Food Emulsifiers: Chemistry, Technology, Functional Properties and Applications*.
- Barrett, K. E. (2006). *Gastrointestinal physiology*: Lange Medical Books/McGraw-Hill Companies.
- Basit, A. W. (2005). Advances in colonic drug delivery. *Drugs*, 65(14), 1991-2007.
- Bauer, E., Jakob, S. y Mosenthin, R. (2005). Principles of physiology of lipid digestion. *Journal of Animal Science*, 18, 282-295.
- Bendsen, N. T., Hother, A. L., Jensen, S. K., Lorenzen, J. K. y Astrup, A. (2008). Effect of dairy calcium on fecal fat excretion: a randomized crossover trial. *Int J Obes*, 32(12), 1816-1824.
- Bermúdez, B., Pacheco, Y. M., López, S., Abia, R. y Muriana, F. J. G. (2004). Digestion and absorption of olive oil. *Grasas y Aceites*, 55, 1-10.
- Beverung, C. J., Radke, C. J. y Blanch, H. W. (1999). Protein adsorption at the oil/water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements. *Biophysical Chemistry* 81, 59-80.
- Beysseriat, M., Decker, E. A. y McClements, D. J. (2006). Preliminary study of the influence of dietary fiber on the properties of oil-in-water emulsions passing through an in vitro human digestion model. *Food Hydrocolloids*, 20(6), 800-809.
- Bracco, U. (1994). Effect of triglyceride structure on fat absorption. *The American Society for Clinical Nutrition*, 60, 1002-1009.
- Bray, G. A., Paeratakul, S. y Popkin, B. M. (2004). Dietary fat and obesity: A review of animal, clinical and epidemiological studies. *Physiology & Behavior* 83(4), 549–555.
- Camenisch, G., Folkers, G. y van de Waterbeemd, H. (1998). Shapes of membrane permeability–lipophilicity curves: Extension of theoretical models with an aqueous pore pathway. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(4), 321-329.
- Carey, M. C., Small, D. M. y Bliss, C. M. (1983). Lipid Digestion and Absorption. *Annual Review of Physiology*, 45, 651-677.
- Chiou, W. L. y Barve, A. (1998). Linear correlation of the fraction of oral dose absorbed of 64 drugs between humans and rats. *Pharm Res*, 15(11), 1792-1795.

- Chu, B.-S., Rich, G. T., Ridout, M. J., Faulks, R. M., Wickham, M. S. J. y Wilde, P. J. (2009). Modulating pancreatic lipase activity with galactolipids: effects of emulsion interfacial composition. *Langmuir*, 25(16), 9352-9360.
- Davies, J. T. (1953). On the shapes of molecules of poly-amino acids and proteins at interfaces. *Biochimica et Biophysica Acta*, 11, 165-177.
- Dickinson, E. (1986). *Food Emulsion and Foams* (Vol. 1).
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17(1), 25-39.
- Dickinson, E. (2015). Colloids in Food: Ingredients, Structure, and Stability. *Food Science and Technology*, 6, 211-233.
- Egger, L., Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., Barberá, R., Brodkorb, A., Cattenoz, T., Clemente, A., Comi, I., Dupont, D., Garcia-Llatas, G., Lagarda, M. J., Le Feunteun, S., Janssen Duijghuijsen, L., Karakaya, S., Lesmes, U., Mackie, A. R., Martins, C., Meynier, A., Miralles, B., Murray, B. S., Pihlanto, A., Picariello, G., Santos, C. N., Simsek, S., Recio, I., Rigby, N., Rioux, L.-E., Stoffers, H., Tavares, A., Tavares, L., Turgeon, S., Ulleberg, E. K., Vegarud, G. E., Vergères, G. y Portmann, R. (2015). The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. *Food Research International*.
- Favé, G., Coste, T. C. y Armand, M. (2004). Physicochemical properties of lipids: new strategies to manage fatty acid bioavailability. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 50(7), 815-831.
- Ford, L., Borwankar, R., Martin, J. R. W. y Holcomb, D. N. (1997). Dressing and sauces. In E. A. Decker (Ed.), *Food Emulsion* (3 ed.).
- Freer, E. M., Yim, K. S., Fuller, G. G. y Radke, C. J. (2004). Interfacial Rheology of Globular and Flexible Proteins at the Hexadecane/Water Interface: Comparison of Shear and Dilatation Deformation. *Journal of Physical Chemistry B*, 108(12), 3835-3844.
- Friberg, S. E. (1997). Emulsion stability. In E. A. Decker (Ed.), *Food Emulsions* (3 ed.).
- Gao, Z.-M., Zhu, L.-P., Yang, X.-Q., He, X.-T., Wang, J.-M., Guo, J., Qi, J.-R., Wang, L.-J. y Yin, S.-W. (2014). Soy lipophilic protein nanoparticles as a novel delivery vehicle for conjugated linoleic acid. *Food & Function*, 5(6), 1286-1293.
- Golay, A. y Bobbioni, E. (1997). The role of dietary fat in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 21 Suppl 3, S2-11.
- Golding, M. y Wooster, T. J. (2010). The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1-2), 90-101.
- Gopal, E. S. R. (1968). Principles of emulsion formation. In P. Sherman (Ed.), *Emulsion Science* (pp. 1-47): Academic Press.
- Gudipati, V., Sandra, S., McClements, D. J. y Decker, E. A. (2010). Oxidative Stability and in Vitro Digestibility of Fish Oil-in-Water Emulsions Containing Multilayered Membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 8093-8099.
- Gueguen, L. y Pointillart, A. (2008). Digestive and metabolic interactions between lipids and calcium. *Sci Aliment*, 28.
- Hakansson, A., Fuchs, L., Innings, F., Revstedt, J., Bergenstahl, B. y Tragardh, C. (2010). Visual observations and acoustic measurements of cavitation in an experimental model of a high-pressure homogenizer. *Journal of Food Engineering* 100(3), 504-513.

- Hamosh, M. (1978). Rat lingual lipase: factors affecting enzyme activity and secretion. *American Journal of Physiology*, 235(4), 416-421.
- Hamosh, M. y Burns, W. (1977). Lipolytic activity of human lingual glands (Ebner). *Journal of Technical Methods and Pathology* 37(6), 603-608.
- Hasenhuettl, G. L. (2008). Overview of food emulsifiers. In G. L. Hasenhuettl y R. W. Hartel (Eds.), *Food Emulsifiers and their Applications* (pp. 1-10): Springer Science.
- Helbig, A., Silletti, E., Timmerman, E., Hamer, R. J. y Gruppen, H. (2012). In vitro study of intestinal lipolysis using pH-stat and gas chromatography. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 10-19.
- Hiemenz, P. C. y Rajagopalan, R. (1997). *Principles of Colloid and Surface Chemistry* (3 ed.): CRC Press.
- Hlebowicz, J., Hlebowicz, A., Lindstedt, S., Bjorgell, O., Hoglund, P., Holst, J. J., Darwiche, G. y Almer, L. O. (2009). Effects of 1 and 3 g cinnamon on gastric emptying, satiety, and postprandial blood glucose, insulin, glucose-dependent insulintropic polypeptide, glucagon-like peptide 1, and ghrelin concentrations in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*, 89(3), 815-821.
- Hu, Q., Gerhard, H., Upadhyaya, I., Venkitanarayanan, K. y Luo, Y. (2016). Antimicrobial eugenol nanoemulsion prepared by gum arabic and lecithin and evaluation of drying technologies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 130-140.
- Hunter, R. J. (1989). *Foundations of Colloid Science* (Vol. 2). Oxford: Oxford University Press.
- Jacobs, D. M., Gaudier, E., van Duynhoven, J. y Vaughan, E. E. (2009). Non-digestible food ingredients, colonic microbiota and the impact on gut health and immunity: a role for metabolomics. *Curr Drug Metab*, 10(1), 41-54.
- Kalantzi, L., Goumas, K., Kalioras, V., Abrahamsson, B., Dressman, J. B. y Reppas, C. (2006). Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharm Res*, 23(1), 165-176.
- Karlberg, M., Thuresson, K. y Lindman, B. (2005). Hydrophobically modified ethyl(hydroxyethyl)cellulose as stabilizer and emulsifying agent in macroemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 262(1-3), 158-167.
- Khan, A. Y., Talegaonkar, S., Iqbal, Z., Ahmed, F. J. y Khar, R. K. (2006). Multiple emulsions: an overview. *Curr Drug Deliv*, 3(4), 429-443.
- Kim, M., Park, Y. G., Lee, H.-J., Lim, S. J., Ahn, H. R., Jung, S. H. y Nho, C. W. (2015). *Youngia denticulata* attenuates diet-induced obesity-related metabolic dysfunctions by activating AMP-activated protein kinase and regulating lipid metabolism. *Journal of Functional Foods*, 18, Part A, 714-726.
- Kim, S. H. y Kinsella, J. E. (1985). Surface activity of food proteins: Relationships between surface pressure development, viscoelasticity of interfacial films and foam stability of bovine serum albumin. *Journal of Food Science*, 50, 1526-1530.
- Kinsella, J. E. y Phillips, L. G. (1989). Structure: function relationships in food proteins, film and foaming behavior. In J. E. Kinsella y W. G. Soucie (Eds.), *Food proteins* (pp. 52-77): The AOCS -Champaign.
- Koeppen, B. M. y Stanton, B. A. (2009). *Berne y Levy Fisiología* (6 ed.): ELSEVIER.

- Kong, F. y Singh, R. P. (2008). Disintegration of solid foods in human stomach. *J Food Sci*, 73(5), 1750-3841.
- Leadbetter, S. L. (1990). Emulsifying Agents in the Food Industry: a Literature Survey. *Food Focus*, 9, 117.
- Leray, C. (2014). *Lipids: Nutrition and Health*.
- Li, Y., Hu, M., Du, Y. y McClements, D. J. (2011). Controlling lipid nanoemulsion digestion using nanolaminated biopolymer coatings. *J Microencapsul*, 28(3), 166-175.
- Liao, T. H., Hamosh, P. y Hamosh, M. (1983). Gastric lipolysis in the developing rat. Ontogeny of the lipases active in the stomach. *Biochim Biophys Acta*, 754(1), 1-9.
- Lindahl, A., Ungell, A.-L., Knutson, L. y Lennernäs, H. (1997). Characterization of fluids from the stomach and proximal Jejunum in men and women. *Pharmaceutical Research*, 14(4), 497-502.
- Lucassen-Reynders, E. H. (1993). Interfacial viscoelasticity in emulsions and foams. *Food Structure*, 12, 1-12.
- Ma, Z. y Boye, J. I. (2013). Advances in the design and production of reduced-fat and reduced-cholesterol salad dressing and mayonnaise: A review. *Food and Bioprocess Technology* 6(3), 648–670.
- Mahler, G. J., Shuler, M. L. y Glahn, R. P. (2009). Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an in vitro digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(7), 494-502.
- Malaki Nik, A., Wright, A. J. y Corredig, M. (2010). Interfacial design of protein-stabilized emulsions for optimal delivery of nutrients. *Food Funct*, 1(2), 141-148.
- Malaki Nik, A., Wright, A. J. y Corredig, M. (2011). Impact of interfacial composition on emulsion digestion and rate of lipid hydrolysis using different in vitro digestion models. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 83(2), 321-330.
- Maldonado-Valderrama, J. (2006). *Caracterización Interfacial de Proteínas y Tensioactivos: Aplicación a Dispersiones Alimentarias*. Universidad de Granada, Granada, España.
- Maldonado-Valderrama, J., Holgado-Terriza, J. A., Torcello-Gomez, A. y Cabrerizo-Vilchez, M. A. (2013). In vitro digestion of interfacial protein structures. *Soft Matter*, 9(4), 1043-1053.
- Maldonado-Valderrama, J., Miller, R., Fainerman, V. B., Wilde, P. J. y Morris, V. J. (2010). Effect of Gastric Conditions on β -Lactoglobulin Interfacial Networks: Influence of the Oil Phase on Protein Structure. *Langmuir*, 26(20), 15901–15908.
- Maldonado-Valderrama, J., Torcello-Gómez, A., del Castillo-Santaella, T., Holgado-Terriza, J. A. y Cabrerizo-Vílchez, M. A. (2015). Subphase exchange experiments with the pendant drop technique. *Advances in Colloid and Interface Science*, 222, 488-501.
- Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P., Macierzanka, A. y Mackie, A. (2011). The role of bile salts in digestion. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 36-46.
- Maldonado-Valderrama, J., Woodward, N. C., Gunning, A. P., Ridout, M. J., Husband, F. A., Mackie, A. R., Morris, V. J. y Wilde, P. J. (2008). Interfacial Characterization

- of β -Lactoglobulin Networks: Displacement by Bile Salts. *Langmuir*, 24, 6759-6767.
- Marciani, J., Faulks, R., Wickham, M. S. J., Bush, D., Pick, B., Wright, J., Cox, E. F., Fillery-Travis, A., Gowland, P. A. y Spiller, R. C. (2009). Effect of intragastric acid stability of fat emulsions on gastric emptying, plasma lipid profile and postprandial satiety. *British Journal of Nutrition*, 101(919-928).
- Maron, S. y Prutton, C. (1975). *Fundamentos de físicoquímica*: Limusa.
- Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B. y Graves, S. M. (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18(41), 635-666.
- McClements, D. J. (1999). *Food Emulsions. Principles, Practice and Techniques*.
- McClements, D. J. (2015). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques* (3 ed. Vol. 1): CRC Press.
- McClements, D. J., Decker, E. y Yeonhwa. (2009). Controlling Lipid Bioavailability through Physicochemical and Structural Approaches. *Food Science and Nutrition*, 49(1), 48-67.
- McClements, D. J. y Decker, E. A. (2007). Lipids. In S. Damodaran, K. L. Parkin y O. R. Fennema (Eds.), *Food Chemistry* (4 ed., pp. 155-216): Boca Raton, F.L: CRC Press.
- McClements, D. J. y Li, Y. (2010). Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based. *Food & Function*, 1, 32-59.
- Micha, R., Khatibzadeh, S., Shi, P., Andrews, K. y Engell, R. (2015). Global, regional and national consumption of major food groups in 1990 and 2010: a systematic analysis including 266 country-specific nutrition surveys worldwide. *BMJ Open*, 5(9), 1-23.
- Miled, N., Riviere, M., Cavalier, J. F., Buono, G., Berti, L. y Verger, R. (2005). Discrimination between closed and open forms of lipases using electrophoretic techniques. *Anal Biochem*, 338(2), 171-178.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W. y Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct*, 5(6), 1113-1124.
- Moughan, P. J. (2016). Protein: Digestion, Absorption and Metabolism A2 - Caballero, Benjamin. In P. M. Finglas y F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 524-529). Oxford: Academic Press.
- Mu, H. y Høy, C.-E. (2004). The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog Lipid Res*, 43(2), 105-133.
- Mun, S., Decker, E. A. y McClements, D. J. (2007). Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 40(6), 770-781.
- Murray, B. S. (2002). Interfacial rheology of food emulsifiers and proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(5-6), 426-431.
- Norde, W. (2011). Colloids and Interfaces In F. L. Boca Raton (Ed.), *Life Sciences and Bionanotechnology*: Press., CRC.

- Pan, Y. y Nitin, N. (2016). Real-time measurements to characterize dynamics of emulsion interface during simulated intestinal digestion. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 141, 233-241.
- Phillips, L., Whitehead, D. y Kinsella, J. (1994). Protein films. . In L. Phillips, D. Whitehead y J. Kinsella (Eds.), *Structure-function properties of food proteins*. (pp. 111-130): Academic Press
- Pignata, S., Maggini, L., Zarrilhi, R., Rea, A. y Acquaviva, A. M. (1994). The Enterocyte-like Differentiation of the Caco-2 Tumor Cell Line Strongly Correlates with Responsiveness to cAMP and Activation of Kinase A Pathway'. *Cell Growth & Differentiation* 5, 967-973.
- Pilosof, A. M. R. (2016). Potential impact of interfacial composition of proteins and polysaccharides stabilized emulsions on the modulation of lipolysis. The role of bile salts. *Food Hydrocolloids*.
- Pinheiro, A. C., Coimbra, M. A. y Vicente, A. A. (2016). In vitro behaviour of curcumin nanoemulsions stabilized by biopolymer emulsifiers – Effect of interfacial composition. *Food Hydrocolloids*, 52, 460-467.
- Porter, C. J. H., Wasan, K. M. y Constantinides, P. (2008). Lipid-based systems for the enhanced delivery of poorly water soluble drugs. *Adv Drug Deliv Rev*, 60(6), 615-616.
- Prins, A. y van Kalsbeek, H. K. A. I. (1998). Foaming behaviour and dynamic surface properties of liquids. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 3(6), 639-642.
- Pugnaloni, L. A., Dickinson, E., Ettelaie, R., Mackie, A. R. y Wilde, P. J. (2004). Competitive adsorption of proteins and low-molecular-weight surfactants: computer simulation and microscopic imaging. *Advances in Colloid and Interface Science*, 107(1), 27-49.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E. y Miller, R. (2009). Lipases at interfaces: a review. *Adv Colloid Interface Sci*, 147-148, 237-250.
- Sandra, S., Decker, E. y McClements, D. (2008). Effect of Interfacial Protein Cross-Linking on the in Vitro Digestibility of Emulsified Corn Oil by Pancreatic Lipase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7488-7494.
- Sanz, T., Falomir, M. y Salvador, A. (2015). Reversible thermal behaviour of vegetable oil cellulose ether emulsions as fat replacers. Influence of glycerol. *Food Hydrocolloids*, 46, 19-27.
- Saravacos, G., Taoukis, P., Krokida, M., Karathanos, V., Lazarides, H., Stoforos, N., Tzia, C., Yanniotis, S., Kaufmann, S. F. M. y Palzer, S. (2011). 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11) Food structure engineering for nutrition, health and wellness. *Procedia Food Science*, 1, 1479-1486.
- Sarkar, A., Goh, K. K. T. y Singh, H. (2009). Colloidal stability and interactions of milk-protein-stabilized emulsions in an artificial saliva. *Food Hydrocolloids*, 23(5), 1270-1278.
- Sarkar, A., Goh, K. K. T., Singh, R. P. y Singh, H. (2009). Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by β -lactoglobulin in an in vitro gastric model. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1563-1569.
- Sarkar, A., Horne, D. S. y Singh, H. (2010). Interactions of milk protein-stabilized oil-in-water emulsions with bile salts in a simulated upper intestinal model. *Food Hydrocolloids*, 24, 142-151.

- Sarkar, A., Murray, B., Holmes, M., Ettelaie, R., Abdalla, A. y Yang, X. (2016). In vitro digestion of Pickering emulsions stabilized by soft whey protein microgel particles: influence of thermal treatment. *Soft Matter*, 12(15), 3558-3569.
- Sastre, J., Sabater, L. y Aparisi, L. (2005). Fisiología de la secreción pancreática. *Gastroenterología y Hepatología*, 28.
- Schulze, K. (2006). Imaging and modelling of digestion in the stomach and the duodenum. *Neurogastroenterol Motil*, 18(3), 172-183.
- Seekkuarachchi, I. N., Tanaka, K. y Kumazawa, H. (2006). Formation and characterization of submicrometer oil-in-water (O/W) emulsions, using high-energy emulsification. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 45(1), 372-390.
- Shefer, A. y Shefer, S. (2003). Novel Encapsulation System Provides Controlled Release of Ingredients. *Food Technology*, 57, 40-43.
- Silletti, E., Vingerhoeds, M. H., Norde, W. y van Aken, G. A. (2007). The role of electrostatics in saliva-induced emulsion flocculation. *Food Hydrocolloids*, 21(4), 596-606.
- Singh, H. y Ye, A. (2013). Structural and biochemical factors affecting the digestion of protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(4), 360-370.
- Tadros, T. y Vincent, B. (1985). *ENCYCLOPEDIA OF EMULSION TECHNOLOGY* (Vol. 3).
- Teo, A., Goh, K. K. T., Wen, J., Oey, I., Ko, S., Kwak, H.-S. y Lee, S. J. (2016). Physicochemical properties of whey protein, lactoferrin and Tween 20 stabilised nanoemulsions: Effect of temperature, pH and salt. *Food Chemistry*, 197, Part A, 297-306.
- Torcello-Gómez, A. y Foster, T. J. (2014). Interactions between cellulose ethers and a bile salt in the control of lipid digestion of lipid-based systems. *Carbohydrate Polymers*, 113, 53-61.
- Torcello-Gómez, A. y Foster, T. J. (2016). Influence of interfacial and bulk properties of cellulose ethers on lipolysis of oil-in-water emulsions. *Carbohydr Polym*, 144, 495-503.
- Troncoso, E., Aguilera, J. M. y McClements, D. J. (2012). Fabrication, characterization and lipase digestibility of food-grade nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 355-363.
- Tso, P. (2000). Overview of digestion and absorption. In K. D. Crissinger y M. H. Stipanuk (Eds.), *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition* (pp. 75-90.). Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company.
- Tuohy, K. M., Hinton, D. J. S., Davies, S. J., Crabbe, M. J. C., Gibson, G. R. y Ames, J. M. (2006). Metabolism of Maillard reaction products by the human gut microbiota--implications for health. *Mol Nutr Food Res*, 50(9), 847-857.
- Vingerhoeds, M. H., Blijdenstein, T. B. J., Zoet, F. D. y van Aken, G. A. (2005). Emulsion flocculation induced by saliva and mucin. *Food Hydrocolloids*, 19(5), 915-922.
- Walstra, P. (1983). Formation of emulsions. In P. Becher (Ed.), *Encyclopedia of emulsion technology* (Vol. 1).
- Walstra, P. (2003). *Physical Chemistry of Foods*. .
- Wilde, P. J. y Clark, D. C. (1996). Foam formation and stability. In G. M. Hall (Ed.), *Methods of testing Protein Functionality* (pp. 110-148): Blackie Academic & Professional.

- Wu, B.-c., Degner, B. y McClements, D. J. (2013). Creation of reduced fat foods: Influence of calcium-induced droplet aggregation on microstructure and rheology of mixed food dispersions. *Food Chemistry*, 141(4), 3393-3401.
- Yang, L. (2008). Biorelevant dissolution testing of colon-specific delivery systems activated by colonic microflora. *J Control Release*, 125(2), 77-86.
- Ye, A., Cui, J., Zhu, X. y Singh, H. (2013). Effect of calcium on the kinetics of free fatty acid release during in vitro lipid digestion in model emulsions. *Food Chemistry*, 139(1-4), 681-688.
- Zangenberg, N. H., Mullertz, A., Kristensen, H. G. y Hovgaard, L. (2001). A dynamic in vitro lipolysis model. I. Controlling the rate of lipolysis by continuous addition of calcium. *Eur J Pharm Sci*, 14(2), 115-122.
- Zhang, R., Zhang, Z., Zhang, H., Decker, E. A. y McClements, D. J. (2015a). Influence of emulsifier type on gastrointestinal fate of oil-in-water emulsions containing anionic dietary fiber (pectin). *Food Hydrocolloids*, 45, 175-185.
- Zhang, R., Zhang, Z., Zhang, H., Decker, E. A. y McClements, D. J. (2015b). Influence of lipid type on gastrointestinal fate of oil-in-water emulsions: In vitro digestion study. *Food Research International*, 75, 71-78.

OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis consiste en estudiar el impacto de la composición/estructura de la película interfacial de emulsiones O/W en la digestión gastroduodenal, con el propósito de identificar los factores que permiten retardar/inhibir la lipólisis. Para ello se estudiarán dos emulsionantes proteicos (β -lactoglobulina (β lg) y aislado proteico de soja (SPI)) y un polisacárido derivado de la sustitución de la celulosa, la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

Las propiedades funcionales/estructurales de la β lg han sido extensamente estudiadas, motivo por el cual en muchas ocasiones es elegida como modelo de referencia. Han sido caracterizadas no solo sus propiedades superficiales/emulsionantes, sino también su comportamiento durante la digestión gastroduodenal *in vitro*, tanto en solución como a nivel interfacial, por lo que su utilización en la presente tesis resultará de gran utilidad.

La utilización de proteínas vegetales en reemplazo de las animales ha cobrado cada vez mayor importancia, siempre que sea una fuente proteica completa y de alta calidad, que cumpla los requerimientos de aminoácidos esenciales, y reduzca el riesgo de padecer ciertas enfermedades. Las proteínas del poroto de soja no solo presentan estas cualidades, sino que su utilización resulta de interés particular debido a sus excelentes propiedades funcionales, entre ellas la formación y estabilización de emulsiones.

Las HPMC han recibido gran interés debido a sus propiedades fisicoquímicas y numerosas aplicaciones tecnológicas. Al presentar en su estructura grupos hidrofóbicos que le confieren actividad interfacial, las HPMC se han convertido en los principales derivados de la celulosa que presentan una amplia gama de aplicaciones en productos farmacéuticos y formulaciones alimenticias. Por otra parte, su utilización en alimentos resulta de interés, ya que ha sido indicada su capacidad para regular los niveles de colesterol en sangre, así como su resistencia a las enzimas gástricas.

El enfoque del estudio será el siguiente:

1. Caracterizar la lipólisis de las emulsiones O/W en relación a la naturaleza del emulsionante.
2. Estudiar la evolución de las emulsiones y de las películas interfaciales de cada emulsionante durante la digestión gastroduodenal *in vitro*.

3. Estudiar los siguientes factores que podrían impactar tanto en la velocidad como en el grado de lipólisis en relación al tipo de emulsionante utilizado:

3.1 Impacto del tamaño de gota de aceite/área interfacial disponible para la adsorción de la lipasa pancreática.

3.2 Rol de las sales biliares (SB) en cada uno de los sistemas. Las SB son surfactantes biológicos que desarrollan un rol crucial en la actividad de la lipasa pancreática y en la eficiencia del proceso de lipólisis. Por un lado mejoran la emulsificación de los lípidos, interfiriendo en la película interfacial de emulsionante adsorbida, con el propósito de unir el complejo lipasa/colipasa a la interfase O/W. Por este motivo, se evaluará la resistencia que ofrece cada película interfacial de emulsionante a la penetración de las SB en la interfase O/W.

Otro rol clave asociado a la actividad de las SB consiste en la desorción y transporte de los productos de la lipólisis, inhibitorios de la actividad de la lipasa, a través de la solubilización en micelas de SB. En este contexto, se estudiará la capacidad que presentan los emulsionantes para modular la disponibilidad de SB, indispensables para la remoción de dichos productos inhibitorios del proceso de lipólisis.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Aislado proteico de soja (SPI)

Se utilizó un aislado proteico de soja soluble desnaturalizado térmicamente a partir de harina desgrasada de soja, de Sambra S.A. (Brasil). El contenido de proteína ($N \times 6,25$) determinado por el método de Kjeldahl fue de 90,5 %.

1.2. β -lactoglobulina (β lg)

BioPure β -lactoglobulina fue provista por Davisco Foods International, Inc. (Le Sueur, Minnesota, Estados Unidos). Su composición se resume en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de la β lg utilizada.

cantidad proteína (% base seca)	97,8
Cantidad βlg /total proteínas (%)	93,6
Grasa (%)	0,3
Cenizas (%)	1,8
Humedad (%)	5,0

1.3. Hidroxipropilmetilcelulosas (HPMC)

Las hidroxipropilmetilcelulosas Methocell E5LV y E4M (grado alimentario) fueron gentilmente donadas por Colorcon Argentina (representantes de Dow Chemical Company) y empleadas sin purificación posterior.

1.4. Polisorbato 20 (Tween 20)

Con fines comparativos en algunas determinaciones se utilizó Tween 20 (Fluka S.A) como emulsionante de bajo peso molecular. El Tween 20 (monolaureato de sorbitano y óxido de polietileno) (Figura 29), pertenece al grupo de los ésteres de sorbitano. Estos tensioactivos se sintetizan a partir de la reacción de óxidos de olefinas con ésteres grasos de polialcoholes. Se caracterizan por ser líquidos a temperatura ambiente y por su capacidad para formar micelas.

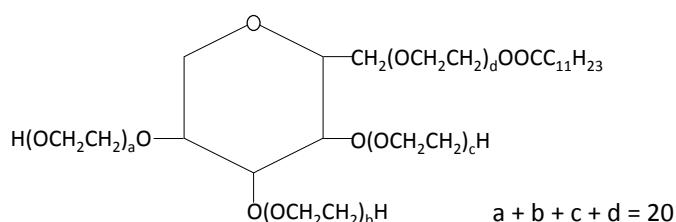


Figura 29. Molécula de Tween 20.

1.5. Aceite vegetal

Se empleó aceite de girasol comercial (de uso común en la industria de alimentos) sin purificación posterior como fase oleosa en la preparación de las emulsiones, así como también en los estudios de interfases.

El aceite de girasol contiene triglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos saturados e insaturados. La longitud de la cadena alquílica varía entre 14 y 22 (Wüstneck, Moser y Muschiolik, 1999).

Se usó aceite de girasol purificado para algunas de las mediciones en interfases. Para ello se dejó interactuar al aceite comercial de girasol con un compuesto (Florisil 60-100 Mesh, Aldrich®) atrapante de las sustancias tensioactivas del aceite (fosfolípidos, ácidos grasos libres, monoglicéridos) durante 24 hs. A continuación se filtró (0,22 mm) la fase superior (Bahtz y col., 2009).

2. Métodos

2.1. Preparación de soluciones de emulsionantes

Las soluciones de proteínas se prepararon disolviendo, a temperatura ambiente, el polvo en agua bidestilada (a la concentración deseada). Para prevenir el crecimiento microbiano, se adicionó azida sódica (NaN_3) en una concentración de 0,02% p/p.

En el caso de los polisacáridos, se prepararon las soluciones de HPMC disolviendo a 80-90 °C el polvo en agua bidestilada y luego enfriando hasta temperatura ambiente.

Todas las soluciones se almacenaron a 4°C durante 24 hs para lograr una completa hidratación del polímero.

2.2. Obtención de emulsiones O/W por tratamiento con ultrasonidos de alta intensidad

Se prepararon emulsiones O/W en una relación 10/90: sobre una solución de 4,5 ml de emulsionante (2% p/p) se colocaron 0,5 ml de aceite de girasol a fin de obtener un volumen final de 5 ml de emulsión. Esta mezcla se homogeneizó mediante la aplicación de ultrasonidos durante 20 min, usando un procesador ultrasónico Vibra Cell Sonics, modelo VCX 750 (potencia neta máxima: 750 W) (Figura 30) a una frecuencia de 20 kHz y una amplitud de 20% (amplitud máx. 40%). Se empleó una sonda de aleación de titanio acoplada a un microtip de 3 mm de diámetro. Para asegurar la homogeneidad del efecto de las ondas ultrasónicas sobre la muestra se debe colocar la punta del microtip en la

interfase existente entre el aceite y el agua. De esta forma, la muestra se sonicó a temperatura controlada, colocándola en un tubo de vidrio de 10 ml sumergido en un baño de glicerina. El baño se mantuvo a temperatura constante mediante una camisa con circulación de agua a 0,5 °C (Polystat, Cole-Parmer). A esta temperatura se disipa totalmente el calor producido durante el proceso de sonicación, manteniendo la muestra por debajo de los 25°C (Camino y Pilosof, 2011).



Figura 30. Equipo de ultrasonido de alta intensidad utilizado para la obtención de emulsiones O/W.

2.3. Caracterización de las emulsiones O/W

2.3.1. Dispersión estática de luz

Los diámetros promedio y las curvas de distribución de tamaño de las gotas de aceite de las diferentes emulsiones se determinaron por dispersión estática de luz en un equipo analizador de partículas Mastersizer 2000 (Figura 31), que cuenta con una unidad de dispersión Hydro 2000MU provisto con un láser He-Ne (633 nm) (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra). El rango de medición del equipo se encuentra entre los 0,1 μm a 1000 μm y la velocidad de la hélice se mantuvo en 1800 rpm. Se utilizó el índice de refracción (IR) de la fase dispersa (1,47) y su parámetro de absorción (0,001). A partir de la distribución de tamaño de partícula se obtuvieron los diámetros promedio: $[D_{3,2}]$ y $[D_{4,3}]$, siendo $[D_{3,2}]$ el diámetro promedio de volumen-superficie o diámetro de Sauter ($[D_{3,2}] = \sum n_i d_i^3 / \sum n_i d_i^2$), donde n_i es el número de partículas de diámetro d_i (Huang, Kakuda y Cui, 2001; Leroux, Langendorff, Schick, Vaishnav y Mazoyer, 2003). Por otra

parte, el $[D_{4,3}]$ se define como el diámetro promedio de volumen equivalente o diámetro de Broucker ($[D_{4,3}] = \Sigma n_i d_i^4 / \Sigma n_i d_i^3$), donde n_i es el número de partículas de diámetro d_i (Galazka, Dickinson y Ledward, 1996; Gu, Decker y McClements, 2005; Güzey, Kim y McClements, 2004; Huang y col., 2001; Leroux y col., 2003). El diámetro $[D_{3,2}]$ brinda una medida del diámetro promedio en donde se encuentran la mayoría de las gotas de aceite, mientras que el diámetro $[D_{4,3}]$ está relacionado con cambios en el tamaño de gota que involucran procesos de desestabilización.

Se informa también el área interfacial específica o área superficial por unidad de masa de la fase dispersa (AIE), determinada a partir del diámetro $[D_{3,2}]$ (Carrera Sanchez y Rodriguez Patino, 2005; Cornec y col., 1998) como se indica en la Ecuación 3 (Walstra, 1983):

$$AIE = 6 \cdot \phi / D_{3,2} \quad [Ecuación 3]$$

donde ϕ es la fracción volumétrica.

Para corroborar la estabilidad de las emulsiones obtenidas se determinó la variación de los parámetros a lo largo del tiempo (durante 24 h).



Figura 31. Analizador de partículas Mastersizer 2000.

2.3.2. Microscopia óptica

La microestructura de las emulsiones O/W se evaluó colocando alícuotas de 0,2 ml de emulsión (sin dilución previa) sobre un portaobjetos. El cubreobjetos (22 x 22 mm) se colocó cuidadosamente y sin deslizamiento para no inducir la coalescencia de las gotas de aceite. Las emulsiones se observaron con un microscopio óptico Olympus Corp. modelo

BX43 (Tokio, Japón) equipado con una cámara digital (Q-Color 3C, Canadá). Se empleó el objetivo de 400X y las muestras se observaron directamente sin agregado de colorantes. Se adquirieron imágenes digitales en formato TIFF en 1024 x 1024 píxeles de resolución mediante el software (Qcapture pro® 6.0, QImaging, Canadá) también de Olympus Corp.

2.4. Digestión gastroduodenal *in vitro* de las emulsiones O/W

2.4.1. Fluidos que simulan las condiciones de digestión gástrica y duodenal

Las condiciones de digestión gástrica fueron simuladas a partir de la utilización de un fluido (fluido gástrico simulado (FGS)) que representa las condiciones de pH y fuerza iónica características del estómago humano (Kalantzi y col., 2006). El mismo consistió en una mezcla de sales formadas por: NaCl (100 mM), CaCl₂ (3mM), NaH₂PO₄ (5 mM) y KCl (22 mM), ajustada a pH 2,5 con cantidad suficiente de HCl (1M). En el FGS se diluyen los componentes característicos del medio gástrico como fosfatidilcolina (PC, P3556 Sigma Aldrich®) y pepsina (mucosa gástrica porcina, P7000 Sigma Aldrich®) a concentraciones fisiológicas (Macierzanka, Sancho, Mills, Rigby y Mackie, 2009).

Por otra parte, las condiciones de digestión duodenal fueron simuladas a partir de la utilización del fluido intestinal simulado (FIS), consistente en una mezcla compleja de iones (39 mM de K₂HPO₄, 150 mM de NaCl y 30 mM de CaCl₂) ajustada a pH 7, según el protocolo reportado por Sarkar, Horne y Singh (2010b). En este último, se llevó a cabo la dilución de los diferentes componentes fisiológicos que participan en la digestión duodenal, entre ellos: sales biliares (Páncreas bovino, B3883 Sigma Aldrich®), tripsina (Páncreas bovino, T8003 Sigma Aldrich®), α-quimotripsina (Páncreas bovino, C4129 Sigma Aldrich®) y lipasa pancreática tipo II (Páncreas porcino, L0382 Sigma Aldrich®), todos a concentración fisiológica.

2.4.2. Proceso de simulación de la digestión gastroduodenal *in vitro* de las emulsiones O/W

Tras verificar que las emulsiones O/W obtenidas eran estables por un período de tiempo no inferior a 24 horas, se sometieron a un proceso de digestión gastroduodenal *in vitro*, consistente en una etapa gástrica (1 hora a pH 2,5) seguida de una etapa duodenal (1 hora a pH 7,0). Este proceso se llevó a cabo a temperatura fisiológica (37 °C), bajo agitación constante en un vaso de vidrio con doble camisa (Figura 32). En primer lugar, se

colocaron 15 ml de emulsión en el recipiente de reacción, donde fueron temostatizados a 37 °C durante 10 min. A continuación se incorporaron 15 ml FGS en presencia de concentraciones fisiológicas de PC (proteína (1) : PC (1,2)) y pepsina (182 U/mg de proteína) (Macierzanka y col., 2009). De ser necesario, la mezcla resultante se ajustó a pH 2,5 utilizando HCl 1M. Finalizada la digestión gástrica (1 h), la mezcla resultante se ajustó a pH 7 con NaOH 1M. El aumento de pH (de 2,5 a 7) pone fin a la etapa gástrica de la digestión, originando la inactivación de la pepsina (Piper y Fenton, 1965).

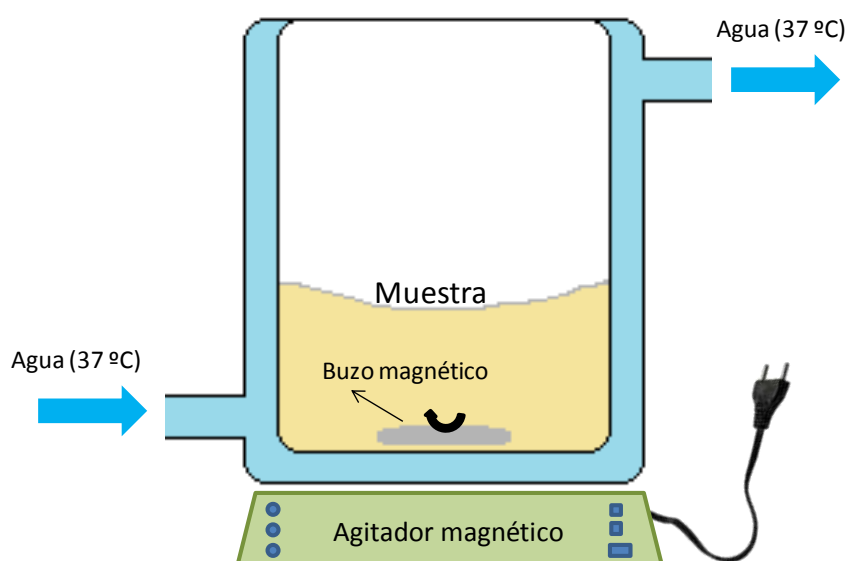


Figura 32. Esquema del recipiente utilizado para llevar a cabo el proceso de digestión *in vitro*.

A continuación, la etapa intestinal de la digestión comenzó con la incorporación a la mezcla del FIS en presencia de concentraciones fisiológicas de SB (5 mg/ml), lipasa pancreática (200000 U) y las proteasas, tripsina y α -quimotripsina en una proporción de 34,5 U y 0,44 U de enzima por mg de proteína, respectivamente. La mezcla se mantuvo por 1 hora en condiciones de digestión duodenal, manteniendo el pH en un valor constante (pH 7) a partir de la adición de cantidad necesaria de NaOH (0,5 M) (Jiménez-Saiz, Ruiz-Henestrosa, López-Fandiño y Molina, 2012; McClements y Li, 2010; Sarkar, Goh, Singh y Singh, 2009; Sarkar, Horne y Singh, 2010a). Para detener las reacciones y finalizar con el proceso de digestión *in vitro*, las enzimas fueron inactivadas empleando concentraciones adecuadas de inhibidores: inhibidor de tripsina y quimotripsina, para las

proteasas intestinales (Proteína de soja, T9777 Sigma Aldrich®) y Orlistat (O4139 Sigma Aldrich®) para detener la actividad de la lipasa pancreática.

2.5 Caracterización de las emulsiones O/W durante la digestión gastroduodenal *in vitro*

A lo largo del proceso de digestión *in vitro* de las emulsiones se realizaron determinaciones con objeto de evaluar el impacto del proceso digestivo sobre estas.

2.5.1. Cambios en el tamaño de partícula

A lo largo del proceso digestivo se analizó la variación de la distribución del tamaño de las gotas de aceite de las emulsiones, los diámetros promedios y el área interfacial específica, según se indicó en el apartado 2.3.1 (analizador de tamaño de partículas (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Inglaterra)) y se estudió también la variación del tamaño de las gotas de aceite por microscopía óptica, como se describió en el apartado 2.3.2. Para tal fin se procedió a la toma de muestras en el tiempo durante la etapa gástrica de la digestión (al inicio, tras la incorporación de pepsina (t_g 0 min), y al final (t_g 60 min)), así como también durante la etapa duodenal (a los 10 minutos de incorporadas las enzimas duodenales (t_d 10 min) y a los 60 minutos finales (t_d 60 min), que representaría el final de la digestión gastroduodenal). Para detener la actividad de la pepsina en las muestras correspondientes a la fase gástrica (t_g 0 min y t_g 60 min), se mezclaron 3 ml de la emulsión parcialmente digerida con la cantidad necesaria de NaHCO_3 (1 M) para ajustar el valor del pH de la mezcla a 7. Por otra parte, las muestras (3 ml) tomadas durante la fase intestinal (t_d 10 min y t_d 60 min) se mezclaron con inhibidor de tripsina y quimotripsina y con Orlistat, poniendo fin de esta forma a la actividad de las enzimas duodenales (Singh, Ye y Horne, 2009).

2.5.2. Caracterización del grado de lipólisis

El grado de lipólisis se determinó a partir del porcentaje de AG liberados (% AGL), durante la etapa duodenal, por acción de la lipasa pancreática. Para tal fin se procedió a la neutralización de los AG producidos durante el proceso, utilizando una solución de NaOH 0,5 M. De esta manera, el volumen de NaOH gastado (V_{NaOH}) para mantener el sistema a pH constante (pH 7) puede vincularse al % AGL, a partir de la siguiente ecuación (Ecuación 4) (Li y McClements, 2010):

$$\% \text{ AGL} = ((V_{\text{NaOH}}(t) * M_{\text{NaOH}} * MW_{\text{TG}}) / m_{\text{TG}} * 2) * 100 \quad [\text{Ecuación 4}]$$

donde M es la concentración molar de la solución de NaOH utilizada, MW_{TG} es el peso molecular promedio de un triglicérido (TG) y m_{TG} corresponde a la masa de triglicéridos presentes al momento de incorporar la lipasa pancreática. El valor de MW_{TG} se estimó a partir de la composición promedio de un TG típico de aceite de girasol, considerando la composición de este en ácidos grasos y el peso molecular de cada uno (Chowdhury, Banu, Khan y Latif, 2007; Rosa y col., 2009). Para la determinación de m_{TG} se tuvo en cuenta el % de TG del aceite utilizado y como la mezcla de digestión contiene 15 ml de emulsión O/W (10/90), el aporte total de aceite será de 1,5 ml, o bien 1,387 g (considerando que la densidad del aceite de girasol es 0,925 g/ml). En base a esto, el valor de m_{TG} surge de considerar el % de TG correspondientes a 1,387 g de muestra. Es importante considerar que para el correcto cálculo de m_{TG} habrá que considerar la masa de aceite retirada durante la fase gástrica, antes de iniciar la fase duodenal, es decir en los muestreos correspondientes a t_g 0 min y t_g 60 min.

La Ecuación 4, utilizada para la estimación del % AGL, tiene en cuenta el hecho de que una molécula de TG es capaz de dar origen a 2 moléculas de AG (titulables) y una molécula de MG, durante el proceso de lipólisis. Es decir, que por cada equivalente de TG (que dará lugar a dos equivalentes de AG), se requieren 2 equivalentes de NaOH para su titulación (Li y col., 2010; McClements y col., 2010).

2.6. Digestión *in vitro* de solución de los emulsionantes

Se llevó a cabo la digestión gastroduodenal *in vitro* de solución de los emulsionantes proteicos, empleando el protocolo descrito en el apartado 2.4 con algunas modificaciones. Para tal fin, se mezclaron 5 ml de solución proteica con 5 ml de solución de pepsina (182 U enzimáticas/mg de proteína) preparada en FGS. La mezcla se mantuvo a pH 2,5 en agitación constante y 37 °C durante 1 hora mediante la circulación de agua termostatzada. El proceso digestivo continuó con la etapa duodenal, a partir del incremento del pH a 7 (NaOH 1M) y la incorporación de 5 ml de FIS en presencia de las proteasas pancreáticas (tripsina y quimotripsina) a concentraciones fisiológicas (34,5 U y 0,44 U enzimáticas/mg de proteína respectivamente). La mezcla se mantuvo por 1 hora a 37 °C y agitación controlada.

2.6.1. Análisis de los digeridos por electrofresis SDS-PAGE

A lo largo de la digestión gastroduodenal *in vitro* de las soluciones proteicas, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos. Para detener la actividad de la pepsina las alícuotas correspondientes a la fase gástrica se ajustaron a pH 7 (NaHCO_3 0,5M). Por su parte, la actividad de las proteasas duodenales fue inhibida utilizando cantidad suficiente de inhibidor de tripsina y quimotripsina.

Finalmente, los digeridos fueron analizados por electroforesis SDS-PAGE en un equipo Mini-Protean II de Bio-Rad Laboratories (Hercules, Estados Unidos) en condiciones desnaturalizantes utilizando dodecil sulfato de sodio (10 % p/p) (del Castillo-Santaella, Sanmartín, Cabrerizo-Vílchez, Arboleya y Maldonado-Valderrama, 2014). Todos los reactivos utilizados en los ensayos de electroforesis fueron de Bio Rad.

Las alícuotas provenientes de la digestión *in vitro* se mezclaron con buffer de muestra en proporción 1:4 (2M Tris-Base, pH 6,8, SDS, Glicerol y Azul de Bromofenol). Las concentraciones de acrilamida utilizadas fueron 12% y 5% para el gel separador y concentrador respectivamente. El buffer de corrida consistió en una mezcla de Tris-HCl (0,025 M), glicina y SDS a pH 8,3. Las electroforesis fueron realizadas a 200 Voltios y tuvieron una duración aproximada de 45 minutos.

El estándar de pesos moleculares (Dual-Color) utilizado consistió en una mezcla de 10 proteínas recombinantes con pesos moleculares en el rango de 10-250 kDa (www.bio-rad.com).

Luego de terminada la corrida se tiñeron los geles con una solución de azul brillante de coomassie (0,1 % p/v en una mezcla 8:1:1 agua: metanol: ácido acético glacial) y finalmente desteñidos utilizando una mezcla 1:1 metanol: ácido acético glacial (Bollag y Eldestein, 1991).

2.7. Digestión *in vitro* de la película interfacial en la interfase O/W

Con objeto de obtener un mayor entendimiento del impacto que ejerce la estructura interfacial frente a las condiciones típicas de la digestión, se determinó el efecto de los diferentes componentes de la digestión sobre las películas interfaciales (O/W) que forma cada uno de los sistemas, utilizando equipos de caracterización interfacial.

Todo el material de vidrio utilizado en los equipos de caracterización interfacial fue limpiado cuidadosamente para eliminar residuos de grasa o cualquier sustancia que

pueda interferir superficialmente. Para ello, en primer lugar el material debe lavarse con agua y detergente, enjuagarse con abundante agua, a continuación tratarse unos minutos con una mezcla compuesta por ácido sulfúrico concentrado y persulfato de amonio, y finalmente enjuagarse con agua bidestilada varias veces.

2.7.1. Tensiómetro interfacial de gota (OCTOPUS)

Se determinó la variación de los parámetros interfaciales de los films localizados en la interfase O/W cuando son sometidos al proceso de digestión *in vitro*, comentado en el apartado 2.4. Tales determinaciones se realizaron utilizando un tensiómetro interfacial (denominado OCTOPUS), diseñado y ensamblado en la universidad de Granada (Granada, España), empleando el método de la gota pendiente (Figura 33) (Maldonado-Valderrama, Torcello-Gómez, del Castillo-Santaella, Holgado-Terriza y Cabrerizo-Vílchez, 2015).

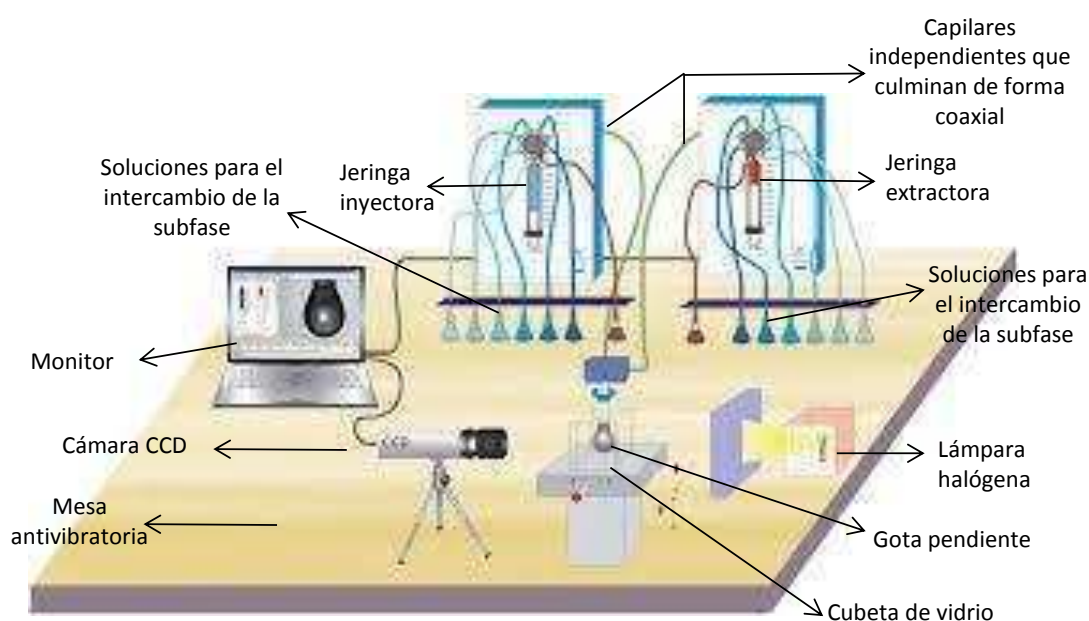


Figura 33. Representación esquemática del tensiómetro interfacial OCTOPUS.

Se pueden distinguir diferentes partes en el tensiómetro interfacial OCTOPUS:

- ✓ El dispositivo de intercambios múltiples de la subfase (Figura 34), constituido por un sistema de micro-inyección, formado por dos jeringas del tipo Hamilton unidas a una serie de capilares: cada jeringa contiene un cabezal rotatorio en la parte superior que permite su conexión a un sistema constituido por 8 capilares, 6 de los cuales se conectan a recipientes que contienen las soluciones de interés, otro que se conecta a un recipiente

de desecho, mientras que el capilar restante constituye el sistema de doble capilar necesario para realizar los intercambios de la subfase. Este último consiste en un sistema formado por dos capilares independientes (uno de cada jeringa) que culminan, de manera coaxial, donde tiene lugar la formación de la gota pendiente y los intercambios de la subfase. Estos intercambios se llevan a cabo de manera que se retira el fluido a intercambiar por el capilar externo, mientras que el fluido que dará lugar a la nueva subfase ingresará por el interno, como se explicará en los siguientes apartados.

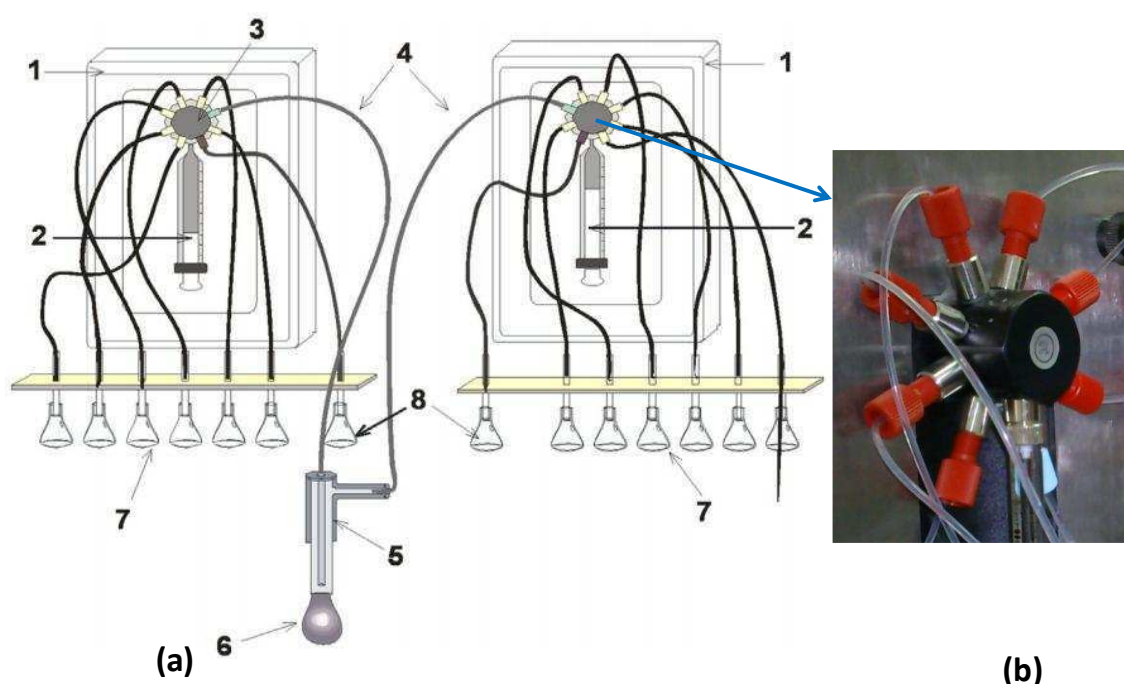


Figura 34. (a) Dispositivo de intercambios múltiples de la subfase: 1) Dispositivo de micro-inyección, 2) Jeringas Hamilton, 3) Cabezal rotatorio, 4) Capilares que constituyen el sistema de doble capilar, 5) Arreglo coaxial de capilares, 6) Gota pendiente, 7) Recipientes que contienen las soluciones de interés, 8) Recipientes para la recolección de soluciones de descarte. (b) Fotografía del cabezal rotatorio unido a la jeringa por la parte inferior y a los 8 capilares.

- ✓ Una lámpara halógena que ilumina la gota de manera uniforme.
- ✓ Una cámara CCD (Pixelink®) conectada a un microscopio óptico (Edmund Optics®), con el que se capturan imágenes del perfil de la gota, que se visualizan en un monitor.
- ✓ Una cubeta de vidrio, donde se forma la gota pendiente, por alrededor de la cual circula agua templada, permitiendo así regular la temperatura. En este caso, para simular las condiciones fisiológicas de la digestión, la temperatura se mantuvo en 37 °C durante todo el experimento.

✓ Por medio de un software (DINATEN, diseñado también por miembros de la Universidad de Granada), se procesan las imágenes de acuerdo a la ecuación de Laplace, lo que determina de manera práctica y en cortos periodos de tiempo el volumen de la gota (V), la tensión interfacial (γ) y el área interfacial (A) a lo largo del experimento.

Además de la variación de γ con el tiempo, se puede obtener la respuesta de γ al someter el área de la interfase a una deformación, llevada a cabo mediante expansiones y contracciones de carácter sinusoidal del volumen de la gota (de amplitud y frecuencia fijas), lo cual produce la variación de la concentración interfacial del agente tensioactivo adsorbido en la interfase, causante de esa respuesta (Figura 35). En este caso, la amplitud se mantuvo en un valor inferior al 10 % (referido al volumen inicial de la gota (10 μ l)) y en una frecuencia de oscilación de 0,1 Hz, para garantizar que los parámetros obtenidos tras la deformación fueran independientes de la misma. Como respuesta a la variación de la tensión interfacial (Ecuación 5) causada por la deformación sinusoidal aplicada en el área (Ecuación 6), se obtiene el valor del módulo elástico dilatacional (E) de la película de emulsionante (Ecuación 7) que permitirá describir el comportamiento reológico de cada interfase.

$$\gamma = \gamma_0 \cdot \sin(\omega\theta + \Phi) \quad [\text{Ecuación 5}]$$

$$A = A_0 \cdot \sin(\omega\theta) \quad [\text{Ecuación 6}]$$

$$E = d\gamma / (dA/A) = -d\pi / d\ln A \quad [\text{Ecuación 7}]$$

donde γ_0 y A_0 son las amplitudes del esfuerzo y de la deformación respectivamente, Φ es el ángulo de fase entre el esfuerzo y la deformación, θ es el tiempo y ω la frecuencia de la oscilación.

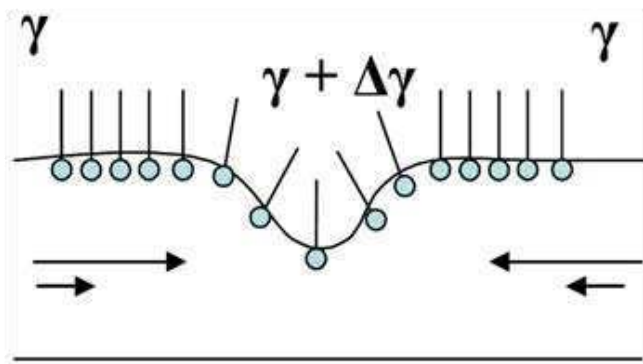


Figura 35. Respuesta de γ ante una deformación del área interfacial.

2.7.2. Proceso de intercambios de la subfase: digestión interfacial

Para llevar a cabo la simulación del proceso digestivo sobre cada película interfacial se prosiguió de acuerdo al siguiente protocolo:

- *Etapas 1 (Control)*: En primer lugar, se formó una gota (10 μ l) con solución de emulsionante por medio del capilar externo, en el interior de la cubeta de vidrio que contiene el aceite de girasol previamente purificado (apartado 1.5). De esta manera se crea la interfase O/W sobre la cual se adsorberán las moléculas de emulsionante, formando una película interfacial característica que se someterá, a continuación, al proceso de digestión *in vitro*.

Tabla 3. Etapas de la digestión gastroduodenal interfacial y composición de los fluidos empleados.

Etapas	Composición
1-Control	Solución acuosa de emulsionante al 1% p/p
2-FGS	NaCl, CaCl ₂ , NaH ₂ PO ₄ , KCl, pH 2,5 + Pepsina
3-FIS 1	NaCl, CaCl ₂ , NaH ₂ PO ₄ , pH 7 + Tripsina y Quimotripsina
4-FIS 2	NaCl, CaCl ₂ , K ₂ HPO ₄ , pH 7 + Lipasa pancreática y SB
5-DES	NaCl, CaCl ₂ , K ₂ HPO ₄ , pH 7

En la Tabla 3 se muestran las diferentes soluciones empleadas en cada una de las etapas del proceso de digestión. Cabe destacar que, a diferencia de la digestión de las emulsiones, se desestimó la utilización de PC en la etapa gástrica, debido a que su elevada actividad interfacial podría enmascarar los efectos de la proteólisis llevada a cabo por la pepsina. Además, la digestión duodenal se realizó en dos fases (Tabla 3), a modo de analizar por separado los efectos de la proteólisis y la lipólisis. Cada una de estas soluciones se colocaron en diferentes eppendorf, los cuales están conectados directamente a la jeringa micro-inyectora por medio del sistema de capilares como se esquematiza en la Figura 36.

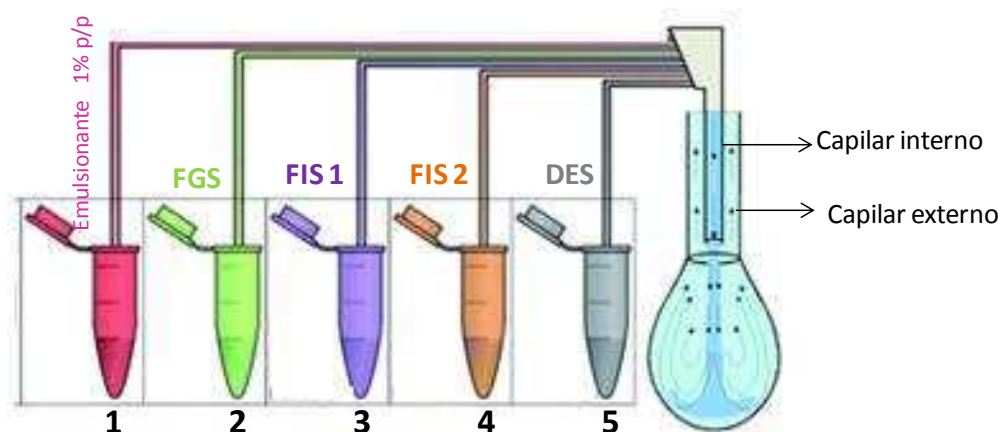


Figura 36. Representación esquemática del dispositivo de intercambio de la subfase.

De esta manera, la solución de emulsionante necesaria para llevar a cabo la primer etapa del proceso (Tabla 3) se colocó en el primer eppendorf de la serie (eppendorf 1, Figura 36).

- *Etapa 2 (FGS):* Una vez que se alcanzó un valor constante de γ , lo que indica que la interfase se ha saturado de moléculas de emulsionante, se procedió a la realización del primer intercambio de la subfase. Por el capilar interno del arreglo coaxial de los capilares (Figura 36) se incorporó el fluido que simula las condiciones de digestión gástrica (FGS), proveniente del segundo eppendorf de la serie (Tabla 3). En simultáneo con la incorporación del FGS, se fue retirando por el capilar externo la solución de la etapa anterior (solución de emulsionante al 1%) como se esquematiza en la Figura 37. Tanto la inyección como la extracción de los fluidos de la subfase se realizan simultáneamente y a igual velocidad, a modo de garantizar que no existan cambios en el volumen de la gota pendiente y minimizar posibles efectos en las características de la interfase. El proceso de intercambio de la subfase se realizó un total de 16 veces (16 extracciones del fluido por el capilar externo, junto con 16 inyecciones del fluido nuevo por el capilar interno), mientras se registra la variación de la tensión interfacial. El hecho de realizar 16 intercambios de la subfase, es necesario para asegurar que las nuevas condiciones han sido reemplazadas, es decir que el fluido recientemente incorporado ocupa el total de la subfase y no quedan trazas del fluido anterior (Figura 37). Finalizado el primer intercambio, tendrá lugar la digestión gástrica del film interfacial adsorbido (del Castillo-Santaella y col., 2014).

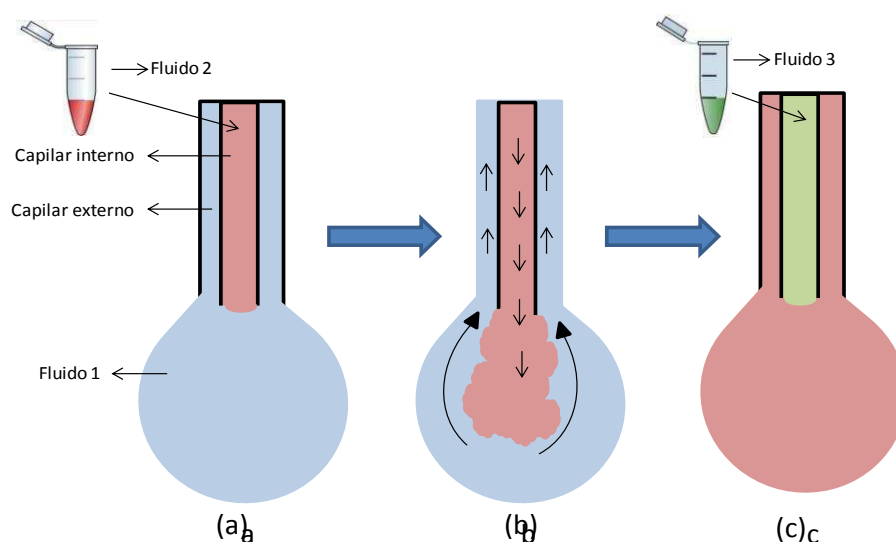


Figura 37. Esquema general del proceso de intercambio de la subfase: (a) La subfase está formada por el fluido 1. (b) La subfase es intercambiada: mientras por el capilar interno ingresa el fluido 2, se retira el fluido 1 por el capilar externo. (c) La subfase está formada por el fluido 2. En el capilar interno está listo para ingresar el fluido 3, que dará lugar al siguiente intercambio.

- *Etapa 3 (FIS 1):* A continuación, se repitió el proceso de intercambio de la subfase, incorporando en este caso el fluido (FIS 1, según la Tabla 3) que simula las condiciones de digestión duodenal (eppendorf 3, Figura 36) por el capilar interno, mientras es retirado el FGS por el capilar externo (Figura 37). Esta etapa corresponde a la proteólisis duodenal de la película interfacial (en presencia de las proteasas: tripsina y quimotripsina) y durante la misma se realizó el seguimiento de la variación de γ .

- *Etapa 4 (FIS 2):* A continuación, se llevó a cabo el intercambio de la subfase por el FIS 2 (Tabla 3) en presencia de concentraciones fisiológicas de lipasa pancreática y SB (eppendorf 4, Figura 36), con objeto de llevar a cabo la simulación del proceso de lipólisis duodenal. Como en todas las etapas, se realizó un seguimiento de la variación de γ con el tiempo. Esta sería la etapa final del proceso digestivo *in vitro*; sin embargo, con fines de remover el material adsorbido de manera reversible en la interfase (productos de la digestión, componentes del medio, etc.) y obtener las características del film interfacial remanente, se procedió a un último intercambio (etapa DES, Tabla 3).

- *Etapa 5 (DES):* Esta etapa consiste en el intercambio de la subfase por el FIS en ausencia de enzimas o biopolímeros (eppendorf 5, Figura 36), manteniendo únicamente las condiciones de pH y fuerza iónica del medio (del Castillo-Santaella y col., 2014), donde se registró nuevamente la variación de γ en el tiempo.

Por otra parte, se determinó el módulo dilatacional interfacial de la película adsorbida al final de cada etapa del proceso de digestión, a modo de realizar la caracterización reológica de la película interfacial sometida al proceso de digestión *in vitro*. Para tal fin, se realizaron deformaciones sinusoidales de la gota pendiente (10 ciclos de expansión-contracción), como se explicó antes en el apartado 2.7.1.

2.8. Comportamiento interfacial de los emulsionantes en presencia de las sales biliares

Teniendo en cuenta el significativo rol de las SB en la digestión de los lípidos (Sarkar, Ye y Singh, 2016), se evaluó el efecto que presenta una solución de las mismas en concentración fisiológica, sobre los films interfaciales. Para tal fin, se empleó otro equipo de caracterización interfacial (tensiómetro interfacial PAT-1 (SINTERFACE Technologies, Berlín, Alemania), a partir del cual se determinó la variación de la tensión interfacial y la reología dilatacional.

2.8.1. Tensiómetro interfacial de gota PAT-1

El equipo utilizado (Figura 38), cuenta con un sistema de inyección que permite la formación de una gota (12 µl), con la solución del emulsionante, en la punta de un capilar inmerso en una cubeta de vidrio, la cual contiene el aceite de girasol purificado utilizado como fase oleosa (apartado 1.5). La cubeta se encuentra dentro de un compartimiento termostatzado que permite mantener la temperatura en condiciones fisiológicas (37 °C). El tensiómetro, además cuenta con un sistema óptico formado por una fuente de luz, lentes y una cámara CCD que permite obtener imágenes de la gota en una computadora. Para disminuir el efecto de perturbaciones, provenientes del exterior, este tipo de equipos deben estar apoyados sobre una mesa antivibratoria y contar con una unidad de protección. De manera similar a lo comentado con el OCTOPUS (apartado 2.7.1), el perfil de la gota es ajustado a la ecuación de Young-Laplace (Ecuación 8), lo que permite determinar de manera automática y en cortos periodos de tiempo la variación de la tensión interfacial:

$$\frac{1}{x} \cdot \frac{d}{dx} \cdot (x \cdot \sin\Phi) = \frac{2}{b} - C \cdot z \quad [\text{Ecuación 8}]$$

donde x y z son las coordenadas cartesianas de cualquier punto del perfil de la gota; b es el radio de curvatura en el punto más bajo de la gota; Φ es el ángulo de la tangente al

perfil de la gota y C es la constante de capilaridad ($C = g \cdot \Delta\rho/\gamma$; donde γ es la tensión superficial, $\Delta\rho$ es la diferencia entre las densidades de los dos fluidos y g es la aceleración de la gravedad).

A partir de los valores de γ , es posible obtener la cinética de adsorción interfacial de cada emulsionante analizando los cambios de presión interfacial (π) con el tiempo. La presión interfacial se define como $\pi = \gamma - \gamma_0$, donde γ_0 es la tensión interfacial de la disolución sin emulsionante, y γ es el valor de la tensión interfacial en presencia del mismo.

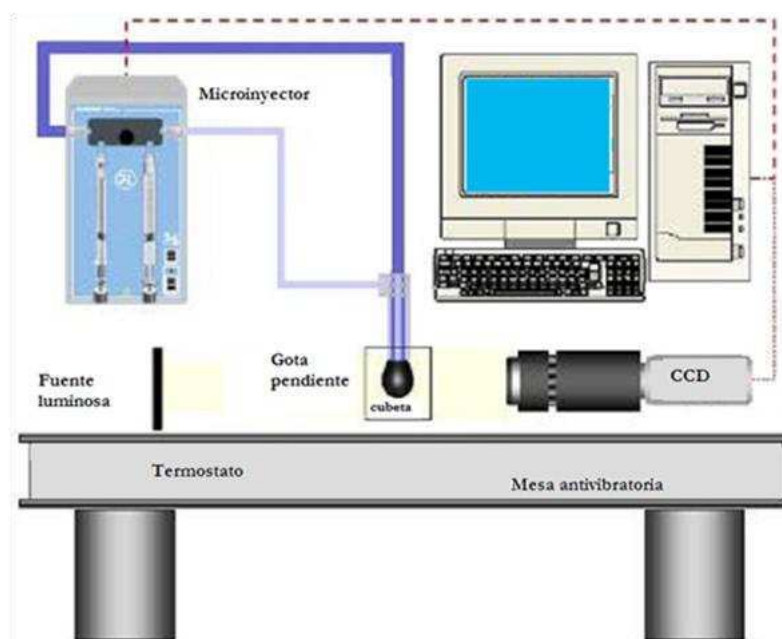


Figura 38. Esquema del tensiómetro interfacial PAT-1.

De forma similar a lo comentado anteriormente (apartado 2.7.1), se determinó la variación de los parámetros viscoelásticos (módulo dilatacional (E) y la viscosidad interfacial (η)) en función del tiempo. Estos parámetros se obtuvieron al someter la gota a una serie de compresiones-expansiones de carácter sinusoidal, controladas automáticamente, a una frecuencia y amplitud de oscilación fija (dentro de la región viscoelástica lineal). De este modo, en todas las experiencias se utilizó un valor de amplitud del 3% del volumen total de la gota y 0,05 Hz de frecuencia (Kazakov y col., 2008). A lo largo de la medida, la gota fue sometida a perturbaciones (consistentes en seis ciclos oscilatorios), seguidas por un tiempo de “relajación”, en el que se mantiene constante el volumen de la gota.

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando la transformación de Fourier, a partir de la cual se obtuvieron los parámetros dilatacionales reológicos (módulo dilatacional,

elasticidad dilatacional y viscosidad dilatacional) de la película interfacial, como se describió en el apartado 2.6.1 (Berthold, Schubert, Brandes, Kroh y Miller, 2007).

El módulo dilatacional es un término complejo que se compone de una parte real y otra imaginaria (Ecuación 9).

$$E = E_d + i \cdot E_v \quad [\text{Ecuación 9}]$$

La parte real del módulo, o componente de almacenamiento, es la elasticidad dilatacional interfacial, $E_d = |E| \cdot \cos\Phi$. La parte imaginaria del módulo, o componente de pérdida, representa a la viscosidad dilatacional interfacial y se define como: $E_v = |E| \cdot \sin\Phi$.

A partir de la relación entre la componente de pérdida y la de almacenamiento puede determinarse también la tangente del ángulo de pérdida (Ecuación 10), que es el desfase existente entre la respuesta de la tensión interfacial (Ecuación 5) con respecto a la deformación que se ha realizado (Ecuación 6). Esta magnitud proporciona una idea de cuán elástico es el comportamiento de la película interfacial, de forma que si su valor es muy pequeño, se considera que la película es prácticamente elástica, y por ello, la respuesta de la película a la perturbación a la que se somete será inmediata. Si por el contrario se trata de un valor alto, nos indicará que en la película hay pérdida de energía suministrada, por lo cual no responderá tan rápidamente a esa perturbación. En estos casos, se asocia a la película un comportamiento viscoso, en cierto grado, que depende del valor del ángulo de pérdida.

$$\tan \phi = E_v/E_d \quad [\text{Ecuación 10}]$$

Para un material perfectamente elástico el esfuerzo y la deformación están en fase ($\phi = 0^\circ$), y el término de la parte imaginaria del módulo es cero. En este caso, la tangente del ángulo de pérdida ($\tan \phi$) es cero. En el caso de un material perfectamente viscoso, $\phi = 90^\circ$, la parte real del módulo es cero y $\tan \phi = 1$.

Para evaluar el impacto que ejerce la presencia de las SB sobre las películas interfaciales, formadas por los diferentes emulsionantes, se realizaron estudios a diferentes niveles:

- En primer lugar, se analizó la actividad de cada uno de los emulsionantes en la interfase O/W.

- Se llevaron a cabo ensayos de adsorción competitiva, en los que se evaluó la capacidad que presenta cada emulsionante de adsorberse, en la interfase O/W, en presencia de las SB a concentración fisiológica (5 mg/ml).
- Por último, mediante ensayos de adsorción secuencial se estudió el efecto que presenta la incorporación de una solución de SB sobre una película interfacial formada previamente. Para estos ensayos se utilizó un sistema de doble capilar similar al descrito en el apartado 2.7.2 y esquematizado en la Figura 39. La metodología consiste en formar una gota con la disolución de emulsionante a través del capilar externo y, transcurrido un tiempo, se intercambia la subfase que se encuentra dentro de esa gota, inyectando la disolución de SB (disueltas en FIS a concentración fisiológica) por el capilar interno. Como se observa en la Figura 39, este equipo cuenta con dos jeringas conectadas a un doble capilar que permite el intercambio de líquido sin alterar la película interfacial. Una de las jeringas se conecta al capilar interno por el que se introducen pequeños volúmenes de la solución de SB, mientras que la segunda jeringa se conecta al capilar externo, que es el que mantiene el tamaño de gota constante (Figura 39).

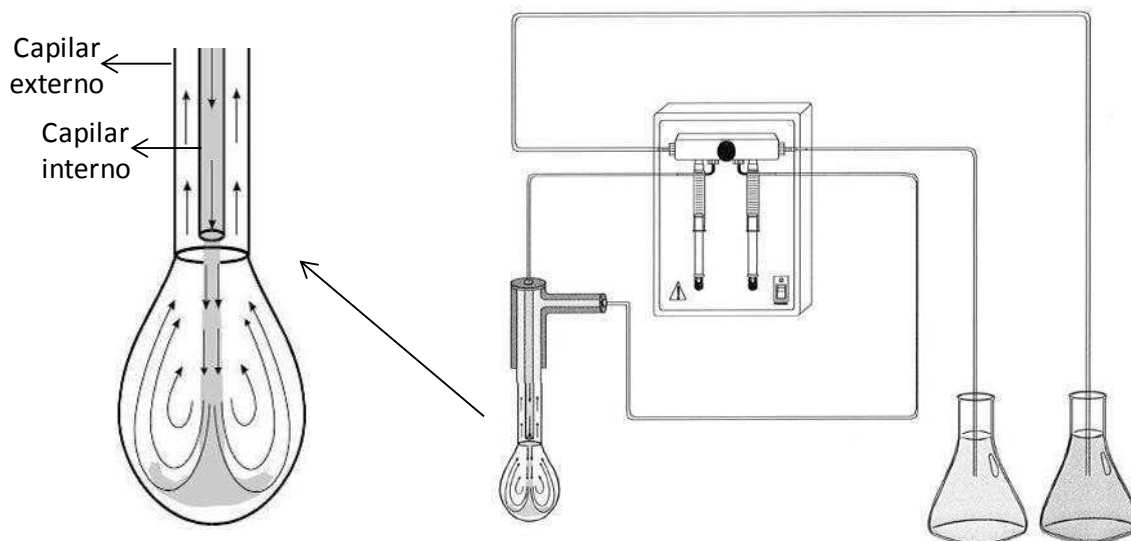


Figura 39. Esquema del sistema de doble capilar con el que se realiza el intercambio de la subfase.

Concluidas las mediciones en cada uno de los tensiómetros interfaciales se procedió con el protocolo de limpieza que consta de repetidos lavados de las jeringas (y sus capilares) con etanol, hexano y finalmente con abundante agua bidestilada.

2.9. Caracterización de las interacciones entre HPMC y las sales biliares

Basándonos nuevamente en el significativo rol que tienen las SB en la digestión de lípidos, se realizaron estudios del grado de interacción existente entre las soluciones de HPMC y SB, tanto en solución acuosa como en emulsiones O/W estabilizadas por las HPMC. Para ello se emplearon diferentes técnicas que se describen a continuación.

2.9.1. Distribución de tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS)

La técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) permite llevar a cabo el estudio de las interacciones que se producen en solución acuosa entre diferentes moléculas. En el presente trabajo se utilizó un analizador Nano Zetasizer, de Malvern Instruments (Worcestershire, Reino Unido), a fin de obtener el tamaño de partícula de las soluciones de HPMC, SB y sus mezclas. El equipo (Figura 40) cuenta con un láser He-Ne (633 nm) y un correlador digital Modelo ZEN3600. Las mediciones se realizaron a un ángulo fijo de 173°, siendo el rango de medida del equipo entre 0,6 nm y 6 μm . Cada una de las muestras utilizadas fueron diluidas lo suficiente y colocadas dentro de cubetas de poliestireno descartables.



Figura 40. Equipo de dispersión dinámica de luz Nano Zetasizer (Malvern Instruments).

El fundamento de este equipo se basa en que la muestra es iluminada con un láser y la intensidad de la luz dispersada por las partículas que forman la muestra fluctúa a una

velocidad que es dependiente del tamaño de estas. El análisis de la intensidad de estas fluctuaciones, permite la obtención del coeficiente de difusión translacional (D) de la partícula, a partir del cual, es posible estimar el tamaño. La relación entre el tamaño de la partícula y el coeficiente de difusión translacional se define por la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 11):

$$d = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad [\text{Ecuación 11}]$$

donde, d es el diámetro hidrodinámico (m), D es el coeficiente de difusión traslacional ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$), k es la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ N m K}^{-1}$), T es la temperatura absoluta (K) y η es la viscosidad del solvente (N s m^{-2}).

Por medio de un ajuste exponencial múltiple (análisis de Contin) se obtiene la intensidad relativa de luz dispersada por las partículas de varias clases de tamaños y es, por lo tanto, conocida como una distribución de tamaño en intensidad (Stepanek, 1993). Aunque la distribución de tamaño fundamental generada por el equipo es la distribución por intensidad, ésta se puede convertir, mediante la teoría de Mie (1908), a distribución en volumen o en número con el objetivo de analizar la importancia de los diferentes picos en relación a la cantidad de partículas que lo conforman. Las distribuciones de tamaño de partícula expresadas en volumen o número darán una visión más realista de la importancia de otras poblaciones presentes en la distribución en intensidad.

Una forma muy simple de describir las diferencias entre las distribuciones de intensidad, volumen y número es considerar por ejemplo dos poblaciones de partículas esféricas de 5 y 50 nm de diámetro presentes en igual cantidad. Si se grafica una distribución en número de estas dos poblaciones de partículas, el gráfico consistirá en dos picos (ubicados a 5 y 50 nm) obteniendo una relación 1:1 (Figura 41a). Si en cambio se grafica una distribución en volumen (Figura 42b), entonces la relación de estos dos picos cambia a 1:1000 (porque el volumen de una esfera es proporcional al diámetro³). Por último en la distribución de intensidad (Figura 42c), la relación entre los dos picos sería de 1:1000000 (porque la intensidad de dispersión es proporcional al diámetro⁶ a partir de la aproximación de Rayleighs) (Malvern-Instruments).

Luego, se utilizó el método de cumulantes para calcular el tamaño promedio (diámetro hidrodinámico promedio o *Z-average*). Los resultados que se obtienen mediante este

análisis son aplicables para citar un único valor promedio, con el propósito de realizar una comparación, pero son inadecuados para dar una completa descripción de los resultados de la distribución en sistemas polidispersos (Malvern Instruments Ltd., 2012).

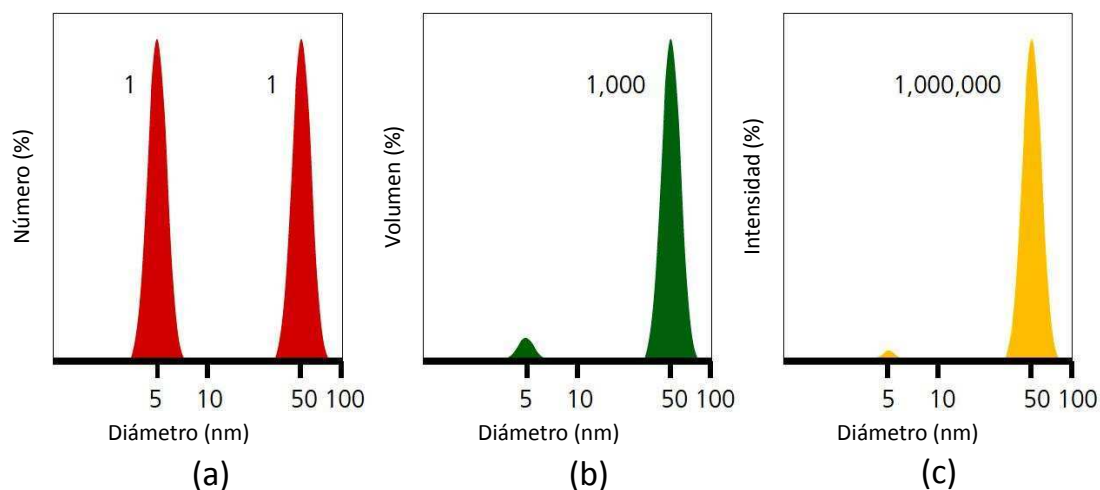


Figura 41. Distribución de tamaño en número (a), volumen (b) e intensidad (c) de una muestra bimodal de partículas de 5 y 50 nm, presentes en igual cantidad.

2.9.2. Determinación del potencial zeta (Z)

Con el mismo analizador se realizaron mediciones de potencial Z a un ángulo fijo de 173°. Las determinaciones se realizaron sobre emulsiones estabilizadas por HPMC (obtenidas según el apartado 3.3) y su mezcla con una solución de SB (disueltas en FIS a concentración fisiológica). Todas las muestras se diluyeron en el buffer correspondiente y se colocaron en celdas capilares provistas de electrodos de platino a cada lado (Figura 42).

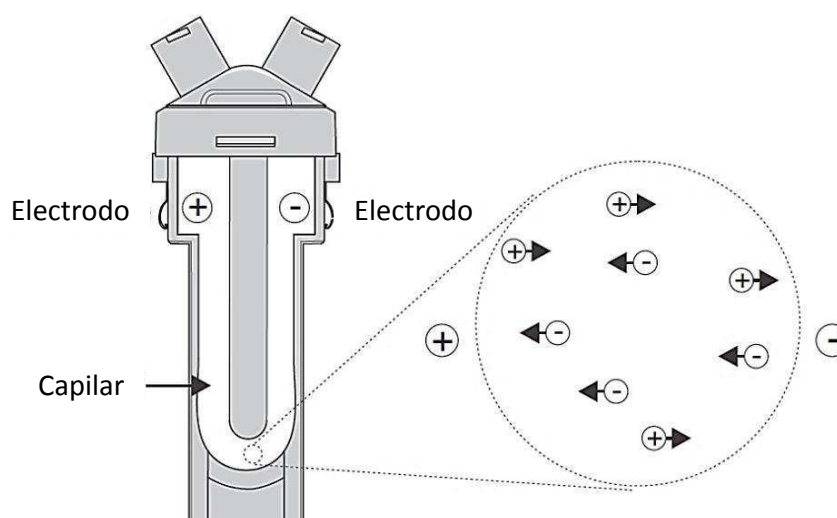


Figura 42. Celda para la determinación del potencial Z.

Cuando se aplica un campo eléctrico, las partículas cargadas que se encuentran en la dispersión migran hacia el electrodo con carga opuesta. La velocidad a la que migran las partículas se conoce como movilidad electroforética y se puede convertir al potencial Z mediante la aplicación de la ecuación de Henry (Ecuación 12):

$$U_E = \frac{2 \varepsilon Z f(ka)}{3 \mu} \quad [Ecuación 11]$$

donde Z es el potencial zeta, U_E es la movilidad electroforética, ε es la constante dieléctrica del medio, μ es la viscosidad y $f(ka)$ es la función de Henry. En medios acuosos y con baja concentración de electrolitos se usa una aproximación de $f(ka)$ igual a 1,0 (aproximación de Huckel) (Malvern Instruments Ltd., 2013).

El desarrollo de una carga neta en la superficie de una partícula afecta a la distribución de los iones que se encuentran en la región interfacial circundante. Esto resulta en un aumento de la concentración de iones de carga opuesta a la partícula que están cercanos a la superficie. Así, se genera una doble capa eléctrica alrededor de cada partícula (Figura 43).

La capa de líquido que rodea a la partícula tiene dos partes: una región interna, conocida como capa de Stern, donde los iones están fuertemente ligados, y una región externa, conocida como capa difusa, donde los iones están ligados más débilmente.

Cuando una partícula se mueve (por ejemplo, debido a la gravedad), lo hace con los iones que conforman la capa Stern y la capa difusa, pero los iones que se encuentran por fuera del límite no se mueven con la partícula. Este límite se conoce como plano de deslizamiento. El potencial que existe en este límite se conoce como potencial zeta (Figura 43) y su magnitud es un indicador de la estabilidad del sistema coloidal en estudio (Malvern Instruments Ltd., 2013).

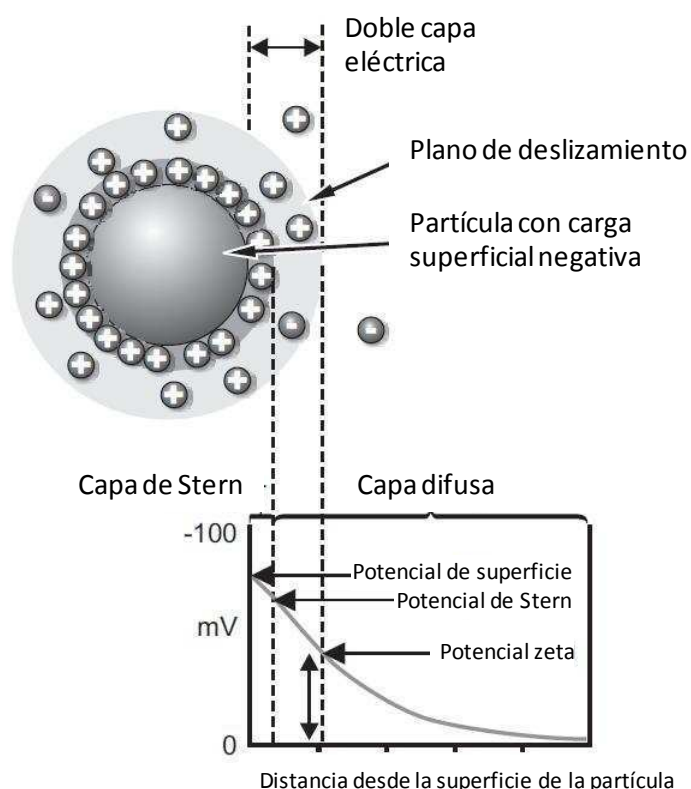


Figura 43. Esquema de una partícula cargada y de la doble capa que la rodea.

2.9.3. Distribución de tamaño de partícula por dispersión estática de luz

Utilizando el analizador de tamaño de partículas Mastersizer 2000 (apartado 2.3.1) se determinó sobre emulsiones estabilizadas por soluciones de las HPMC el efecto que presentan las SB a concentración fisiológica sobre el tamaño de las emulsiones, obteniendo las correspondientes distribuciones de tamaño en volumen y los diámetros promedios, $D_{4,3}$ y $D_{3,2}$, como se describió previamente.

2.9.4. Determinación del punto gel (*Cloud point*)

Durante la primera etapa del proceso de gelificación se observa la transición de soluciones transparentes a turbias que acontece a una temperatura que se denomina *cloud point*, indicativo del comienzo de la formación de clusters mediados por interacciones hidrofóbicas. A modo de evidenciar o no interacciones entre las moléculas de HPMC y las SB se determinó la temperatura de cloud point de cada HPMC y su mezcla con soluciones de SB a diferentes concentraciones. Para tal fin, en un baño seco a temperatura constante (70 °C), se calentaron varios tubos conteniendo 2ml de las diferentes soluciones. Los mismos fueron sellados por medio de esferitas de vidrio para

evitar así la evaporación del líquido. A tiempos sucesivos se retiraron de a un tubo por vez del baño y se observaron los cambios visualmente perceptibles en la solución, como el cloud point, dado por la aparición de un punto opaco en la muestra (Pérez, Wargon y M.R. Pilosof, 2006).

Las mediciones se informan como el promedio y la desviación estándar de al menos tres mediciones.

Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre los parámetros estudiados fueron determinadas por análisis de varianza (one Way ANOVA) usando el procedimiento de modelo lineal (Statgraphic 16.0). Se utilizó un nivel de alfa 0,05 ($p < 0,05$) para determinar la significancia. Los valores estadísticamente diferentes son indicados con diferentes superíndices.

3. Referencias

- Bahtz, J., Knorr, D., Tedeschi, C., Leser, M. E., Valles-Pamies, B. y Miller, R. (2009). Adsorption of octanoic acid at the water/oil interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74(2), 492-497.
- Berthold, A., Schubert, H., Brandes, N., Kroh, L. y Miller, R. (2007). Behaviour of BSA and of BSA-derivatives at the air/water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 301(1-3), 16-22.
- Bollag, D. M. y Eldestein, S. J. (1991). Gel Electrophoresis under Denaturing Conditions. In I. Wiley-Liss (Ed.), *Protein Methods*. (pp. 95-142). New York.
- Camino, N. A. y Pilosof, A. M. R. (2011). Hydroxypropylmethylcellulose at the oil–water interface. Part II. Submicron-emulsions as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1051-1062.
- Carrera Sanchez, C. y Rodriguez Patino, J. M. (2005). Interfacial, foaming and emulsifying characteristics of sodium caseinate as influenced by protein concentration in solution. *Food Hydrocolloids*, 19, 407-416.
- Cornec, M., Wilde, P., Gunning, P., Mackie, A., Husband, F., Parker, M. y Clark, D. (1998). Emulsions stability as affected by competitive adsorption between an oil-soluble emulsifier and milk proteins at the interface. *Journal of Food Science*, 63(39-43).
- Chowdhury, K., Banu, L. A., Khan, S. y Latif, A. (2007). Studies on the fatty acid composition of edible oil. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 42(3), 311–316.
- del Castillo-Santaella, T., Sanmartín, E., Cabrerizo-Vílchez, M. A., Arboleya, J. C. y Maldonado-Valderrama, J. (2014). Improved digestibility of β -lactoglobulin by pulsed light processing: a dilatational and shear study. *Soft Matter*, 10(48), 9702-9714.
- Galazka, V. B., Dickinson, E. y Ledward, D. A. (1996). Effect of high pressure on the emulsifying behaviour of β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 10(2), 213-219.
- Gu, Y. S., Decker, A. E. y McClements, D. J. (2005). Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by multilayer membranes consisting of β -lactoglobulin, l-carrageenan and gelatin. *Langmuir*, 21(13), 5752-5760.
- Güzey, D., Kim, H. J. y McClements, D. J. (2004). Factors influencing the production of o/w emulsions stabilized by β -lactoglobulin-pectin membranes. *Food Hydrocolloids*, 18(6), 967-975.
- Huang, X., Kakuda, Y. y Cui, W. (2001). Hydrocolloids in emulsions: Particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 533-542.
- Jiménez-Saiz, R., Ruiz-Henestrosa, V. M. P., López-Fandiño, R. y Molina, E. (2012). In vitro digestibility and allergenicity of emulsified hen egg. *Food Research International*, 48(2), 404-409.
- Kalantzi, L., Goumas, K., Kalioras, V., Abrahamsson, B., Dressman, J. B. y Reppas, C. (2006). Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharm Res*, 23(1), 165-176.
- Kazakov, V. N., Fainerman, V. B., Kondratenko, P. G., Elin, A. F., Sinyachenko, O. V. y Miller, R. (2008). Dilational rheology of serum albumin and blood serum solutions as studied by oscillating drop tensiometry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62(1), 77-82.
- Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V. y Mazoyer, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 455-462.
- Li, Y. 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, 8085-8092.
- Macierzanka, A., Sancho, A. I., Mills, E. N. C., Rigby, N. M. y Mackie, A. R. (2009). Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of β -casein and β -lactoglobulin. *Soft Matter*, 5(3), 538-550.

- Maldonado-Valderrama, J., Torcello-Gómez, A., del Castillo-Santaella, T., Holgado-Terriza, J. A. y Cabrerizo-Vílchez, M. A. (2015). Subphase exchange experiments with the pendant drop technique. *Advances in Colloid and Interface Science*, 222, 488-501.
- Malvern Instruments Ltd. (2012). A basic guide to particle characterization. In. Worcestershire, Reino Unido.
- Malvern Instruments Ltd. (2013). Zetasizer nano user manual. In. Worcestershire, Reino Unido.
- McClements, D. J. y Li, Y. (2010). Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based. *Food & Function*, 1, 32-59.
- Pérez, O. E., Wargon, V. y M.R. Pilosof, A. (2006). Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/hydroxypropylmethylcellulose mixtures. *Food Hydrocolloids*, 20(7), 966-974.
- Piper, D. W. y Fenton, B. H. (1965). pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance. *Gut*, 6(5), 506-508.
- Rosa, P. M., Antoniassi, R., Freitas, S. C., Bizzo, H. R., Zanotto, D. L., Oliveira, M. F. y Castiglioni, V. B. R. (2009). Chemical composition of brazilian sunflower varieties. *Helia*, 32(50), 145-156.
- Sarkar, A., Goh, K. K. T., Singh, R. P. y Singh, H. (2009). Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by β -lactoglobulin in an in vitro gastric model. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1563-1569.
- Sarkar, A., Horne, D. S. y Singh, H. (2010a). Interactions of milk protein-stabilized oil-in-water emulsions with bile salts in a simulated upper intestinal model. *Food Hydrocolloids*, 24, 142-151.
- Sarkar, A., Horne, D. S. y Singh, H. (2010b). Pancreatin-induced coalescence of oil-in-water emulsions in an in vitro duodenal model. *International Dairy Journal*, 20(9), 589-597.
- Sarkar, A., Ye, A. y Singh, H. (2016). On the role of bile salts in the digestion of emulsified lipids. *Food Hydrocolloids*, 60, 77-84.
- Singh, H., Ye, A. y Horne, D. (2009). Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Prog Lipid Res*, 48(2), 92-100.
- Stepanek, P. D. a. i. I. s. (1993). Data analysis in light scattering. In W. Brown (Ed.), *Dynamic light scattering. The Methods and Some Applications* (pp. 177-241). London, UK: Clarendon Press.
- Walstra, P. (1983). Formation of emulsions. In P. Becher (Ed.), *Encyclopedia of emulsion technology* (Vol. 1).
- Wüstneck, R., Moser, B. y Muschiolik, G. (1999). Interfacial dilational behaviour of adsorbed β -lactoglobulin layers at the different fluid interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 15(3-4), 263-273.

RESULTADOS

Capítulo I

***Digestión gastroduodenal in vitro de
emulsiones estabilizadas por proteínas y HPMC***

I.1. Introducción

Las emulsiones sufren numerosos cambios durante su recorrido por el tracto gastrointestinal debido a la acción de numerosos factores, entre ellos: cambios de pH, de fuerza iónica, presencia de enzimas y surfactantes biológicos. Estos factores, modifican la estructura inicial de las emulsiones y, en particular, la estructura de las películas interfaciales, cuyas características dependen principalmente del tipo y concentración de emulsionante utilizado y del proceso de emulsificación.

Estos cambios involucran modificaciones de la composición interfacial, espesor de la película interfacial, carga superficial de las gotas, entre otros, lo que finalmente conlleva a fenómenos de floculación y coalescencia.

La lipólisis, al ser una reacción interfacial podría verse particularmente afectada por estos cambios, ya que al llegar la emulsión al duodeno podrían tener lugar cambios sustanciales en el área interfacial (debido a fenómenos de floculación y/o coalescencia), o bien modificaciones en la película interfacial que alteren su susceptibilidad a los componentes presentes en el fluido duodenal (sales biliares, enzimas, etc.).

En este capítulo se pretenden caracterizar en forma comparativa los cambios en la estabilidad de emulsiones formadas por β -lactoglobulina (β lg), aislado proteico de soja (SPI) y la hidroxipropilmetilcelulosa E5LV, durante la digestión gastroduodenal *in vitro* a fin de correlacionarlos con la velocidad y extensión del proceso de lipólisis determinada a partir de la liberación de ácidos grasos.

I.2. Caracterización inicial de emulsiones O/W estabilizadas por proteínas y HPMC

Las distribuciones de tamaño de gota de las emulsiones expresadas en porcentaje en volumen y en número (Figura I.1) muestran la capacidad de cada uno de los emulsionantes empleados para producir pequeñas gotas de aceite durante el proceso de homogenización. Se observa que las emulsiones proteicas (SPI y β lg) presentaron menores valores de tamaño de gota para las condiciones de homogenización establecidas, en comparación con los valores obtenidos para la emulsión estabilizada por E5LV. Para las primeras, la distribución de tamaño de gota, expresada en volumen, se caracterizó por ser monomodal, es decir, presentó un solo pico en la zona inferior a los 0,5 μ m (Figura I.1 a y b), mientras que la emulsión estabilizada por E5LV (Figura I.1c) dio

lugar a una distribución más amplia que, en lugar de ser monomodal, se caracterizó por la presencia de un pico predominante en 1,5 μm , acompañado por un hombro a tamaños menores (0,3 μm), lo cual está en concordancia con los datos reportados por Camino y Pilosof (2011). Las distribuciones de tamaño de gota expresadas en número fueron similares para todas las emulsiones, observándose una población monomodal con predominancia de gotas con tamaños inferiores a 0,3 μm (Figura I.1 d-f). Esto indica que las gotas mayores a 0,3 μm contribuyen al volumen total de la fase dispersa, pero no al área interfacial creada durante el tratamiento con ultrasonidos de alta intensidad.

Estos resultados sugieren que las proteínas serían más eficientes para producir gotas más pequeñas durante la emulsificación, o bien, serían más eficaces en prevenir la agregación de las gotas durante el proceso, en comparación a E5LV (Malaki Nik, Wright y Corredig, 2011; Sarkar, Horne y Singh, 2010; Singh y Sarkar, 2011).

Es importante destacar que el tamaño de gota obtenido se encuentra mayoritariamente por debajo de 1 μm , indicando que se trata de emulsiones submicrónicas, lo cual contribuye al logro de una mayor estabilidad de las emulsiones en el tiempo, ya que las gotas de mayor tamaño son las que aceleran los procesos de cremado y floculación (McClements, 2015).

La Tabla I.1 muestra los valores de los diámetros promedio, el área interfacial específica (AIE) creada y el índice de polidispersidad obtenido para cada emulsión. El AIE o área superficial por unidad de masa de la fase dispersa se calcula con el software del Mastersizer, empleando el valor del diámetro promedio $D_{3,2}$. Durante el proceso de homogeneización, las fases acuosa y oleosa son sometidas a una agitación mecánica intensa, por consiguiente, el área interfacial resultante es un balance entre los procesos de ruptura (creación de área interfacial) y coalescencia (reducción de área interfacial) de las gotas (McClements, 2015; Palazolo, 2006; Walstra, 1993). El hecho de que las condiciones de homogeneización fueran las mismas para todas las emulsiones, al igual que la concentración de emulsionante empleada (2% p/p), nos permite inferir que la variación del AIE lograda en cada caso es atribuible en mayor medida a la naturaleza del emulsionante empleado, que podrá favorecer o inhibir, en distinto grado, los procesos antes mencionados. Los resultados de AIE guardan una relación inversamente proporcional con los del $D_{3,2}$, de manera que gotas más pequeñas (menor $D_{3,2}$) dan lugar a un mayor área interfacial (mayor AIE) (Tabla I.1). Los mayores valores de AIE se lograron

utilizando proteínas como emulsionantes dado sus menores valores de $D_{3,2}$. En general, los valores reportados en la Tabla I.1 evidencian las mejores propiedades interfaciales reportadas para las proteínas en comparación con las de las moléculas de HPMC (Camino y col., 2011).

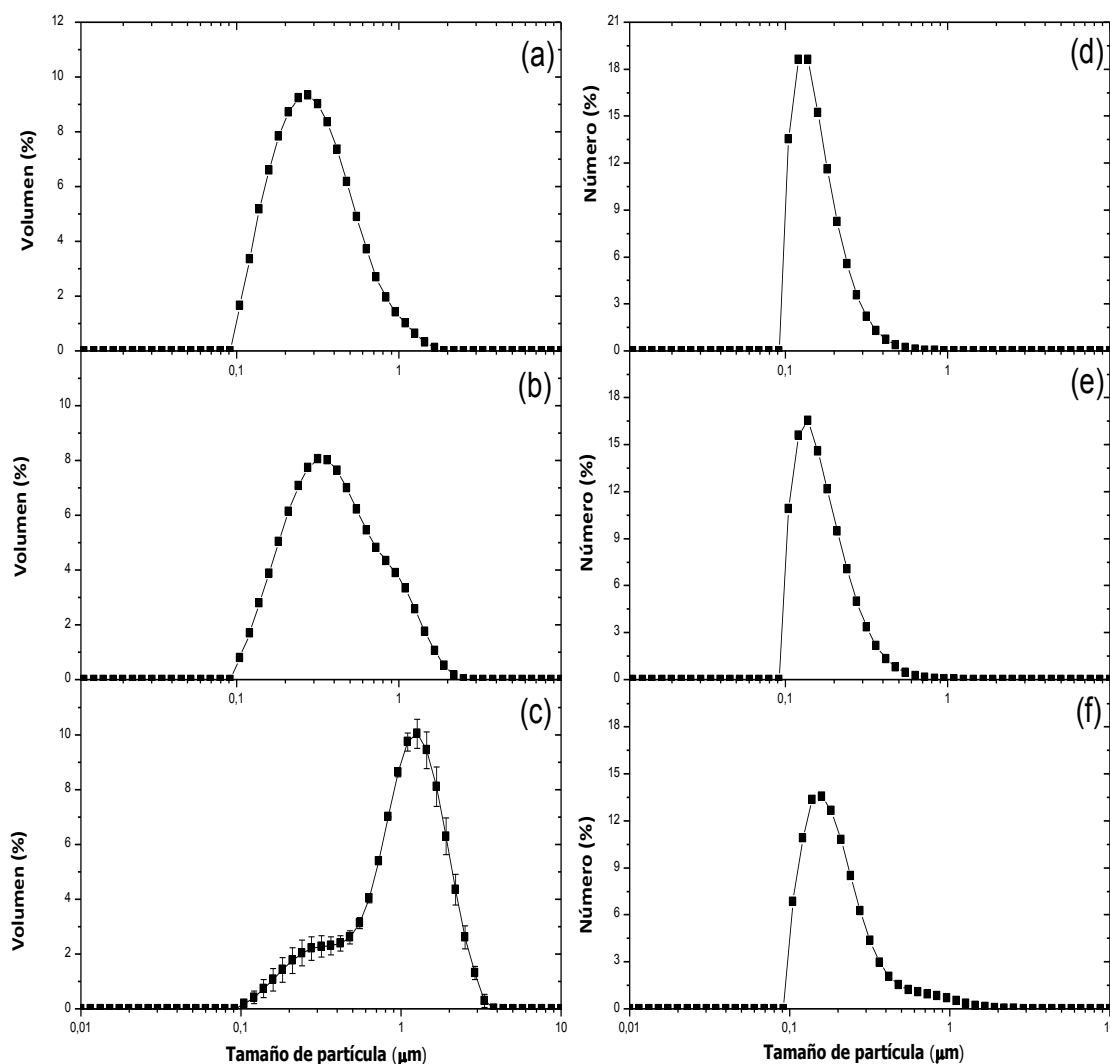


Figura I.1. Distribución de tamaño de gota en volumen y número para emulsiones O/W (10/90) estabilizadas por β lg (a,d), SPI (b,e) y ESLV (c,f).

Tabla I.1. Diámetros promedio ($D_{3,2}$ y $D_{4,3}$), área interfacial específica (AIE), e índice de polidispersidad (IP) de las emulsiones estabilizadas por los diferentes emulsionantes.

Emulsionante	$D_{3,2}$ (μm)	$D_{4,3}$ (μm)	AIE (m^2/g)	IP
β lg	$0,277^a \pm 0,001$	$0,3895^a \pm 0,0003$	$22,15^c \pm 0,07$	$1,75^a \pm 0,08$
SPI	$0,278^a \pm 0,001$	$0,531^b \pm 0,002$	$17,50^b \pm 0,6$	$2,06^b \pm 0,1$
ESLV	$0,730^b \pm 0,008$	$1,19^c \pm 0,007$	$7,56^a \pm 0,01$	$1,55 \pm^a 0,07$

La estabilidad de estos sistemas coloidales está gobernada por la presencia de gotas de aceite de mayor tamaño, aún cuando están presentes en un pequeño porcentaje con respecto al número total de gotas (McClements, 2015). De esta forma, cuanto mayor sea el tamaño de las gotas en una emulsión, estas serán más propensas a la desestabilización causada por una coalescencia/floculación inducida por colisión, debido a que las fuerzas de impacto que se generan y la magnitud de las mismas durante la colisión se incrementan con el aumento del tamaño de las gotas (McClements, 1999). Es por este motivo que el análisis de estabilidad se realiza en base a las distribuciones de tamaño de partícula en volumen (Palazolo, 2006), y los valores del $D_{4,3}$ (sensibles a la variación de volumen) se convierten en una herramienta útil para el análisis de los fenómenos de desestabilización.

Si bien ambas proteínas dan lugar a emulsiones con tamaños de gota ($D_{3,2}$) prácticamente iguales (Tabla I.1), las emulsiones estabilizadas por SPI dieron lugar a un valor de $D_{4,3}$ algo mayor. Este hecho es indicativo de que la emulsión de SPI presentaría un mayor grado de floculación, con un porcentaje pequeño de gotas mayores que, si bien no impactan en la distribución en volumen (Figura I.1), dan lugar a un mayor $D_{4,3}$ y, en consecuencia, a un mayor grado de polidispersidad que se evidencia por la mayor área del pico, en comparación con las emulsiones de β Ig (Tabla I.1).

A diferencia de lo observado para las emulsiones formadas por proteínas, las estabilizadas por E5LV dieron lugar a gotas de aceite de mayor $D_{3,2}$ que da lugar a una menor área interfacial entre el aceite y el agua, además de presentar mayores valores de $D_{4,3}$, indicativo de cierto grado de floculación de las gotas de aceite (Tabla I.1).

La uniformidad del tamaño de las gotas de aceite de estas emulsiones puede corroborarse también por medio de micrografías obtenidas por microscopía óptica para las emulsiones recién preparadas (Figura I.2). En este tipo de microscopía, las gotas que se observan con mayor facilidad son aquellas de mayor tamaño; sin embargo, debe tenerse en cuenta que no suelen ser las mayoritarias en número y, por lo tanto, las micrografías nos brindan una información parcial de la microestructura real de las emulsiones. Por este motivo, la microscopía óptica se convierte en una herramienta útil para ver si las gotas están o no floculadas y las características de los flóculos formados (Palazolo, 2006). En lo que respecta a las emulsiones del presente trabajo, puede

deducirse de esas imágenes (Figura I.2) que en ninguno de los casos se observó formación de flóculos entre las gotas de aceite.

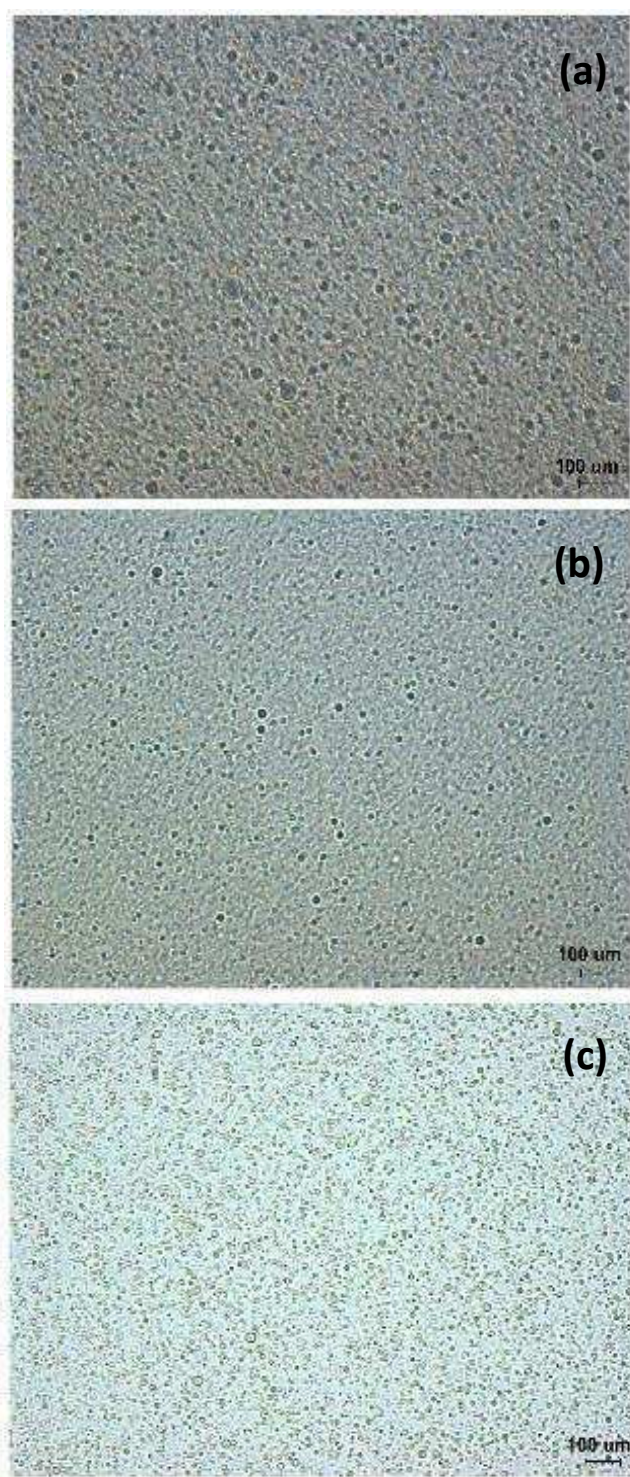


Figura I.2. Imágenes obtenidas por microscopía óptica (objetivo de 400X) de las emulsiones iniciales estabilizadas por: β lg (a), SPI (b) y E5LV (c).

En el presente trabajo la microscopía óptica resultará de utilidad a modo comparativo, para evaluar el efecto que los diferentes fluidos digestivos tienen sobre cada una de las

emulsiones, en lo que respecta al incremento (o no) en el tamaño de las gotas de aceite durante la digestión *in vitro*.

Con respecto a la estabilidad de estas emulsiones, se hizo un seguimiento de la evolución del tamaño de las gotas de aceite con el tiempo (24 h). La finalidad de esta determinación fue la de conseguir un producto que desde el inicio fuera estable, para evitar posibles errores de interpretación en los resultados que se obtengan al momento de someter estas emulsiones al proceso de la digestión *in vitro*. Así, los cambios que se produzcan en este proceso puedan ser debidos a la digestión en sí mismo y no como consecuencia de la inestabilidad inherente de los sistemas de partida. Se comprobó de esta manera que las emulsiones preparadas resultaron estables, ya que no se evidenciaron cambios significativos en el valor del diámetro promedio, $D_{3,2}$ (Figura I.3), ni en la evolución de las distribuciones del tamaño de gota con el tiempo (no mostradas).

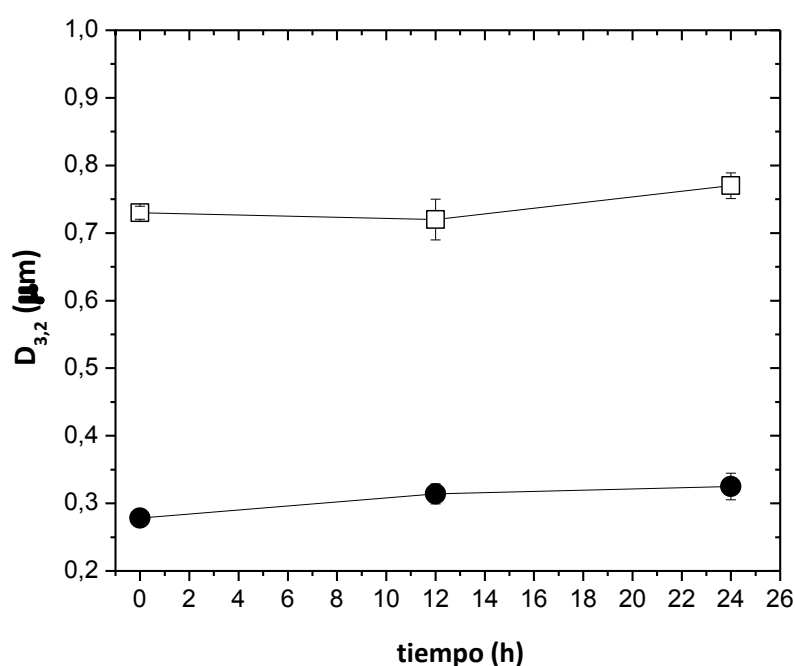


Figura I.3. Variación del diámetro de gota promedio ($D_{3,2}$) a lo largo del tiempo para las emulsiones estabilizadas por SPI (●) y E5LV (□). La emulsión estabilizada por β lg arrojó resultados muy similares a la estabilizada por SPI.

I.3. Comportamiento de las emulsiones O/W estabilizadas por proteínas y HPMC durante el proceso de digestión gastroduodenal *in vitro*

Las emulsiones analizadas en la sección anterior se sometieron al proceso de digestión gastroduodenal *in vitro* detallado anteriormente consistente en una etapa gástrica (1h,

pH 2,5), seguida de una etapa duodenal (1h, pH 7,0), en presencia de enzimas y biomoléculas en concentraciones fisiológicas. A lo largo del mismo se fue evaluando el cambio del tamaño de las gotas de aceite (técnicas de dispersión de luz y microscopia óptica), así como también, el grado de lipólisis durante la etapa duodenal.

I.3.1. Evolución del tamaño de las gotas de aceite durante la digestión gastroduodenal *in vitro*

Previo a desarrollar el proceso de digestión gastroduodenal *in vitro*, cada una de las emulsiones se mezcló con el FGS en ausencia de biomoléculas (pepsina y PC) durante 1h, a 37 °C, a fin de analizar el posible efecto del cambio de pH y de la fuerza iónica en el tamaño de las gotas de aceite. Al analizar la distribución de tamaño de gota en volumen (Figura I.4) se observó que las emulsiones experimentaron un pequeño cambio en presencia del FGS, que se mantuvo constante en el tiempo de ensayo (1h). Estos resultados son indicativos de que el cambio de pH y fuerza iónica da lugar a un cierto grado de floculación, evidenciado por la aparición de una señal a mayor tamaño en la distribución en volumen. El mayor cambio tuvo lugar con las emulsiones estabilizadas por proteínas, las cuales dieron lugar a la aparición de un pico con un tamaño aproximado de 5 μm para βlg (Figura I.4a) y 50 μm para las emulsiones estabilizadas por SPI (Figura I.4b), en comparación con las estabilizadas por E5LV que resultaron más estables en presencia del FGS (Figura I.4.c). Este resultado podría deberse a que al tratarse de un polisacárido no iónico (Camino y col., 2011), los cambios en las condiciones del medio no repercuten en cambios en la distribución de tamaño de las gotas de aceite, a diferencia de las proteínas, que presentan en su estructura gran cantidad de grupos ionizables (Sarkar, Ye y Singh, 2016). Si bien este cambio es mayor para las emulsiones proteicas, para todos los casos, no se evidenciaron cambios significativos a lo largo del tiempo de ensayo. Resultados similares también han sido reportados por Malaki Nik y col. (2011) después de evaluar el efecto del fluido gástrico sobre la estabilidad de emulsiones formadas con aislado proteico de suero lácteo y de soja, concluyendo que la ausencia de biopolímeros y surfactantes biológicos en el fluido gástrico no conllevó a un cambio importante en el tamaño de las gotas de aceite.

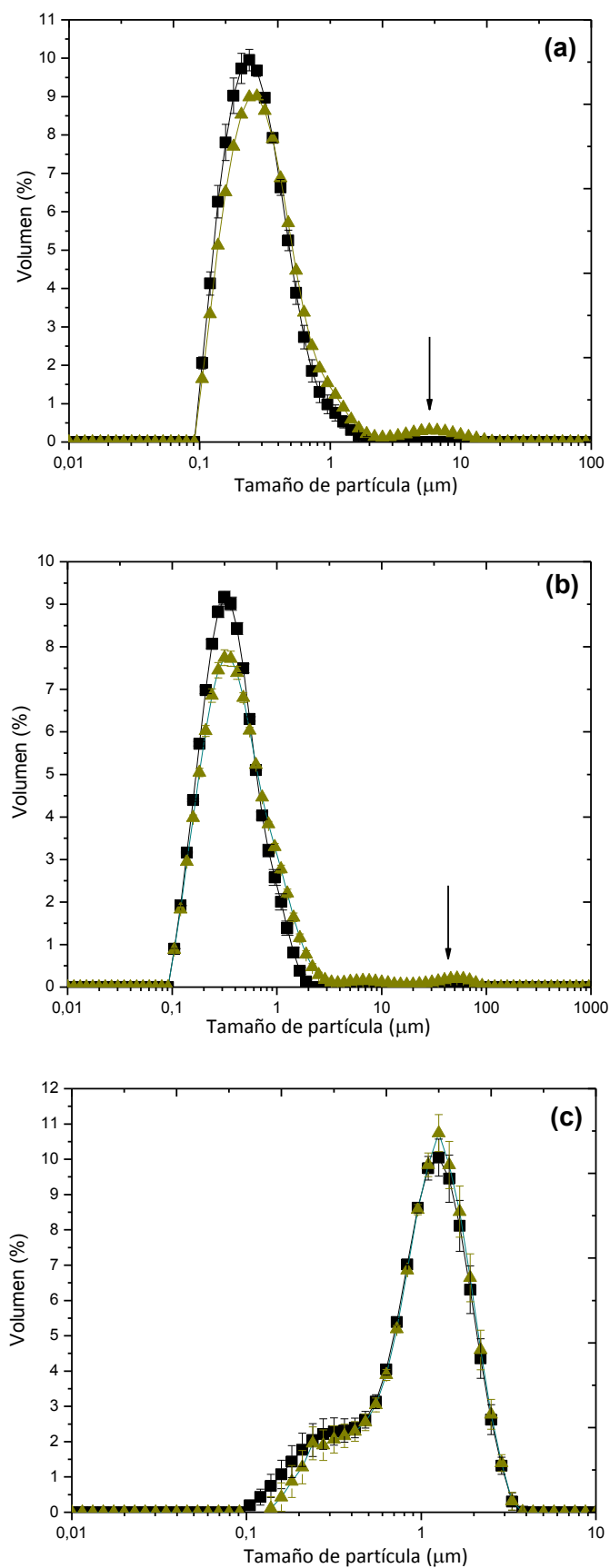


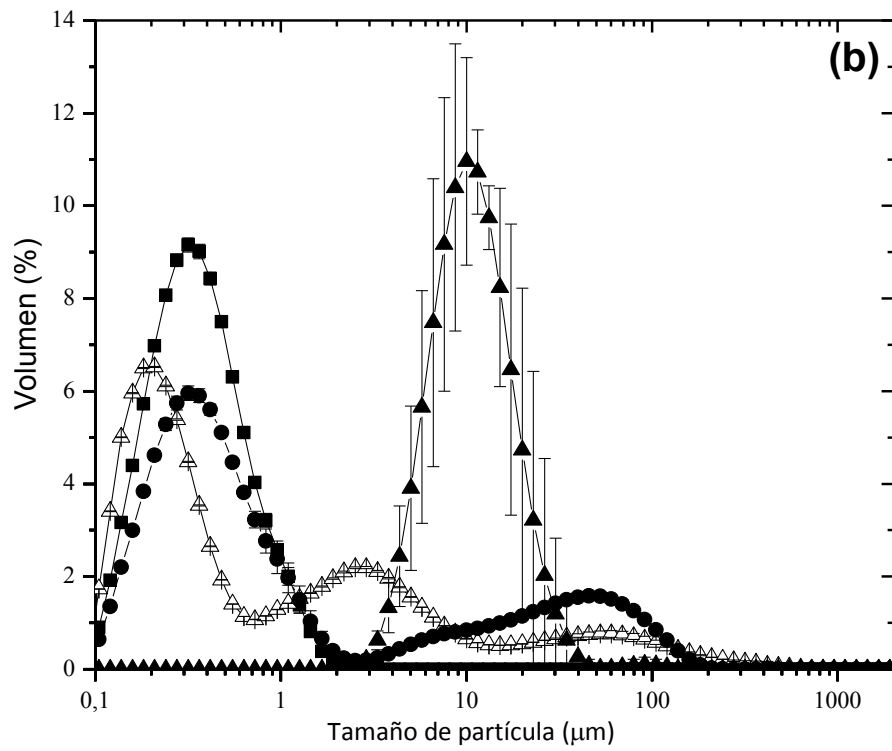
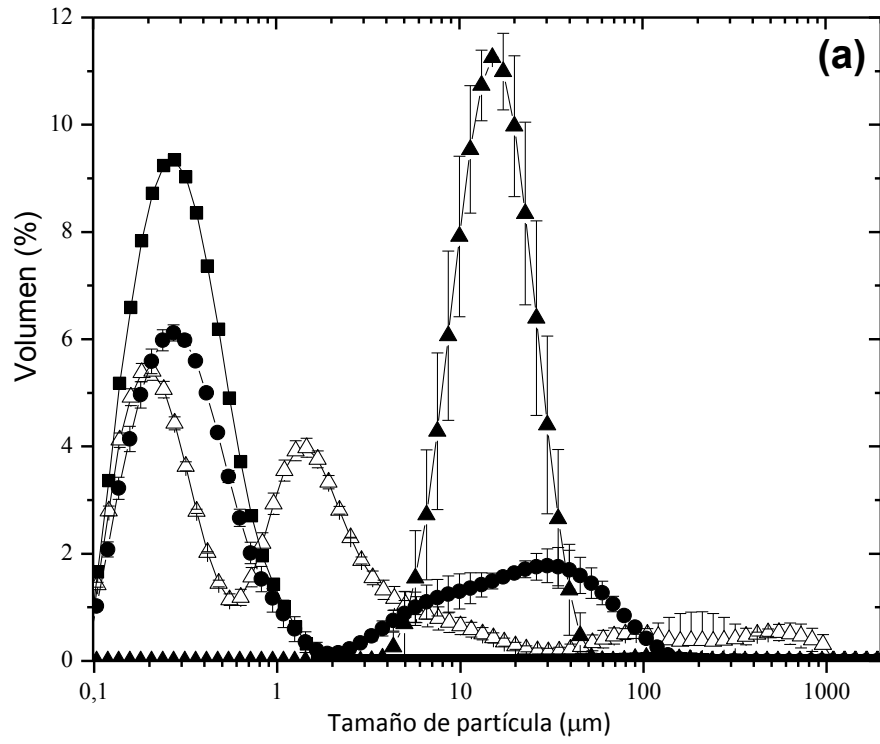
Figura I.4. Distribución de tamaño de gota para las emulsiones estabilizadas por βlg (a), SPI (b) y E5LV (c). Emulsiones iniciales (■) y mezcladas con el FGS durante 1 h a 37 °C (▲). Se indica con flecha las nuevas poblaciones resultantes de mezclar las emulsiones con el FGS.

Sin embargo, se evidenciaron cambios importantes cuando las emulsiones se mezclaron con el FGS en presencia de pepsina y PC, en concentraciones fisiológicas (Figura I.5). Los cambios más evidentes tuvieron lugar nuevamente con las emulsiones proteicas (Figura I.5 a y b), que al instante inmediato de iniciada la digestión (t_{g0}) mostraron una distribución bimodal, caracterizada por la aparición, en la distribución en volumen, de una segunda población (adicional a la de la emulsión original) con un tamaño comprendido entre 2 y 100 μm . Resultados similares a estos fueron observados también por Singh y col. (2011) al trabajar con emulsiones estabilizadas por βlg . Estos autores demostraron que aunque las moléculas de βlg son resistentes a la acción de pepsina cuando se encuentran en solución acuosa, estas son fácilmente hidrolizadas cuando se despliegan en la interfase O/W, al exponer grupos funcionales de la cadena polipeptídica a la proteasa (Mackie y Macierzanka, 2010; Singh y col., 2011). En la Figura I.6 se muestra cómo evoluciona el diámetro promedio de las gotas de aceite ($D_{3,2}$) a lo largo del proceso de digestión *in vitro*. Se observa que, a pesar de que ambas proteínas dan lugar a emulsiones con similar tamaño de gota inicial, la emulsión estabilizada por βlg experimentó un mayor grado de floculación/coalescencia durante la etapa gástrica de la digestión, lo que dio lugar a un incremento del $D_{3,2}$, al final de la etapa gástrica (t_{g60}), alcanzando un valor dos veces superior que el de la emulsión estabilizada por SPI (Tabla I.2). El seguimiento de la evolución del tamaño de las gotas de aceite durante la fase gástrica de la digestión resulta de especial interés, ya que se ha demostrado la existencia de una relación directa entre la estabilidad de las emulsiones y la tasa de vaciamiento gástrico, es decir, el tiempo de residencia de un alimento en el estómago. A su vez, también se sabe que cuanto mayor es el tiempo en que un alimento permanece en el estómago, mayor es la sensación de saciedad que produce (Marciani y col., 2009). Según Golding y Wooster (2010) las emulsiones de menor tamaño de gota, al presentar mayor tiempo de residencia en el estómago, producen mayor sensación de saciedad que las emulsiones con tamaño de gota mayor (que permanecerán en el estómago por cortos períodos de tiempo). Por lo tanto, esa mayor sensación de saciedad podría hacer que se prolongue el tiempo entre comidas. De esta manera, podría pensarse que una emulsión estable a las condiciones de digestión gástrica estaría contribuyendo a disminuir el impacto negativo de las emulsiones (o de las grasas) sobre la salud de los consumidores.

Tabla I.2. Diámetros promedio ($D_{3,2}$ y $D_{4,3}$) y área interfacial específica (AIE) obtenidos para las emulsiones iniciales (t_0), al final de la etapa gástrica (t_{g60}), a los 10 min de iniciada la etapa duodenal (t_{d10}) y al final de esta última (t_{d60}).

		t_0	t_{g60}	t_{d10}	t_{d60}
β lg	$D_{3,2}$ (μm)	$0,277 \pm 0,001$	$14,6 \pm 0,1$	$0,57 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,03$
	$D_{4,3}$ (μm)	$0,3895 \pm 0,0003$	$18,3 \pm 3,0$	$6,7 \pm 0,9$	$34,6 \pm 0,4$
	AIE (m^2/g)	$22,15 \pm 0,07$	$0,41 \pm 0,04$	$10,2 \pm 0,6$	$12,9 \pm 0,9$
SPI	$D_{3,2}$ (μm)	$0,278 \pm 0,001$	$7,4 \pm 0,1$	$0,61 \pm 0,08$	$0,43 \pm 0,08$
	$D_{4,3}$ (μm)	$0,531 \pm 0,002$	$12,9 \pm 2,9$	$11,7 \pm 4,1$	$9,7 \pm 0,8$
	AIE (m^2/g)	$17,5 \pm 0,6$	$0,581 \pm 0,008$	$9,97 \pm 1,30$	$14,2 \pm 2,6$
E5LV	$D_{3,2}$ (μm)	$0,73 \pm 0,08$	$1,01 \pm 0,05$	$0,9 \pm 0,1$	$0,53 \pm 0,01$
	$D_{4,3}$ (μm)	$1,19 \pm 0,07$	$7,2 \pm 0,9$	$13,3 \pm 2,4$	$6,1 \pm 0,3$
	AIE (m^2/g)	$7,56 \pm 0,01$	$5,4 \pm 0,6$	$7,07 \pm 1,46$	$11,3 \pm 0,1$

Se observa en la Figura I.5 que, al final de la fase gástrica de la digestión (t_{g60}), las distribuciones de tamaño de gota correspondientes a las emulsiones proteicas fueron monomodales, caracterizándose por la presencia de un pico en $15 \mu\text{m}$ para las emulsiones de β lg (Figura I.5a) y $10 \mu\text{m}$ para la estabilizada por SPI (Figura I.5b). En esta instancia del proceso de digestión, la emulsión estabilizada por SPI exhibió un $D_{4,3}$ que prácticamente duplica el valor del correspondiente $D_{3,2}$ (Tabla I.2), lo que indicaría que las gotas de aceite presentan un alto grado de floculación. A partir de las micrografías (Figura I.7), puede corroborarse que todos los sistemas estudiados dieron lugar a la aparición de gotas floculadas, en especial en las emulsiones estabilizadas por β lg (Figura I.7a), que mostraron alto grado de floculación incluso al inicio del proceso, hechos que guardan relación con los altos valores de $D_{4,3}$ mostrados en la Tabla I.2 (Kenmogne-Domguia, Meynier, Viau, Llamas y Genot, 2012; Li, Ye, Lee y Singh, 2012; Malaki Nik y col., 2011; Sandra, Decker y McClements, 2008).



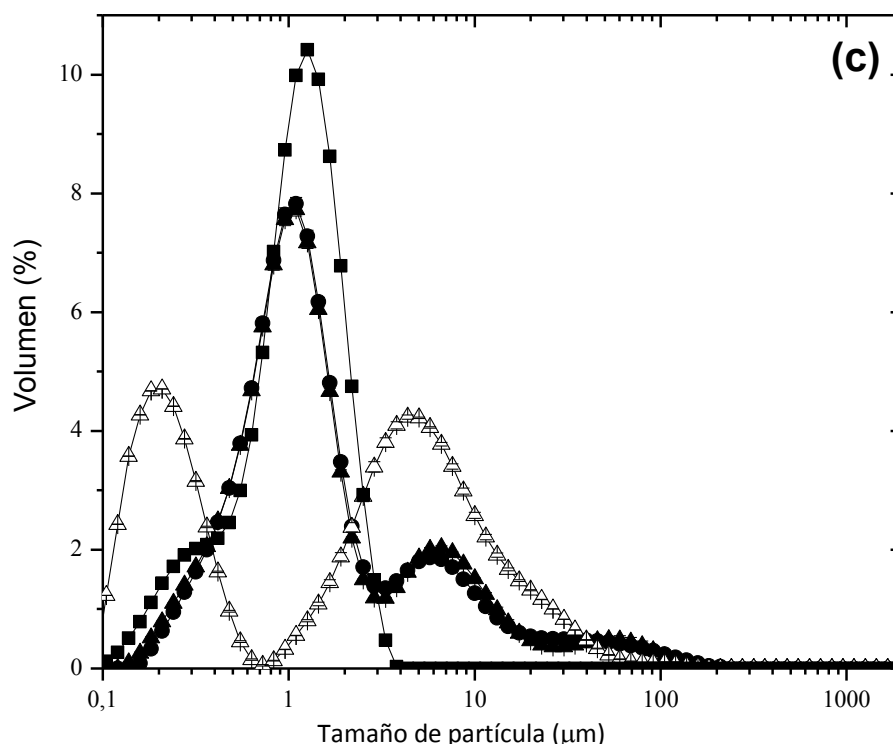


Figura I.5. Variación de la distribución de tamaño de gota de aceite para emulsiones estabilizadas por β lg (a), SPI (b) y E5LV (c) a lo largo del proceso de digestión gastroduodenal *in vitro*: Emulsión inicial (■), t_{g0} (●), t_{g60} (▲) y t_{d60} (Δ).

Según Gallier, Tate y Singh (2013), la distribución de tamaño de partícula tiende a correrse hacia la zona de tamaños mayores como resultado de la floculación/coalescencia que experimentan las gotas de aceite más pequeñas durante la digestión gástrica. Estos autores trabajaron con emulsiones de aceite de nuez, utilizando un aislado proteico del mismo fruto como emulsionante, y observaron que, luego de 30 minutos bajo condiciones de digestión gástrica, las distribuciones de tamaño de gota pasaron a ser monomodales, como consecuencia de la desaparición de las gotas más pequeñas.

En base a los resultados encontrados en el presente trabajo, podría pensarse que la proteólisis interfacial (hidrolisis parcial o total de la proteína adsorbida en la interfase O/W), llevada a cabo por la pepsina, sería responsable, en parte, de la formación de los flóculos entre las gotas de aceite. Posiblemente, una pérdida gradual de la carga superficial de la gota de aceite, sumado a una reducción del espesor de la película interfacial, darían lugar a una menor repulsión electrostática entre las gotas, favoreciendo su acercamiento, su interacción y la formación de agregados (Li y col., 2012; Malaki Nik y col., 2011; Sarkar, Goh, Singh y Singh, 2009; Singh y col., 2011; Tikekar, Pan y Nitin, 2013).

De hecho, Gallier y col. (2013) sugieren que, a raíz de la proteólisis, la consecuente generación de péptidos pequeños es insuficiente para mantener la cobertura total de la interfase O/W, lo cual podría explicar la coalescencia que observaron en las emulsiones mediante microscopía confocal de barrido. A partir de las imágenes obtenidas concluyeron que, tras haber sido expuestas a un proceso de simulación de la digestión gástrica, la superficie de las gotas de aceite queda cubierta solamente por proteínas y péptidos que han resistido la proteólisis enzimática.

Contrariamente al comportamiento observado hasta ahora para las emulsiones proteicas, las emulsiones estabilizadas por E5LV presentaron un pequeño cambio en la distribución de tamaño de partícula al inicio de la etapa gástrica (t_{g0}), cambio que se mantuvo prácticamente inalterable durante el resto de la etapa (Figura I.5c). Las moléculas de HPMC, a diferencia de las proteínas, no son sensibles a la actividad de la pepsina (Fathi, Martín y McClements, 2014; Mudgil y Barak, 2013). Además, al ser la E5LV una molécula neutra que no presenta grupos ionizables (Camino y col., 2011), tampoco presenta sensibilidad a los cambios de pH o de fuerza iónica, como se corroboró previamente (Figura I.4c). Por lo tanto, se podrían relacionar los pequeños cambios obtenidos durante la etapa gástrica (Figura I.6) a la presencia de fosfatidilcolina, surfactante biológico con elevada actividad interfacial (Knoth, Scherze y Muschiolik, 2005). La microestructura obtenida para estas emulsiones (Figura I.7c) evidencia un pequeño grado de floculación de las gotas, que explicaría el pequeño incremento observado en el diámetro promedio obtenido al final de la etapa gástrica (Tabla I.2), que pasó de 0,73 a 1 μm (acompañado de la consecuente disminución del AIE). Además, se observó un cambio más evidente en lo que respecta al valor de $D_{4,3}$ (incremento de aproximadamente 7 veces con respecto al de la emulsión original) lo que corrobora la existencia de un cierto grado de floculación de las gotas, aunque muy inferior al encontrado para las emulsiones proteicas.

En términos generales, los resultados demuestran que las emulsiones de E5LV serían más resistentes que las emulsiones proteicas a las condiciones de digestión gástrica. El menor grado de desestabilización encontrado para las emulsiones de E5LV en tales condiciones presenta especial interés, ya que, como se indicó antes, una emulsión más resistente a las condiciones gástricas podría dar lugar a un vaciamiento gástrico más lento. Es decir, el alimento (en este caso la emulsión) tendría mayor tiempo de residencia en la cavidad estomacal, ejerciendo un impacto directo en la regulación hormonal de la digestión y, en

consecuencia, en la sensación de saciedad, lo cual podría retardar el tiempo entre comidas (Malaki Nik, Wright y Corredig, 2010; Marciani y col., 2009; Marciani y col., 2007). En definitiva, podría lograrse una reducción en el consumo de grasas emulsionadas y, con ello, un beneficio en la salud de los consumidores.

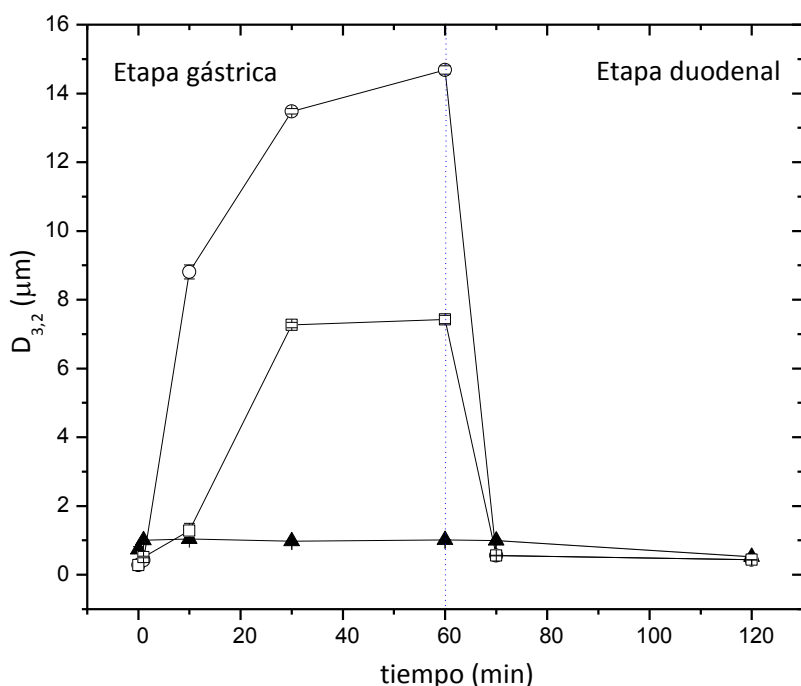


Figura I.6. Cambio del diámetro promedio ($D_{3,2}$) durante el proceso de digestión gastroduodenal *in vitro* para emulsiones estabilizadas por β lg (○), SPI (□) y E5LV (▲).

Finalizada la etapa gástrica de la digestión *in vitro*, cada uno de los sistemas se sometió a las condiciones de digestión duodenal. Durante esta etapa, se evidenciaron los cambios más importantes en el tamaño de las gotas de aceite, independientemente del emulsionante utilizado (Figuras I.5 y I.6), resultado que ha sido reportado también en numerosos artículos científicos. Estos importantes cambios se pueden atribuir al cambio de las condiciones del medio de reacción: pH, fuerza iónica y presencia de componentes biológicos con actividad interfacial (sales biliares, enzimas, etc.) que alteran las características de cada interfase (Gallier y col., 2013; Malaki Nik y col., 2010; Sarkar y col., 2009; Singh y col., 2011). La Figura I.5 muestra que las distribuciones de tamaño de gota, luego de una hora en condiciones de digestión duodenal (t_{d60}), pasan a ser multimodales para los tres sistemas analizados, con la predominancia de picos en la zona de menor tamaño (0,1-0,7 μ m). Esto último podría ser consecuencia de la formación de micelas de SB que contienen productos de la digestión lipídica, como los ácidos grasos y los

monoglicéridos (Gallier y col., 2013), que son removidos de la interfase para mantener la actividad de la lipasa pancreática. En la literatura se ha reportado que, en condiciones de digestión *in vivo*, el tamaño de las micelas de SB se corresponde solo a unos pocos nanómetros (Armand y col., 1999), pero en condiciones de digestión *in vitro*, estas micelas pueden unirse a causa de su acumulación en el medio de reacción, generando vesículas de mayor tamaño (Gallier y Singh, 2012).

Se observó, además, que independientemente de la naturaleza del emulsionante, las emulsiones mostraron valores similares de diámetro de gota promedio (0,43 - 0,53 μm) al final de la etapa duodenal, así como también de AIE (Tabla I.2).

Pero en la distribución de tamaño de partícula en volumen, además de observar poblaciones presentes en la zona de diámetros menores a 1 μm , en todos los casos se observaron poblaciones en la zona de tamaños mayores (10 - 100 μm), lo que resulta indicativo de un cierto grado de desestabilización de las emulsiones durante esta fase del proceso. Se ha comprobado en otros trabajos que la hidrólisis de los emulsionantes o su desplazamiento de la interfase por surfactantes biológicos (como las SB) promueve la interacción entre las gotas, que da lugar a la floculación y/o coalescencia (Gallier y col., 2013; Hur, Decker y McClements, 2009; Sandra y col., 2008). Por ejemplo, se ha reportado que las SB pueden ingresar en la interfase O/W produciendo la ruptura de la película interfacial, generando así carga negativa en la superficie de la gota (Maldonado-Valderrama, Wilde, Macierzanka y Mackie, 2011; Maldonado-Valderrama y col., 2008; Torcello-Gómez y col., 2011). Si bien es de esperar que la carga negativa superficial aumente la repulsión entre las gotas de aceite, la elevada fuerza iónica del medio de reacción y la gran cantidad de cationes presentes (Ca^{2+} , Na^+ , K^+) tendría un efecto neutralizante de dicha repulsión (McClements, 2015). De esta manera se favorece el acercamiento de las gotas y su interacción, lo que daría lugar a la formación de flóculos, que podría favorecer finalmente el fenómeno de coalescencia (McClements, 2015; Torcello-Gómez y col., 2011). Una contribución adicional al incremento observado en el tamaño de las gotas de aceite es consecuencia del cambio de pH desde 2,5 (condiciones gástricas) a 7,0 (condiciones duodenales), que induce a cambios en la carga de la película interfacial que rodea las gotas de aceite, sobre todo las de origen proteico, que al atravesar el punto isoelectrico disminuyen su repulsión electrostática, dando lugar a un aumento en el grado de interacción (Singh y Ye, 2013). Por medio de las imágenes

obtenidas por microscopía óptica (Figura I.7) puede corroborarse la existencia de flóculos y un cierto grado de coalescencia, sin embargo, debido a la dilución experimentada al pasar de las condiciones del medio gástrico a las del duodenal, se ve disminuido el número de gotas por unidad de volumen, por lo que la concentración de las gotas de aceite que se ven en la imagen es inferior respecto a la de la etapa gástrica.

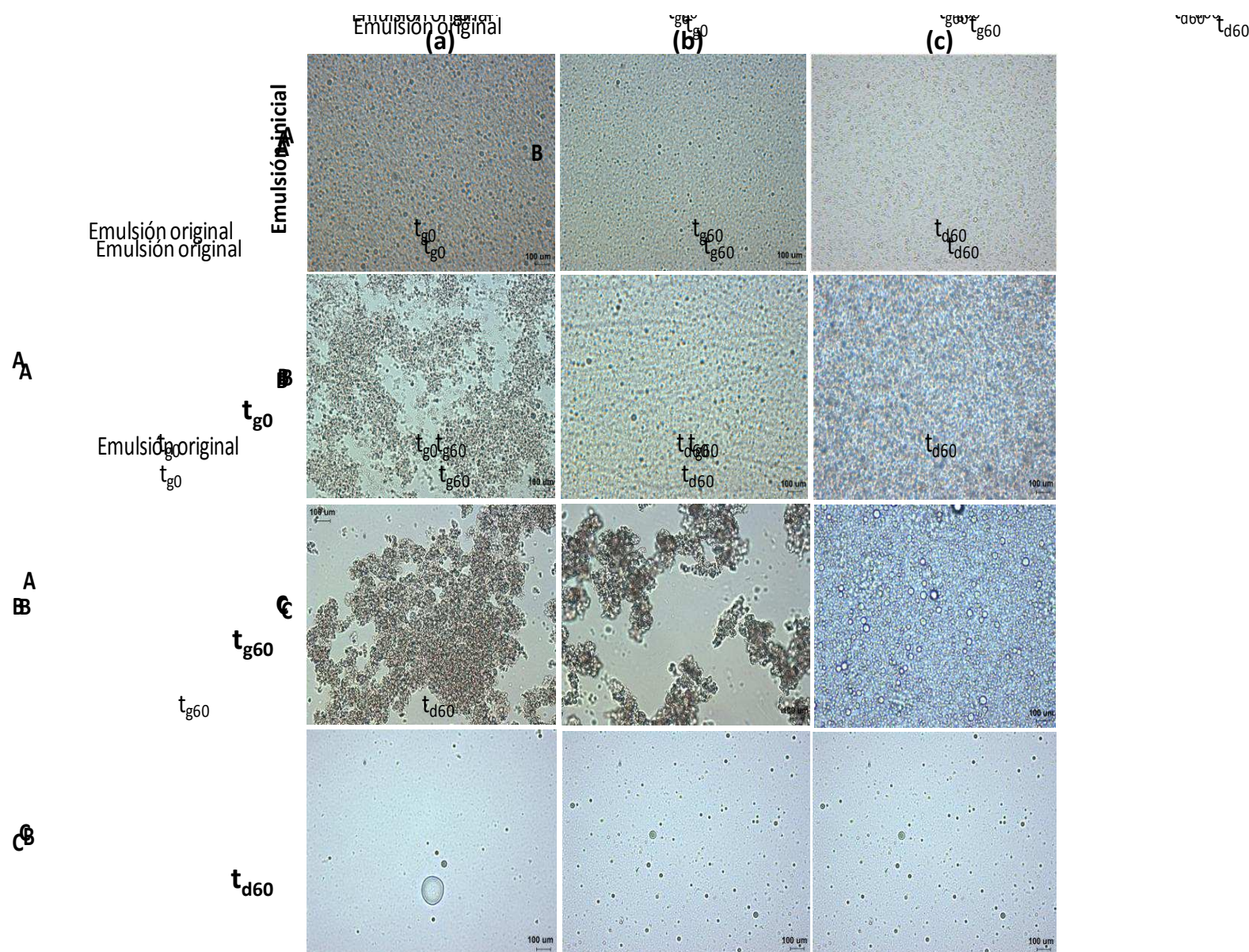


Figura I.7. Imágenes de microscopía óptica (objetivo: 400 X) antes y durante el proceso de digestión gastroduodenal *in vitro* de emulsiones estabilizadas por β lg (a), SPI (b) y E5LV (c).

Una vez finalizada la fase duodenal de la digestión, la mezcla de reacción resultante se centrifugó a 4000 rpm, a 20 °C por 30 minutos (Soler-Rivas y col., 2010), con objeto de separar el digerido en tres fases: una fase superior (oleosa), un precipitado (compuesto

principalmente por enzimas y otras proteínas), y una fase acuosa intermedia (mayoritaria) denominada fase micelar, sobre la cual se determinó el tamaño de partícula. La importancia de llevar a cabo esta separación de fases radica en el interés de conocer cómo se distribuyen los compuestos resultantes del proceso digestivo (Fatouros, Bergenstahl y Mullertz, 2007). La fase micelar comprende las estructuras micelares de SB, que contienen los productos de la digestión lipídica, motivo por el cual, su análisis resulta de utilidad para evaluar la potencial biaccesibilidad de los productos de la hidrólisis, sobre todo cuando se trata de lípidos bioactivos o ácidos grasos esenciales, ya que aquellos productos que se encuentren en dicha fase, serán potencialmente más bioaccesibles que aquellos que se encuentren en la fase oleosa o en el precipitado (Morán Valero, 2015). A modo de ejemplo, en la Figura I.8 se representa la distribución tamaño de partícula (expresada en volumen) correspondiente a la fase micelar procedente de la digestión de la emulsión de SPI. Se observa, que el diámetro promedio de la población mayoritaria se encuentra en 0,2 μm , en concordancia con los resultados representados en la Figura I.5, corroborando que las micelas de SB se aglomerarían en el medio de reacción formando grandes vesículas (Gallier y col., 2012). Determinaciones equivalentes sobre las emulsiones de βlg y E5LV digeridas arrojaron resultados similares (resultados no mostrados), lo que indica que el tamaño de las micelas de SB no se vería influenciado por la naturaleza del emulsionante.

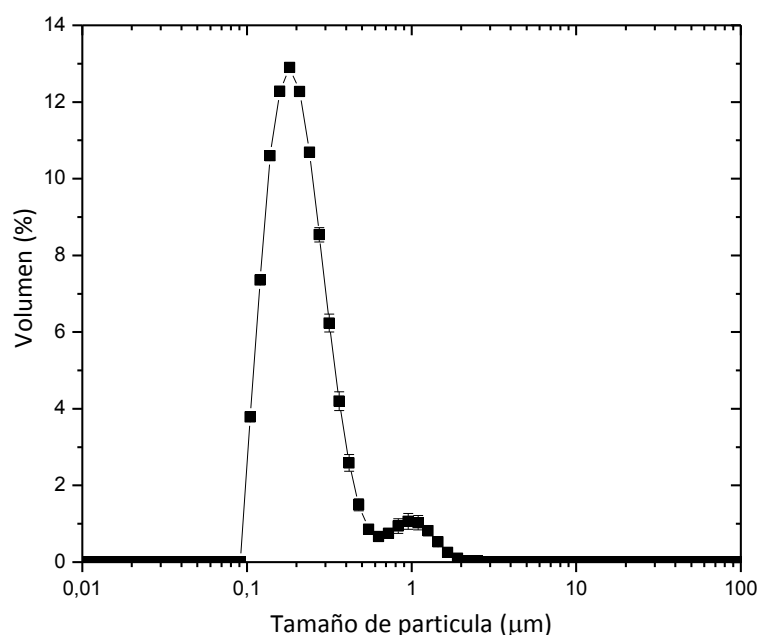


Figura I.8. Distribución del tamaño de partícula correspondiente a la fase micelar de la emulsión estabilizada por SPI.

I.3.2. Cinética de la lipólisis: Liberación de ácidos grasos en el tiempo

La influencia de la naturaleza del emulsificante en la digestibilidad de las gotas de aceite de la emulsión fue determinada por medio de la neutralización de los ácidos grasos producidos a partir de la acción de la lipasa pancreática durante la fase duodenal del proceso de digestión *in vitro* (Abrahamse y col., 2012; Li y McClements, 2010).

En la Figura I.9 se muestra la cinética de liberación de los ácidos grasos durante la etapa duodenal (1h), para cada una de las emulsiones. Para todos los casos se observó un rápido incremento durante los primeros 10 minutos en el porcentaje de ácidos grasos liberados (% AGL), previo a alcanzar un valor de pseudoequilibrio a tiempos mayores. En trabajos previos se ha comprobado que al trabajar con suficiente concentración de lipasa pancreática, su adsorción a la interfase O/W es casi inmediata a su incorporación al medio de reacción. A raíz de esto, el proceso de lipólisis (que da lugar a la liberación de AG) comienza de manera inmediata una vez que se ha incorporado la lipasa pancreática, sin evidenciarse la existencia de un período de inducción (McClements y Li, 2010; Mun, Decker y McClements, 2007).

La disminución en la velocidad de lipólisis en el tiempo puede asociarse con la acumulación de los productos de reacción (AG, MG) en la superficie de las gotas de aceite, que actúan como inhibidores de la lipasa, reduciendo su actividad (Gallier y col., 2013; Troncoso, Aguilera y McClements, 2012). Debido a que estos productos presentan actividad interfacial, en condiciones *in vitro* podrían acumularse en la interfase, dificultando el acceso de la lipasa, hecho que durante la digestión *in vivo* sería resuelto por la presencia de las SB, quienes, en forma de micelas, realizan la continua remoción de los AG de la interfase garantizando el acceso de la lipasa pancreática y su óptima actividad (Reis, Holmberg, Watzke, Leser y Miller, 2009; Troncoso y col., 2012).

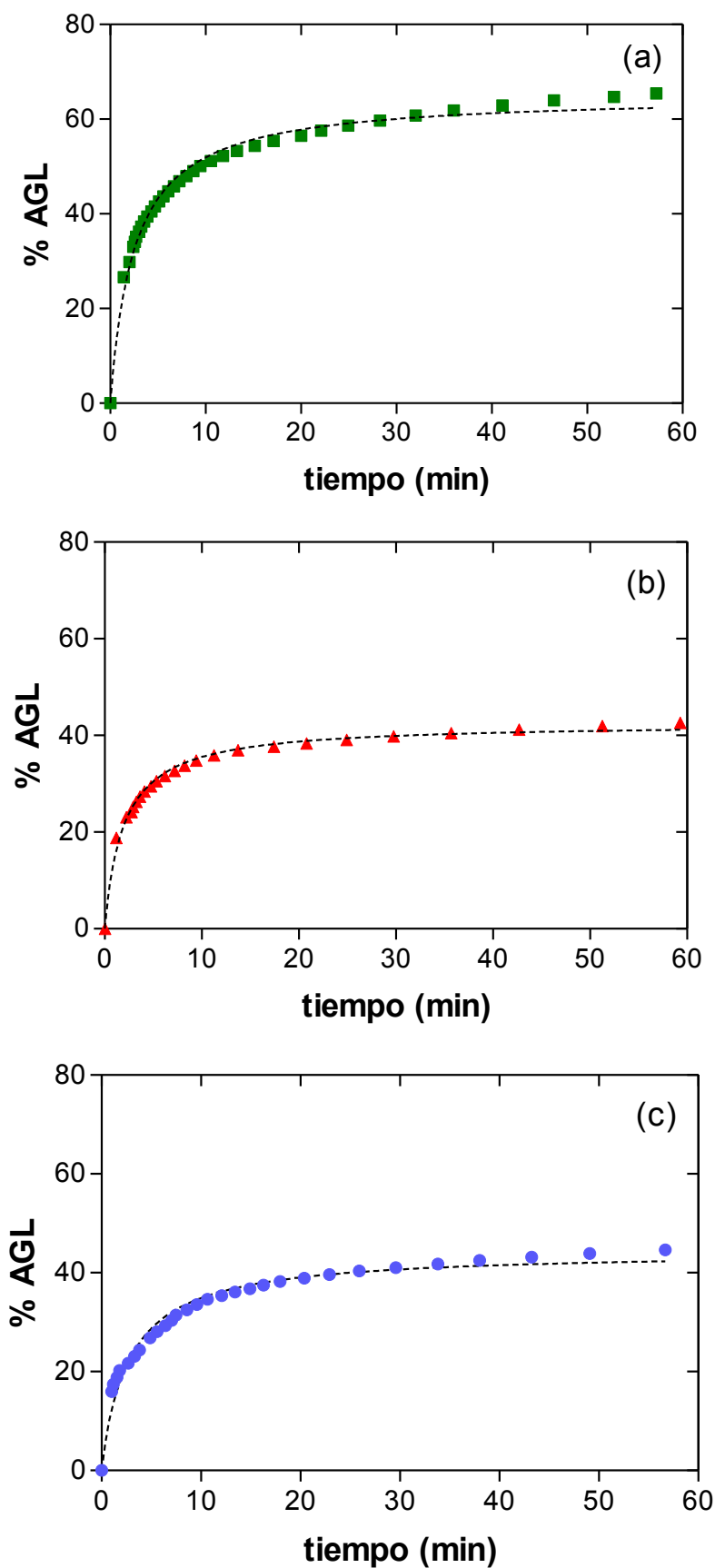


Figura I.9. Liberación de los ácidos grasos (% AGL) en el tiempo durante la fase duodenal de la digestión *in vitro* de las emulsiones estabilizadas por: β lg (a), SPI (b) y E5LV (c).

Las curvas experimentales que describen la lipólisis (Figura I.9) fueron ajustadas de acuerdo con el siguiente modelo empírico (Pilosof, Boquet y Bartholomai, 1985):

$$\% \text{ AGL} (t) = [(\% \text{ AGL})_{\max} * t] / (B + t) \quad [\text{Ecuación I.1}]$$

donde % AGL(t) y $(\% \text{ AGL})_{\max}$ se refiere al % AGL liberados al tiempo t y al valor donde se alcanza el pseudoequilibrio, respectivamente y B es el tiempo (min.) necesario para alcanzar la mitad del $(\% \text{ AGL})_{\max}$, es decir $(\% \text{ AGL})_{\max}/2$.

En la Tabla I.3 se resumen los valores obtenidos del ajuste. Se puede observar que el valor máximo de liberación de ácidos grasos $(\% \text{ AGL})_{\max}$ obtenido para las emulsiones estabilizadas por SPI $(42,5 \pm 0,3)$ fue ligeramente inferior al obtenido para las estabilizadas por E5LV $(44,3 \pm 0,6)$, mientras que las emulsiones estabilizadas por β lg arrojaron un valor aproximadamente 50% mayor $(65,1 \pm 0,5)$.

Tabla I.3. Parámetros cinéticos que describen la liberación de AG para cada emulsión, obtenidos según el modelo desarrollado por Pilosof y col. (1985).

Emulsionante	R ²	(% AGL) _{max}	B (min)	K ₀ ^{AGL} (1/min)	K ^{AGL} · 10 ³ (1/min)
β lg	0,9890	65,14 ^c ± 0,55	2,55 ± 0,09	25,6 ^c ± 1,1	6,03 ^a ± 0,22
SPI	0,9922	42,53 ^a ± 0,36	1,97 ± 0,08	21,58 ^b ± 1,05	11,9 ^c ± 0,6
E5LV	0,9742	44,36 ^b ± 0,68	2,76 ± 0,19	16,4 ^a ± 1,4	8,3 ^b ± 0,6

De acuerdo con Pilosof y col. (1985), es posible estimar la velocidad inicial (K_0^{AGL}) y la velocidad global (K^{AGL}) del proceso de lipólisis a partir de los valores de $(\% \text{ AGL})_{\max}$ y B:

$$K_0^{\text{AGL}} = (\% \text{ AGL})_{\max} / B \quad [\text{Ecuación I.2}]$$

$$K^{\text{AGL}} = ((\% \text{ AGL})_{\max} * B)^{-1} \quad [\text{Ecuación I.3}]$$

En base a los resultados obtenidos al aplicar las ecuaciones I.2 y I.3 (Tabla I.3), se puede concluir que la emulsión estabilizada por SPI mostró la mayor velocidad global de lipólisis (K^{AGL}), seguida por la emulsión estabilizada por E5LV y finalmente por la de β lg que arrojó un valor que equivale a la mitad que el obtenido para SPI.

Sin embargo, a partir del análisis de la velocidad inicial del proceso (K_0^{FFA}) se observa que los valores aumentan de acuerdo al siguiente orden: β lg > SPI > E5LV (Tabla I.3). Por lo

tanto, la emulsión de β lg, que es hidrolizada inicialmente a mayor velocidad (mayor K_0^{AGL}), es la que produce también la mayor liberación de ácidos grasos durante el proceso de lipólisis (mayor $(\% AGL)_{max}$). A una conclusión similar llegaron Li, Hu y McClements (2011), al encontrar una correlación directa entre la velocidad inicial de lipólisis y la extensión del proceso cuando trabajaron con emulsiones de aceite de maíz estabilizadas por β lg. Sin embargo, en el presente trabajo no se encontró correlación directa entre los valores de K_0^{AGL} y $(\% AGL)_{max}$ para las emulsiones estabilizadas por SPI y E5LV ya que, si bien exhibieron valores similares de $(\% AGL)_{max}$, dieron lugar a valores muy diferentes de K_0^{AGL} (Tabla I.3).

En base a estos resultados, se puede concluir que, además de la velocidad a la cual se produce la lipólisis, ya sea velocidad inicial o velocidad global del proceso, existen otros factores adicionales que determinan la extensión del mismo. Por consiguiente, a continuación se analizará el impacto que ejerce el tamaño de las gotas de aceite en el grado de lipólisis.

I.4. Análisis de la relación existente entre el tamaño de partícula/área interfacial con el grado de lipólisis

Como se comentó anteriormente, la lipólisis es una reacción interfacial en la cual la lipasa pancreática debe adsorberse en la interfase O/W para llevar a cabo la conversión de los TG en AGL y MG (Jódar-Reyes, Torcello-Gómez, Wulff-Pérez, Gálvez-Ruiz y Martín-Rodríguez, 2010; McClements y col., 2010). Por lo tanto, es de esperar que el tamaño de las gotas de aceite que llegan al intestino delgado impacte en el proceso de lipólisis. En base a esto podría pensarse que las gotas de aceite más pequeñas, al presentar mayor AIE, generarían una mayor cantidad de sitios disponibles para la adsorción de la lipasa dando lugar, por lo tanto, a una mayor extensión del proceso de lipólisis (Armand y col., 1992; Bauer, Jakob y Mosenthin, 2005; Helbig, Silletti, Timmerman, Hamer y Gruppen, 2012; Li y col., 2011; Singh y col., 2013).

Sin embargo, la disponibilidad de la lipasa para su adsorción en la interfase O/W se verá influenciada por el grado de floculación de las gotas de aceite, debido a que cuanto mayor es el grado de floculación de las gotas, menor es el área interfacial disponible para su adsorción. Por lo tanto, el uso del diámetro de gota promedio ($D_{3,2}$) no siempre es representativo de la disponibilidad interfacial para la adsorción de las moléculas. Por

ejemplo, si bien con ambas emulsiones proteicas se obtuvieron valores de $D_{3,2}$ iniciales similares (Tabla I.1), los valores de AEI fueron mayores para las emulsiones estabilizadas por β lg que para las estabilizadas por SPI, debido a que estas últimas presentaron un mayor grado de floculación (mayor $D_{4,3}$). Por tal motivo, para analizar el impacto del tamaño de gota en los fenómenos que involucran la región interfacial es conveniente hacerlo utilizando los valores de AIE, ya que son más representativos que los valores de diámetro promedio.

Se analizó entonces la correlación existente entre los valores de AIE inicial de cada emulsión (Tabla I.1) y los valores de las constantes que describen la velocidad de lipólisis, tanto la velocidad inicial o como la velocidad global del proceso (Tabla I.3). A partir de este análisis se encontró una relación lineal entre los valores iniciales de AIE de cada emulsión y los de la velocidad inicial del proceso de lipólisis, K_0^{AGL} (Figura I.10). Los resultados ponen en relevancia que, independientemente del emulsionante utilizado, el área interfacial de las emulsiones impacta en la velocidad inicial de la lipólisis.

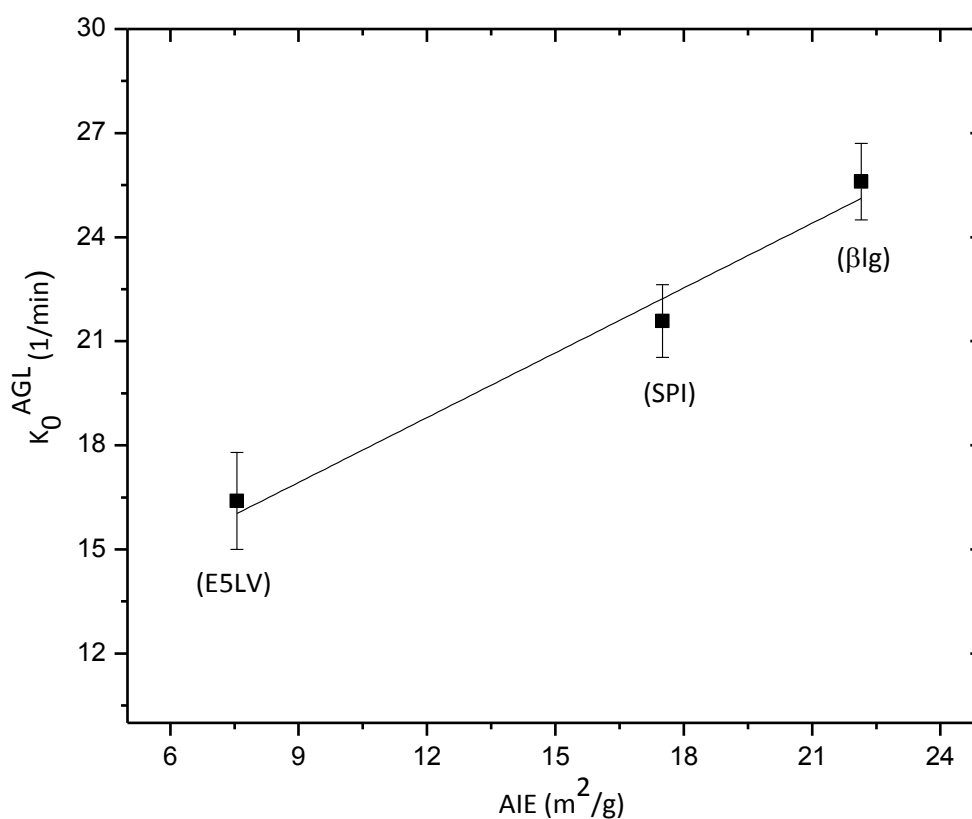


Figura I.10. Correlación entre la velocidad inicial del proceso de lipólisis (K_0^{AGL}) y el área interfacial específica (AEI) obtenida para las emulsiones iniciales.

En base al mismo criterio, también es lógico suponer la existencia de una relación directa entre el valor de AIE disponible para la adsorción de la lipasa y la extensión del proceso de lipólisis, de manera que las emulsiones que presentan un mayor área interfacial (mayor AIE) originan, en consecuencia, mayor número de AGL durante la lipólisis (mayor $(\% \text{ AGL})_{\text{max}}$). Sin embargo, no se encontró correlación alguna entre ambos valores, ya sea con el AIE inicial de cada emulsión, o bien con el valor de AIE al momento previo a incorporar la lipasa pancreática, es decir, al final de la etapa gástrica (t_{g60} , Tabla I.2). Por ejemplo, en el primero de los casos (AIE inicial), a pesar de que las emulsiones estabilizadas por SPI presentaron un AIE mucho mayor (más del 50%) a la obtenida con E5LV, ambas experimentaron un grado de lipólisis de similar extensión. Por otra parte, considerando los valores alcanzados al final de la etapa gástrica (t_{g60}), a pesar de que las emulsiones estabilizadas por proteínas mostraron similar AIE, no presentaron similitud en los valores de $(\% \text{ AGL})_{\text{max}}$. Es por ello que la falta de una correlación entre ambos valores pone en evidencia la existencia de otros factores que determinan la extensión del proceso.

I.5. Conclusiones

Se puede concluir que la naturaleza del emulsionante que forma la película interfacial alrededor de las gotas de aceite tiene un impacto directo sobre el comportamiento de las emulsiones frente a los componentes característicos de la digestión. Es así que se comprobó que, durante la simulación gástrica de la digestión, las emulsiones estabilizadas por proteínas fueron más sensibles a los procesos de desestabilización, en comparación con las estabilizadas por HPMC.

Sin embargo para todos los casos, los cambios más importantes en el tamaño de las gotas de aceite tuvieron lugar durante la fase duodenal de la digestión. Durante esta última se evidenció la formación de gotas de gran tamaño como consecuencia de fenómenos de floculación/coalescencia, además de la presencia, en la distribución de tamaño en volumen, de micelas de sales biliares que contienen productos derivados de la hidrólisis de los triglicéridos.

En cuanto al grado de lipólisis, las emulsiones estabilizadas por SPI mostraron una liberación de AG muy inferior a la obtenida para las estabilizadas por β lg y similar al observado para las emulsiones de E5LV, a pesar de que estas últimas son resistentes a la acción de pepsina en condiciones de digestión gástrica. Se encontró además que el grado de lipólisis no guarda relación con el área interfacial potencialmente disponible.

Sin dudas, al ser la lipólisis un proceso interfacial, la estructura de cada interfase (determinada en parte por la naturaleza de cada emulsionante) se convierte en un factor clave a considerar en la búsqueda de respuestas que puedan explicar las diferencias encontradas en el grado de lipólisis. Es por este motivo que la ingeniería interfacial se ha convertido en una herramienta clave de estudio, y el número de trabajos que utilizan tecnología interfacial se han ido incrementando en los últimos años.

En las siguientes secciones se estudiará de forma más detallada, el impacto de la composición de cada interfase en el proceso de digestión interfacial gastroduodenal *in vitro*. Para tal fin se utilizarán diferentes técnicas para el estudio del comportamiento de las películas interfaciales durante la digestión.

I.6. Referencias

- Abrahamse, E., Minekus, M., van Aken, G. A., van de Heijning, B., Knol, J., Bartke, N., Oozeer, R., van der Beek, E. M. y Ludwig, T. (2012). Development of the Digestive System-Experimental Challenges and Approaches of Infant Lipid Digestion. *Food Dig*, 3(1-3), 63-77.
- Armand, M., Borel, P., Ythier, P., Dutot, G., Melin, C., Senft, M., Lafont, H. y Lairon, D. (1992). Effects of droplet size, triacylglycerol composition, and calcium on the hydrolysis of complex emulsions by pancreatic lipase: an in vitro study. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 3(7), 333-341.
- Armand, M., Pasquier, B., André, M., Borel, P., Senft, M., Peyrot, J., Salducci, J., Portugal, H., Jaussan, V. y Lairon, D. (1999). Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *Am J Clin Nutr*, 70(6), 1096-1106.
- Bauer, E., Jakob, S. y Mosenthin, R. (2005). Principles of physiology of lipid digestion. *Journal of Animal Science*, 18, 282-295.
- Camino, N. A. y Pilosof, A. M. R. (2011). Hydroxypropylmethylcellulose at the oil-water interface. Part II. Submicron-emulsions as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1051-1062.
- Fathi, M., Martín, Á. y McClements, D. J. (2014). Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 39(1), 18-39.
- Fatouros, D. G., Bergenstahl, B. y Mullertz, A. (2007). Morphological observations on a lipid-based drug delivery system during in vitro digestion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31(2), 85-94.
- Gallier, S. y Singh, H. (2012). Behavior of almond oil bodies during in vitro gastric and intestinal digestion. *Food Funct*, 3(5), 547-555.
- Gallier, S., Tate, H. y Singh, H. (2013). In vitro gastric and intestinal digestion of a walnut oil body dispersion. *J Agric Food Chem*, 61(2), 410-417.
- Golding, M. y Wooster, T. J. (2010). The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1-2), 90-101.
- Helbig, A., Silletti, E., Timmerman, E., Hamer, R. J. y Gruppen, H. (2012). In vitro study of intestinal lipolysis using pH-stat and gas chromatography. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 10-19.
- Hur, S. J., Decker, E. A. y McClements, D. J. (2009). Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during in vitro digestion. *Food Chemistry*, 114(1), 253-262.
- Jódar-Reyes, A. B., Torcello-Gómez, A., Wulff-Pérez, M., Gálvez-Ruiz, M. J. y Martín-Rodríguez, A. (2010). Different stability regimes of oil-in-water emulsions in the presence of bile salts. *Food Research International*, 43(6), 1634-1641.
- Kenmogne-Domguia, H. B., Meynier, A., Viau, M., Llamas, G. y Genot, C. (2012). Gastric conditions control both the evolution of the organization of protein-stabilized emulsions and the kinetic of lipolysis during in vitro digestion. *Food Funct*, 3(12), 1302-1309.
- Knoth, A., Scherze, I. y Muschiolik, G. (2005). Effect of lipid type on water-in-oil-emulsions stabilized by phosphatidylcholine-depleted lecithin and polyglycerol polyricinoleate. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(12), 857-863.
- Li, J., Ye, A., Lee, S. J. y Singh, H. (2012). Influence of gastric digestive reaction on subsequent in vitro intestinal digestion of sodium caseinate-stabilized emulsions. *Food Funct*, 3(3), 320-326.
- Li, Y., Hu, M. y McClements, D. J. (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), 498-505.
- Li, Y. 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, 8085-8092.

- Mackie, A. y Macierzanka, A. (2010). Colloidal aspects of protein digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1–2), 102-108.
- Malaki Nik, A., Wright, A. J. y Corredig, M. (2010). Interfacial design of protein-stabilized emulsions for optimal delivery of nutrients. *Food Funct*, 1(2), 141-148.
- Malaki Nik, A., Wright, A. J. y Corredig, M. (2011). Impact of interfacial composition on emulsion digestion and rate of lipid hydrolysis using different in vitro digestion models. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 83(2), 321-330.
- Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P., Macierzanka, A. y Mackie, A. (2011). The role of bile salts in digestion. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 36-46.
- Maldonado-Valderrama, J., Woodward, N. C., Gunning, A. P., Ridout, M. J., Husband, F. A., Mackie, A. R., Morris, V. J. y Wilde, P. J. (2008). Interfacial Characterization of β -Lactoglobulin Networks: Displacement by Bile Salts. *Langmuir*, 24, 6759-6767.
- Marciani, J., Faulks, R., Wickham, M. S. J., Bush, D., Pick, B., Wright, J., Cox, E. F., Fillery-Travis, A., Gowland, P. A. y Spiller, R. C. (2009). Effect of intragastric acid stability of fat emulsions on gastric emptying, plasma lipid profile and postprandial satiety. *British Journal of Nutrition*, 101(919-928).
- Marciani, L., Wickham, M., Singh, G., Bush, D., Pick, B., Cox, E., Fillery-Travis, A., Faulks, R., Marsden, C., Gowland, P. A. y Spiller, R. C. (2007). Enhancement of intragastric acid stability of a fat emulsion meal delays gastric emptying and increases cholecystokinin release and gallbladder contraction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292(6), G1607-1613.
- McClements, D. J. (1999). *Food Emulsions. Principles, Practice and Techniques*.
- McClements, D. J. (2015). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques* (3 ed. Vol. 1): CRC Press.
- McClements, D. J. y Li, Y. (2010). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 159(2), 213-228.
- Morán Valero, M. I. (2015). *DESARROLLO Y APLICACIÓN DE MODELOS DE DIGESTIÓN INTESTINAL IN VITRO EN LA EVALUACIÓN DE LÍPIDOS BIOACTIVOS*. Univeridad Autonoma de Madrid, España.
- Mudgil, D. y Barak, S. (2013). Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 1-6.
- Mun, S., Decker, E. A. y McClements, D. J. (2007). Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 40(6), 770-781.
- Palazolo, G. (2006). *Formación y estabilidad de emulsiones O/W preparadas con proteínas nativas y desnaturalizadas de soja*. Universidad Nacional de La Plata.
- Pilosoph, A. M. R., Boquet, R. y Bartholomai, G. B. (1985). Kinetics of water uptake by food powders. *J of Food Science*, 50(1), 278-279.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E. y Miller, R. (2009). Lipases at interfaces: a review. *Adv Colloid Interface Sci*, 147-148, 237-250.
- Sandra, S., Decker, E. y McClements, D. (2008). Effect of Interfacial Protein Cross-Linking on the in Vitro Digestibility of Emulsified Corn Oil by Pancreatic Lipase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7488-7494.
- Sarkar, A., Goh, K. K. T., Singh, R. P. y Singh, H. (2009). Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by β -lactoglobulin in an in vitro gastric model. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1563-1569.
- Sarkar, A., Horne, D. S. y Singh, H. (2010). Pancreatin-induced coalescence of oil-in-water emulsions in an in vitro duodenal model. *International Dairy Journal*, 20(9), 589-597.
- Sarkar, A., Ye, A. y Singh, H. (2016). On the role of bile salts in the digestion of emulsified lipids. *Food Hydrocolloids*, 60, 77-84.

- Singh, H. y Sarkar, A. (2011). Behaviour of protein-stabilised emulsions under various physiological conditions. *Adv Colloid Interface Sci*, 165(1), 47-57.
- Singh, H. y Ye, A. (2013). Structural and biochemical factors affecting the digestion of protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(4), 360-370.
- Soler-Rivas, C., Marin, F. R., Santoyo, S., Garcia-Risco, M. R., Senorans, F. J. y Reglero, G. (2010). Testing and enhancing the in vitro bioaccessibility and bioavailability of Rosmarinus officinalis extracts with a high level of antioxidant abietanes. *J Agric Food Chem*, 58(2), 1144-1152.
- Tikekar, R. V., Pan, Y. y Nitin, N. (2013). Fate of curcumin encapsulated in silica nanoparticle stabilized Pickering emulsion during storage and simulated digestion. *Food Research International*, 51(1), 370-377.
- Torcello-Gómez, A., Maldonado-Valderrama, J., de Vicente, J., Cabrerizo-Vílchez, M. A., Gálvez-Ruiz, M. J. y Martín-Rodríguez, A. (2011). Investigating the effect of surfactants on lipase interfacial behaviour in the presence of bile salts. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 809-816.
- Troncoso, E., Aguilera, J. M. y McClements, D. J. (2012). Fabrication, characterization and lipase digestibility of food-grade nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 355-363.
- Walstra, P. (1993). Formation of emulsions. In P. Becher (Ed.), *Encyclopedia of emulsion technology* (Vol. 1).

Capítulo II

***Digestión gastroduodenal in vitro de las
películas formadas por proteínas y HPMC***

II.1. Introducción

Al ser la lipólisis una reacción que tiene lugar a nivel interfacial (Reis, Holmberg, Watzke, Leser y Miller, 2009), resulta de crucial importancia entender cómo impacta la composición de la película interfacial en esta reacción.

Si bien existen numerosos trabajos enfocados en estudiar la digestibilidad de emulsionantes como las proteínas y, en menor medida los polisacáridos, en su mayoría, los trabajos se enfocan en estudios de la digestión *in vitro* de soluciones de estos emulsionantes y de las emulsiones estabilizadas por los mismos (Guo, Ye, Lad, Dalglish y Singh, 2014; Kim y col., 2007; Macierzanka, Sancho, Mills, Rigby y Mackie, 2009; Malaki Nik, Wright y Corredig, 2010b; Mandalari y col., 2014). Los estudios dedicados a la digestión interfacial (ya sean sobre interfases aceite/agua o aire/agua) son escasos debido, en su mayoría, a limitaciones en las técnicas de estudio. La mayor parte de estas limitaciones se encuentran al momento de evaluar el efecto conjunto de la digestión gastroduodenal, es decir, evaluar el efecto de la fase duodenal una vez que la película interfacial ha sido sometida a la fase gástrica de la digestión. Las técnicas interfaciales más tradicionales permiten caracterizar las propiedades mecánicas de la película interfacial formada (cinética de adsorción del emulsionante y sus características reológicas). Sin embargo, existen otras técnicas más modernas que también permiten evaluar el efecto que presenta la inyección de una solución determinada sobre una película interfacial formada previamente. Esto se consigue a partir del intercambio de la subfase, es decir, retirando la subfase original y reemplazándola por la nueva solución, cuyo efecto se desea analizar (Chu y col., 2009; Mackie, Gunning, Ridout, Wilde y Rodríguez Patino, 2001; Maldonado-Valderrama, Miller, Fainerman, Wilde y Morris, 2010). Sin embargo, sólo es posible evaluar el efecto que presenta la incorporación de un solo fluido, por ejemplo FGS o FIS, por lo que sólo sería posible simular la etapa/fase gástrica o duodenal de la digestión de la película interfacial, encontrándose limitaciones en el análisis, si lo que se desea es hacer la digestión gastroduodenal *in vitro* de forma secuencial.

Para subsanar estas limitaciones, investigadores pertenecientes al grupo de Física de Fluidos y Biocoloides (Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada, España), han desarrollado un nuevo tensiómetro interfacial (OCTOPUS) que permite, por medio de

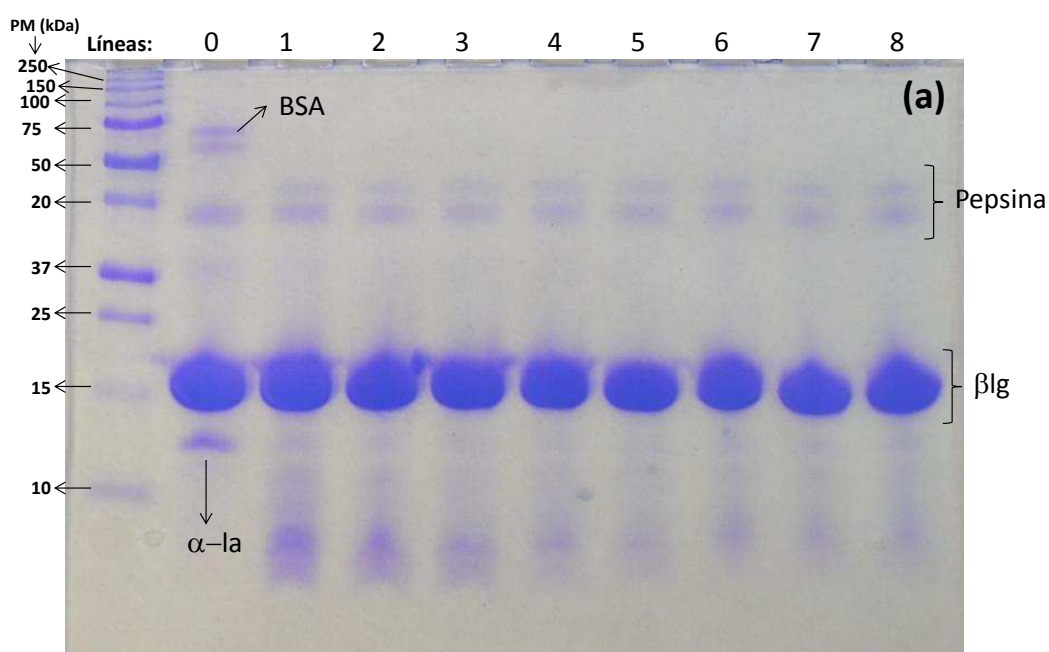
intercambios de la subfase, analizar de forma secuencial el efecto de los diferentes fluidos característicos de la digestión sobre las películas interfaciales previamente formadas en interfases aceite/agua o aire/agua (Maldonado-Valderrama, Torcello-Gómez, del Castillo-Santaella, Holgado-Terriza y Cabrerizo-Vílchez, 2015). Se utilizó por lo tanto, el tensiómetro interfacial OCTOPUS, a fin de estudiar en forma comparativa el comportamiento de las películas interfaciales formadas por cada emulsionante (β lg, SPI y E5LV), durante la digestión gastroduodenal interfacial *in vitro*. Para ello, en primer lugar se evaluó el efecto de las proteasas digestivas sobre los emulsionantes proteicos. A continuación se determinó la variación de los parámetros interfaciales a lo largo del proceso de digestión gastroduodenal *in vitro*, para obtener así mayor información del impacto de la presencia de los distintos fluidos digestivos sobre las películas interfaciales formadas con cada emulsionante. El proceso se realizó en 5 etapas de acuerdo con trabajos previos reportados en la literatura (Maldonado-Valderrama, Gunning, Wilde y Morris, 2010; Maldonado-Valderrama, Holgado-Terriza, Torcello-Gomez y Cabrerizo-Vilchez, 2013; Maldonado-Valderrama, Wilde, Mulholland y Morris, 2012).

II.2. Digestión de los emulsionantes proteicos en solución

Sobre soluciones de los emulsionantes proteicos (2% p/p), se aplicó el protocolo de digestión gastroduodenal *in vitro* con objeto de evaluar la actividad de las proteasas (gástrica y duodenales) sobre cada una de las proteínas. Los digeridos, a continuación fueron analizados mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE).

La Figura II.1, muestra el perfil electroforético obtenido para la solución de β lg sometida al proceso de digestión *in vitro*. La primera de las calles (Calle 0, Figura II.1a) corresponde al resultado de mezclar la solución proteica con el FGS, en ausencia de pepsina, en la cual puede distinguirse una banda principal a 18 kDa asociada a la forma monomérica de la β lg (Martínez, Carrera Sanchez, Rodriguez Patino y Pilosof, 2009). A su vez, se observa una banda de mucha menor intensidad en la zona de 14 kDa la cual puede asociarse con la presencia de α -lactoalbúmina contaminante (Brew, Castellino, Vanaman y Hill, 1970; Madureira, Pereira, Gomes, Pintado y Xavier Malcata, 2007). Durante el proceso de pepsinólisis, en presencia de concentraciones fisiológicas de pepsina (Calles 2-9, Figura II.1a), se observó que la banda correspondiente a la β lg permaneció inalterable en todo el periodo de tiempo estudiado (60 min), indicativo de que la proteína es resistente a la

actividad de la pepsina en concordancia con los resultados reportados por otros autores (del Castillo-Santaella, Sanmartín, Cabrerizo-Vílchez, Arboleya y Maldonado-Valderrama, 2014; Macierzanka y col., 2009; Malaki Nik, Wright y Corredig, 2010a). En la zona de 35-40 kDa, puede distinguirse una pequeña banda que se mantiene durante toda la fase gástrica de la digestión, la cual puede ser atribuida a la pepsina (Macierzanka y col., 2009; Mandalari y col., 2014). Contrariamente a lo observado para β lg, la banda correspondiente a la α -lactoalbúmina, desaparece luego de unos pocos minutos bajo condiciones de digestión gástrica, lo que indica que esta proteína es susceptible a la hidrólisis llevada a cabo por pepsina (Guo y col., 2014; Kim y col., 2007). Sin embargo, al analizar la fase duodenal de la digestión (Figura II.1b), se observa que la banda de β lg permanece durante todo el tiempo de digestión aunque con menor intensidad a la vez que aparecen bandas difusas en la zona de bajo peso molecular. Este resultado indicaría que las soluciones de β lg, presentan mayor sensibilidad a las proteasas duodenales que a la pepsina como han indicado otros autores (del Castillo-Santaella y col., 2014; Macierzanka y col., 2012). Además, se observan bandas entre 25-30 kDa que permanecen durante toda la fase duodenal, las cuales pueden ser atribuidas a tripsina y quimotripsina.



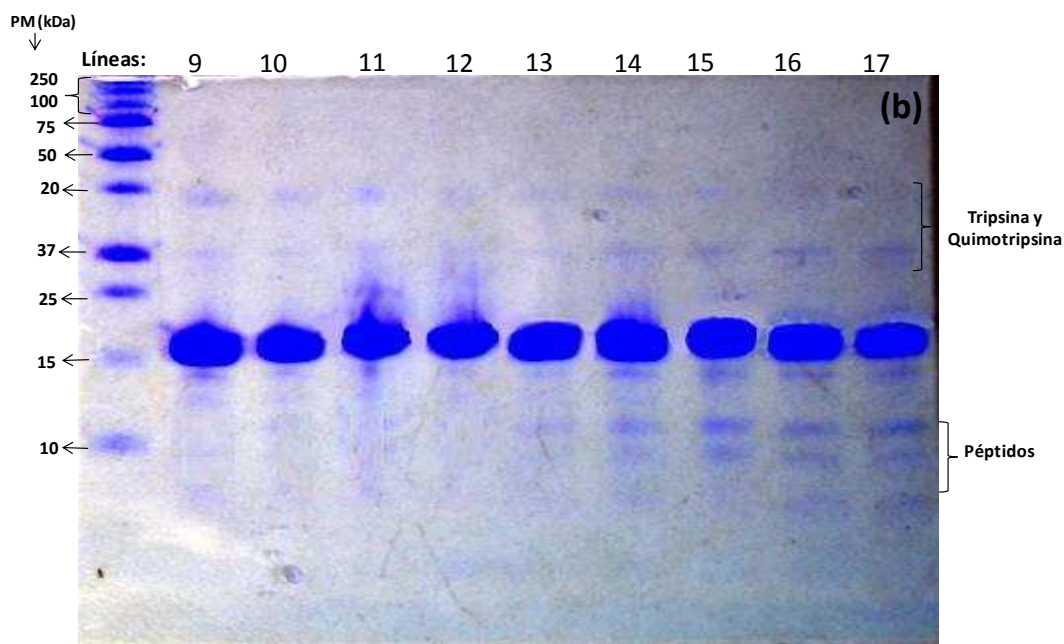


Figura II.1. Perfil electroforético para una solución de β lg 2% p/p durante la digestión gastroduodenal *in vitro*: (a) Etapa gástrica y (b) Etapa duodenal. PM: Patrón de pesos moleculares; Línea 0: Solución de β lg con FGS; Líneas 1-8: solución de β lg con FGS en presencia de pepsina incubada por 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 40 y 60 minutos respectivamente. Líneas 9-17: solución de β lg con FIS en presencia de tripsina y quimotripsina incubada por 0; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 y 60 minutos respectivamente.

El perfil electroforético obtenido para la solución de SPI sometida al proceso de digestión gastroduodenal se muestra en la Figura II.2. En la calle 0 (Figura II.2a) se observa el resultado correspondiente de mezclar la solución de SPI con el FGS, en la cual pueden distinguirse diferentes bandas asociadas con las subunidades constitutivas de esta proteína. El perfil electroforético obtenido presenta similitud con el reportado por Malaki Nik, Wright y Corredig (2011), a partir del cual es posible identificar las diferentes unidades correspondientes a la β -conglucina (α , α' y β) y a la glicina (subunidad ácida (A) y subunidad básica (B)) (Petrucelli y Añón, 1995; Pizones Ruiz-Henestrosa, Martínez, Patino y Pilosof, 2012). Respecto a los resultados de la pepsinólisis de la solución de SPI (Calles 1-8, Figura II.2a), puede deducirse que esta proteína presenta mayor sensibilidad a la actividad de la proteasa que la β lg al mostrar una importante reducción en la intensidad de las bandas características en el tiempo de digestión, a la vez que se identifica la aparición de nuevas bandas en la zona de menor peso molecular, que pueden ser asociadas a la formación de pequeños péptidos. De hecho, las bandas

correspondientes a las subunidades α , α' , A y B, desaparecen hacia el final de la etapa gástrica (calles 7-8, Figura II.2a).

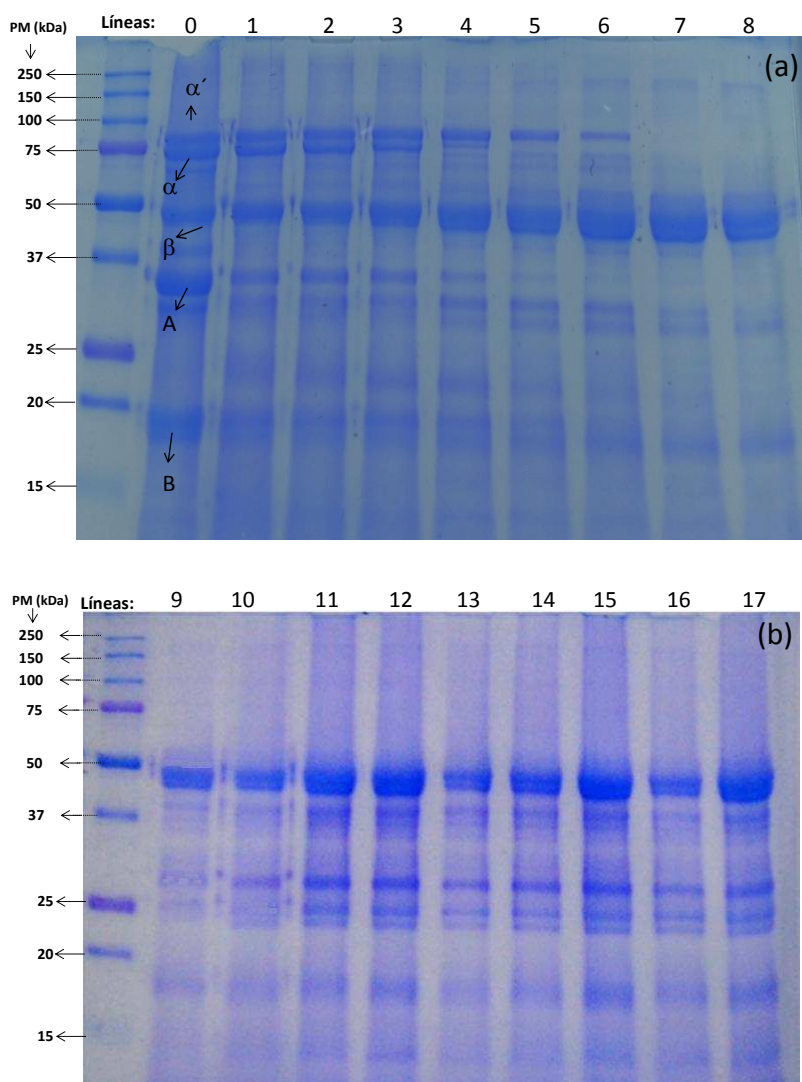


Figura II.2. Perfil electroforético para una solución de SPI 2% p/p durante la digestión gastroduodenal *in vitro*: (a) Etapa gástrica y (b) Etapa duodenal. PM: Patrón de pesos moleculares; Línea 0: Solución de SPI con FGS; Líneas 1-8: solución de SPI con FGS en presencia de pepsina incubada por 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 40 y 60 minutos respectivamente. Líneas: 9-17: solución de SPI con FIS en presencia de tripsina y quimotripsina incubada por 0; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 y 60 minutos respectivamente.

En la fase duodenal (Figura II.2b) se observa que la banda de 47 kDa reduce su intensidad a lo largo del tiempo de digestión, a la vez que algunas bandas difusas aparecen en la zona de menor peso molecular, indicando la actividad de la proteasas duodenales sobre los productos provenientes de la pepsinólisis previa, aunque de todas maneras, los cambios no fueron tan evidentes como en la fase gástrica.

II.3. Digestión interfacial de la película formada por cada emulsionante

La digestión interfacial se evaluó a partir de la evolución de la tensión interfacial (γ) a lo largo del tiempo, a medida que la película interfacial es sometida a las distintas etapas del proceso de digestión *in vitro* (Figuras II.3-II.5). Por otra parte, también se determinó la variación del módulo dilatacional interfacial (Figura II.6) a lo largo de dichas etapas. En la Tabla II.1 se presentan los valores de γ en el pseudoequilibrio (al alcanzar valores de γ prácticamente constantes) y del módulo dilatacional interfacial obtenido al final de cada etapa de la digestión.

II.3.1. Etapa control: *Formación de la película interfacial con el emulsionante*

La primera etapa del proceso (etapa control) consiste en la formación de una gota pendiente con solución de emulsionante (1 %) en la cubeta de vidrio que contiene el aceite de girasol purificado, utilizado como fase oleosa. De esta manera se crea la interfase O/W que permitirá la formación de la película interfacial de emulsionante, que en las etapas sucesivas se someterá al proceso de digestión gastroduodenal *in vitro*.

En el caso de las proteínas (Figura II.3 (β lg) y Figura II.4 (SPI)) se observó una continua disminución de los valores de γ , indicativo de que con el tiempo aumenta la cantidad de proteínas que se adsorben en la interfase O/W creada (Damodaran y Kinsella, 1990; Murray, 2011; Rodríguez Niño, Sánchez, Pizones Ruíz-Henestrosa y Rodríguez Patino, 2005). Este comportamiento corrobora la actividad interfacial reportada en la literatura para estos emulsionantes (Malaki Nik y col., 2011; Maldonado-Valderrama y col., 2008; Palazolo, Mitidieri y Wagner, 2003). En ambos casos se observó un comportamiento similar, distinguiéndose dos regiones: una primera en la que se produce un descenso rápido de γ , seguida de otra región donde el valor de γ disminuye de una forma mucho más lenta (del Castillo-Santaella y col., 2014). Como ya indicó MacRitchie (1989), el proceso de adsorción interfacial de macromoléculas complejas como las proteínas tiene lugar en diferentes etapas: En primer lugar, se produce la difusión de las moléculas proteicas desde el seno de la subfase hacia la interfase; a continuación ocurre la penetración del emulsionante en la interfase, responsable de la gran disminución inicial de γ . Como última etapa, se produce el reordenamiento de estas macromoléculas adsorbidas en la interfase, mediante el cual estas exponen los grupos polares a la fase acuosa y los no polares a la fase oleosa, responsables de la menor tasa de disminución de

γ registrada a tiempos mayores. El comportamiento obtenido en ambos casos es característico de este tipo de moléculas (del Castillo-Santaella y col., 2014; Maldonado-Valderrama y col., 2013) presentando una cinética de adsorción interfacial muy diferente a la reportada para moléculas más simples y pequeñas como las sales biliares o los polisorbato (Tween 20 o Tween 80), con los que se alcanzan valores constantes de γ en cortos períodos de tiempo (Kerwin, 2008; Rodríguez Niño y Rodríguez Patino, 1998; Torcello-Gomez, Maldonado-Valderrama, Jodar-Reyes, Cabrerizo-Vilchez y Martín-Rodríguez, 2014). A tiempos mayores (4500 s), a medida que la interfase se va saturando con las moléculas de emulsionante adsorbidas, la variación de γ comienza a ser mucho menor. En esta instancia se puede hablar de la existencia de una barrera energética para la adsorción de la proteína, de forma que la capacidad de estas para crear un espacio en la película, penetrar en ella y, posteriormente, reordenarse, se convierte en el mecanismo controlante del proceso de adsorción (McClements, 2015; Pizones Ruiz-Henestrosa, 2008).

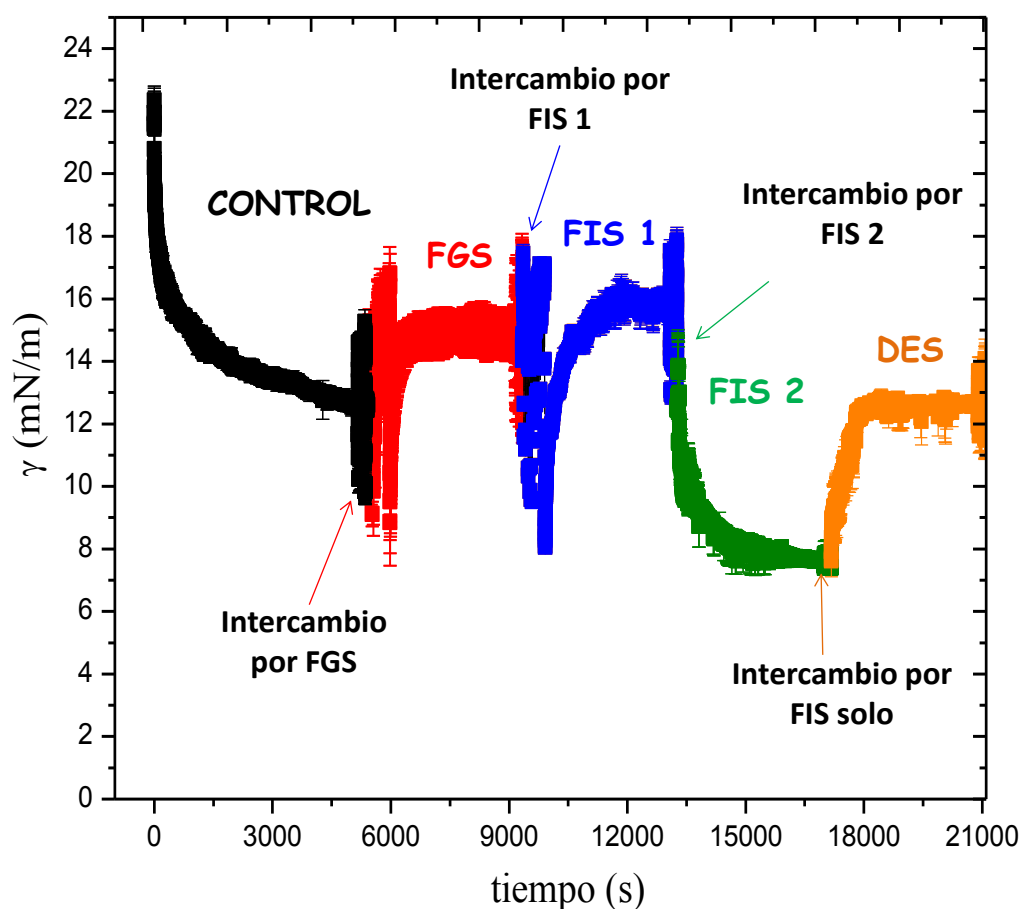


Figura II.3. Variación de la tensión interfacial (γ) en el tiempo a 37 °C durante el proceso de digestión gastroduodenal *in vitro* de la película formada por β lg en la interfase O/W.

Si bien el comportamiento de ambas proteínas es similar, los valores de γ alcanzados por la película de SPI fueron menores a los obtenidos por la película de β Ig hacia el final de la etapa (Tabla II.1), lo que refleja una mayor actividad interfacial de las proteínas de soja. Esta diferencia podría ser consecuencia de diferencias en la funcionalidad de las moléculas, por ejemplo en su hidrofobicidad (Martin, Grolle, Bos, Stuart y van Vliet, 2002), o bien puede asociarse también con diferencias en la flexibilidad molecular ya que cuanto más flexible es una proteína, menor es el valor de γ que puede alcanzar durante su adsorción interfacial (Benjamins, Lyklema y Lucassen-Reynders, 2006). Además, es importante recordar que el aislado proteico de soja utilizado en el presente trabajo se encuentra desnaturalizado térmicamente y, como ya se ha reportado antes, las modificaciones estructurales de las proteínas de soja (como por ejemplo su desnaturalización) aumentan su flexibilidad molecular mejorando, por lo tanto, sus propiedades interfaciales (Martinez, Carrera Sanchez, Pizones Ruiz-Henestrosa, Rodríguez Patino y Pilosof, 2007).

A diferencia de lo visto con las proteínas, la adsorción interfacial obtenida para E5LV (Figura II.5) fue mucho más rápida, caracterizándose por alcanzar un valor de γ constante a los pocos minutos de iniciada la adsorción. Este comportamiento ya ha sido descrito antes por Camino, Pérez, Sanchez, Rodriguez Patino y Pilosof (2009) y la diferencia con respecto al comportamiento observado para las proteínas puede atribuirse a su menor complejidad estructural, menor peso molecular y su excelente actividad interfacial, que permite que las moléculas de HPMC alcancen la interfase en cortos períodos de tiempo (Beverung, Radke y Blanch, 1999; Camino, Sánchez, Rodríguez Patino y Pilosof, 2011; Dickinson, 2003; Torcello-Gómez y col., 2011).

Ha sido reportado en numerosos artículos, que la complejidad estructural de las proteínas se debe a la naturaleza de los aminoácidos que las conforman. Al tratarse de sustancias anfifílicas, en solución adoptan estructuras tridimensionales complejas, de modo que los grupos hidrofóbicos quedan recluidos al interior de la macromolécula, mientras que los grupos más hidrofílicos, por su naturaleza quedan en contacto con la fase acuosa circundante (Stoker, 2015). Pero en la interfase que se genera entre dos líquidos inmiscibles (en este caso entre el aceite de girasol y el agua), las proteínas se adsorben y cambian su conformación, dependiendo de su peso molecular, la flexibilidad de la molécula, el grado de hidrofobicidad, la carga, etc. (Miller y col., 2013; Mitropoulos,

Mutze y Fischer, 2014). Lo cierto es que, debido a los numerosos cambios conformacionales que experimentan las proteínas en la interfase, normalmente requieren de mayor tiempo para alcanzar las condiciones de pseudoequilibrio, (Bos y van Vliet, 2001; del Castillo-Santaella y col., 2014).

Respecto a los valores de E obtenidos al final de esta etapa (Figura II.6), se observa que las proteínas forman películas interfaciales más elásticas (mayores valores de E) que las formadas por las moléculas de E5LV, lo cual refleja el mayor grado de interacción entre las moléculas de proteína adsorbidas en la interfase (Murray, 2011).

II.3.2. Etapa FGS: *Digestión gástrica de la película interfacial*

Luego de 60 minutos de iniciada la etapa control se procedió a realizar el primer intercambio de la subfase. El mismo consistió en la incorporación del FGS en presencia de concentración fisiológica de pepsina a modo de llevar a cabo la etapa gástrica de la digestión *in vitro* sobre la película interfacial.

Sin embargo, antes de proceder al intercambio de la subfase, se verificó que cada emulsionante se adsorbiera en la interfase O/W de forma irreversible (resultados no mostrados). Para ello se formó una gota con la solución acuosa del emulsionante dentro de la fase oleosa y luego de 90 minutos se realizó el intercambio de la subfase con agua bidestilada (mismo medio con el que se preparó la solución de emulsionante) a modo de no inducir cambios en el pH o en las condiciones iónicas del medio. De esta forma se pudo corroborar la irreversibilidad en la adsorción de las moléculas de emulsionante, ya que no se observaron cambios en los valores de γ ni en los de E . De esta manera, puede descartarse que los cambios que tengan lugar luego de los sucesivos intercambios de la subfase sean consecuencia de las perturbaciones producidas en cada película por el proceso de intercambio en sí mismo. Beverung y col. (1999) han mostrado que la irreversibilidad con la que se adsorben algunas macromoléculas en la interfase O/W es atribuible a la presencia de grupos hidrófobos (por ejemplo, aminoácidos hidrófobos) que, al presentar una gran afinidad por la fase oleosa, incrementan la estabilidad de la conformación desplegada de las macromoléculas.

Volviendo a la simulación de la etapa gástrica, los cambios más importantes de γ se observaron para las películas interfaciales formadas por proteínas (Figura II.3 (β Ig) y Figura II.4 (SPI)), donde la tensión interfacial, alcanzó un valor de 14,5 y 11,4 mN/m, al

final de la etapa, para las películas formadas por β lg y SPI, respectivamente (Tabla II.1). Tales cambios pueden estar asociados a la actividad de la pepsina sobre las proteínas adsorbidas en la interfase O/W (Maldonado-Valderrama y col., 2013; Maldonado-Valderrama y col., 2012). Macierzanka y col. (2009) han investigado el efecto que presenta el FGS (en presencia de pepsina) sobre películas formadas en interfases O/W, utilizando aceite de oliva como fase oleosa. En este caso, las películas interfaciales de origen proteico (β lg y β -caseína) también experimentaron un aumento en los valores de γ al exponerlas a las condiciones de digestión gástrica. Esto se atribuyó a la degradación de la proteína adsorbida, que da como resultado una disminución de la cobertura interfacial, es decir, un incremento en la superficie expuesta entre el aceite y el agua. Resultados similares observaron del Castillo-Santaella y col. (2014), concluyendo que al adsorberse las moléculas de β lg en la interfase, estas exponen sitios activos para que la pepsina lleve a cabo la proteólisis. Además, corroboraron que los pulsos eléctricos modifican la estructura y la conformación de la proteína, aumentando su hidrofobicidad superficial, en consecuencia su grado de desplegamiento y por ende la susceptibilidad a la pepsina. Estos resultados demuestran que, si bien las moléculas de β lg son estables en presencia de pepsina cuando se encuentran en solución (Figura II.1), la desnaturalización interfacial que tiene lugar cuando la proteína se adsorbe en la interfase aumenta su susceptibilidad a la proteólisis, fenómeno que también fue evidenciado por otros autores (del Castillo-Santaella y col., 2014; Malaki Nik y col., 2010b; Singh y Ye, 2013), quienes indicaron que el despliegue interfacial de la proteína origina la exposición de grupos sensibles a la actividad de la pepsina que, de lo contrario (cuando la proteína se encuentra en solución) se encontrarían recluidos en el interior de la estructura globular.

Por el contrario, los efectos fueron menos evidentes para la película formada por E5LV (Figura II.5), donde se observó una disminución instantánea en el valor de γ al inicio de la etapa que se mantuvo constante hasta el final de la misma. Este resultado concuerda con el hecho de que las moléculas de HPMC no son hidrolizadas por la pepsina (Fathi, Martín y McClements, 2014; Mudgil y Barak, 2013), y además guarda relación con el comportamiento de las emulsiones estabilizadas por E5LV, que presentaron un cierto grado de desestabilización al inicio de la fase gástrica de la digestión *in vitro*, aunque la distribución de tamaño de gota se mantuvo constante durante el tiempo restante (apartado I.3.1).

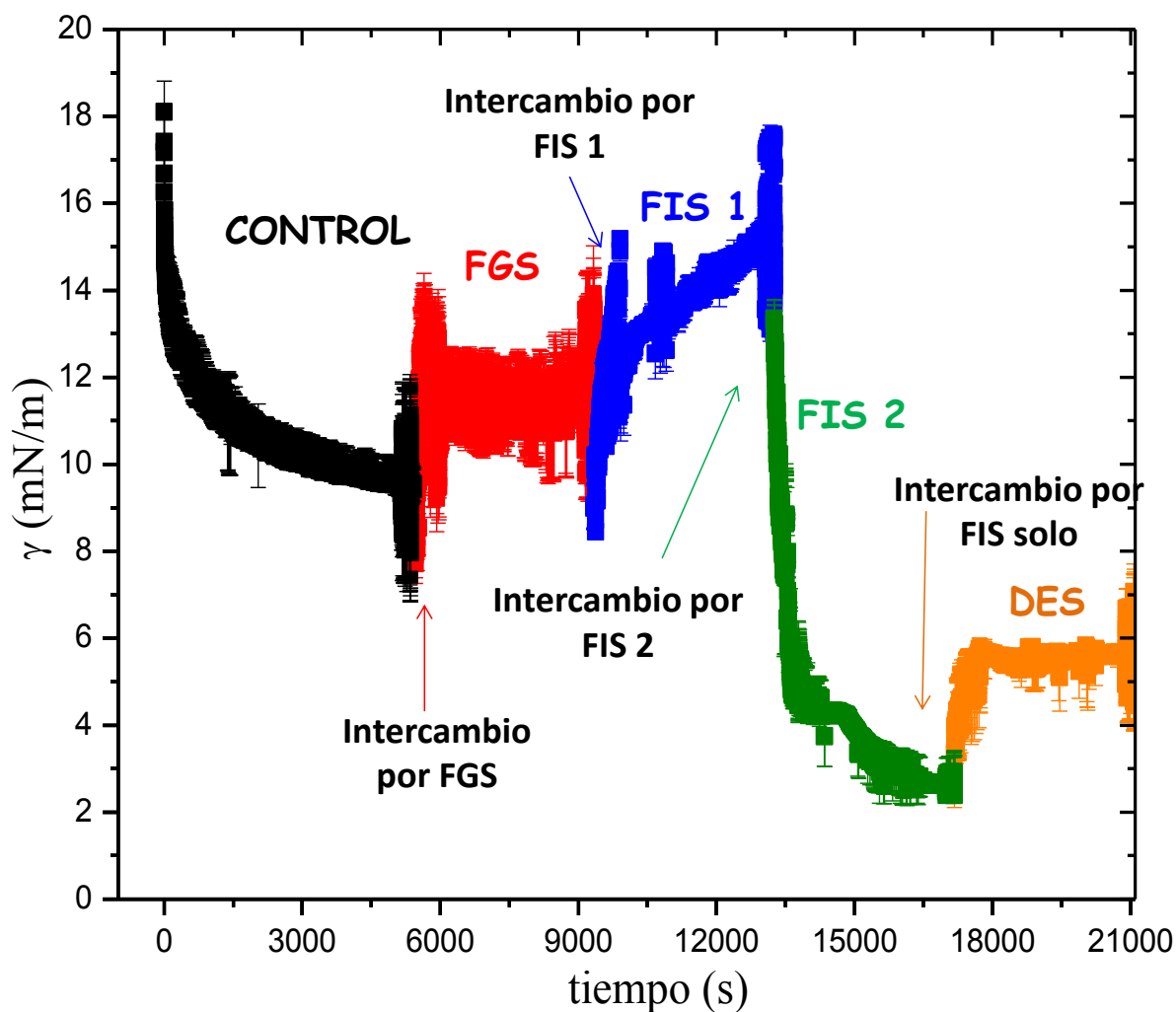


Figura II.4. Variación de la tensión interfacial (γ) en el tiempo a 37 °C durante el proceso de digestión gastroduodenal *in vitro* de la película formada por SPI en la interfase O/W.

Con respecto al comportamiento reológico interfacial de estas películas al finalizar esta etapa, prácticamente no se observó cambio en los valores de E (respecto a la etapa control) para la película interfacial de SPI, lo que sugiere que la hidrólisis llevada a cabo por pepsina no afectaría a la elasticidad de esta película. Sin embargo, se observó un aumento de E para la película formada por β lg (Figura II.6). No obstante, Maldonado-Valderrama y col. (2013) reportaron que las películas de β lg formadas en interfases O/W (usando aceite de oliva como fase oleosa) experimentaron una pequeña disminución en los valores de E cuando se sometieron a las condiciones de digestión gástrica, posiblemente debido a la ruptura de las uniones entre las moléculas, originados por la pepsina. Esta diferencia puede deberse, en parte, a diferencias en las condiciones del medio de reacción, ya que ellos emplearon solo una solución de NaCl para simular las

condiciones de digestión gástrica, mientras que en este trabajo se ha empleado un FGS cuya composición es mucho más compleja (apartado 2.4.1, materiales y métodos). Como se ha reportado previamente, cambios en la composición de sales o en la fuerza iónica del medio acuoso, afectan el carácter elástico de las películas interfaciales (Maldonado-Valderrama, Miller, y col., 2010; Singh y col., 2013). Es posible, que en el presente trabajo el efecto de las sales y la fuerza iónica haya podido enmascarar la hidrólisis interfacial de la película de β lg y, en consecuencia, el apantallamiento de las cargas podría favorecer la interacción entre las moléculas, lo que daría lugar a los incrementos en E observados (Figura II.6). En un trabajo previo Roth, Murray y Dickinson (2000) han demostrado que el apantallamiento de las cargas superficiales promueve el incremento en la cohesividad de las películas interfaciales, obstaculizando la penetración de los surfactantes de bajo peso molecular en la interfase. Por el mismo motivo, al disminuir la repulsión electrostática entre moléculas, el apantallamiento de cargas podría favorecer el acercamiento y la posterior interacción de las gotas de aceite en las emulsiones estabilizadas por β lg, conduciendo a un incremento en el diámetro promedio de las gotas de aceite a lo largo de la etapa gástrica (Tabla I.2) (Kim, Decker y McClements, 2002; Tcholakova, Denkov, Sidzhakova y Campbell, 2006; Wooster y Augustin, 2007). Sin embargo, Maldonado-Valderrama y col. (2013) también han observado que, aunque las películas interfaciales formadas por β -caseína experimentan aumentos en los valores de γ tras la pepsinólisis, a diferencia la película de β lg, también reportaron incrementos en los valores de E, los cuales fueron atribuidos al mayor grado de interacción entre los péptidos resultantes de dicha proteólisis.

Para la película formada por E5LV, los valores de E permanecen casi sin cambios respecto a la etapa control, lo que sugiere que el grado de interacción entre las moléculas de HPMC adsorbidas en la interfase no se vería afectado por las condiciones de digestión gástrica. La HPMC, además de ser resistente a la acción de la pepsina (Jin, Xia, Jiang, Zhao y He, 2009; Mudgil y col., 2013), es un polisacárido no iónico cuyas soluciones presentan igual carga (y magnitud) a pH cercano a la neutralidad (pH 6,0) que a pH ácido (pH 3,0) (Camino y Pilosof, 2011), lo que sugiere que el grado de interacción tampoco debería verse afectado por los cambios de pH de 7,0 (etapa control) a 2,5 (etapa gástrica). Estos resultados guardan relación con el comportamiento observado para las emulsiones

estabilizadas por E5LV, que en presencia del FGS no registraron cambios en la distribución de tamaño de gota de aceite (Figura I.4).

II.3.3. Etapa FIS 1 de digestión duodenal de la película interfacial: *Proteólisis duodenal*

En el caso de las películas proteicas, se llevó a cabo a continuación, el intercambio de la subfase resultante de la etapa anterior por el FIS en presencia de las proteasas duodenales (tripsina y quimotripsina) en concentraciones fisiológicas. Este proceso se realizó solo con las películas de origen proteico (y no con las de HPMC) con el objetivo de simplificar el método y acortar el tiempo de duración de la medición, al menos para la película de E5LV, dada su conocida resistencia a la acción hidrolítica de las proteasas duodenales quienes, por su naturaleza, solo actúan sobre las proteínas (Ikeda y Kusano, 1983).

Tras la incorporación del FIS 1, la tensión interfacial experimentó un pequeño incremento en ambas películas interfaciales (Figura II.3 (β lg) y Figura II.4 (SPI)), alcanzando un valor final de 15,5 mN/m en ambos casos (Tabla II.1). Esto sugiere que la hidrólisis de la película interfacial que llevan a cabo las proteasas duodenales (tripsina y quimotripsina), conlleva a una disminución de la cobertura interfacial, aumentando así el área expuesta entre el aceite y el agua, algo similar a lo observado en la etapa anterior, en presencia de la pepsina. del Castillo-Santaella y col. (2014) han atribuido los aumentos de γ que observaron tras la proteólisis de la película interfacial, llevada a cabo por proteasas duodenales a la disminución del espesor de la película ya que al ser solubles, los péptidos más pequeños producidos en la proteólisis, podrían ser desorbidos de la interfase y pasar así al seno de la solución. Por otra parte Shimizu, Saito y Yamauchi (1985) sugirieron que las películas interfaciales formadas por β lg aumentan su flexibilidad molecular al pasar de pH 3 a pH 7, lo que podría dar lugar a la mayor exposición de grupos funcionales a las proteasas duodenales, aumentando de esta forma su susceptibilidad a la proteólisis.

Respecto a los valores de E (Figura II.6), en ambos casos se observó un descenso en el mismo, indicando que la película interfacial resultante es menos compacta. Esta reducción, aunque poco significativa, también es indicativo de la degradación de la película interfacial llevada a cabo por las enzimas duodenales, que da lugar a la formación de péptidos de menor peso molecular, alguno de los cuales podrían desorberse de la interfase, como se ha comentado antes.

Tabla II.1. Tensión interfacial (γ) y módulo dilatacional interfacial (E) obtenidos al final de cada una de las etapas (mN/m).

Etapas	β lg		SPI		E5LV	
	γ	E	γ	E	γ	E
Control	$12,6^b \pm 0,3$	$24,6^b \pm 2,5$	$9,5^c \pm 0,4$	$24,3^b \pm 2,7$	$11,28^c \pm 0,7$	$7,1^c \pm 0,1$
FGS	$14,5^c \pm 1,1$	$30,3^c \pm 1,7$	$11,4^d \pm 0,8$	$23,6^b \pm 1,2$	$10,05^c \pm 0,6$	$6,9^c \pm 0,5$
FIS 1	$15,5^c \pm 0,3$	$25,6^{bc} \pm 2,3$	$15,7^e \pm 0,2$	$20,3^b \pm 2,5$		
FIS 2	$7,5^a \pm 0,1$	$5,6^a \pm 1,2$	$2,6^a \pm 0,1$	$4,9^a \pm 0,9$	$3,55^a \pm 0,2$	$1,6^a \pm 0,7$
DES	$12,8^b \pm 0,2$	$8,23^a \pm 1,2$	$5,6^b \pm 0,2$	$9,6^a \pm 2,9$	$7,3^b \pm 0,3$	$4,6^b \pm 0,2$

II.3.4. Etapa FIS 2 de digestión duodenal de la película interfacial: *Lipólisis duodenal*

En esta etapa se llevó a cabo el proceso de lipólisis duodenal, utilizando concentraciones fisiológicas de lipasa pancreática y sales biliares (SB). Al igual que lo observado previamente durante la digestión *in vitro* de las emulsiones (Capítulo I), los cambios más importantes se han observado en las condiciones de lipólisis duodenal en concordancia con lo observado por otros autores (Lesmes y McClements, 2012; Malaki Nik y col., 2011; Sarkar, Goh, Singh y Singh, 2009; Singh y col., 2013). La magnitud de los cambios observados en los parámetros interfaciales se puede asociar a numerosos fenómenos que tienen lugar durante esta etapa de la digestión, entre los que se encuentran: la adsorción de las SB a la interfase; su interacción con la película interfacial parcialmente digerida, adsorción y actividad enzimática (lipasa pancreática), cambio de las cargas superficiales, acumulación de los productos de la reacción, etc. que, en definitiva, dan como resultado una interfase de características mucho más complejas.

En concordancia con del Castillo-Santaella y col. (2014), se observó una importante disminución en los valores de γ bajo las condiciones de lipólisis duodenal, independientemente de la naturaleza de la película interfacial (Tabla II.1). Maldonado-Valderrama y col. (2013) y Torcello-Gomez y col. (2014) indicaron que la disminución en los valores de γ que tiene lugar durante la lipólisis interfacial puede dividirse en dos regiones: una importante disminución al principio, es decir ni bien se inicia esta etapa, seguida por una disminución mucho más gradual de γ , que se mantiene hasta el final del proceso, alcanzando un valor de pseudoequilibrio. La gran disminución inicial, que tiene lugar en cuestión de segundos, puede asociarse a la rápida penetración de las SB, surfactantes biológicos caracterizados por su gran actividad interfacial, que por su pequeño tamaño serían capaces de penetrar las películas interfaciales, cubrir la interfase

O/W y en consecuencia, originar los descensos de γ observados (Golding y col., 2011; Mackie y col., 2001; Malaki Nik y col., 2011; Maldonado-Valderrama, Wilde, Macierzanka y Mackie, 2011; Maldonado-Valderrama y col., 2008; Sarkar y col., 2009). Por otra parte, de disminución más lenta de γ observada a tiempos mayores estaría asociada con el proceso de lipólisis, que da lugar formación de AGL (producto de la digestión de lípidos) que por su naturaleza anfifílica, contribuyen a esa disminución de γ , pero de una forma más gradual (Reis y col., 2009; Sarkar, Horne y Singh, 2010). Finalmente, a tiempos mayores la saturación interfacial causada por la acumulación de moléculas (SB y AGL) tiene un efecto inhibitorio en la actividad de la lipasa pancreática (por impedimentos estéricos), y como consecuencia γ permanece casi sin cambios hacia el final de la etapa. Esta conclusión guarda relación con los resultados observados durante la fase duodenal de la digestión *in vitro* de las emulsiones, más precisamente con las curvas de lipólisis (Figura I.9), donde se observó que luego de 10 minutos, el incremento en el número de AGL (% AGL) disminuyó considerablemente como consecuencia de su acumulación en la interfase, resultados que también fueron observados por otros autores (Espinal-Ruiz, Parada-Alfonso, Restrepo-Sánchez, Narváez-Cuenca y McClements, 2014; McClements y Li, 2010; Mun, Decker y McClements, 2007).

Por otra parte, puede observarse en la Figura II.6 la gran reducción en los valores de E, indicativo de que la estructura interfacial resultante es menos compacta. Posiblemente, a consecuencia de la hidrólisis de la película interfacial, la penetración de las SB y, la acumulación de los productos resultantes de la lipólisis se produce una ruptura de cada película interfacial que afecta el grado de interacción entre las moléculas adsorbidas.

Este gran descenso de los valores de E guarda relación con los altos grados de desestabilización observados para todas las emulsiones bajo las condiciones que simulan a la etapa duodenal de la digestión *in vitro* (Figura I.5), ya que cuanto menos elástica es la película interfacial que forma un emulsionante, menor es la estabilidad de la emulsión resultante (Maldonado-Valderrama y col., 2013; Tadros, 2013). Sin embargo, a pesar del cambio observado, si se compara el resultado obtenido para las películas proteicas resulta que, el sistema formado por β lg experimentó el mayor descenso del valor de E en comparación con los resultados de SPI, con respecto al valor obtenido al final de la etapa anterior (Etapa FIS 1). Este resultado, guarda relación con el mayor grado de

desestabilización observado para las emulsiones estabilizadas por β lg, en comparación con las estabilizadas por SPI, cuando fueron sometidas a la fase duodenal de la digestión *in vitro* (Figura I.5). Estos resultados podrían indicar que la película de β lg sería más afectada por la penetración de SB, quienes dificultan la interacción entre las moléculas de emulsionante adsorbidas, o bien, por el mismo motivo, por el mayor número de AGL generados, lo que concuerda con el % AGL observado durante la fase duodenal de la digestión *in vitro* de las emulsiones, donde la emulsión estabilizada por β lg presentó mayor % AGL que la emulsión de SPI (Figura I.9).

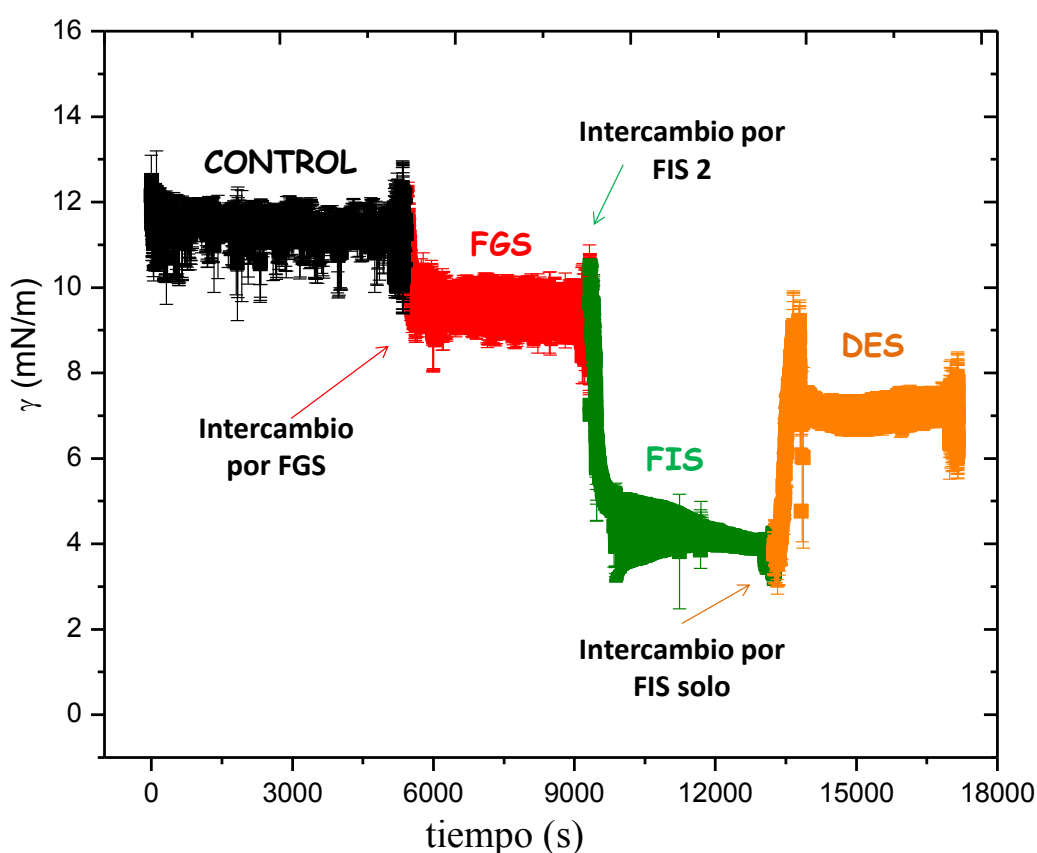


Figura II.5. Variación de la tensión interfacial (γ) en el tiempo a 37 °C durante el proceso de digestión gastroduodenal *in vitro* de la película formada por E5LV en la interfase O/W.

En términos generales, los resultados obtenidos en esta etapa demuestran la formación de una interfase más fluida, de composición heterogénea que debido a los numerosos procesos que tienen lugar, resulta de características muy complejas.

II.3.5. Etapa DES: *Desorción interfacial*

La última etapa (desorción (DES)) consiste en el intercambio de la subfase por el FIS solo, en ausencia de biomoléculas, con objeto de realizar la remoción de cualquier material adsorbido de manera reversible en la interfase: ya sean SB, enzimas, productos de reacción (AGL, MG), etc., sin producir cambios de pH o de fuerza iónica que conlleven a una errónea interpretación de los resultados y poder obtener, de esta manera, las características del film interfacial remanentes tras pasar por todo el proceso de digestión gastroduodenal *in vitro* (Maldonado-Valderrama y col., 2013; Torcello-Gomez y col., 2014).

Se observó un incremento en los valores de γ , en todos los casos, lo que en principio indicaría que ha tenido lugar la remoción de productos (en diferente grado) de cada interfase, generando como resultado una interfase O/W más desprotegida de moléculas interfacialmente activas, lo que se traduce en un aumento de tensión interfacial (del Castillo-Santaella y col., 2014) (Figuras II.3- II.5).

En la Tabla II.1 se observan los valores finales que alcanzaron los parámetros interfaciales (γ y E), indicando que, luego del proceso de desorción, permanecen (en todos los casos) trazas de material adsorbido en la interfase, ya que si hubieran sido removidos en su totalidad, los valores de estos parámetros deberían coincidir con los de la interfase O/W pura, en ausencia de emulsionante (Bellesi, Pizones Ruiz-Henestrosa y Pilosof, 2014). Previamente, algunos autores han estudiado el grado de irreversibilidad con el que se adsorben diferentes componentes involucrados en el proceso de lipólisis. Maldonado-Valderrama y col. (2013) han demostrado, en experimentos similares de adsorción secuencial, la reversibilidad en la adsorción de moléculas de SB en interfases formadas por aceite de oliva y agua. Tras permitir la adsorción de las SB, en la subsiguiente etapa de desorción, corroboraron una remoción completa, al observar que los valores de γ alcanzaron un valor igual al correspondiente a la interfase O/W pura. Por otra parte, Torcello-Gómez y col. (2011) concluyeron también que, a diferencia de las SB, la lipasa pancreática se adsorbe de manera irreversible, de modo que no se generan cambios de γ cuando se lleva a cabo la etapa de desorción. Por el mismo motivo concluyeron que, en ausencia de SB, no tendría lugar la formación de productos de lipólisis, ya que de lo contrario serían retirados de la interfase en diferente grado, pudiendo originar algún

aumento en γ durante la desorción. Sin embargo, se han reportado cambios durante la desorción de una mezcla de ambos componentes (lipasa pancreática en presencia de SB) donde los valores de γ aumentaron hasta alcanzar valores finales intermedios entre los correspondientes a una solución de SB y de lipasa, como consecuencia de la presencia de productos de la lipólisis que quedan adsorbidos en la interfase de forma irreversible (Maldonado-Valderrama y col., 2013). De esta manera, se deduce de estos resultados el rol fundamental de la presencia de las SB en la actividad de la lipasa pancreática en concordancia con Ye, Cui y Singh (2010) quienes reportaron que la lipólisis que tiene lugar sobre glóbulos de grasa láctea se incrementó significativamente en presencia de SB.

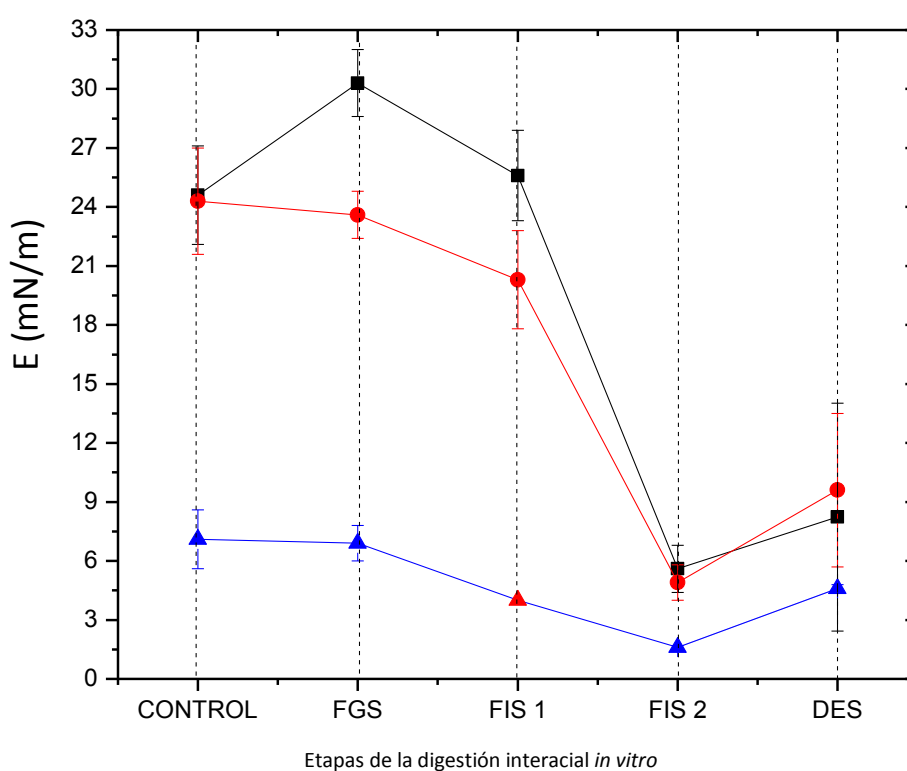


Figura II.6. Variación del módulo dilatacional interfacial (E) durante el proceso de digestión gastroduodenal *in vitro* a 37 °C de la película formada por: β lg (■), SPI (●), y E5LV (▲) en la interfase O/W.

Por lo tanto, se podría emplear el grado en el que aumenta el valor de γ , después de realizar la desorción, como un indicativo de la resistencia que ofrece cada película interfacial a la remoción de los materiales adsorbidos que a su vez son inhibitorios del proceso de lipólisis. Teniendo en cuenta esto, aquellas películas interfaciales que experimentan los mayores aumentos de γ indicarían la mayor facilidad para llevar a cabo la remoción de estos materiales, mientras que por el contrario, aquellos casos que dan

lugar a menores aumentos de γ podrían asociarse a la mayor dificultad para la eliminación de estos materiales durante la desorción. Teniendo en cuenta este criterio, se analizó la variación que experimentó la tensión interfacial durante esta etapa. Es así que se observó que la película formada por β lg es la que experimentó un mayor aumento de γ ($\gamma_{\text{final}} = 12,8 \text{ mN/m}$), seguida por la película de E5LV ($\gamma_{\text{final}} = 7,3 \text{ mN/m}$) y finalmente por la de SPI ($\gamma_{\text{final}} = 5,6 \text{ mN/m}$), lo cual podría indicar que los productos inhibitorios de la lipólisis serían eliminados en mayor medida de las películas formadas por β lg, seguido de las películas de E5LV y finalmente en las formadas por SPI. Este resultado guarda relación con los resultados obtenidos durante el análisis del grado de lipólisis ($(\% \text{ AGL})_{\text{max}}$), discutidos en el capítulo I (Figura I.9), donde las emulsiones estabilizadas por β lg fueron las que experimentaron el mayor % AGL durante la etapa duodenal, seguida por las estabilizadas por E5LV y finalmente por las emulsiones formadas por SPI.

En base a estos resultados, podría pensarse que el logro de una lipólisis reducida estaría relacionado con la menor remoción de los productos de la digestión adsorbidos en la interfase.

Respecto a los valores de E (Figura II.6) obtenidos en dicha etapa, se observó un incremento en relación a la etapa de lipólisis (Etapa FIS 2), pero los valores se mantuvieron bajos en todos los casos, lo cual es indicativo de que ninguna de las películas recupera su integridad tras el proceso de digestión gastroduodenal.

A partir del análisis de películas interfaciales de β lg sometidas a pulsos eléctricos, del Castillo-Santaella y col. (2014) comprobaron la persistencia de los valores bajos de E tras el proceso desorción, lo que indicaría la permanencia de productos resultantes de la lipólisis, como los AGL, que no han sido removidos y, en consecuencia, dificultan la formación de una película elástica.

II.4. Conclusiones

A partir de la utilización del tensiómetro interfacial OCTOPUS, se pudo determinar el efecto de la digestión gastroduodenal sobre películas interfaciales formadas con distintos tipos de emulsionantes en la interfase O/W. Los resultados discutidos en el presente capítulo indican que las características de la estructura interfacial impactan en el proceso de digestión interfacial, tanto en la etapa gástrica como en la duodenal.

Durante la fase gástrica se comprobó una mayor resistencia de la película formada por E5LV en comparación con las de origen proteico, en las cuales, a causa de la proteólisis, se produjo una reducción de la cobertura interfacial. Estos hechos guardan relación con la mayor estabilidad de las emulsiones formadas por E5LV bajo las condiciones de digestión gástrica, en comparación con las estabilizadas por proteínas. Por otra parte, se corrobora el hecho de que el cambio conformacional que tiene lugar cuando la β lg se adsorbe en la interfase, incrementa su susceptibilidad a la actividad de la pepsina. Este hecho indica que el control conformacional de las macromoléculas podría utilizarse para manipular su resistencia a las enzimas digestivas.

Sin embargo, los cambios más importantes se registraron durante la lipólisis duodenal, en concordancia con el comportamiento de las emulsiones durante la digestión, que da como resultado la formación de interfases complejas compuestas por componentes del medio de reacción, restos de cada película interfacial de emulsionante y productos de la digestión de lípidos. Finalmente, la etapa de desorción permitió identificar las películas interfaciales que dificultarían al proceso de remoción interfacial de los componentes adsorbidos en la interfase de forma reversible, que son, a su vez, inhibidores del proceso de lipólisis. Es así que se comprobó que la película de SPI representa el mayor impedimento, seguida por E5LV y finalmente por la película formada por β lg, hecho que guarda relación con el grado de lipólisis alcanzado durante la digestión *in vitro* de cada emulsión.

Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que una lipólisis reducida estaría asociada a la mayor dificultad en la eliminación interfacial de los productos inhibitorios del proceso (como los AGL) mediado por las SB quienes remueven estos materiales en forma de micelas.

Es decir que las SB podrían no estar disponibles en igual grado en las diferentes emulsiones para llevar a cabo el proceso de remoción en forma óptima. Esto sugiere que cada emulsionante adsorbido en la interfase O/W podría tener una capacidad de interacción diferente con las SB adsorbidas en la película interfacial, facilitando o retardando la capacidad de estas para ingresar a la interfase y remover los productos generados durante la lipólisis.

II.5. Referencias

- Bellesi, F. A., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M. y Pilosof, A. M. R. (2014). Behavior of protein interfacial films upon bile salts addition. *Food Hydrocolloids*, 36, 115-122.
- Benjamins, J., Lyklema, J. y Lucassen-Reynders, E. H. (2006). Compression/Expansion Rheology of Oil/Water Interfaces with Adsorbed Proteins. Comparison with the Air/Water Surface. *Langmuir*, 22(14), 6181-6188.
- Beverung, C. J., Radke, C. J. y Blanch, H. W. (1999). Protein adsorption at the oil/water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements. *Biophysical Chemistry* 81, 59-80.
- Bos, M. y van Vliet, T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91(3), 437-471.
- Brew, K., Castellino, F. J., Vanaman, T. C. y Hill, R. L. (1970). The Complete Amino Acid Sequence of Bovine α -Lactalbumin. *Journal of Biological Chemistry*, 10, 4570-4582.
- Camino, N. A., Pérez, O. E., Sanchez, C. C., Rodríguez Patino, J. M. y Pilosof, A. M. R. (2009). Hydroxypropylmethylcellulose surface activity at equilibrium and adsorption dynamics at the air–water and oil–water interfaces. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2359-2368.
- Camino, N. A. y Pilosof, A. M. R. (2011). Hydroxypropylmethylcellulose at the oil–water interface. Part II. Submicron-emulsions as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1051-1062.
- Camino, N. A., Sánchez, C. C., Rodríguez Patino, J. M. y Pilosof, A. M. R. (2011). Hydroxypropylmethylcellulose at the oil–water interface. Part I. Bulk behaviour and dynamic adsorption as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 25(1), 1-11.
- Chu, B.-S., Rich, G. T., Ridout, M. J., Faulks, R. M., Wickham, M. S. J. y Wilde, P. J. (2009). Modulating pancreatic lipase activity with galactolipids: effects of emulsion interfacial composition. *Langmuir*, 25(16), 9352-9360.
- Damodaran, S. y Kinsella, J. (1990). Interfaces, Protein Films, and Foams. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 34, pp. 1-79): Academic Press.
- del Castillo-Santaella, T., Sanmartín, E., Cabrerizo-Vílchez, M. A., Arbolea, J. C. y Maldonado-Valderrama, J. (2014). Improved digestibility of β -lactoglobulin by pulsed light processing: a dilatational and shear study. *Soft Matter*, 10(48), 9702-9714.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17(1), 25-39.
- Espinal-Ruiz, M., Parada-Alfonso, F., Restrepo-Sánchez, L.-P., Narváez-Cuenca, C.-E. y McClements, D. J. (2014). Impact of dietary fibers [methyl cellulose, chitosan, and pectin] on digestion of lipids under simulated gastrointestinal conditions. *Food Funct*, 5(12), 3083-3095.
- Fathi, M., Martín, Á. y McClements, D. J. (2014). Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 39(1), 18-39.
- Golding, M., Wooster, T. J., Day, L., Xu, M., Lundin, L., Keogh, J. y Clifton, P. (2011). Impact of gastric structuring on the lipolysis of emulsified lipids. *Soft Matter*, 7(7), 3513-3523.
- Guo, Q., Ye, A., Lad, M., Dalgleish, D. y Singh, H. (2014). Effect of gel structure on the gastric digestion of whey protein emulsion gels. *Soft Matter*, 10(8), 1214-1223.
- Ikeda, K. y Kusano, T. (1983). In Vitro Inhibition of Digestive Enzymes by Indigestible Polysaccharides. *American Association of Cereal Chemistry*, 60(4), 260-263.
- Jin, H., Xia, F., Jiang, C., Zhao, Y. y He, L. (2009). Nanoencapsulation of Lutein with Hydroxypropylmethyl Cellulose Phthalate by Supercritical Antisolvent. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 17(4), 672-677.
- Kerwin, B. A. (2008). Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways. *J Pharm Sci*, 97(8), 2924-2935.
- Kim, H. J., Decker, E. A. y McClements, D. J. (2002). Impact of protein surface denaturation on droplet flocculation in hexadecane oil-in-water emulsions stabilized by beta-lactoglobulin. *J Agric Food Chem*, 50(24), 7131-7137.

- Kim, S. B., Ki, K. S., Khan, M. A., Lee, W. S., Lee, H. J., Ahn, B. S. y Kim, H. S. (2007). Peptic and tryptic hydrolysis of native and heated whey protein to reduce its antigenicity. *J Dairy Sci*, 90(9), 4043-4050.
- Lesmes, U. y McClements, D. J. (2012). Controlling lipid digestibility: response of lipid droplets coated by beta-lactoglobulin-dextran Maillard conjugates to simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 221-230.
- Macierzanka, A., Böttger, F., Lansonneur, L., Groizard, R., Jean, A.-S., Rigby, N. M., Cross, K., Wellner, N. y Mackie, A. R. (2012). The effect of gel structure on the kinetics of simulated gastrointestinal digestion of bovine β -lactoglobulin. *Food Chem*, 134(4), 2156-2163.
- Macierzanka, A., Sancho, A. I., Mills, E. N. C., Rigby, N. M. y Mackie, A. R. (2009). Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of β -casein and β -lactoglobulin. *Soft Matter*, 5(3), 538-550.
- Mackie, A. R., Gunning, A. P., Ridout, M. J., Wilde, P. J. y Rodriguez Patino, J. (2001). In situ Measurement of the Displacement of Protein films from the Air/Water Interface by Surfactant. *Biomacromolecules*, 2, 1001-1006.
- MacRitchie, F. (1989). Protein adsorption/desorption at fluid interfaces. *Colloids Surfaces*, 41, 25-34.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E. y Xavier Malcata, F. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40(10), 1197-1211.
- Malaki Nik, A., Wright, A. J. y Corredig, M. (2010a). Interfacial design of protein-stabilized emulsions for optimal delivery of nutrients. *Food Funct*, 1(2), 141-148.
- Malaki Nik, A., Wright, A. J. y Corredig, M. (2010b). Surface adsorption alters the susceptibility of whey proteins to pepsin-digestion. *J Colloid Interface Sci*, 344(2), 372-381.
- Malaki Nik, A., Wright, A. J. y Corredig, M. (2011). Impact of interfacial composition on emulsion digestion and rate of lipid hydrolysis using different in vitro digestion models. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 83(2), 321-330.
- Maldonado-Valderrama, J., Gunning, A. P., Wilde, P. J. y Morris, V. J. (2010). In vitro gastric digestion of interfacial protein structures: visualisation by AFM. *Soft Matter*, 6(19), 4908-4915.
- Maldonado-Valderrama, J., Holgado-Terriza, J. A., Torcello-Gomez, A. y Cabrerizo-Vilchez, M. A. (2013). In vitro digestion of interfacial protein structures. *Soft Matter*, 9(4), 1043-1053.
- Maldonado-Valderrama, J., Miller, R., Fainerman, V. B., Wilde, P. J. y Morris, V. J. (2010). Effect of Gastric Conditions on β -Lactoglobulin Interfacial Networks: Influence of the Oil Phase on Protein Structure. *Langmuir*, 26(20), 15901-15908.
- Maldonado-Valderrama, J., Torcello-Gómez, A., del Castillo-Santaella, T., Holgado-Terriza, J. A. y Cabrerizo-Vilchez, M. A. (2015). Subphase exchange experiments with the pendant drop technique. *Advances in Colloid and Interface Science*, 222, 488-501.
- Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P., Macierzanka, A. y Mackie, A. (2011). The role of bile salts in digestion. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 36-46.
- Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P. J., Mulholland, F. y Morris, V. J. (2012). Protein unfolding at fluid interfaces and its effect on proteolysis in the stomach. *Soft Matter* 8 (16), 4402-4414.
- Maldonado-Valderrama, J., Woodward, N. C., Gunning, A. P., Ridout, M. J., Husband, F. A., Mackie, A. R., Morris, V. J. y Wilde, P. J. (2008). Interfacial Characterization of β -Lactoglobulin Networks: Displacement by Bile Salts. *Langmuir*, 24, 6759-6767.
- Mandalari, G., Rigby, N. M., Bisignano, C., Lo Curto, R. B., Mulholland, F., Su, M., Venkatachalam, M., Robotham, J. M., Willison, L. N., Lapsley, K., Roux, K. H. y Sathe, S. K. (2014). Effect of food matrix and processing on release of almond protein during simulated digestion. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 439-447.
- Martin, A. H., Grolle, K., Bos, M. A., Stuart, M. A. C. y van Vliet, T. (2002). Network Forming Properties of Various Proteins Adsorbed at the Air/Water Interface in Relation to Foam Stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 254(1), 175-183.

- Martinez, K. D., Carrera Sanchez, C., Pizones Ruiz-Henestrosa, V., Rodríguez Patino, J. M. y Pilosof, A. M. R. (2007). Soy protein-polysaccharides interactions at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 21(5-6), 804-812.
- Martínez, M. J., Carrera Sanchez, C., Rodríguez Patino, J. M. y Pilosof, A. M. (2009). Bulk and interfacial behaviour of caseinoglycomacropeptide (GMP). *Colloids Surf B Biointerfaces*, 71(2), 230-237.
- McClements, D. J. (2015). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques* (3 ed. Vol. 1): CRC Press.
- McClements, D. J. y Li, Y. (2010). Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based. *Food & Function*, 1, 32-59.
- Miller, R., Aksenenko, E. V., Alahverdijeva, V. S., Fainerman, V. B., Kotsmar, C. S., Krägel, J., Leser, M. E., Maldonado-Valderrama, J., Pradines, V., Stefaniu, C., A., S. y Wustneck, R. (2013). *Proteins in Solution and at Interfaces. Methods and Applications in Biotechnology and Materials Science*. New Jersey.
- Mitropoulos, V., Mutze, A. y Fischer, P. (2014). Mechanical properties of protein adsorption layers at the air/water and oil/water interface: a comparison in light of the thermodynamical stability of proteins. *Adv Colloid Interface Sci*, 206, 195-206.
- Mudgil, D. y Barak, S. (2013). Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 1-6.
- Mun, S., Decker, E. A. y McClements, D. J. (2007). Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 40(6), 770-781.
- Murray, B. S. (2011). Rheological properties of protein films. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16(1), 27-35.
- Palazolo, G. G., Mitidieri, F. E. y Wagner, J. R. (2003). Relationship between Interfacial Behaviour of Native and Denatured Soybean Isolates and Microstructure and Coalescence of Oil in Water Emulsions - Effect of Salt and Protein Concentration. *Food Science & Technology International*, 9, 409-419.
- Petrucelli, S. y Añón, M. C. (1995). Soy Protein Isolate Components and Their Interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1762-1767.
- Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M. (2008). *Optimización de las propiedades interfaciales y espumantes de las globulinas de soja*. Universidad de Sevilla, España.
- Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M., Martinez, M. J., Patino, J. M. R. y Pilosof, A. M. R. (2012). A Dynamic Light Scattering Study on the Complex Assembly of Glycinin Soy Globulin in Aqueous Solutions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(7), 1183-1191.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E. y Miller, R. (2009). Lipases at interfaces: a review. *Adv Colloid Interface Sci*, 147-148, 237-250.
- Rodríguez Niño, M. R. y Rodríguez Patino, J. (1998). Surface tension of bovine serum albumin and tween 20 at the air-aqueous interface. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(10), 1241-1248.
- Rodríguez Niño, M. R., Sánchez, C. C., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. y Rodríguez Patino, J. M. (2005). Milk and soy protein films at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 417-428.
- Roth, S., Murray, B. S. y Dickinson, E. (2000). Interfacial Shear Rheology of Aged and Heat-Treated β -Lactoglobulin Films: Displacement by Nonionic Surfactant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1491-1497.
- Sarkar, A., Goh, K. K. T., Singh, R. P. y Singh, H. (2009). Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by β -lactoglobulin in an in vitro gastric model. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1563-1569.
- Sarkar, A., Horne, D. S. y Singh, H. (2010). Pancreatin-induced coalescence of oil-in-water emulsions in an in vitro duodenal model. *International Dairy Journal*, 20(9), 589-597.

- Shimizu, M., Saito, M. y Yamauchi, K. (1985). Emulsifying and structural properties of β -lactoglobulin at different pHs. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 189-194.
- Singh, H. y Ye, A. (2013). Structural and biochemical factors affecting the digestion of protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(4), 360-370.
- Stoker, H. S. (2015). General Structural Characteristics of Proteins. In H. S. Stoker (Ed.), *General, Organic, and Biological Chemistry*: Cengage Learning.
- Tadros, T. F. (2013). *Emulsion Formation, Stability, and Rheology*: WILEY-VCH.
- Tcholakova, S., Denkov, N. D., Sidzhakova, D. y Campbell, B. (2006). Effect of thermal treatment, ionic strength, and pH on the short-term and long-term coalescence stability of beta-lactoglobulin emulsions. *Langmuir*, 22(14), 6042-6052.
- Torcello-Gómez, A., Maldonado-Valderrama, J., de Vicente, J., Cabrerizo-Vílchez, M. A., Gálvez-Ruiz, M. J. y Martín-Rodríguez, A. (2011). Investigating the effect of surfactants on lipase interfacial behaviour in the presence of bile salts. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 809-816.
- Torcello-Gomez, A., Maldonado-Valderrama, J., Jodar-Reyes, A. B., Cabrerizo-Vilchez, M. A. y Martin-Rodriguez, A. (2014). Pluronic-covered oil-water interfaces under simulated duodenal conditions. *Food Hydrocolloids*, 34(54-61).
- Wooster, T. J. y Augustin, M. A. (2007). The emulsion flocculation stability of protein-carbohydrate diblock copolymers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 313(2), 665-675.
- Ye, A., Cui, J. y Singh, H. (2010). Effect of the fat globule membrane on in vitro digestion of milk fat globules with pancreatic lipase. *International Dairy Journal*, 20(12), 822-829.

Capítulo III

Adsorción de las sales biliares en condiciones de digestión duodenal sobre películas formadas por proteínas y HPMC

III.1. Introducción

Si bien la digestión de lípidos comienza en el estómago (10-30 %), se desarrolla en mayor extensión (70-80 %) en el duodeno, primera sección del intestino delgado (Maldonado-Valderrama, Wilde, Macierzanka y Mackie, 2011; Sarkar, Ye y Singh, 2016). Cuando el alimento parcialmente digerido abandona el estómago para ingresar al duodeno, se mezcla con sales y secreciones pancreáticas formando una emulsión estabilizada por surfactantes biológicos, entre ellos principalmente las sales biliares (SB) (Bauer, Jakob y Mosenthin, 2005; McClements y Li, 2010). Estas últimas, sintetizadas en el hígado y almacenadas en la vesícula biliar, se liberan al duodeno para desarrollar un rol crucial durante la digestión lipídica.

Según Golding y Wooster (2010) el proceso de lipólisis involucra un conjunto de eventos que tienen lugar a nivel interfacial, que esencialmente implica tres etapas claves: (1) Unión del complejo entre las SB y la lipasa/colipasa a la interfase O/W, (2) Hidrólisis de los lípidos emulsionados con producción de monoglicéridos y AG, (3) Solubilización de los productos de la lipólisis en micelas de SB para su transporte hacia el epitelio intestinal, quedando la interfase libre para la continua actividad de la lipasa (Reis, Holmberg, Watzke, Leser y Miller, 2009).

Considerando el rol de las interfases en el proceso de lipólisis, numerosos trabajos científicos se han basado en la hipótesis de que las características estéricas, mecánicas y eléctricas de la película interfacial podrían resultar en una barrera a la actividad de la lipasa pancreática y por lo tanto reducir la velocidad y extensión de la lipólisis. Desafortunadamente, los resultados han demostrado que no es posible conseguir una inhibición significativa de la actividad lipolítica controlando estas características de la película interfacial (Pilosof, 2016).

Se ha sugerido que existe un impacto indirecto de los emulsionantes que forman la película interfacial sobre la lipólisis debido a la capacidad de estos para interactuar con las SB, que cumplen un rol crucial para el desarrollo de la lipólisis. Estudios previos han demostrado que la susceptibilidad de las películas interfaciales al desplazamiento-perturbación que llevan a cabo las SB depende de las características moleculares de cada emulsionante (Maldonado-Valderrama y col., 2008; Sarkar, Horne y Singh, 2010), indicando la posibilidad de modular la actividad de la lipasa pancreática a partir de la selección adecuada de emulsionantes.

Como se indicó previamente, el primer paso clave en la digestión de los lípidos requiere de la adsorción interfacial de las SB que, debido a su estructura anfifílica se adsorben rápidamente en la interfase aceite/agua, produciendo la emulsificación de la materia grasa que llega al duodeno. De esta manera, las SB estabilizan pequeñas gotas de aceite, con el propósito de mantener un área interfacial (O/W) elevada para la adsorción posterior del complejo lipasa/colipasa. Previamente, otros trabajos han demostrado que la adsorción interfacial de la lipasa se ve favorecida en presencia de concentraciones fisiológicas de SB (Torcello-Gómez, Maldonado-Valderrama, de Vicente, y col., 2011). Por ejemplo, Ye, Cui y Singh (2010) demostraron que tanto la extensión como la velocidad de lipólisis se incrementa de forma significativa cuando las SB se encuentran presentes en el medio de reacción.

Es decir, que las SB ingresarían a la interfase interfiriendo sobre los emulsionantes adsorbidos, facilitando la adsorción del complejo lipasa/colipasa, motivo por el cual la resistencia que podría ofrecer una película interfacial al desplazamiento/penetración que llevan a cabo las SB, abre un conjunto de hipótesis que constituyen una nueva área de investigación para el diseño de estrategias que permitan un control del proceso de lipólisis (Maldonado-Valderrama y col., 2008; Pilosof, 2016).

En el presente capítulo se estudiará la capacidad de las SB para adsorberse/penetrar en las películas interfaciales formadas por β lg, SPI y E5LV, a fin de determinar si esta etapa del proceso de lipólisis puede explicar las diferencias observadas en la velocidad y extensión de la digestión de lípidos (Capítulo I). Estos estudios se realizarán empleando un tensiómetro interfacial PAT-1 (SINTERFACE Technologies, Berlín, Alemania) y los emulsionantes sin digerir, es decir, en ausencia de proteasas. Además, los resultados se compararán con el comportamiento de una película interfacial formada por un tensioactivo de bajo peso molecular.

III.2. Comportamiento interfacial de las sales biliares

III.2.1. Cinética de adsorción interfacial

En la Figura III.1 se muestra la cinética de adsorción (variación de π con el tiempo) de las SB en la interfase O/W bajo condiciones de digestión duodenal, es decir preparando las soluciones de SB en FIS y realizando las determinaciones a 37 °C. El rango de

concentración estudiado fue de 0 a 25 mg/ml ya que representa el rango de concentraciones fisiológicas según lo reportado en la literatura (Lesmes, Baudot y McClements, 2010; Ruiz-Rodriguez, Meshulam y Lesmes, 2014; Sarkar y col., 2010).

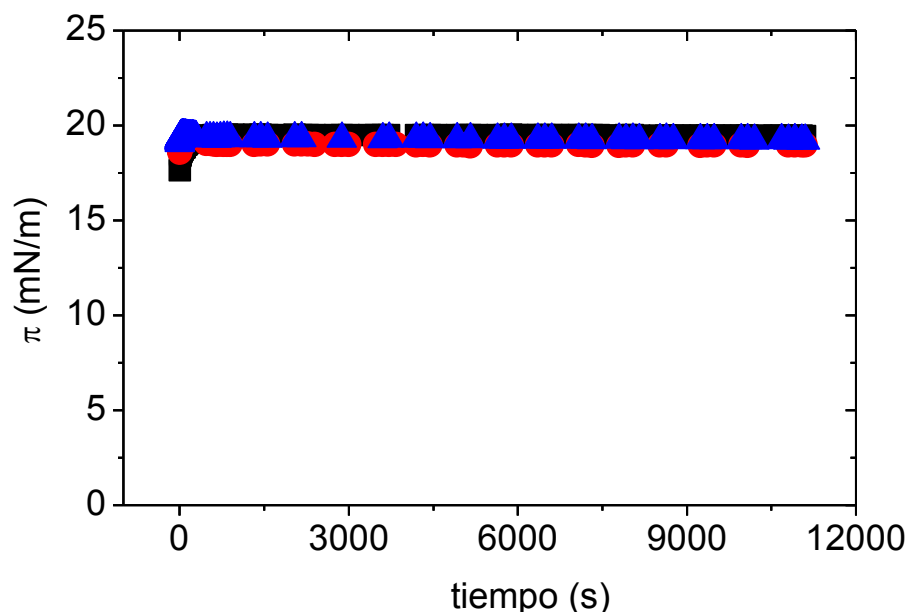


Figura III.1. Variación de la presión interfacial (π) con el tiempo a 37 °C durante la adsorción de las SB a distintas concentraciones: 5 (■), 15 (●) y 25 (▲) mg/ml.

Se observa que el incremento de π durante la etapa inicial de adsorción de las SB es independiente de su concentración en el seno de la fase acuosa, lo cual está de acuerdo con datos previos de la literatura (Maldonado-Valderrama y col., 2008). En todos los casos la velocidad de adsorción interfacial es muy rápida, alcanzándose un valor de π máximo (~19 mN/m) en un tiempo inferior a los cuatro minutos. Este comportamiento corrobora los resultados reportados por Tejera García (2008), quien indicó que los aumentos de π son prácticamente nulos tras la adsorción inicial de las SB. Puede comprobarse también que el valor de π en el “equilibrio” (valor de π a tiempos elevados, momento en que se supone que las SB están organizadas en la interfase) es independientemente de la concentración de SB, lo que indicaría que la interfase se encuentra saturada de SB a todas las concentraciones estudiadas.

III.2.2. Propiedades dilatacionales interfaciales de la película interfacial

Con respecto a las propiedades dilatacionales interfaciales, se muestra en la Figura III.2 la variación del módulo dilatacional (E) con el tiempo de adsorción en función de la

concentración de SB. Estos datos se obtuvieron al aplicar deformaciones sinusoidales a la gota pendiente. Los bajos valores de E que se obtuvieron para las concentraciones analizadas (1-2 mN/m), serían indicativos del bajo grado de interacción existente entre las moléculas de SB adsorbidas en la interfase (Mackie, Gunning, Ridout, Wilde y Rodriguez Patino, 2001). Estos valores coinciden con datos reportados en la bibliografía (Maldonado-Valderrama y col., 2011) e indicarían que prácticamente no hay respuesta de tales películas interfaciales a las pequeñas deformaciones sinusoidales aplicadas.

Wilde y Chu (2011) indicaron que la baja elasticidad de las películas interfaciales formadas por las SB, puede asociarse a su morfología atípica, que determina que las sales presenten una baja densidad de empaquetamiento interfacial (interfase O/W), dando lugar a la formación de una película de mayor fluidez, o por lo menos con menor carácter elástico. Debido a la elevada velocidad de adsorción de las mismas en la interfase, se alcanza un valor de E constante en los primeros minutos, manteniéndose así a lo largo del tiempo de medición, situación similar a la observada al analizar la variación de π .

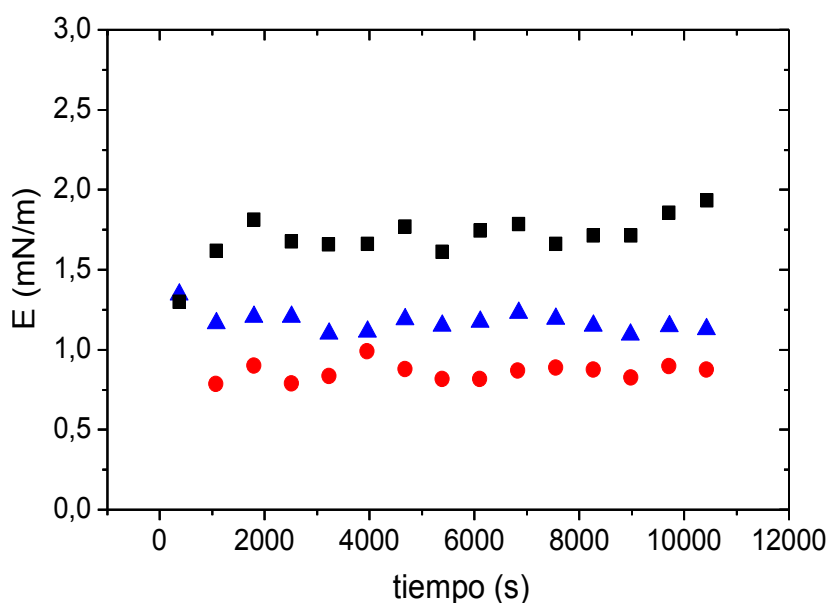


Figura III.2. Variación del módulo dilatacional interfacial (E) con el tiempo a 37 °C durante la adsorción de las SB a distintas concentraciones: 5 (■), 15 (●) y 25 (▲) mg/ml.

En términos generales, el comportamiento de las SB es característico de los emulsionantes de bajo peso molecular que, a diferencia de las macromoléculas, solo

requieren de pocos minutos para adsorberse en la interfase (Bos y van Vliet, 2001; Wilde, Mackie, Husband, Gunning y Morris, 2004).

Los resultados encontrados, indican que la interfase se encuentra saturada de moléculas de SB a la menor concentración analizada (5 mg/ml), de modo que se eligió esta concentración para realizar los estudios que se mostrarán a continuación.

III.3. Comportamiento interfacial de las proteínas y la HPMC

III.3.1. Cinética de adsorción interfacial de las proteínas

En la Figura III.3 se muestra la evolución de π con el tiempo durante la adsorción de β lg y SPI en la interfase O/W, partiendo de soluciones acuosas a una concentración de 1% p/p. En ambos casos se observa un incremento de π durante la etapa inicial de adsorción que se puede asociar con un aumento de la concentración de proteínas en la interfase. Se puede observar, además, que el cambio de π con el tiempo, relacionado con la difusión, penetración y reordenamiento de las proteínas, fue menor para β lg en comparación con SPI.

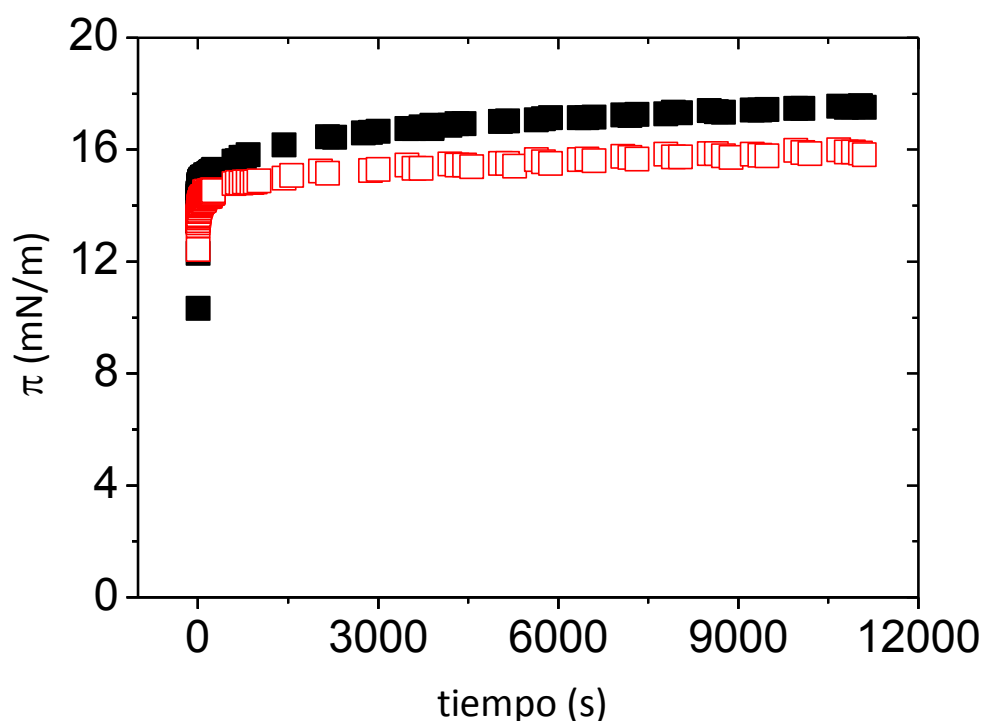


Figura III.3. Variación de la presión interfacial (π) con el tiempo a 37 °C para la adsorción de: SPI (□) y β lg (■). La concentración de proteína en la solución es 1% p/p.

Al comparar estos resultados con los obtenidos para las SB (Figura III.1) se observa que ambos sistemas presentan un comportamiento muy diferente. Mientras las SB alcanzaron un valor de π de equilibrio en menos de cuatro minutos, las proteínas requirieron de un tiempo mayor para lograr saturar la interfase (aproximadamente 4500 segundos). Este comportamiento concuerda con reportes previos que indican que el coeficiente de difusión interfacial que presentan las macromoléculas complejas es inferior al reportado para las SB (tres veces o más, dependiendo del tipo de macromolécula)(Kratohvil, Hsu, Jacobs, Aminabhavi y Mukunoki, 1983; Tejera García, 2008). Dicha diferencia puede atribuirse a las diferencias en el tamaño, forma y complejidad entre ambos tipos de moléculas. Por un lado, las SB son mucho más pequeñas y presentan mayor actividad interfacial que las proteínas que, al presentar mayor peso molecular y tamaño, necesitan más tiempo, no solo para difundir desde el seno de la solución hacia la interfase, sino también para adsorberse y finalmente reordenarse (Abrahamse y col., 2012; Maldonado-Valderrama y col., 2008; Torcello-Gómez, Maldonado-Valderrama, de Vicente, y col., 2011).

III.3.2. Propiedades dilatacionales interfaciales de las proteínas

En cuanto al comportamiento reológico, la Figura III.4 muestra un incremento en los valores de E en función del tiempo, el cual puede atribuirse a la adsorción de la proteína en la interfase (Damodaran y Song, 1988; Graham y Phillips, 1979). Estos resultados son consecuentes con la existencia de una mayor concentración de proteína en la interfase conforme aumenta el tiempo y por ende, un mayor grado de interacción entre las moléculas que forman la película interfacial, que se refleja por el incremento del módulo dilatacional interfacial (Martin, Bos y van Vliet, 2002; Rodríguez Patino, Molina Ortiz, Carrera Sánchez, Rodríguez Niño y Añón, 2003).

Teniendo en cuenta el valor final de E , podría decirse que ambos sistemas se caracterizan por presentar un comportamiento elástico, característico de la mayoría de las macromoléculas interfacialmente activas (Bos y col., 2001; Malcolm, Dexter y Middelberg, 2006), a diferencia de las SB que, como se vio en la Figura III.2, dieron lugar a la formación de película más fluida.

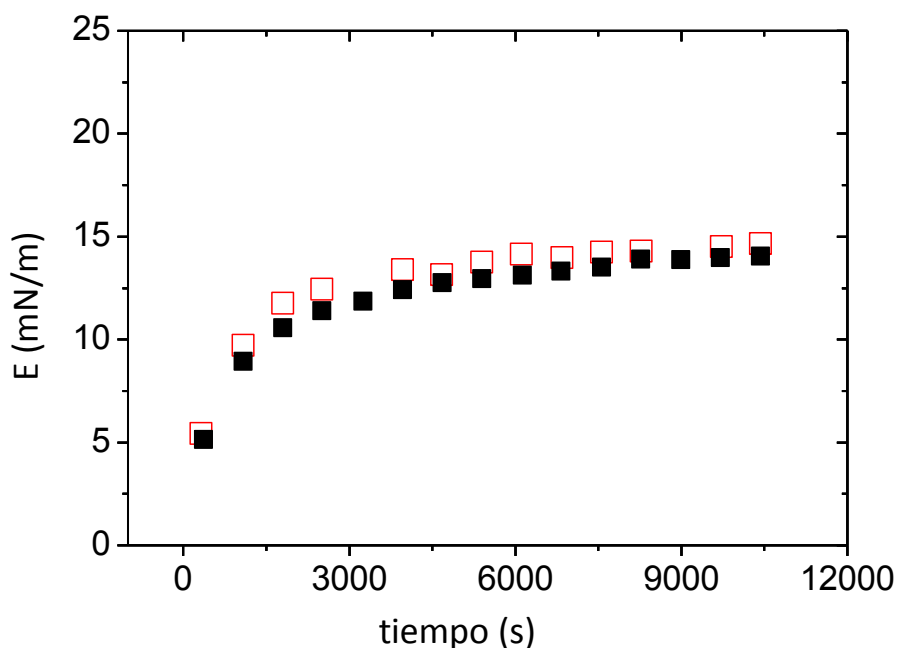


Figura III.4. Variación del módulo dilatacional interfacial (E) con el tiempo a 37 °C para películas de: SPI (□) y βlg (■). La concentración de proteína en la solución es 1% p/p.

Se observa también que los valores finales de E son similares para ambas proteínas, alcanzándose en ambos casos un valor de “equilibrio” de aproximadamente 14 mN/m.

III.3.3. Cinética de adsorción interfacial de la HPMC

Las propiedades de las películas interfaciales formadas por E5LV fueron determinadas a 37 °C empleando una solución a una concentración de 0,5% p/p, ya que representa un valor suficiente para conseguir la saturación interfacial (Camino, Pérez, Sanchez, Rodriguez Patino y Pilosof, 2009; Pérez, Carrera-Sánchez, Rodríguez-Patino y Pilosof, 2007).

La Figura III.5 muestra la cinética de adsorción interfacial, en la cual se observó que los valores de π se incrementaron de inmediato alcanzando un valor máximo en pocos minutos (valor de pseudo-equilibrio), el cual permaneció constante en el tiempo. Estos resultados reflejan la alta actividad interfacial de esta molécula, la cual ya ha sido reportada previamente (Mezdour, Lepine, Erazo-Majewicz, Ducept y Michon, 2008; Pérez y col., 2007; Perez, Sanchez, Rodriguez Patino y Pilosof, 2006) y se correlacionan con los obtenidos utilizando el tensiómetro interfacial OCTOPUS (Figura II.3), donde se corroboró que la tensión interfacial disminuía prácticamente de forma instantánea para alcanzar un valor constante que se mantuvo sin cambios durante el resto del ensayo.

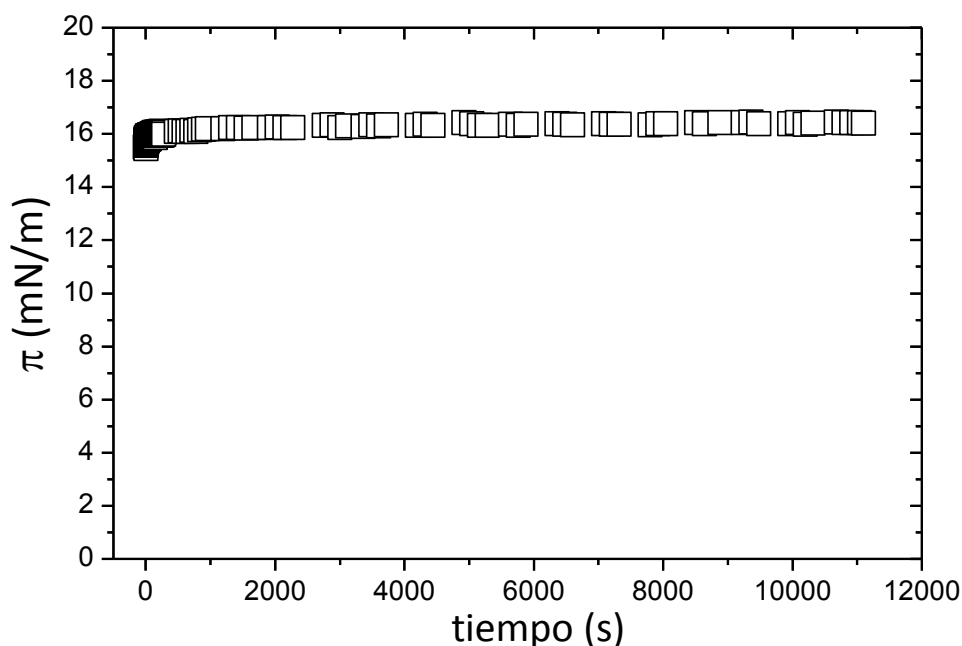


Figura III.5. Variación de la presión interfacial (π) con el tiempo a 37 °C para la adsorción de E5LV. La concentración de E5LV en la solución es 0,5% p/p.

III.3.4. Propiedades dilatacionales interfaciales de la HPMC

En cuanto a los resultados de reología dilatacional interfacial se puede observar, en la Figura III.6 la evolución de E con el tiempo de adsorción del polisacárido.

Se observó un incremento continuo del valor de E , lo que refleja que con el tiempo aumentan de forma lenta y gradual las asociaciones entre las moléculas de polisacárido adsorbidas (Camino, Sánchez, Rodríguez Patino y Pilosof, 2011; Pérez, Sánchez, Pilosof y Rodríguez Patino, 2008). Los elevados valores de E obtenidos reflejan el carácter elástico de la película interfacial formada por esta molécula, lo cual puede ser atribuido al alto grado de sustitución en grupos metilos, lo que aumenta su hidrofobicidad y de esta forma promueven su asociación/gelificación interfacial (Pérez y col., 2008; Rodríguez Patino y Pilosof, 2011; Torcello-Gómez y Foster, 2014).

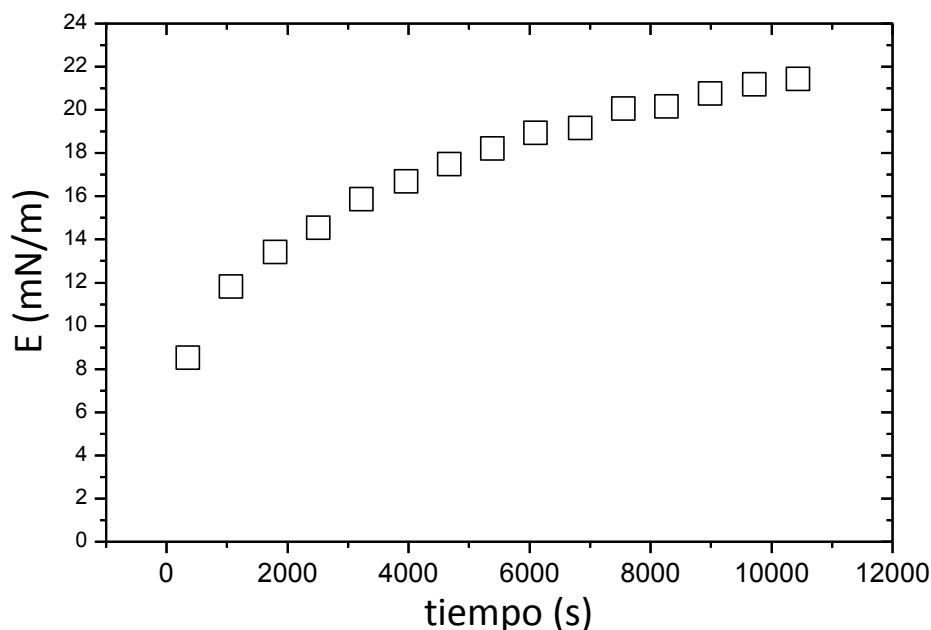


Figura III.6. Variación del módulo dilatacional interfacial (E) con el tiempo a 37 °C para la adsorción de E5LV. La concentración de E5LV en la solución es 0,5% p/p.

III.4. Efecto de las sales biliares en las películas interfaciales formadas por proteínas y HPMC

III.4.1. Adsorción competitiva entre las moléculas de emulsionante y las sales biliares

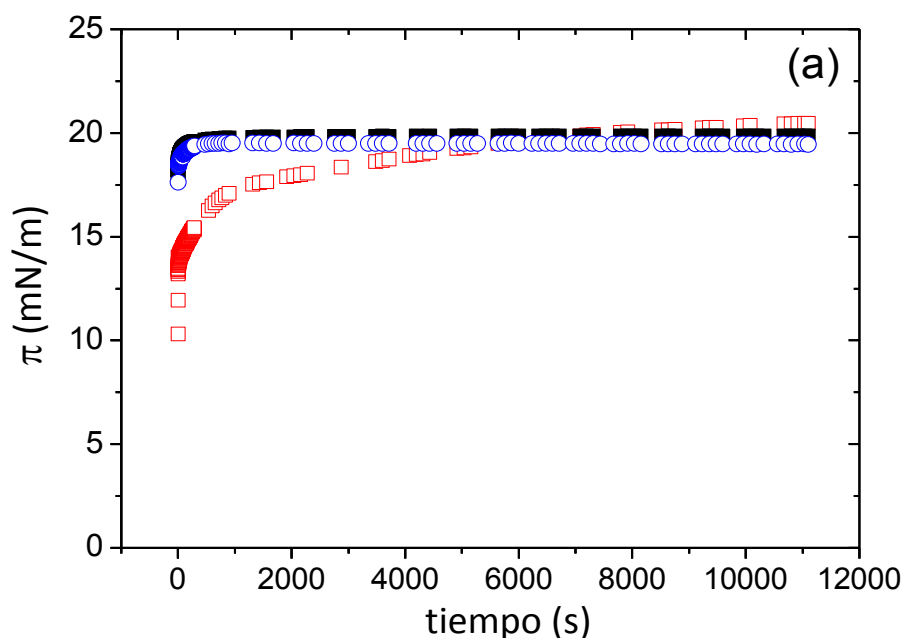
En este apartado se estudiará en primer lugar la adsorción competitiva entre las SB y cada uno de los emulsionantes, es decir, se evaluará la competencia entre los componentes (sistemas mixtos) durante su co-adsorción en la interfase O/W. Por lo tanto, se analizará el efecto que ejerce la adición de SB en la disolución de emulsionante sobre las propiedades dinámicas interfaciales.

Los sistemas mixtos evaluados, se prepararon de manera que en la solución, se mantuvieran las concentraciones finales de cada componente igual que las empleadas para cada componente individual (la concentración final de solución proteica fue de 1% p/p, la de E5LV fue 0,5% p/p, mientras que la de SB fue de 5 mg/ml) para relacionarlos con el comportamiento de los sistemas individuales discutidos en la sección anterior.

III.4.1.1. Adsorción competitiva entre las proteínas y las sales biliares

En el caso del sistema mixto formado por β lg y SB se puede observar que los valores de π (Figura III.7a) son similares a los obtenidos para la solución de SB solas, lo que en principio indicaría que la actividad interfacial está dominada por las SB. Sin embargo, se alcanzaron valores de π en el equilibrio muy similares entre sí en todos los sistemas, por lo cual sería apresurado concluir que las SB dominan el proceso de adsorción interfacial frente a las moléculas de β lg.

Sin embargo, al analizar los valores de E correspondientes a las películas interfaciales formadas por cada uno de los componentes (Figura III.7b) se observó que los valores de E para el sistema mixto fueron muy parecidos a los obtenidos para las SB solas, lo que indicaría que la proteína no contribuye a las propiedades reológicas de la interfase formada. Por lo tanto, se podría decir que la interfase está ocupada preferentemente por las SB, dominando tanto la presión interfacial como las propiedades reológicas del sistema mixto. Estos resultados concuerdan con lo publicado previamente por Maldonado-Valderrama y col. (2008), quienes indicaron que no existe sinergismo, en cuanto a las propiedades interfaciales, en una mezcla formada por β lg y SB.



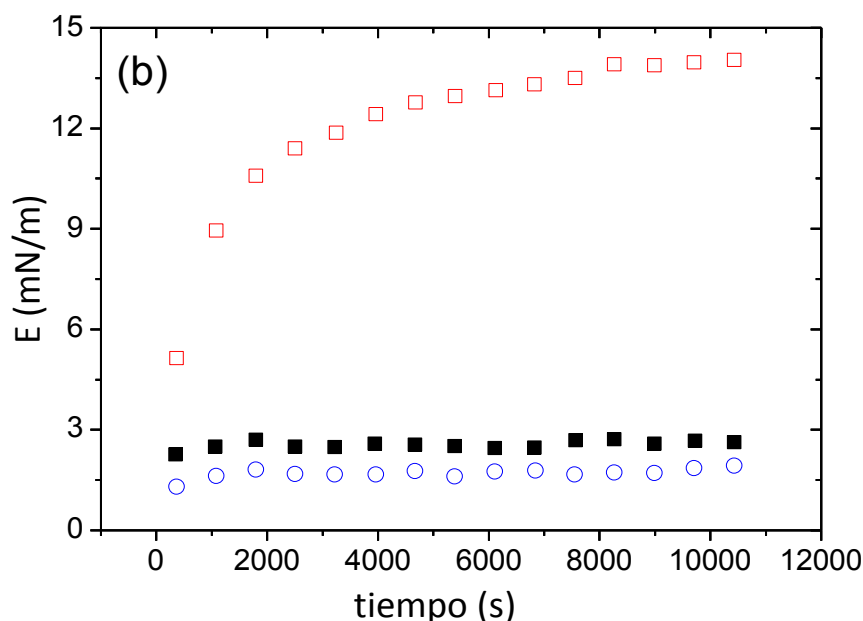


Figura III.7. Variación de la presión interfacial (a) y del módulo dilatacional interfacial (b) con el tiempo a 37 °C para: β lg 1% p/p (□), SB 5 mg/ml (○) y sistema mixto (■).

En el caso del sistema mixto formado por SPI y las SB se puede observar, a diferencia de lo encontrado para β lg, que el valor de π alcanzado es mayor que el correspondiente a los componentes individuales (Figura III.8a). Este fenómeno reflejaría la coexistencia de ambos componentes en la interfase O/W, lo que permite una mayor cobertura de la interfase y da origen a mayores valores de π .

En lo que respecta a las propiedades dilatacionales interfaciales (Figura III.8b) se observó en este caso que los valores de E son algo mayores que los correspondientes a las SB, lo cual reflejaría un mayor grado de coexistencia en la interfase entre ambos componentes. Este hecho está en concordancia con el comportamiento observado al analizar la variación de π con el tiempo (Figura III.8a). La reducción en el valor de E con respecto a los valores obtenidos para SPI, indicaría que las SB, al coexistir con las moléculas de SPI en la interfase, interrumpirían las interacciones entre estas proteínas ocasionando, por consiguiente, la disminución de la elasticidad interfacial. Sin embargo, podría decirse que esta interrupción es parcial, ya que de lo contrario (si las SB interrumpieran totalmente las interacciones moleculares entre las proteínas), los valores de E deberían ser similares a los de las SB solas.

Tejera García (2008) analizó el comportamiento interfacial de un sistema mixto formado por concentraciones fisiológicas de SB y lipasa pancreática, a partir del cual demostró que, al presentar mayor velocidad de difusión interfacial, las SB dominan en el proceso de

adsorción a tiempos cortos, teniendo lugar solo a continuación la adsorción de la enzima, con menos espacio disponible en una interfase dominada por las SB.

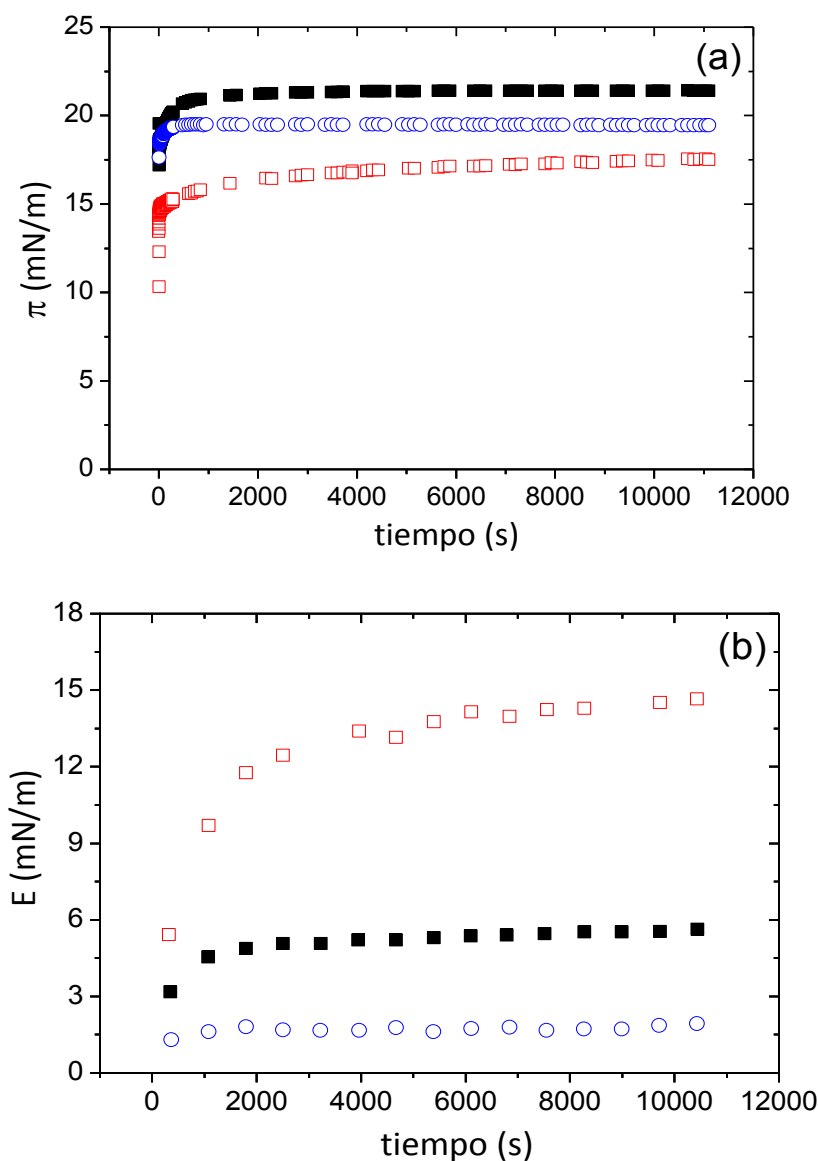


Figura III.8. Variación de la presión interfacial (a) y del módulo dilatacional interfacial (b) con el tiempo a 37 °C para: SPI 1% p/p (■), SB 5 mg/ml (○) y sistema mixto (■).

III.4.1.2. Adsorción competitiva entre la HPMC y las sales biliares

El análisis de la variación de π en el tiempo (Figura III.9a) indica que las SB dominan la actividad interfacial del sistema mixto dado que los valores de π obtenidos en todo el ensayo coinciden con el de las SB solas.

Lo mismo se observa al analizar los valores de E (Figura III.9B), los cuales resultaron muy parecidos a los obtenidos para las SB solas, independientemente de que el polisacárido da

lugar a películas de carácter elástico muy elevado. Este comportamiento indicaría que las moléculas de E5LV no contribuyen a las propiedades reológicas de la interfase formada, algo similar a lo encontrado para el sistema mixto formado por β lg y SB.

Estos resultados, en definitiva indican que, en el sistema mixto formado por el polisacárido y las SB, la interfase sería ocupada por estas últimas, quienes dominan en el proceso de co-adsorción.

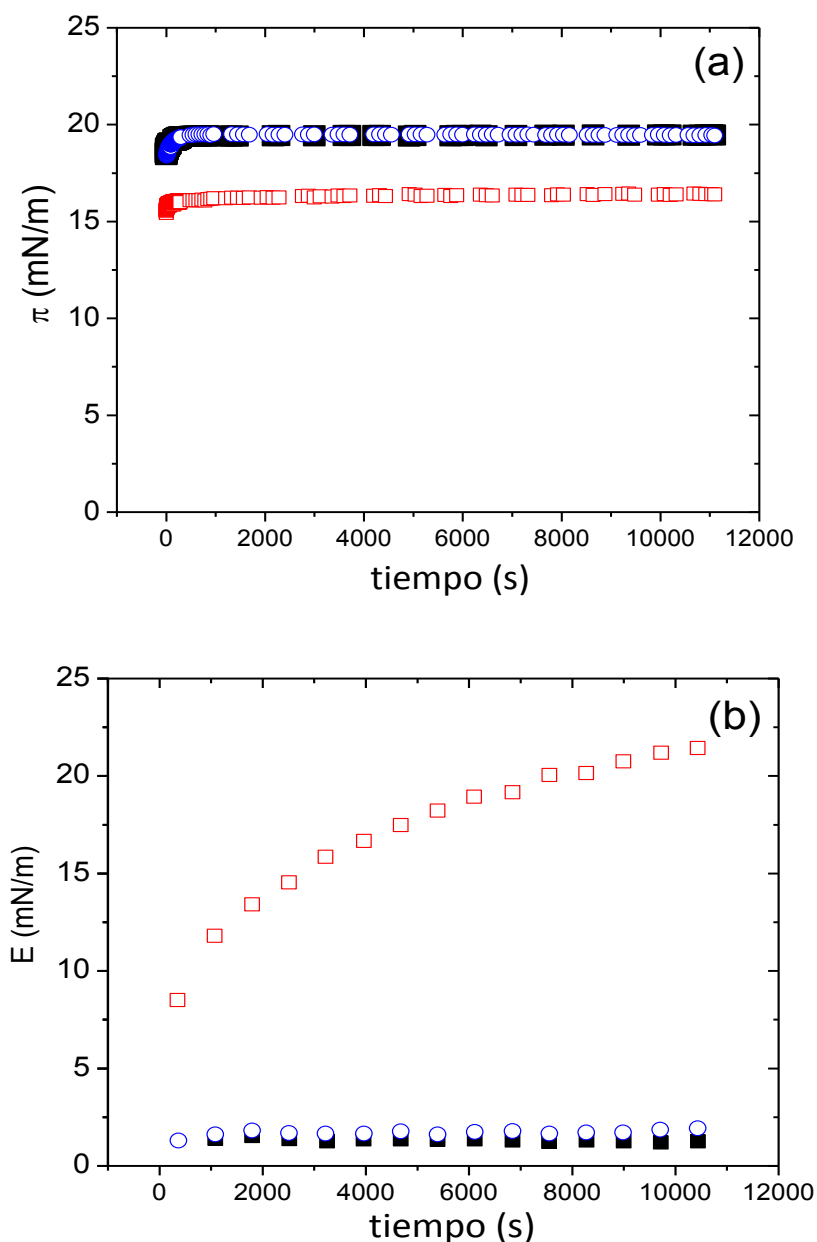


Figura III.9. Variación de la presión interfacial (a) y del módulo dilatacional interfacial (b) con el tiempo a 37 °C para: E5LV 0,5% p/p ($\square$), SB 5 mg/ml ($\circ$) y sistema mixto ($\blacksquare$).

III.4.2. Estudios de adsorción secuencial

Los ensayos para evaluar el grado de resistencia que podría presentar la película de emulsionante al desplazamiento interfacial que pueden llevar a cabo las SB (en la fase duodenal de la digestión) se realizaron mediante una adsorción secuencial, empleando el sistema del doble capilar del tensiómetro interfacial.

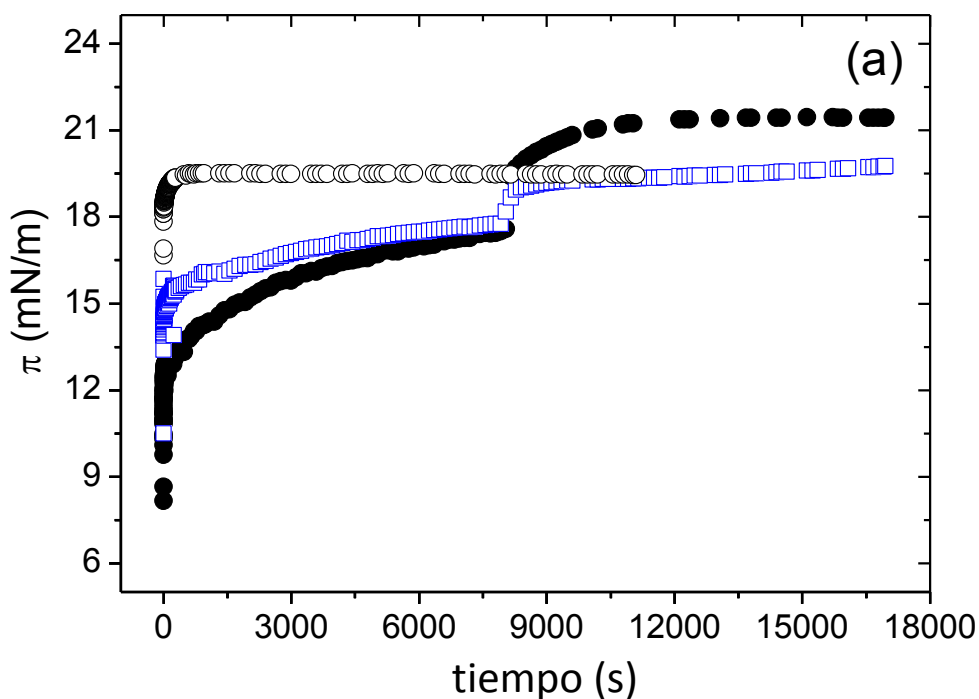
Para esto se formó previamente una película de emulsionante (solución de emulsionante) y posteriormente, a los 8000 segundos, se inyectó la solución de SB (5 mg/ml). A este tiempo de adsorción suficientemente largo, todos los emulsionantes estudiados alcanzan un valor de pseudo-equilibrio para π (Figuras III.3 y III.5), indicando la saturación de la interfase, y además forman una película elástica lo suficientemente estable (Figuras III.4 y III.6). La importancia de los resultados que se obtengan de este estudio radica en que se podría obtener información de la acción de las SB sobre las películas interfaciales bajo condiciones semejantes a las condiciones del duodeno (soluciones preparadas en FIS) simulando de esta manera el proceso interfacial que tiene lugar cuando una emulsión pasa al duodeno y toma contacto con una solución fisiológica de SB, que iniciarán el proceso de digestión de lípidos (Bauer y col., 2005).

III.4.2.1. Efecto de las sales biliares en la presión interfacial

Antes de realizar estas medidas se verificó la irreversibilidad de la adsorción de las proteínas y la E5LV en la interfase O/W (resultados no mostrados). Para tal fin, se procedió a la formación de la película interfacial y a continuación, se llevó a cabo el intercambio de la subfase con FIS (mismo medio donde fue preparada la solución proteica para no originar cambios de pH o de las condiciones iónicas del medio). Se corroboró dicha irreversibilidad por la ausencia de cambios en los valores de π y E de cada película interfacial. Estos resultados permiten descartar entonces que los posibles cambios que se observen tras el intercambio de la subfase por la solución de SB, sean consecuencia del proceso de intercambio en sí mismo.

Se puede observar, en la Figura III.10, que tras la inyección de las SB se produce un rápido aumento de π en todos los sistemas hasta valores similares, o incluso algo mayores, que los correspondientes a las SB solas (~19,5 mN/m), lo cual indica que las SB han penetrado en las películas interfaciales que forman todos los emulsionantes. Para el caso de la

película interfacial formada por SPI, los valores de π alcanzados tras realizar la inyección de las SB fueron mayores que los obtenidos para las SB solas, lo que estaría sugiriendo que estas proteínas no serían desplazadas totalmente de la interfase. En el caso hipotético de que las moléculas de SB hubieran desplazado totalmente a las moléculas de proteína adsorbidas en la interfase, y esta quedara ocupada únicamente por las SB, sería de esperar que los valores de π coincidieran con los de las SB solas, ya que en este caso el emulsionante hubiese pasado a la solución. Por lo tanto, cuanto más alejados se encuentren los valores de π del valor para las SB, mayores son los indicios de la presencia de emulsionante en la interfase. Chu y col. (2010), trabajando con interfases aire-agua estabilizadas por digalactocildiacilglicerol y dipalmitoilfosfatidilcolina, también encontraron que la adsorción de las SB en la interfase resultó en un incremento neto de los valores de π por encima del valor de las SB, sugiriendo que estos lípidos no serían desplazados en su totalidad de la monocapa interfacial.



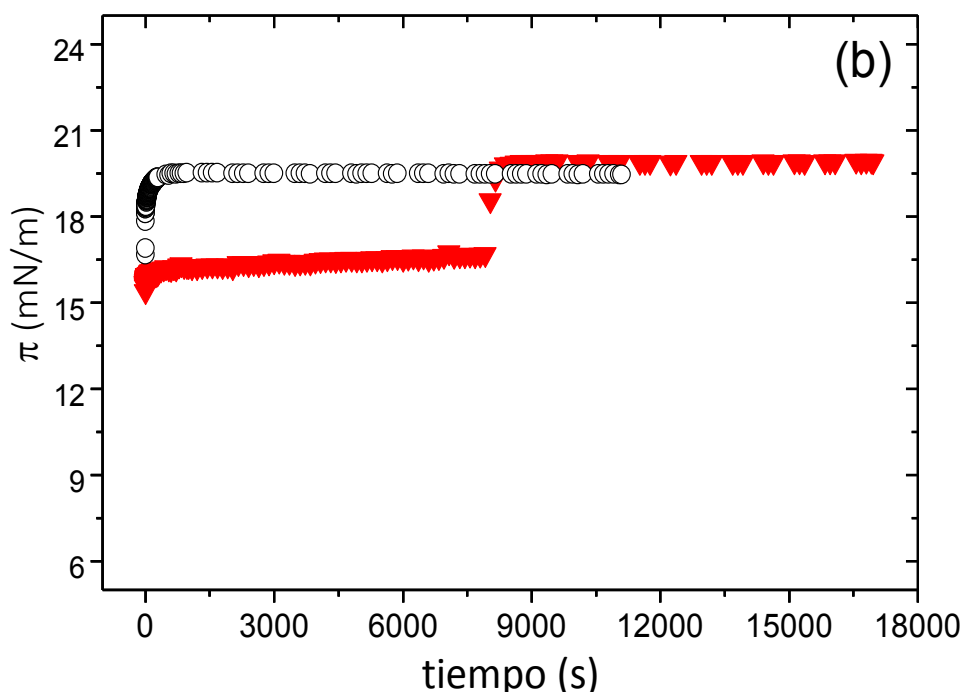


Figura III.10. Variación de la presión interfacial (π) con el tiempo tras la adición secuencial de una solución de SB a 37 °C sobre: (a) películas proteicas (1% p/p) de β lg ($\square$) y SPI ($\bullet$), (b) película de E5LV ($\blacktriangledown$) 0,5% p/p. Se muestra como referencia el resultado de las SB a 5mg/ml (O).

Para el caso de las películas interfaciales formadas por β lg y E5LV, a diferencia de lo observado con SPI, al final de la medida, se obtuvieron valores de π más bien similares a los de SB. Estos resultados indicarían que las SB dominan las características de la interfase formada, algo que ya habían comprobado otros autores al trabajar con películas interfaciales formadas por proteínas (Lesmes y col., 2010; Maldonado-Valderrama y col., 2008), lípidos (Chu y col., 2010; Gallier y col., 2014) e incluso otros polisacáridos (Torcello-Gómez y col., 2014; Torcello-Gómez, Maldonado-Valderrama, de Vicente, y col., 2011).

Por lo tanto, en base al análisis de la variación de la presión interfacial, los resultados indicarían una mayor resistencia de las proteínas soja al desplazamiento interfacial de las SB en comparación con la interfase formada por las moléculas de β lg y E5LV en iguales condiciones.

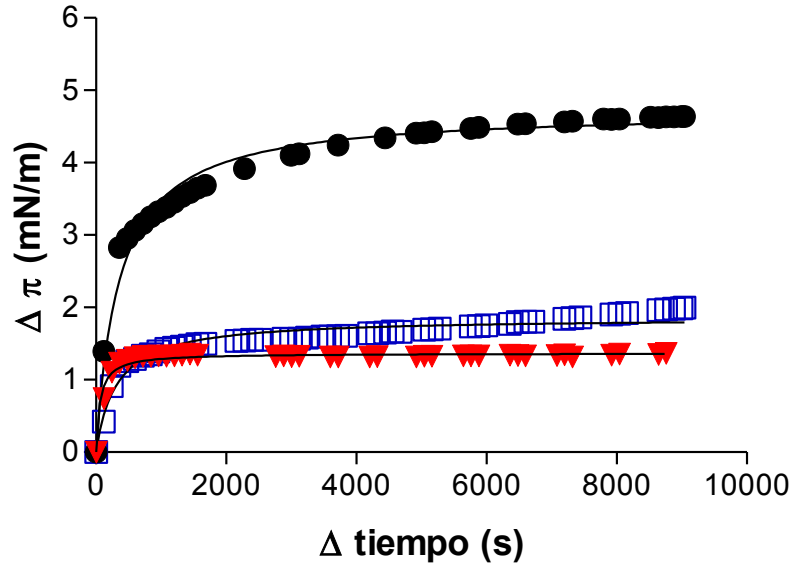


Figura III.11. Aumento de π tras la introducción de las SB a 37 °C para: β lg (□), SPI (●) y E5LV (▼).

El grado en que aumentan los valores de π tras la inyección de las SB puede ser utilizado para establecer un orden tentativo del impacto que presentan las SB en cada una de las películas interfaciales. A tal fin se calculó el aumento de π por encima del valor que tenía la película en el momento de la inyección de las SB (a los 8000 s) (Figura III.11). Para modelar las curvas se empleó la siguiente expresión empírica (Ecuación III.1):

$$\pi - \pi_0 = \Delta\pi_{\infty} \cdot t / (B + t) \quad [\text{Ecuación III.1}]$$

Donde $\Delta\pi_{\infty}$ representa la variación de π alcanzada por el sistema tras la inyección de las SB al finalizar la medición (18000 s), π_0 es la presión interfacial inicial en el momento de la inyección de las SB (8000 s) y B (tiempo medio) que representa el tiempo necesario para alcanzar la mitad del valor de $\Delta\pi_{\infty}$ ($\Delta\pi_{\infty} / 2$). La aplicación de la Ecuación III.1 a los datos experimentales arrojó valores del coeficiente de regresión lineal, R^2 , entre 0,96 y 0,99. Además, se puede describir la cinética de adsorción interfacial de las SB sobre cada sistema, calculando una constante de velocidad (Ecuación III.2), según el modelo de Pilosof, Boquet y Bartholomai (1985):

$$K = \frac{1}{\Delta\pi_{\infty} \cdot B} \quad [\text{Ecuación III.2}]$$

A partir de los resultados obtenidos tras aplicar las ecuaciones antes mencionadas (Tabla III.1), se puede inferir que los sistemas que sufran los mayores aumentos de presión interfacial serían aquellos donde el emulsionante es menos desplazado por las SB y por lo tanto puede contribuir a la obtención de un valor de π por encima del obtenido para las SB.

Tabla III.1. Parámetros que describen la adsorción de SB en las películas interfaciales.

Emulsionante	$\Delta\pi_{\infty} (mN/m)$	$B (s)$	$K (m/s \cdot mN)$
SPI	$4,73 \pm 0,04$	$356,3 \pm 15$	$0,59 \cdot 10^{-3}$
βlg	$1,86 \pm 0,02$	316 ± 25	$1,7 \cdot 10^{-3}$
E5LV	$1,367 \pm 0,008$	$61,4 \pm 6,3$	$1,2 \cdot 10^{-2}$

Se podría establecer entonces que la película proteica formada por SPI sería la menos desplazada por las SB, ya que es aquella en la que se produce un mayor incremento en los valores de π tras su inyección (Tabla III.1). Por otra parte, en las películas interfaciales de β lg y E5LV, se produce el menor incremento de π , alcanzándose en ambos sistemas un valor muy similar al de las SB solas (Figura III.10). Esto indicaría que estas películas serían bastante penetradas por las SB y las moléculas de emulsionante podrían estar siendo desplazadas de la interfase, por lo menos en mayor medida que SPI. Los valores de la constante de velocidad (K) para la adsorción de las SB indican que la velocidad de adsorción es mucho mayor en el caso de E5LV, seguido por β lg y finalmente para la película interfacial formada por moléculas de SPI. Esto está vinculado al $\Delta\pi_{\infty}$, ya que cuanto mayor es este, menor es la velocidad con que aumenta la presión interfacial (Ecuación III.2).

III.4.2.2. Efecto de las sales biliares en las propiedades dilatacionales interfaciales

En la Figura III.12, se observan los valores de E de las películas interfaciales antes y después de la inyección de la solución de SB. Como se indicó anteriormente, los tres emulsionantes estudiados se caracterizaron por la formación de una película interfacial elástica, en especial las moléculas de E5LV (Figura III.6), sin embargo, tras la inyección de las SB (a los 8000 s) se observó que los valores de E disminuyeron rápidamente en distinta intensidad. Esta disminución indica que las películas interfaciales, serían bastante

perturbadas tras la adsorción de las SB, que se estarían adsorbiendo dentro de imperfecciones de cada película, evitando, en cierto grado, las interacciones entre las moléculas de emulsionante adsorbidas.

A partir del análisis de la Figura III.12 se deduce que la película interfacial formada por E5LV sería la más perturbada por la incorporación de las SB, dado que alcanzó valores de E prácticamente iguales a los de las SB solas (mostradas como referencia), en concordancia con los efectos observados al analizar la variación que experimentó la presión interfacial.

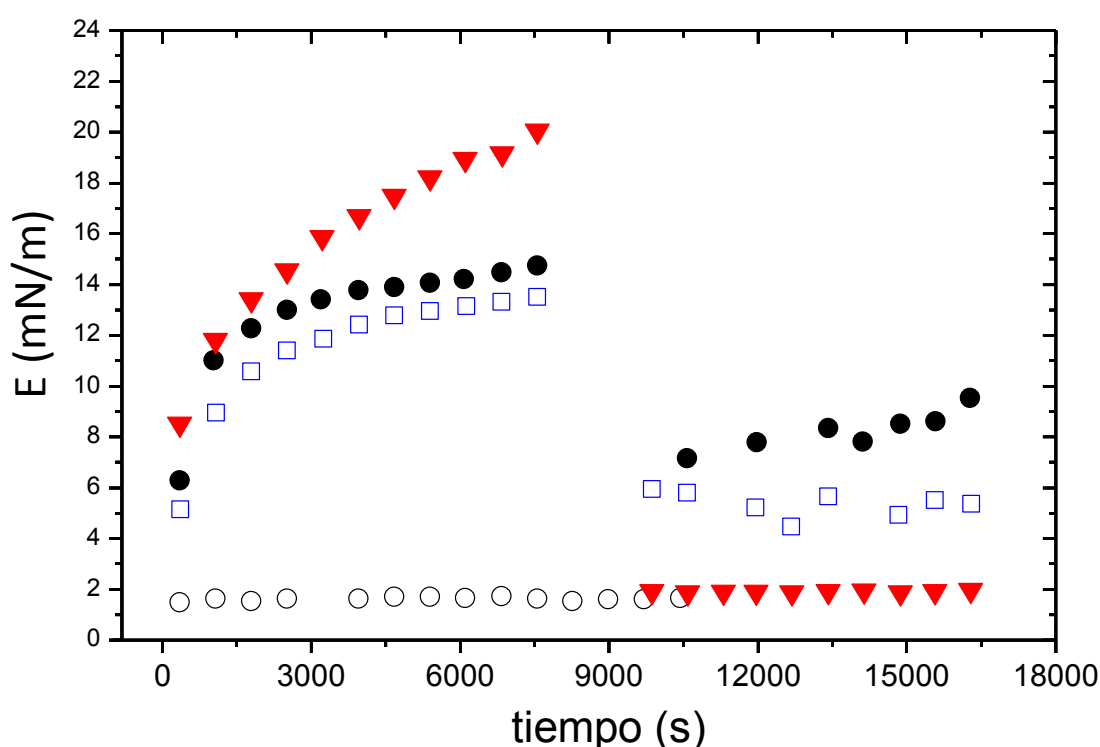


Figura III.12. Variación del módulo dilatacional (E) con el tiempo tras la adición secuencial de una solución de SB a 37 °C sobre películas proteicas (1% p/p) de β lg (□) y SPI (●), y sobre película de E5LV (▼) 0,5% p/p. Se muestra como referencia el resultado de las SB a 5mg/ml (○).

Contrariamente al comportamiento observado para E5LV, para los emulsionantes proteicos los valores de E alcanzados tras la introducción de las SB fueron superiores a los obtenidos para las SB, lo que indicaría que no ha tenido lugar un desplazamiento total de los emulsionantes proteicos.

Para analizar este fenómeno se procedió a cuantificar la variación experimentada por los valores de E tras la incorporación de las SB en cada uno de los casos. En la Tabla III.2 se muestra, en la primer columna, la variación experimentada por E entre el instante en que

se introdujeron las SB al medio (E_{8000}) y el instante en que se obtuvo el primer valor de E tras dicha adición (E_{9800}), es decir, se estaría analizando la perturbación inicial que sufre el sistema por la incorporación de la solución de SB. En la siguiente columna se representa la variación que experimentó el valor de E entre el momento de adición de las SB (E_{8000}) y el valor final obtenido (E_{Final}), lo cual indicaría el efecto que produce la adición de las SB a tiempos mayores (18000 s). De aquí se puede deducir que las películas proteicas, experimentan una caída inicial muy similar en el valor de E tras la incorporación de las SB, siendo un poco más perturbada la película formada por β Ig (caída del 55 %), en comparación con la formada por SPI, donde la pérdida de elasticidad fue del 50 %. Estos datos indican en ambos casos que la presencia de las SB impide la asociación de las proteínas en la interfase para mantener la elasticidad inicial característica. Sin embargo, la película interfacial de E5LV resulta mucho más perturbada por las SB, dado que se produce una pérdida de elasticidad del 90 % (Tabla III.2).

Un fenómeno llamativo es que, tras la adsorción de las SB, en el caso de las películas formadas por SPI, el valor de E experimentó un ligero ascenso con el transcurso del tiempo (Figura III.13), hecho que podría estar relacionado con cambios conformacionales en la película interfacial que involucran el grado de interacción entre las moléculas proteicas adsorbidas en la interfase. Este fenómeno nos permite confirmar que las proteínas de soja adsorbidas en la interfase no han sido desplazadas (al menos totalmente), ya que de lo contrario sería esperable que E alcanzara los valores correspondientes a los de las SB, menor a 2 mN/m y se mantuviera en el tiempo. La recuperación de la elasticidad interfacial solo se observó para la película formada por las proteínas de soja. Como se observa en la Tabla III.2, para la película de SPI, el valor de E solo se redujo en un 34 % al final de la experiencia, respecto al valor que tenía antes de la incorporación de las SB. Esta recuperación podría explicarse considerando el hecho de que las SB ingresarían a la interfase a partir de huecos o imperfecciones de la película interfacial, aumentando así el grado de compactación de las moléculas de proteína adsorbidas, generando por lo tanto un incremento en la rigidez de la película (Woodward, Gunning, Maldonado-Valderrama, Wilde y Morris, 2010).

Tabla III.2. Variación de E a partir de la adsorción de las SB en las diferentes películas interfaciales.

Emulsionantes	$\Delta E/E: (E_{8000} - E_{9800})/E_{8000}$	$\Delta E/E: (E_{8000} - E_{Final})/E_{8000}$
SPI	$0,50 \pm 0,01$	$0,34 \pm 0,02$
β Ig	$0,55 \pm 0,01$	$0,60 \pm 0,01$
E5LV	$0,905 \pm 0,004$	$0,901 \pm 0,002$

Contrariamente al comportamiento observado para la película de SPI, en el caso de β Ig y E5LV las SB producen una perturbación irreversible sobre el grado de interacción entre las moléculas adsorbidas que impide la recuperación de la elasticidad al final de la determinación (Tabla III.2).

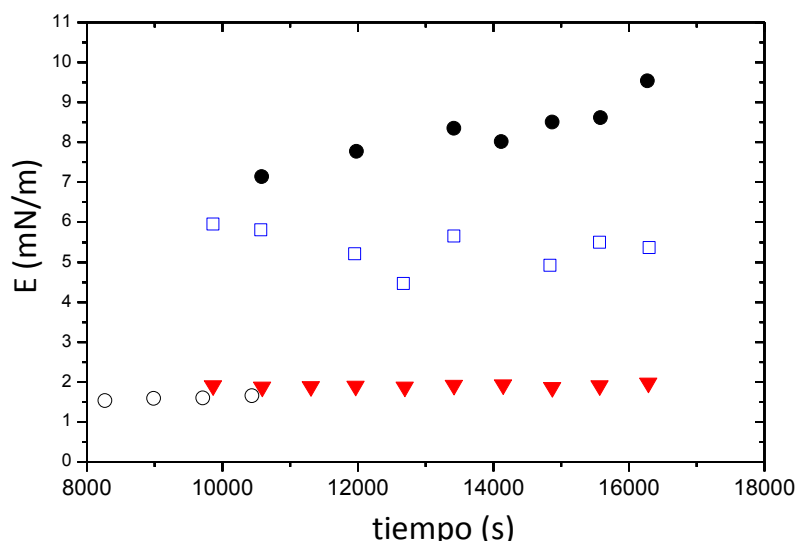


Figura III.13. Variación del módulo dilatacional interfacial (E) con el tiempo luego de la adición de una solución de SB a 37 °C sobre películas proteicas (1% p/p) de β Ig (□) y SPI (●), y sobre película de E5LV (▼) 0,5% p/p. Se muestra como referencia el resultado de SB a 5mg/ml (O).

El impacto de la adsorción de SB en películas interfaciales de β Ig (sobre interfases aceite/agua y aire/agua) ha sido estudiado primeramente por Maldonado-Valderrama y col. (2008). Según estos autores, la adición de SB produce un decrecimiento severo de E en ambos tipos de interfases, sugiriendo que las SB penetran, debilitan y finalmente rompen la película interfacial desplazando a la β Ig de la interfase. Además, a partir de estudios de microscopia de fuerza atómica, indicaron que dicho desplazamiento ocurre por el mecanismo orogénico, por medio del cual las SB podrían desplazar, casi por

completo, a la β lg bajo condiciones de digestión duodenal, quedando la interfase dominada por las SB.

El mecanismo orogénico fue propuesto originalmente por Mackie, Gunning, Wilde y Morris (1999) y ha sido utilizado para explicar el impacto que tienen los surfactantes convencionales (como los polisorbatos) sobre películas interfaciales formadas por proteínas (β lg, β caseína y α -lactoalbúmina), con el fin de estudiar la estabilidad de coloides alimentarios (Mackie y col., 2001; Woodward, Gunning, Mackie, Wilde y Morris, 2009). Según este mecanismo, las proteínas podrían ser parcialmente desplazadas de la interfase por un surfactante de bajo peso molecular (por ejemplo: un fosfolípido) en un proceso complejo que puede resumirse en tres etapas:

1^{ra} Etapa: conocida como fase de compresión, en la que el surfactante de bajo peso molecular ocuparía los pequeños huecos existentes en un film interfacial formado por la macromolécula. Este fenómeno da lugar a la cobertura adicional de la región interfacial (que no puede cubrir la proteína) que como consecuencia daría lugar a aumentos de la presión interfacial, como se ha podido observar también en este trabajo (Figura III.11).

2^{da} Etapa: Los dominios ocupados por los surfactantes de bajo peso molecular continúan aumentando a medida que la proteína es obligada a moverse y comprimirse en la interfase. A esta etapa se la conoce como fase de colapso.

3^{ra} Etapa: Cuando la presión interfacial es lo suficientemente alta, el film proteico se podría romper y la proteína podría ser desplazada de la interfase, ya sea en forma total o parcial, formando pequeños agregados en el medio, quedando el sistema dominado por el surfactante de bajo peso molecular.

Por lo tanto, de acuerdo con este modelo, las SB (surfactantes biológicos de bajo peso molecular) podrían adsorberse en los pequeños huecos que se originan a partir de “imperfecciones” presentes en el film proteico originando los aumentos de π observados (Figura III.11). La película proteica interfacial se podría comprimir por el crecimiento de los “pools” de SB generados hasta que finalmente se podría producir la ruptura de la misma, con el posible desplazamiento total, quedando el sistema dominado por las SB (Maldonado-Valderrama y col., 2008).

No obstante, nuestros resultados no indican que las proteínas sean desplazadas (o por lo menos no totalmente) de la interfase sino más bien sugieren que las SB que penetran en la interfase interfieren en la estructuración de las películas en diferente grado, según su

naturaleza. Este comportamiento se debería a que en nuestras experiencias las SB se inyectan a interfases donde las proteínas se encuentran muy empaquetadas ($\pi > 17$ mN/m), mientras que los estudios mencionados anteriormente mostraron resultados correspondientes a interfases poco cubiertas ($\pi = 10$ mN/m).

Anteriormente, Chu y col. (2009) demostraron que la habilidad que presentan las moléculas de digalactosildiacilglicerol para inhibir la adsorción de las SB en interfases O/W (atribuida a su elevada densidad de empaquetamiento en la región interfacial) retarda la adsorción de la lipasa pancreática y, en consecuencia, la velocidad a la cual se desarrolla el proceso de lipólisis. En el subsiguiente trabajo (Chu y col., 2010) demostraron que las SB se adsorbieron en la interfase (en este caso sobre la interfase aire-agua) causando un incremento neto de π , por encima del valor reportado para las SB solas. Basados en observaciones microscópicas (microscopía de fuerza atómica) de la morfología de la película interfacial, postularon que la adsorción de las SB en la interfase ocasiona la separación de las moléculas de tensioactivo, interfiriendo en el grado de empaquetamiento existente entre las moléculas. Sin embargo, no evidenciaron que tuviera lugar un desplazamiento total de las moléculas adsorbidas.

Por otra parte Torcello-Gómez, Maldonado-Valderrama, Martín-Rodríguez y McClements (2011) indicaron que el menor grado de lipólisis encontrado para las emulsiones estabilizadas por un tensioactivo no iónico (Plurónico F68), en comparación con las estabilizadas con lecitina, podría estar asociado a que las primeras presentaron mayor resistencia al desplazamiento interfacial de las SB. De todas maneras no indicaron, en ninguno de los casos analizados, la existencia de un desplazamiento total.

En definitiva, los resultados obtenidos en las experiencias de adsorción secuencial, parecen indicar que las proteínas de soja serían más resistentes al desplazamiento interfacial que llevan a cabo las SB. Este comportamiento concuerda con el hecho de que estas proteínas compitieron con las SB por un lugar en la interfase en las experiencias de adsorción competitiva (co-adsorción) realizadas.

En cuanto a la película de E5LV, los resultados obtenidos indicarían que estas películas son penetradas y desestructuradas por las SB. Sin embargo, no hay evidencia de su desplazamiento total de la interfase. Para dilucidar esto se realizó la determinación del potencial Z de las emulsiones de E5LV, en ausencia y presencia de SB. A partir del

potencial Z es posible evaluar cualitativamente el impacto que presentan las SB sobre la carga superficial de las gotas de aceite debido a que los cambios de dicho parámetro reflejan las alteraciones que se pueden producir en la composición interfacial (Gu, Decker y McClements, 2007; Hur, Decker y McClements, 2009; Sarkar, Murray, y col., 2016).

Como era de esperar, al tratarse de un polisacárido no iónico (Camino y col., 2011), el valor determinado sobre las emulsiones (10/90) fue prácticamente nulo ($-1,23 \pm 0,07$ mV). Sin embargo, cuando las emulsiones se mezclaron con las SB (5 mg/ml), el potencial Z disminuyó significativamente ($-7,13 \pm 0,8$ mV), indicativo de que las SB han penetrado en la interfase formada por este HPMC, en concordancia con los resultados determinados a nivel interfacial. Sin embargo, el valor alcanzado se encuentra muy por encima a los obtenidos para una solución de SB solas ($-45,30 \pm 2,97$ mV) o incluso a los de una emulsión estabilizada por una solución de SB preparada en FIS, que presenta un potencial Z cercano a -40 mV (Sarkar, Ye, y col., 2016).

Los resultados mostrados en este trabajo se correlacionan con los reportados por Sarkar, Ye, y col. (2016), quienes concluyeron que las SB se adsorben en interfases O/W cubiertas por caseinato de sodio, originando cambios en la carga superficial (potencial Z) de las emulsiones estabilizadas por esta proteína. En dicho trabajo tampoco evidenciaron un desplazamiento total de las proteínas ya que, si bien el potencial Z cambia y se acerca al de una emulsión estabilizada por SB, se encuentra muy lejos de su valor final.

Estos resultados sugieren que, aunque las SB penetran las películas interfaciales formadas por E5LV originando la pérdida total de su carácter elástico, no existiría un desplazamiento total del polisacárido, sino que más bien podría pensarse que las SB quedan atrapadas en el interior de la estructura del HPMC, motivo por el cual no se produce el impacto esperado, respecto al cambio de la carga superficial de las gotas de aceite de sus emulsiones.

III.5. Efecto de las sales biliares sobre la película interfacial formada por un tensioactivo de bajo peso molecular

III.5.1. Comportamiento interfacial de un tensioactivo de bajo peso molecular

Ya que el objetivo buscado en este capítulo consiste en la formación de películas interfaciales que consigan una inhibición (o una reducción al menos) del desplazamiento

interfacial ejercido por las SB, en este apartado se estudiará el comportamiento de una película interfacial formada por un tensioactivo de bajo peso molecular Tween 20, tensioactivo ampliamente utilizado en la industria de los alimentos (Ayorinde, Gelain, Johnson y Wan, 2000). El incentivo para realizar esta determinación, se basa en que este tipo de tensioactivos presenta una estructura mucho más simple que las proteínas o los polisacáridos, más bien es similar a la de las SB, por lo cual podría pensarse que ambas moléculas sean compatibles entre sí dando lugar, tal vez, a un mayor grado de coexistencia a nivel interfacial que pudiera impactar en la actividad de las SB.

Para la correcta interpretación de los resultados es importante que la concentración a utilizar de estos tensioactivos se encuentre por encima de su concentración micelar crítica (CMC). Dicha concentración es un parámetro de gran utilidad que representa la concentración a la cual la interfase se encuentra saturada de moléculas del tensioactivo (Patist, Bhagwat, Penfield, Aikens y Shah, 2000; Rodríguez Niño y Rodríguez Patino, 1998). Debido a que la CMC del Tween 20 se encuentra comprendida entre 0,015 mM y 0,02 mM (Hsu y Nacu, 2003) la concentración escogida para realizar las determinaciones fue de 0,1 mM, valor por encima de la CMC reportada.

III.5.1.1. Cinética de adsorción interfacial

Como se muestra en la Figura III.14, en forma análoga a lo observado con las SB, el Tween 20 presentó una actividad interfacial elevada debido a que π aumenta casi de inmediato, alcanzando un valor máximo a los pocos minutos, valor que se mantuvo constante en el tiempo, indicando que, a esta concentración, la interfase se encuentra saturada con las moléculas de Tween 20 en concordancia con reportes previos (Dickinson, van Vliet, Benjamins y Lucassen Reynders, 2003; Ma R. Rodríguez Niño y col., 1998). La forma de la curva es característica de componentes de bajo peso molecular, que debido a su pequeño tamaño difunden rápidamente hacia la interfase para alcanzar un valor de pseudo-equilibrio. Rodríguez Niño, Wilde, Clark y Rodríguez Patino (1998) indicaron previamente que las moléculas de Tween 20 presentan una cinética de adsorción interfacial muy superior a la reportada para proteínas lácteas. A partir de la determinación de las constantes de velocidad de adsorción además concluyeron que, en sistemas mixtos (Tween 20-proteína), la presencia del Tween 20, en concentraciones elevadas, domina en

el proceso de adsorción interfacial, mientras que por el contrario, a concentraciones bajas de Tween 20 la cinética interfacial es lenta, debido a que es dominada por la proteína.

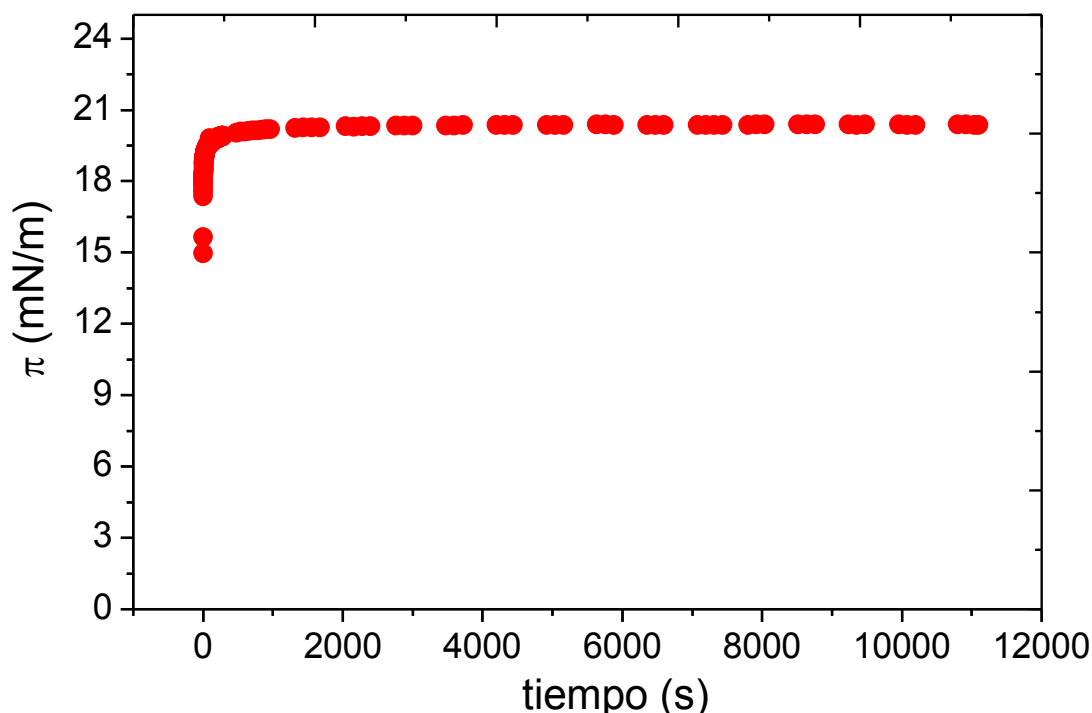


Figura III.14. Variación de la presión interfacial (π) con el tiempo a 37 °C para la adsorción de Tween 20 a una concentración de 0,1 mM (●).

III.5.1.2. Propiedades dilatacionales interfaciales de la película interfacial

El aumento que se observa en los valores del módulo dilatacional (E) (Figura III.15) con el tiempo están asociados con la adsorción de estos agentes tensioactivos en la interfase O/W. Este comportamiento es similar al observado para la adsorción del Tween 20 en otros trabajos (Álvarez Gómez y Rodríguez Patino, 2006; Benjamins, 2000; Murray, 2002; M. Rosario Rodríguez Niño y col., 1998). Se obtuvieron valores de E más bajos que los correspondientes a las películas formadas por proteínas (Figura III.4) o por E5LV (Figura III.6), lo cual es debido a que las interacciones entre los tensioactivos de bajo peso molecular son más débiles que las que se producen entre las macromoléculas (Dickinson, 1992; Halling, 1981), indicando esto la formación de una película interfacial con un alto grado de movilidad.

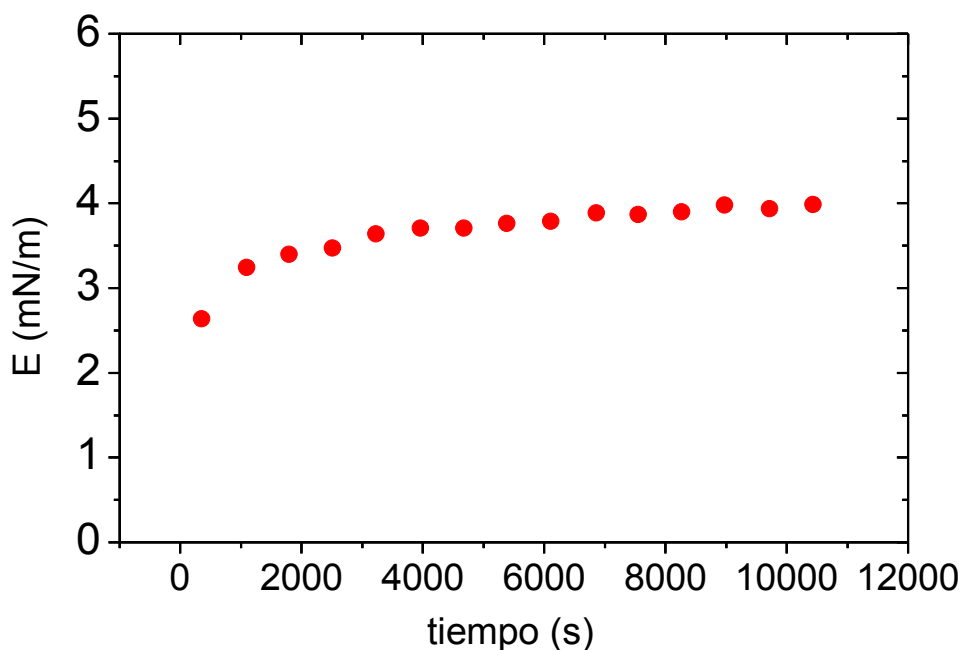


Figura III.15. Variación del módulo dilatacional interfacial (E) con el tiempo a 37 °C para la película interfacial formada por Tween 20 a una concentración de 0,1 mM (■).

III.5.2. Adsorción competitiva entre el Tween 20 y las sales biliares

A partir de ensayos de adsorción competitiva o co-adsorción, en una experiencia similar a la descrita para las macromoléculas, se evaluó la capacidad de las moléculas de Tween 20 (0,1 mM) para adsorberse en la interfase O/W en presencia de concentración fisiológica de SB (5 mg/ml).

A partir de los resultados que describen la variación de π con el tiempo se puede ver, para el sistema mixto formado por el Tween 20 y las SB (Figura III.16a), que la actividad interfacial fue similar a la obtenida por cada uno de los componentes por separado (que a su vez fueron similares entre sí). Por lo tanto, en este caso no es posible establecer cuál de los sistemas gobierna en el proceso de adsorción hacia la interfase, a diferencia de lo observado antes con las proteínas.

Sin embargo, al observar la variación de E con el tiempo (Figura III.16b) se observa que el valor resultante se corresponde con el de las SB solas, indicando que las propiedades viscoelásticas de este sistema mixto vienen gobernadas por las SB.

Este resultado indicaría que, a pesar de que tanto el Tween 20 como las SB son tensioactivos de bajo peso molecular con una actividad interfacial similar, las SB dominan

en el proceso de adsorción competitiva, y por lo tanto determinan las características de la interfase resultante.

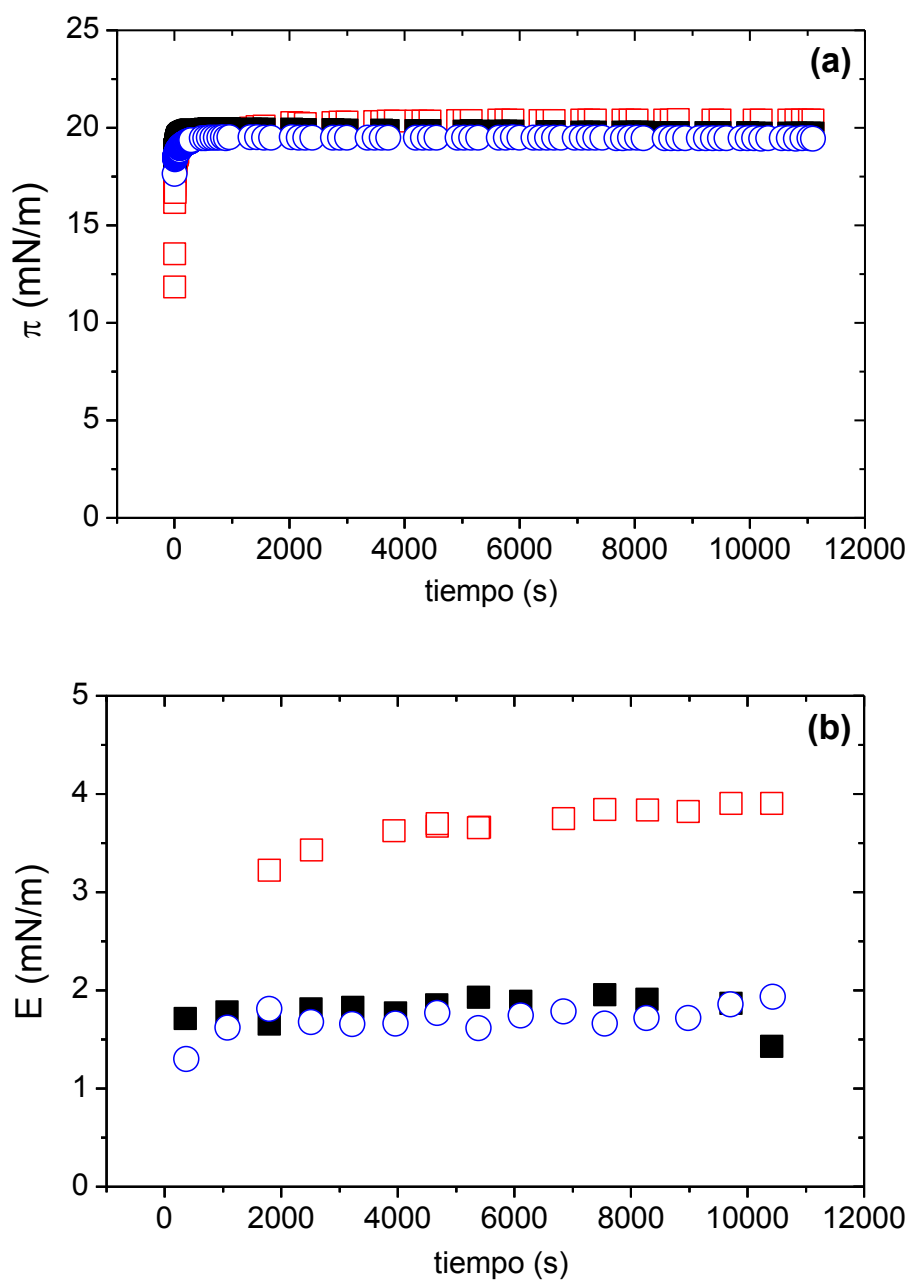


Figura III.16. Variación de la presión interfacial (a) y del módulo dilatacional (b) con el tiempo a 37 °C para: Tween 20 0,1 mM (□); SB 5 mg/ml (○); y sistema mixto (■).

III.5.3. Estudios de adsorción secuencial de las sales biliares en la película interfacial de Tween 20

Utilizando el sistema de doble capilar del tensiómetro interfacial, luego de 8000 segundos de adsorción del Tween 20 se inyectaron las SB en concentración fisiológica (5 mg/ml).

Los resultados obtenidos demuestran que la presión interfacial prácticamente no sufrió cambios por la presencia de SB (Figura III.17), comportamiento que era de esperar ya que, como se comentó en el apartado anterior, la actividad interfacial de las SB es muy similar a la de las moléculas de Tween 20. Por este motivo es que, a partir de estos resultados, no es posible concluir si ha tenido lugar un desplazamiento total de las moléculas de Tween 20 o si ambos componentes coexisten la interfase O/W.

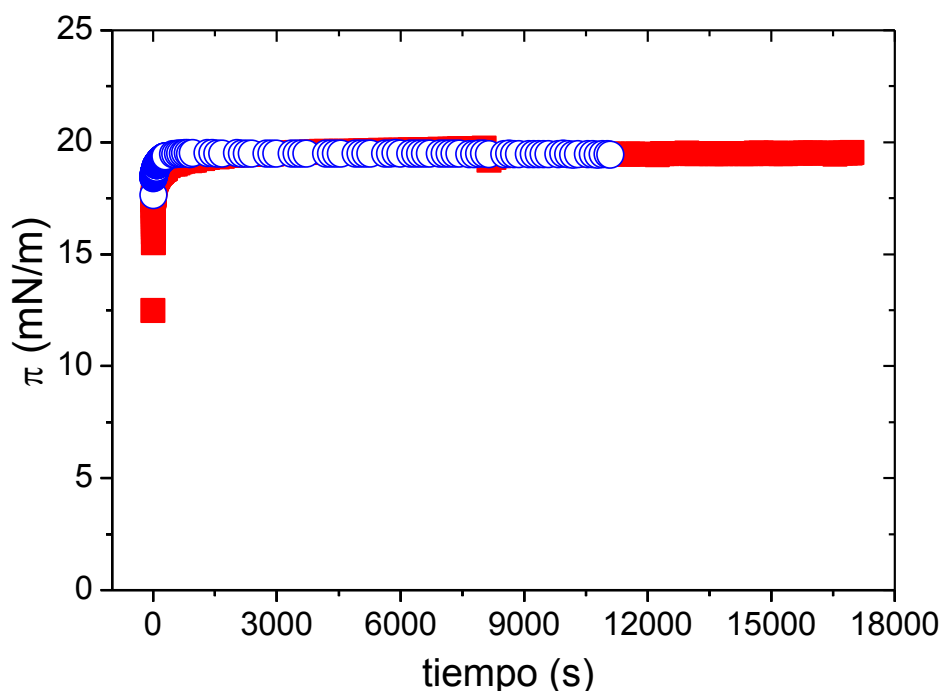


Figura III.17. Variación de la presión interfacial (π) con el tiempo a 37 °C tras la adición de una solución de SB sobre películas interfaciales de Tween 20 0,1 mM (■). Como referencia se muestra el resultado de SB solas a 5mg/ml (○).

Sin embargo, a partir del análisis de la variación del módulo dilatacional con el tiempo se concluye que la película interfacial de Tween 20 resultó severamente perturbada por la presencia de las SB, evidenciado por la caída en los valores de E (Figura III.18), alcanzando los valores correspondientes a los de las SB solas (mostrado como referencia). Este hecho indicaría que las moléculas de SB podrían penetrar en la interfase y desplazar casi totalmente a las moléculas adsorbidas de Tween 20, resultando estas últimas en una barrera débil a su actividad.

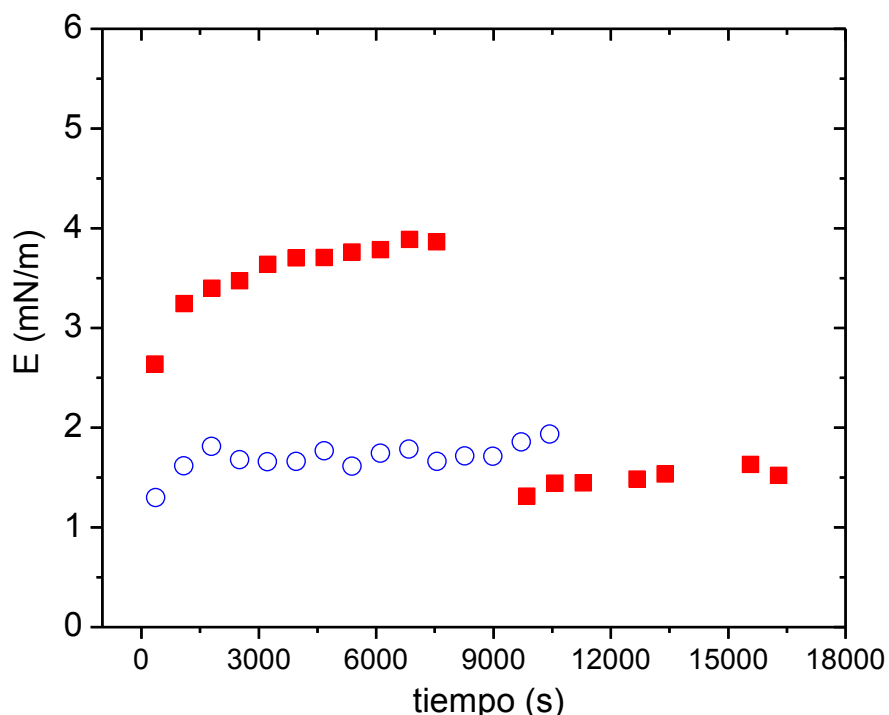


Figura III.18. Variación del módulo dilatacional interfacial (E) con el tiempo a 37 °C tras la adición secuencial de una solución de SB sobre películas de interfaciales de Tween 20 0,1 mM (■). Como referencia se muestra el resultado de SB a 5mg/ml (○).

En general, se puede concluir que las moléculas de Tween 20, a pesar de presentar actividad interfacial similar a la de las SB, no son capaces de competir con estas en las experiencias de co-adsorción realizadas, ni de resistir su adsorción interfacial, a diferencia de las proteínas.

Sin embargo, Vinarov y col. (2012) han reportado que, a partir de una relación de concentraciones adecuadas entre las SB y los polisorbatos (en este caso utilizaron Tween 80), podría regularse la adsorción interfacial de las SB, lo que impactaría en el proceso de lipólisis. De esta forma, estos autores determinaron el grado de lipólisis sobre emulsiones preparadas con una mezcla de Tween 80 y SB en diferente relación, determinando que cuando la relación SB:Tween 80 es alta (concentraciones mayores de SB), las SB dominarían el proceso de adsorción interfacial, generando como resultado un mayor grado de lipólisis. Por el contrario, el grado de lipólisis disminuye a medida que esta relación es menor, es decir, a menor concentración de SB, corroborando el rol fundamental de estas en el proceso de lipólisis.

III.6. Conclusiones

En términos generales, se comprobó que la actividad interfacial del material adsorbido en las gotas de la emulsión influye en el mecanismo de desplazamiento por las sales biliares (Sarkar y col., 2010). Los resultados obtenidos sugieren que las SB no producen un desplazamiento total de las proteínas adsorbidas en la película interfacial aceite/agua cuando su concentración interfacial es elevada, es decir, en condiciones de saturación o $\pi > 17 \text{ mN/m}$, pero su adsorción en los huecos o imperfecciones presentes en la película afecta a las interacciones entre las moléculas de proteína causando su debilitamiento, lo cual se manifiesta como una disminución en el valor del módulo dilatacional (E).

Se comprobó que las películas interfaciales de origen proteico resultaron ser más resistentes a la adsorción interfacial de las SB, en comparación con las formadas por Tween 20.

Se demostró además que la interfase formada por la proteína de soja es la que resultó menos desestructurada por las SB, lo cual está de acuerdo con que esta proteína es la que pudo competir con las SB por un sitio en la interfase en las experiencias de co-adsorción realizadas, demostrando que ambas moléculas pueden coexistir en la interfase O/W.

Considerando el rol de las SB en la digestión de lípidos, el hecho de que las proteínas de soja demostraran mayor resistencia a su actividad podría dificultar la adsorción posterior de la lipasa pancreática, lo que podría explicar el menor grado de lipólisis observado para las emulsiones estabilizadas por SPI (Figura I.9). Además, dada la compatibilidad/afinidad interfacial de las SB y las proteínas de soja, esta película podría constituir una barrera que dificulta la remoción interfacial de los productos de lipólisis en forma de micelas de SB, aumentando por consiguiente la presencia de AGL en la región interfacial lo que produce un efecto inhibitorio en la actividad de la lipasa. Este resultado concuerda con los resultados obtenidos en el Capítulo II, donde se observó que durante la etapa de desorción (remoción interfacial de los productos adsorbidos de forma reversible) la película de SPI ofreció la mayor resistencia al proceso (menores aumentos de γ).

Por el contrario, el que la película formada por β lg fuera más susceptible a la penetración de las SB, podría facilitar la adsorción de la lipasa pancreática y la remoción de los productos de la digestión. Esto permitiría la obtención de un mayor grado de lipólisis de sus emulsiones como se observó previamente (Figura I.9).

Con respecto a la película de E5LV, los estudios de co-adsorción y de adsorción secuencial indican, en primera instancia, que estas películas serían penetradas por las SB y desestructuradas totalmente, lo cual podría indicar que la HPMC es desplazada de la interfase por las SB. Sin embargo, a partir del análisis del potencial Z de las emulsiones, se concluye que este polisacárido no sería desplazado de la interfase. Más aún, los resultados indican que las SB adsorbidas estarían “secuestradas” por la HPMC, por lo que no contribuyen a la carga superficial de las gotas de aceite.

III.7. Referencias

- Abrahamse, E., Minekus, M., van Aken, G. A., van de Heijning, B., Knol, J., Bartke, N., Oozeer, R., van der Beek, E. M. y Ludwig, T. (2012). Development of the Digestive System-Experimental Challenges and Approaches of Infant Lipid Digestion. *Food Dig*, 3(1-3), 63-77.
- Álvarez Gómez, J. M. y Rodríguez Patino, J. M. (2006). Formulation Engineering of Food Model Foams Containing Diglycerol Esters and β -Lactoglobulin. *Industrial and Engineering Chemistry*, 45(22), 7510-7519.
- Ayorinde, F. O., Gelain, S. V., Johnson, J. H., Jr. y Wan, L. W. (2000). Analysis of some commercial polysorbate formulations using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 14(22), 2116-2124.
- Bauer, E., Jakob, S. y Mosenthin, R. (2005). Principles of physiology of lipid digestion. *Journal of Animal Science*, 18, 282-295.
- Benjamins, J. (2000). *Static and dynamic properties of proteins adsorbed at liquid interfaces*. Wageningen Países Bajos.
- Bos, M. y van Vliet, T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91(3), 437-471.
- Camino, N. A., Pérez, O. E., Sanchez, C. C., Rodríguez Patino, J. M. y Pilosof, A. M. R. (2009). Hydroxypropylmethylcellulose surface activity at equilibrium and adsorption dynamics at the air–water and oil–water interfaces. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2359-2368.
- Camino, N. A., Sánchez, C. C., Rodríguez Patino, J. M. y Pilosof, A. M. R. (2011). Hydroxypropylmethylcellulose at the oil–water interface. Part I. Bulk behaviour and dynamic adsorption as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 25(1), 1-11.
- Chu, B.-S., Gunning, P. A., Rich, G. T., Ridout, M. J., Faulks, R. M., Wickham, M. S. J., Morris, V. J. y Wilde, P. J. (2010). Adsorption of Bile Salts and Pancreatic Colipase and Lipase onto Digalactosyl-diacylglycerol and Dipalmitoyl-phosphatidylcholine Monolayers. *Langmuir*, 26(12), 9782-9793.
- Chu, B.-S., Rich, G. T., Ridout, M. J., Faulks, R. M., Wickham, M. S. J. y Wilde, P. J. (2009). Modulating pancreatic lipase activity with galactolipids: effects of emulsion interfacial composition. *Langmuir*, 25(16), 9352-9360.
- Damodaran, S. y Song, K. B. (1988). Kinetics of adsorption of proteins at interfaces: role of protein conformation in diffusional adsorption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 954, 253-264.
- Dickinson, E. (1992). *An Introduction to Food Colloids*: Oxford University Press, USA.
- Dickinson, E., van Vliet, T., Benjamins, J. y Lucassen Reynders, E. H. (2003). Static and dynamic properties of proteins adsorbed at three different liquid interfaces. *Food Colloids, Biopolymers and Materials*.
- Gallier, S., Shaw, E., Laubscher, A., Gragson, D., Singh, H. y Jiménez-Flores, R. (2014). Adsorption of Bile Salts to Milk Phospholipid and Phospholipid–Protein Monolayers. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (1363–1372), 1363–1372.
- Golding, M. y Wooster, T. J. (2010). The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1–2), 90-101.

- Graham, D. E. y Phillips, M. C. (1979). Proteins at liquid interfaces: II. Adsorption isotherms. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70(3), 415-426.
- Gu, Y.-S., Decker, E. A. y McClements, D. J. (2007). Formation of colloidosomes by adsorption of small charged oil droplets onto the surface of large oppositely charged oil droplets. *Food Hydrocolloids*, 21(4), 516-526.
- Halling, P. J. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 15(2), 155-203.
- Hsu, J.-P. y Nacu, A. (2003). Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science*, 259(2), 374-381.
- Hur, S. J., Decker, E. A. y McClements, D. J. (2009). Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during in vitro digestion. *Food Chemistry*, 114(1), 253-262.
- Kratohvil, J. P., Hsu, W. P., Jacobs, M. A., Aminabhavi, T. M. y Mukunoki, Y. (1983). Concentration-dependent aggregation patterns of conjugated bile salts in aqueous sodium chloride solutions. *Colloid and Polymer Science*, 261(9), 781-785.
- Lesmes, U., Baudot, P. y McClements, D. J. (2010). Impact of interfacial composition on physical stability and in vitro lipase digestibility of triacylglycerol oil droplets coated with lactoferrin and/or caseinate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 7962-7969.
- Mackie, A. R., Gunning, A. P., Ridout, M. J., Wilde, P. J. y Rodriguez Patino, J. (2001). In situ Measurement of the Displacement of Protein films from the Air/Water Interface by Surfactant. *Biomacromolecules*, 2, 1001-1006.
- Mackie, A. R., Gunning, A. P., Wilde, P. J. y Morris, V. J. (1999). Orogenic Displacement of Protein from the Air/Water Interface by Competitive Adsorption. *Journal of Colloid and Interface Science*, 210(1), 157-166.
- Malcolm, A. S., Dexter, A. F. y Middelberg, A. P. (2006). Mechanical properties of interfacial films formed by lysozyme self-assembly at the air-water interface. *Langmuir*, 22(21), 8897-8905.
- Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P., Macierzanka, A. y Mackie, A. (2011). The role of bile salts in digestion. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 36-46.
- Maldonado-Valderrama, J., Woodward, N. C., Gunning, A. P., Ridout, M. J., Husband, F. A., Mackie, A. R., Morris, V. J. y Wilde, P. J. (2008). Interfacial Characterization of β -Lactoglobulin Networks: Displacement by Bile Salts. *Langmuir*, 24, 6759-6767.
- Martin, A. H., Bos, M. A. y van Vliet, T. (2002). Interfacial rheological properties and conformational aspects of soy glycinin at the air/water interface. *Food Hydrocolloids*, 16(1), 63-71.
- McClements, D. J. y Li, Y. (2010). Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based. *Food & Function*, 1, 32-59.
- Mezdour, S., Lepine, A., Erazo-Majewicz, P., Ducept, F. y 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: Physicochemical and Engineering Aspects*, 331(1-2), 76-83.
- Murray, B. S. (2002). Interfacial rheology of food emulsifiers and proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(5-6), 426-431.
- Patist, A., Bhagwat, S. S., Penfield, K. W., Aikens, P. y Shah, D. O. (2000). On the measurement of critical micelle concentrations of pure and technical-grade nonionic surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*, 3(1), 53-58.

- Pérez, O. E., Carrera-Sánchez, C., Rodríguez-Patino, J. M. y Pilosof, A. M. R. (2007). Adsorption dynamics and surface activity at equilibrium of whey proteins and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixtures at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 21(5-6), 794-803.
- Pérez, O. E., Sánchez, C. C., Pilosof, A. M. R. y Rodríguez Patino, J. M. (2008). Dynamics of adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 22(3), 387-402.
- Perez, O. E., Sanchez, C. C., Rodriguez Patino, J. M. y Pilosof, A. M. (2006). Thermodynamic and dynamic characteristics of hydroxypropylmethylcellulose adsorbed films at the air-water interface. *Biomacromolecules*, 7(1), 388-393.
- Pilosof, A. M. R. (2016). Potential impact of interfacial composition of proteins and polysaccharides stabilized emulsions on the modulation of lipolysis. The role of bile salts. *Food Hydrocolloids*.
- Pilosof, A. M. R., Boquet, R. y Bartholomai, G. B. (1985). Kinetics of water uptake by food powders. *J of Food Science*, 50(1), 278-279.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E. y Miller, R. (2009). Lipases at interfaces: a review. *Adv Colloid Interface Sci*, 147-148, 237-250.
- Rodríguez Niño, M. R. y Rodríguez Patino, J. (1998). Surface tension of bovine serum albumin and tween 20 at the air-aqueous interface. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(10), 1241-1248.
- Rodríguez Niño, M. R., Wilde, P. J., Clark, D. C. y Rodríguez Patino, J. M. (1998). Rheokinetic analysis of bovine serum albumin and Tween 20 mixed films on aqueous solutions. *Agricultural Food Chemistry*, 46, 2177-2184.
- Rodríguez Patino, J. M., Molina Ortiz, S., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Niño, M. R. y Añón, M. C. (2003). Dynamic properties of soy globulin adsorbed film at the air-water interface. *Colloid and Interface Science*, 268(1), 50-67.
- Rodríguez Patino, J. M. y Pilosof, A. M. R. (2011). Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1925-1937.
- Ruiz-Rodriguez, P. E., Meshulam, D. y Lesmes, U. (2014). Characterization of Pickering O/W Emulsions Stabilized by Silica Nanoparticles and Their Responsiveness to In vitro Digestion Conditions. *Food Biophysics*, 9(4), 406-415.
- Sarkar, A., Horne, D. S. y Singh, H. (2010). Interactions of milk protein-stabilized oil-in-water emulsions with bile salts in a simulated upper intestinal model. *Food Hydrocolloids*, 24, 142-151.
- Sarkar, A., Murray, B., Holmes, M., Ettelaie, R., Abdalla, A. y Yang, X. (2016). In vitro digestion of Pickering emulsions stabilized by soft whey protein microgel particles: influence of thermal treatment. *Soft Matter*, 12(15), 3558-3569.
- Sarkar, A., Ye, A. y Singh, H. (2016). On the role of bile salts in the digestion of emulsified lipids. *Food Hydrocolloids*, 60, 77-84.
- Tejera García, R. (2008). *Estabilidad y actividad interfacial de emulsiones modelo con interes en alimentacion funcional*. Universidad de Granada, España.
- Torcello-Gómez, A. y Foster, T. J. (2014). Interactions between cellulose ethers and a bile salt in the control of lipid digestion of lipid-based systems. *Carbohydrate Polymers*, 113, 53-61.
- Torcello-Gómez, A., Maldonado-Valderrama, J., de Vicente, J., Cabrerizo-Vílchez, M. A., Gálvez-Ruiz, M. J. y Martín-Rodríguez, A. (2011). Investigating the effect of

- surfactants on lipase interfacial behaviour in the presence of bile salts. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 809-816.
- Torcello-Gómez, A., Maldonado-Valderrama, J., Martín-Rodríguez, A. y McClements, D. J. (2011). Physicochemical properties and digestibility of emulsified lipids in simulated intestinal fluids: influence of interfacial characteristics. *Soft Matter*, 7(13), 6167-6177.
- Vinarov, Z., Tcholakova, S., Damyanova, B., Atanasov, Y., Denkov, N. D., Stoyanov, S. D., Pelan, E. y Lips, A. (2012). Effects of emulsifier charge and concentration on pancreatic lipolysis: 2. Interplay of emulsifiers and biles. *Langmuir*, 28(33), 12140-12150.
- Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P. y Morris, V. (2004). Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* 108–109, 63-71.
- Wilde, P. J. y Chu, B. S. (2011). Interfacial & colloidal aspects of lipid digestion. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 14-22.
- Woodward, N. C., Gunning, A. P., Mackie, A. R., Wilde, P. J. y Morris, V. J. (2009). Comparison of the Orogenic Displacement of Sodium Caseinate with the Caseins from the Air-Water Interface by Nonionic Surfactants. *Langmuir*, 25(12), 6739-6744.
- Woodward, N. C., Gunning, P. A., Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P. J. y Morris, V. J. (2010). Probing the in situ competitive displacement of protein by non-ionic surfactant using atomic force microscopy. *Langmuir*, 15(26), 12560-12566.
- Ye, A., Cui, J. y Singh, H. (2010). Effect of the fat globule membrane on in vitro digestion of milk fat globules with pancreatic lipase. *International Dairy Journal*, 20(12), 822-829.

Capítulo IV

***Impacto de la estructura de HPMC en la
modulación del proceso de lipólisis: rol de las
sales biliares***

VI.1. Introducción

Las HPMC varían en el grado de sustitución de los grupos metilo e hidroxipropilo, por lo que presentan variedad en su peso molecular, en la viscosidad de sus soluciones (Chang y Gray, 1978; Daniels y Barta, 1994), gelificación y actividad interfacial (Pérez, Sánchez, Pilosof y Rodríguez Patino, 2008). Si bien diversos artículos han descripto la capacidad de las HPMC para reducir los niveles de colesterol en sangre (Kim y col., 2011; Maki y col., 2009; Maki y col., 2000; Reppas, Swidan, Tobey, Turowski y Dressman, 2009; Yokoyama y col., 2011), los trabajos más recientes se han centrado en la utilización de estas macromoléculas como vehículos para el transporte de sustancias bioactivas con el fin de controlar su liberación en el tracto gastrointestinal (Fathi, Martín y McClements, 2014; Mun, Kim, Shin y McClements, 2015). Debido a estas propiedades interesantes, y a la necesidad de reducir los efectos asociados al consumo elevado de grasas que afectan a la población mundial, el uso de HPMC en los alimentos se convierte en un objeto interesante de estudio.

Como se ha demostrado en el presente trabajo, las emulsiones estabilizadas por hidroxipropilmetilcelulosa resultan de interés particular ya que experimentaron un bajo grado de lipólisis durante la fase duodenal de la digestión *in vitro* (Figura I.9). Si bien las emulsiones de SPI también presentaron resistencia al proceso de lipólisis, en el caso de las emulsiones estabilizadas por HPMC el interés no solo radica en el bajo grado de lipólisis alcanzado, sino también en su resistencia a las enzimas gástricas, lo que se ha asociado a su vez con retardos en la velocidad de vaciado gástrico y con aumentos en la sensación de saciedad (Hlebowicz y col., 2009; Moreno Esteban, Gargallo Fernández y López de la Torre, 1997; Naslund, Gutniak, Skogar, Rossner y Hellstrom, 1998).

Por este motivo, en el presente capítulo se estudiará si la hidrofobicidad y peso molecular (viscosidad) de estas celulosas afectan la extensión y velocidad del proceso de lipólisis. Para ello se comparará el grado de lipólisis de emulsiones estabilizadas por dos tipos de HPMC: E5LV (utilizada en los capítulos anteriores) y E4M, que se diferencian principalmente en su hidrofobicidad y peso molecular (Tabla IV.1). E4M presenta menor hidrofobicidad que E5LV (menor % de metilos y relación metilos/hidroxipropilos) pero mucha mayor viscosidad.

Una vez determinado el grado de lipólisis de las emulsiones obtenidas con cada HPMC, se estudiarán sus interacciones con las SB ya sea en la interfase o en solución, debido a que esta interacción puede modular el proceso de lipólisis.

Tabla IV.1. Características fisicoquímicas de las HPMC utilizadas

Características/HPMC	E4M	E5LV
% metilos	28,0	29,5
% hidroxipropilos	10,2	9,7
Relación metilos/ hidroxipropilos	2,3	3,0
Sustitución en metilos (DS)	1,90	1,9
Sustitución en hidroxipropilos (MS)	0,23	0,23
Sustitución total (DS + MS)	2,13	2,13
Viscosidad (cp), solución 2% p/p, 25°C	4965	5,4
Peso molecular (Da)	90000	2000

IV.2. Cinética de lipólisis: Liberación de ácidos grasos en el tiempo

En primer lugar, las emulsiones O/W (10/90) obtenidas con cada uno de los polisacáridos a una concentración del 2% p/p se sometieron al proceso de digestión gastroduodenal *in vitro* descrito anteriormente, consistente en una etapa gástrica (1h, pH 2,5) seguida de una etapa duodenal (1h, pH 7,0), en presencia de las enzimas y biomoléculas en concentraciones fisiológicas (37 °C). La cinética de lipólisis se determinó a partir de la neutralización de los ácidos grasos liberados (AGL) por la acción de la lipasa pancreática durante la fase duodenal de la digestión *in vitro*.

En la Figura IV.1 se observa que las emulsiones estabilizadas por E4M fueron más susceptibles al proceso de lipólisis que las estabilizadas por E5LV, presentando una mayor extensión del proceso luego de 60 min (mayores valores de % AGL).

Las curvas de lipólisis obtenidas para cada polisacárido se ajustaron de acuerdo al modelo empírico desarrollado por Pilosof, Boquet y Bartholomai (1985) (Ecuación I.1) a fin de determinar los parámetros cinéticos del proceso: velocidad inicial (K_0^{AGL}) y velocidad global de lipólisis (K^{AGL}) (Ecuaciones I.2 y I.3). Los resultados obtenidos (Tabla IV.2) indican que ambas emulsiones son digeridas a igual velocidad inicial (K_0^{AGL}), independientemente de las características del polisacárido. Sin embargo, la constante de velocidad global (K^{AGL}) indica que las emulsiones de E4M se digieren más lentamente que las formadas por E5LV.

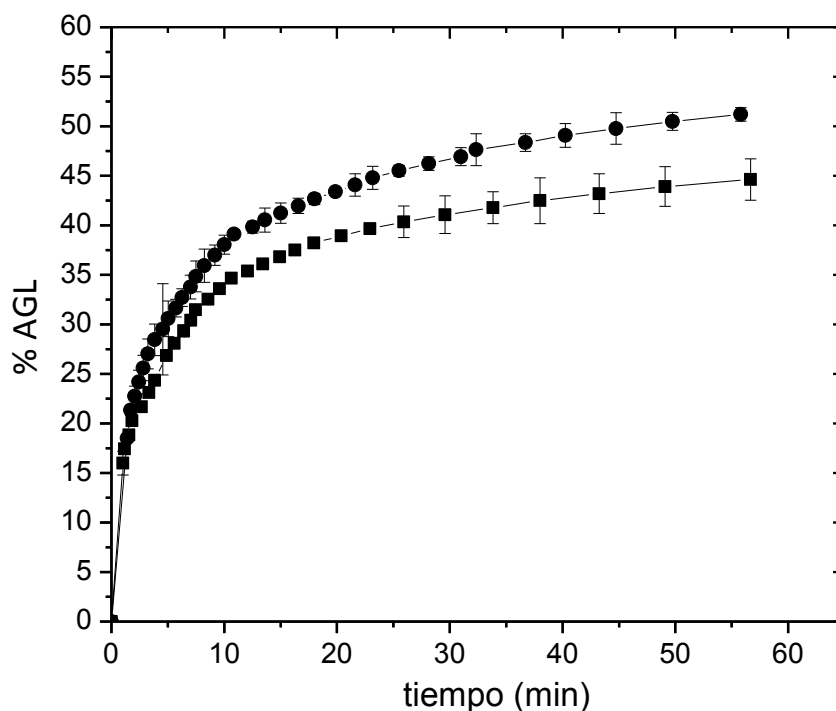


Figura IV.1. Liberación de ácidos grasos en el tiempo durante la fase duodenal de la digestión *in vitro* de emulsiones (10/90) de HPMC al 2% p/p: E5LV (■) y E4M (●).

Como ha sido indicado previamente por McClements (2014), la viscosidad del medio continuo juega un rol importante en el desarrollo de la lipólisis, ya que regula la adsorción de los componentes fisiológicos desde el seno de la solución hacia la interfase (enzimas, SB, etc.), así como también durante la desorción (desde la interfase hacia la solución) de los productos resultantes de la digestión lipídica, tales como los ácidos grasos. Debido al mayor peso molecular de E4M, este polisacárido da lugar a soluciones acuosas de mayor viscosidad que E5LV (Tabla IV.1), este podría ser el motivo por el cual el proceso se desarrolla más lentamente en emulsiones estabilizadas por E4M. Sin embargo, la mayor viscosidad de las soluciones de E4M no repercutió en la extensión del proceso, ya que en las emulsiones de E4M se observó mayor grado de lipólisis (Tabla IV.2).

Tabla IV.2. Parámetros cinéticos que describen la liberación de AG para cada emulsión, obtenidos según el modelo empírico desarrollado por Pilosof y col. (1985).

HPMC	(% AGL) _{max}	K_0^{AGL} (1/min)	$K^{AGL}(*10^3)$ (1/min)	R^2
E4M	$51,3^a \pm 0,6$	$16,3^a \pm 0,9$	$1,9^a \pm 0,4$	0,9892
E5LV	$44,4^a \pm 0,7$	$16,4^a \pm 1,4$	$8,3^b \pm 0,6$	0,9742

Como se ha indicado a lo largo del trabajo, la lipólisis es un proceso complejo que no solo involucra las características del medio de reacción (la subfase), sino que al ser un proceso interfacial, depende en gran medida de las características de la interfase (Jódar-Reyes, Torcello-Gómez, Wulff-Pérez, Gálvez-Ruiz y Martín-Rodríguez, 2010; McClements, 2010). Es por ese motivo que tanto la extensión como la velocidad con la cual ocurre el proceso en cada uno de los casos podrían estar relacionados con el tamaño de las gotas de aceite (que determinan el tamaño de la interfase), con la estructura molecular de cada HPMC, o bien con el rol que juegan estos polisacáridos en la actividad de las SB, indispensables para la actividad de la lipasa pancreática (Torcello-Gómez, Maldonado-Valderrama, Martín-Rodríguez y McClements, 2011; Ye, Cui y Singh, 2010).

Por todo lo planteado, en los próximos apartados se evaluará el impacto del agregado de SB en el tamaño de las gotas de aceite, y las características de cada interfase, con el objetivo de encontrar una explicación a las diferencias observadas en el grado y velocidad de lipólisis de las emulsiones estabilizadas por cada polisacárido.

IV.3. Impacto de la presencia de sales biliares sobre emulsiones O/W estabilizadas por HPMC

Las distribuciones de tamaño de gota de aceite de las emulsiones O/W iniciales (recién preparadas), expresadas en volumen (Figura IV.2), muestran que las estabilizadas por E5LV (Figura IV.2a) presentaron una distribución caracterizada por una población mayoritaria con un tamaño de 1,5 μm acompañada por un hombro a tamaños menores (0,3 μm), como se indicó previamente (Figura I.1). Por otra parte, las emulsiones estabilizadas por E4M (Figura IV.2b) presentaron una distribución bimodal con tamaño de gotas comprendidos entre 0,12 y 5,8 μm , pero con una población mayoritaria en 1,4 μm . Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados previamente por Camino y Pilosof (2011), que trabajaron con estos polisacáridos a pH 6. Adicionalmente, los valores de los diámetros promedios de las gotas de aceite ($D_{4,3}$) correspondiente a cada emulsionante (Tabla IV.3) también muestran que las emulsiones de E4M presentan gotas de mayor tamaño que las de E5LV. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Loning, Horst y Hoffmann (2002), quienes sostienen que cuanto mayor es la viscosidad de la fase continua resulta más difícil de inducir el fenómeno de cavitación necesario para

romper la fase oleosa en pequeñas gotas, lo que llevaría a obtener diámetros promedios mayores y distribuciones de tamaño más polidispersas.

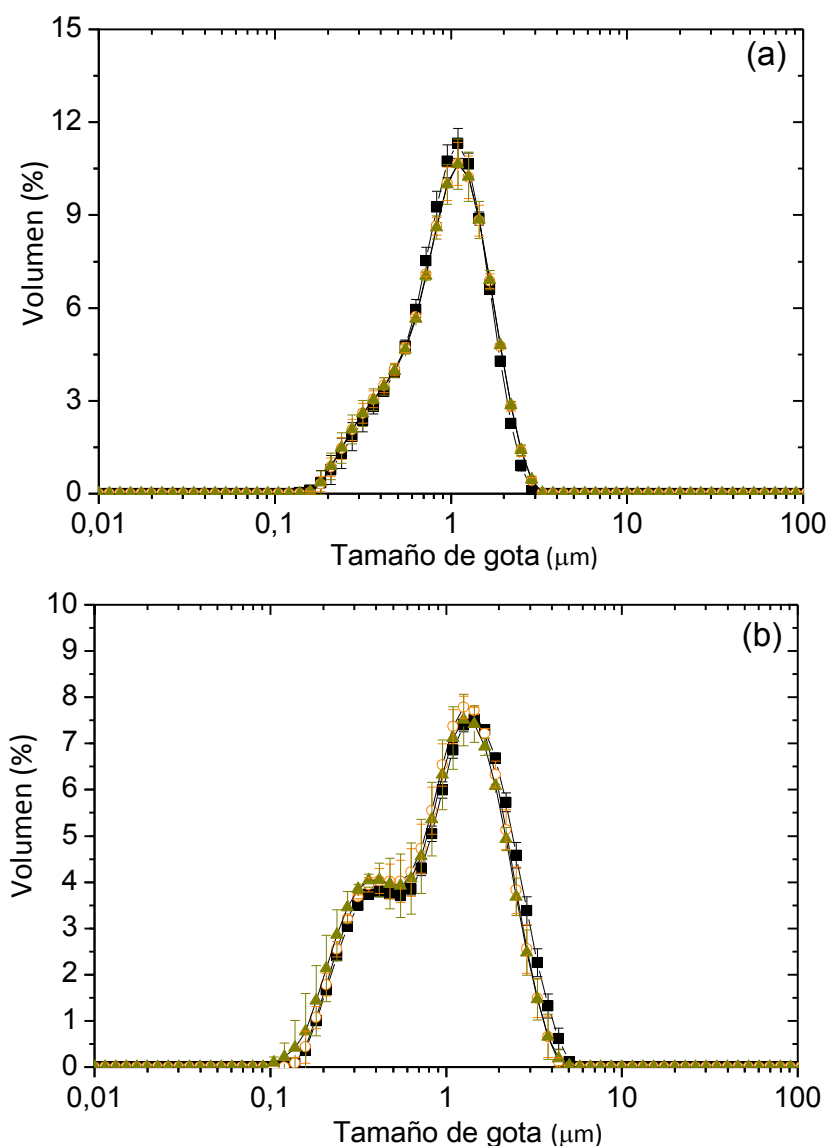


Figura IV.2. Distribución de tamaño de gota en volumen para emulsiones O/W de HPMC (E5LV (a) y E4M (b)) iniciales (■) y luego de mezclarse con SB (en el momento de la mezcla (t_0 min, ○) y una hora después (t_{60} min, ▲)) bajo condiciones de digestión duodenal a 37 °C.

Antes de analizar qué sucede al mezclar las emulsiones con una solución de SB en concentración fisiológica, se corroboró que la mezcla de las emulsiones con el FIS (en ausencia de SB) no presentó un efecto significativo sobre el tamaño y la estabilidad de cada emulsión (resultados no mostrados). Este comportamiento era de esperar, ya que en ambos casos se trata de polisacáridos no iónicos, por lo que se supone que estos presentan estabilidad a los cambios de pH y fuerza iónica (Camino y col., 2011).

Para analizar el impacto de las SB sobre las emulsiones obtenidas con cada polisacárido, se trabajó con una concentración de SB de 5 mg/ml, ya que como se ha indicado, este valor se encuentra comprendido en el rango de concentraciones fisiológicas (Sarkar, Horne y Singh, 2010). Los resultados obtenidos al mezclar las SB con las emulsiones de HPMC (distribución de tamaño de gota (Figura IV.2) y los parámetros obtenidos de tal distribución (Tabla IV.3)) revelan que no tiene lugar un cambio importante, ya sea al momento de realizar la mezcla (t_0 min) o una hora después del mezclado (t_{60} min). Esto estaría indicando que ambos sistemas son estables bajo las condiciones de digestión duodenal en presencia de SB. Se han observado resultados similares con emulsiones estabilizadas por caseinato de sodio (Sarkar, Ye y Singh, 2016) y otras proteínas lácteas, como aislado proteico de suero lácteo o β lg (Mun, Decker y McClements, 2007; Sarkar y col., 2010), donde se ha corroborado que las SB no inducen a la floculación o coalescencia de las gotas de aceite de esas emulsiones.

Tabla IV.3. Diámetros promedio ($D_{3,2}$ y $D_{4,3}$) y área interfacial específica (AIE) obtenidos para las emulsiones iniciales (E5LV y E4M) y luego de mezclarlas con SB: al momento de la mezcla (t_0 min) y una hora después (t_{60} min) bajo condiciones de digestión duodenal a 37 °C.

		Emulsión	$D_{3,2}$ (μm)	$D_{4,3}$ (μm)	AIE (m^2/g)
E5LV	original		$0,805^b \pm 0,048$	$1,083^a \pm 0,012$	$8,62^{ab} \pm 0,94$
	SB	t_0 min	$0,801^b \pm 0,039$	$1,106^a \pm 0,017$	$7,49^{ab} \pm 0,37$
		t_{60} min	$0,801^b \pm 0,054$	$1,108^a \pm 0,025$	$7,5^{ab} \pm 0,5$
E4M	original		$0,771^{ab} \pm 0,016$	$1,365^b \pm 0,046$	$7,03^{ab} \pm 0,82$
	SB	t_0 min	$0,735^{ab} \pm 0,008$	$1,25^b \pm 0,05$	$8,31^a \pm 0,12$
		t_{60} min	$0,684^b \pm 0,071$	$1,221^b \pm 0,028$	$8,81^b \pm 0,91$

Ya se ha comentado antes (Figura I.10) que, con independencia del emulsionante utilizado, cuanto mayor es el área interfacial inicial de las emulsiones, mayor es la velocidad inicial con la cual se desarrollaba el proceso de lipólisis. Al analizar las áreas interfaciales iniciales de las emulsiones obtenidas con cada HPMC (Tabla IV.3), ya sea antes o después de la adición de SB, se observa que existen pequeñas diferencias entre estos valores, lo cual está en concordancia con los valores similares de K_0^{AGL} que exhibieron ambos sistemas (Tabla IV.2).

Los resultados encontrados hasta ahora muestran que no es posible explicar la diferencia existente entre ambos emulsionantes en el grado de lipólisis, teniendo en cuenta

únicamente el impacto de la solución de las SB sobre el tamaño de las gotas de aceite de las emulsiones. Por tal motivo, en el siguiente apartado se comparará el impacto de la presencia de SB sobre las películas interfaciales formadas con cada HPMC, realizando experimentos análogos a los desarrollados en el Capítulo III. 3 (adsorción secuencial de SB utilizando el tensiómetro interfacial SINTERFACE PAT-1).

IV.4. Impacto de la presencia de sales biliares sobre películas interfaciales de HPMC

IV.4.1. Comportamiento interfacial de las HPMC

Las propiedades de las películas interfaciales formadas con cada HPMC fueron determinadas a 37 °C empleando soluciones de cada emulsionante a una concentración de 0,5% p/p, ya que representa un valor suficiente para conseguir la saturación interfacial (Camino, Pérez, Sanchez, Rodriguez Patino y Pilosof, 2009). La Figura IV.3 muestra que la adsorción interfacial de ambas HPMC, determinada a partir de la evolución de la presión interfacial (π) a lo largo del tiempo de adsorción, fue muy similar. En ambos casos se observó que los valores de π se incrementaron de inmediato alcanzando un valor máximo en pocos minutos (valor de pseudo-equilibrio), el cual permaneció constante en el tiempo.

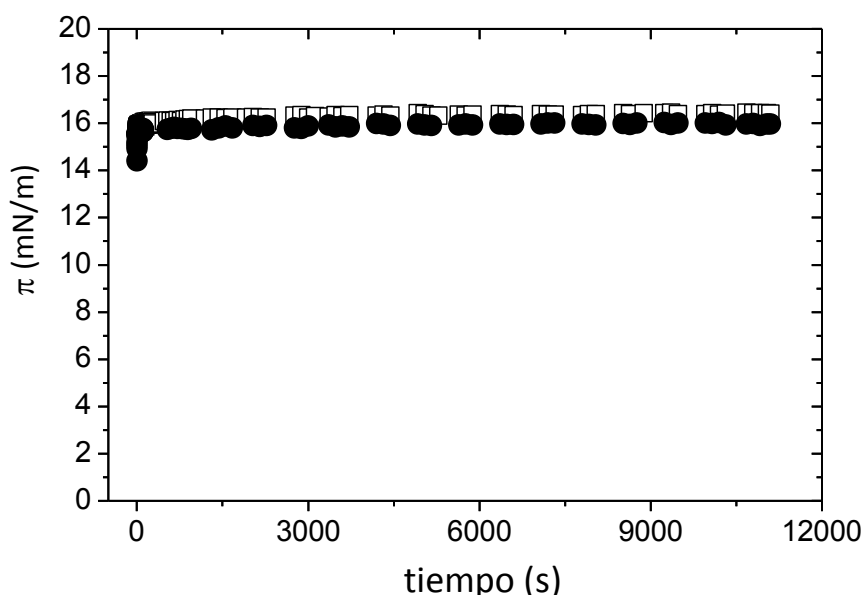


Figura IV.3. Variación de la presión interfacial (π) con el tiempo a 37 °C para la adsorción de: E5LV ($\square$) y E4M ($\bullet$) ambos al 0,5% p/p.

El análisis de los parámetros dilatacionales resulta de fundamental importancia, ya que dan información sobre las interacciones moleculares que tienen lugar entre las moléculas

adsorbidas en la interfase, y por lo tanto dependen de la estructura y composición de las moléculas de emulsionante que forman la película interfacial.

Se puede observar, en la Figura IV.4, la evolución de E y la viscosidad interfacial (η) con el tiempo de adsorción para cada sistema. Los menores valores de E obtenidos para E4M en comparación con E5LV, reflejan el menor carácter elástico de la película interfacial formada por E4M, lo cual puede ser atribuido al menor grado de sustitución en grupos metilos, lo que disminuye su hidrofobicidad y por ende su asociación interfacial (Pérez y col., 2008; Rodríguez Patino y Pilosof, 2011; Torcello-Gómez y Foster, 2014).

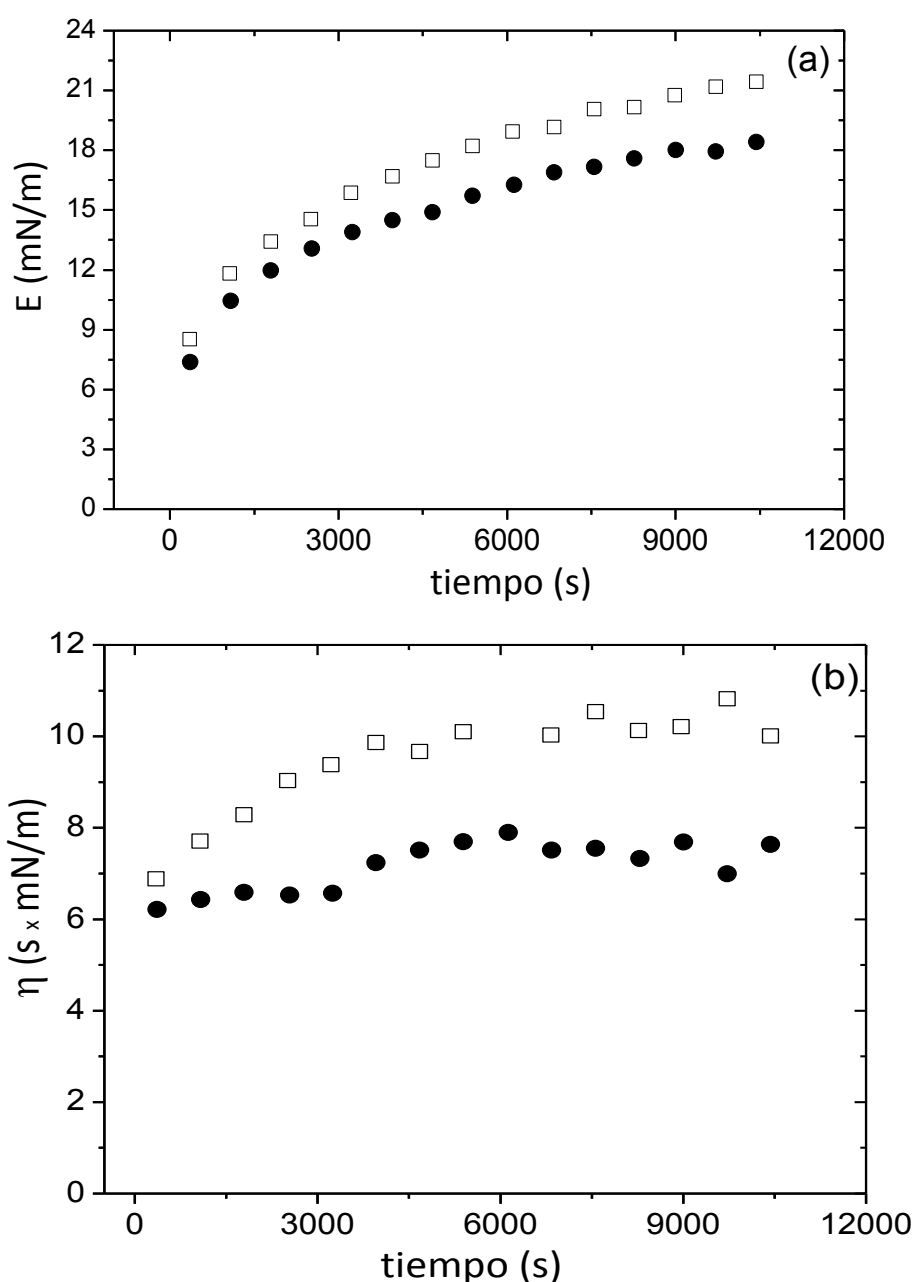


Figura IV.4. Variación del módulo dilatacional interfacial (a) y la viscosidad dilatacional interfacial (b) con el tiempo a 37 °C para la adsorción de: E5LV (□) y E4M (●) ambos al 0,5% p/p.

En cuanto a la viscosidad interfacial (η) de las películas (Figura IV.4b), E4M presentó también valores más bajos que E5LV en todo el rango de tiempo estudiado, lo cual es indicativo de la formación de una película interfacial más flexible (Berthold, Schubert, Brandes, Kroh y Miller, 2007). Sin embargo, los resultados indican que, ambas HPMC formaron películas viscoelásticas que implican la asociación de los grupos hidrofóbicos.

IV.4.2. Estudios de adsorción secuencial de las sales biliares sobre películas interfaciales de HPMC

A continuación, se evaluó en una experiencia de adsorción secuencial el efecto que presenta la incorporación de una solución de SB en concentración fisiológica (5 mg/ml) sobre la película interfacial formada con cada polisacárido. Para tal fin se utilizó el sistema de doble capilar del tensiómetro interfacial. Nuevamente, el tiempo elegido para realizar el intercambio de la subfase fue de 8000 segundos, ya que representa un tiempo lo suficientemente largo como para garantizar la saturación interfacial por las HPMC.

Antes de evaluar el impacto que representa la incorporación de las SB en cada película interfacial se determinó el efecto que tiene la incorporación de FIS, en ausencia de SB (resultados no mostrados). Se corroboró de esta forma la irreversibilidad en el proceso de adsorción de las moléculas de polisacárido, al observar que no se produjeron cambios en los parámetros interfaciales tras la incorporación del fluido.

Como fue indicado al estudiar el comportamiento interfacial de las SB (Capítulo III), estas se caracterizan por alcanzar un valor de π constante casi de forma instantánea ($\pi \sim 20$ mN/m), formando una película interfacial muy poco elástica, con valores muy bajos de E ($E \sim 2$ mN/m).

Respecto a los resultados de la adsorción secuencial de las SB (Figura IV.5) ambas películas se comportan en forma similar y serían penetradas por las SB, ya que en ambos casos se produjo un aumento de π de forma instantánea que alcanzó, al final de la medida, los valores correspondientes a las SB solas ($\pi \sim 20$ mN/m).

En la Figura IV.6a se observan los valores del módulo dilatacional interfacial (E) de las películas formadas por ambas HPMC antes y después de la inyección de la solución de SB. A pesar de que ambos sistemas se caracterizaron por la formación de una película con elevados valores de E (Figura IV.4a), se observó un comportamiento similar luego de la

inyección de las SB (a los 8000 s) donde los parámetros disminuyeron rápidamente alcanzando valores muy bajos, similares a los obtenidos por la disolución de SB solas (mostrados como referencia en la Figura IV.6), lo que indicaría que las películas interfaciales serían bastante perturbadas tras la adsorción de las SB, dando como resultado la formación de una interfase de carácter elástico muy pobre.

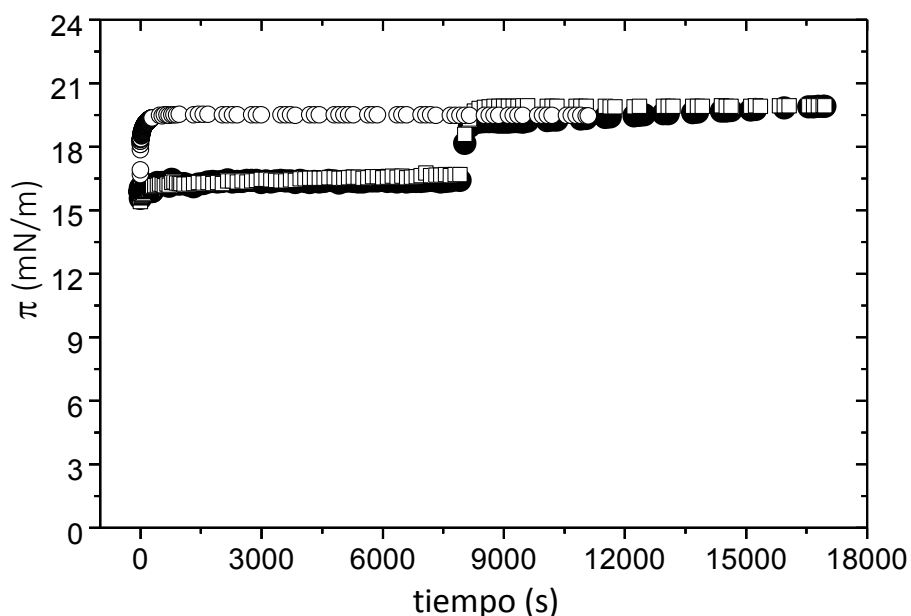


Figura IV.5. Variación de la presión interfacial (π) con el tiempo a 37 °C tras la adición secuencial de una solución de SB sobre películas interfaciales de HPMC: E5LV ($\square$) y E4M ($\bullet$), a 0,5% p/p. Como referencia se muestra el resultado de SB a 5 mg/ml (O).

Con respecto a los datos de viscosidad interfacial (Figura IV.6b), se puede concluir que la incorporación de SB da lugar a la formación de un film interfacial más flexible (menores valores de η) en ambas HPMC, alcanzando un valor final de η muy similar al de las SB solas ($\eta \approx 1,5 \text{ s} \times \text{mN/m}$), mostrados en esta figura a modo de referencia.

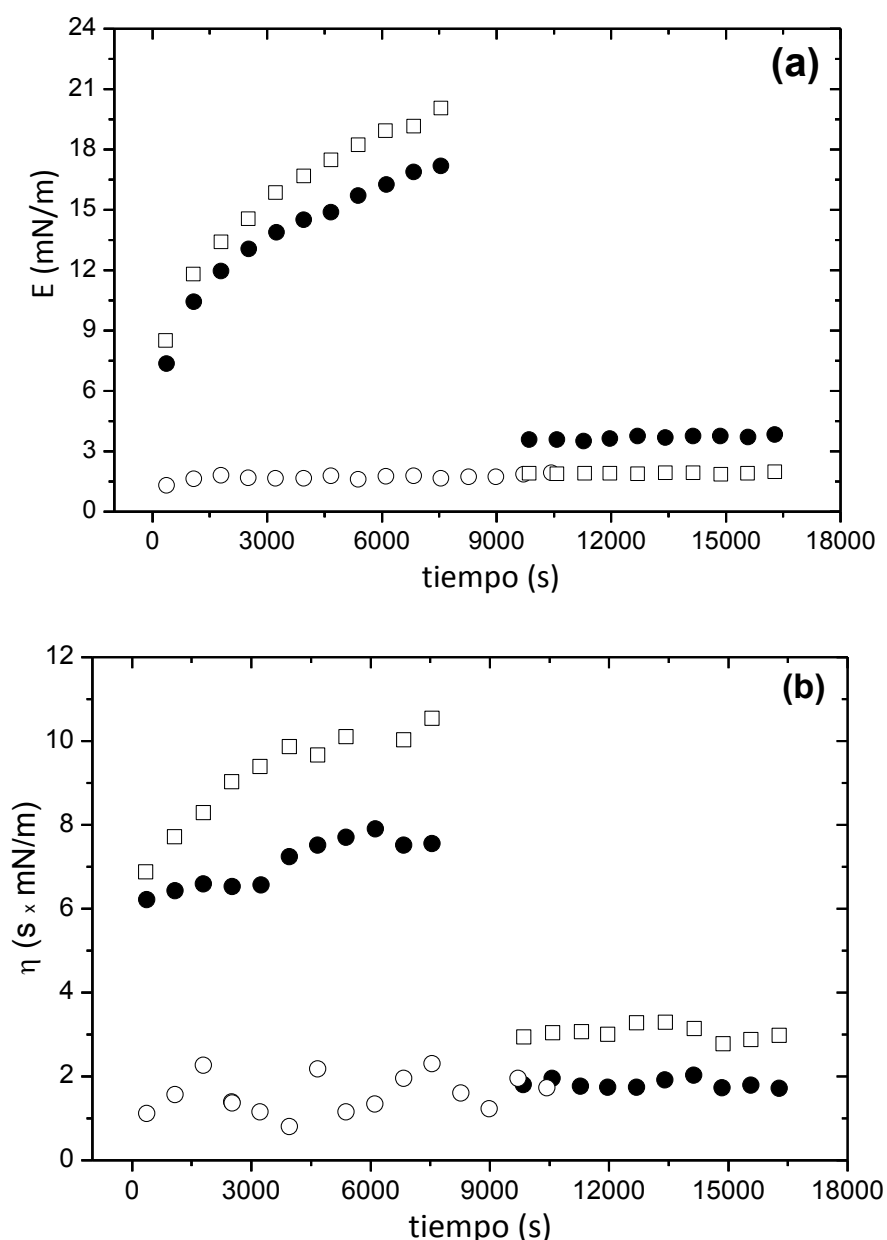


Figura IV.6. Variación del módulo dilatacional (a) y la viscosidad dilatacional interfacial (b) en el tiempo a 37 °C tras la adición de una solución de SB sobre películas interfaciales de HPMC: E5LV (□) y E4M (●) a 0,5% p/p. Como referencia se muestra el resultado de SB 5 mg/ml (○).

A partir de los resultados de la adsorción secuencial de las SB se puede concluir que estas moléculas penetran en ambas películas interfaciales causando un importante desarreglo molecular, al dificultar las interacciones hidrofóbicas que permiten la estructuración de la interfase, motivo por el cual se produce una importante pérdida de la elasticidad interfacial (Beysseriat, Decker y McClements, 2006; Chu y col., 2009; Lesmes, Baudot y McClements, 2010; Li y McClements, 2011). Sin embargo, ambas HPMC exhibieron un comportamiento similar en respuesta a la adsorción de las SB, por lo cual no es posible

explicar las diferencias encontradas en el grado de lipólisis, en base a su resistencia a la penetración interfacial de las SB.

IV.5. Impacto de la adsorción de las sales biliares en la carga superficial de emulsiones de HPMC

A partir de la determinación del potencial Z se evaluó el impacto de las SB sobre la carga superficial de las gotas de aceite de las emulsiones (10/90) preparadas con ambas HPMC a una concentración del 2% p/p (Tabla IV.4).

Al tratarse de polisacáridos no iónicos, el valor determinado para las emulsiones iniciales fue prácticamente nulo (~ -1 mV). Sin embargo, cuando se mezclaron con las SB (5 mg/ml) ambas emulsiones mostraron un comportamiento muy similar, arrojando valores de potencial Z más negativos que el de las emulsiones iniciales, lo que indica que las SB han penetrado en la interfase formada por cada HPMC, en concordancia con los resultados determinados al analizar los parámetros interfaciales. Sin embargo, los valores obtenidos se encuentran por encima al de las SB, hecho que refleja que las HPMC permanecen adsorbidas en la interfase O/W. Este comportamiento guarda relación con los resultados obtenidos al analizar el impacto de las SB sobre el tamaño de las emulsiones donde se observó que el tamaño de las gotas de aceite no cambió en presencia de SB (Figura IV.2).

Tabla IV.4. Potencial Z de las emulsiones iniciales (E5LV y E4M) y luego de mezclarlas con SB bajo condiciones de digestión duodenal. El potencial Z reportado para una emulsión estabilizada por SB (5 mg/ml) es < -40 mV (Sarkar y col., 2016).

HPMC	Potencial Z (mV) Sin SB	Potencial Z (mV) Con SB
E5LV	$-1,23 \pm 0,07$	$-7,13 \pm 0,8$
E4M	$-0,54 \pm 0,24$	$-4,01 \pm 0,8$

Los resultados obtenidos indican que las SB desestructuran ambas películas interfaciales, pero no evidencian un desplazamiento total de los polisacáridos, ya que no se produce un cambio esperado respecto a la carga superficial de las gotas de aceite (Tabla IV.4) o en el tamaño de sus emulsiones (Figura IV.2). Sin embargo, el comportamiento obtenido para ambos HPMC es muy similar, independientemente de sus diferencias fisicoquímicas.

Por lo tanto, ni las diferencias en las características de las emulsiones, ni la respuesta de cada película interfacial a la actividad de las SB ha sido suficiente para explicar las diferencias observadas en el grado de lipólisis de las emulsiones de cada HPMC (Figura IV.1). Por consiguiente, se estudiarán en las próximas secciones, las interacciones que establecen ambas HPMC y las SB en solución acuosa, a fin de entender si el grado de interacción entre estas influye en la velocidad y extensión del proceso de lipólisis.

IV.6. Interacciones entre las HPMC y las sales biliares en solución acuosa

Debido a su naturaleza anfifílica, las SB pueden autoensamblarse en solución acuosa formando micelas que se mantienen estables, principalmente por interacciones hidrofóbicas, aunque también contribuyen a su integridad los puentes de hidrógeno en los que participan los grupos hidroxilos y grupos ácidos de la molécula (Madenci y Egelhaaf, 2010; Maldonado-Valderrama, Wilde, Macierzanka y Mackie, 2011). Debido a su estructura molecular peculiar, la formación de micelas de SB es un proceso dinámico y versátil en cuanto a la variedad de formas que puede adquirir, lo que se vuelve de crucial importancia para el transporte y la distribución de los diferentes nutrientes en el intestino delgado (Verde y Frenkel, 2010; Warren, Chalmers, Hutchison, FDang y Pouton, 2006). Por otra parte, la capacidad de las SB para interactuar con otros componentes en solución podría alterar su capacidad de autoensamblaje, afectando el grado de interacción y el tamaño de la micela resultante. Por este motivo, en este apartado se evaluará el impacto que presenta la presencia de cada HPMC sobre la capacidad de asociación de las moléculas de SB, bajo condiciones de digestión duodenal.

IV.6.1. Análisis del grado de interacción entre las HPMC y las sales biliares por dispersión dinámica de luz

En la Figura IV.7 se observa la distribución de tamaño de las micelas de SB, expresada en volumen, obtenida con el analizador de tamaño de partícula Zetasizer Nano-ZS. Esta determinación se realizó sobre una solución de SB a una concentración final comprendida en el rango de las concentraciones fisiológicas (5 mg/ml), la cual previamente se diluyó 1/100 utilizando el FIS. Se puede observar que, en las condiciones de estudio, las SB forman dos poblaciones de micelas: una con un tamaño promedio de 460 nm y otra menos importante de 106 nm.

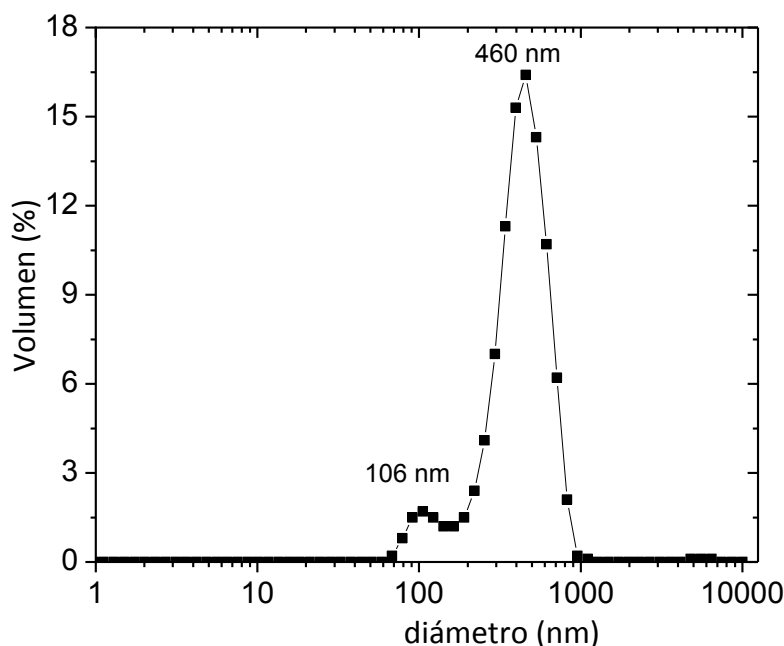


Figura IV.7. Distribución de tamaño de partícula expresada en volumen para una solución de SB (5 mg/ml).

Por otra parte también se estudió la distribución del tamaño de partícula, expresada en volumen, de las soluciones de ambas HPMC a una concentración de 0,5% p/p. Se observó que la solución de E5LV se caracterizó por una distribución monomodal, con una población de 7,5 nm de diámetro (Figura IV.8a), mientras que la solución de E4M presentó una distribución bimodal con un pico principal a 18,2 nm, acompañado por un hombro a 10 nm (Figura IV.8b). Sin embargo, del ancho de la base de la distribución de ambas HPMC puede concluirse que se trata de soluciones polidispersas, en concordancia con reportes previos (Camino, Pérez y Pilosof, 2009). Este comportamiento indica la existencia de asociaciones o clusters (denominación en inglés) entre las moléculas de HPMC, aún cuando las muestras fueran agitadas con el fin de destruir los posibles agregados antes de la medición. El autoensamblaje de las HPMC se debe al alto grado de sustitución con grupos metilos (Tabla IV.1) lo cual permite la existencia de fuertes interacciones hidrofóbicas (Kato, Yokoyama y Takahashi, 1978). Este comportamiento fue evidenciado también por Camino, Pérez y Pilosof (2009), quienes además han indicado que el tamaño de los clusters de HPMC se incrementa con la concentración del polisacárido.

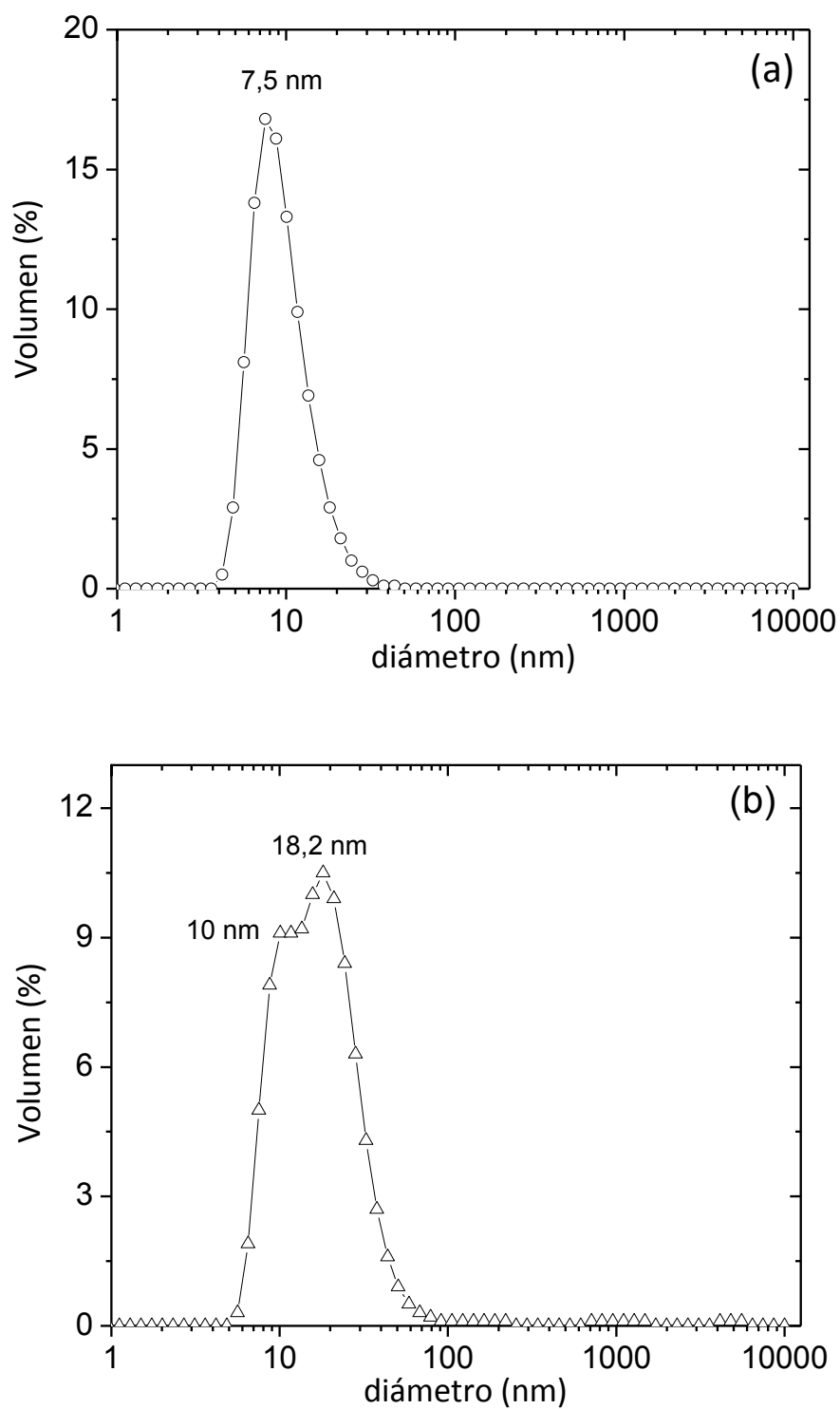


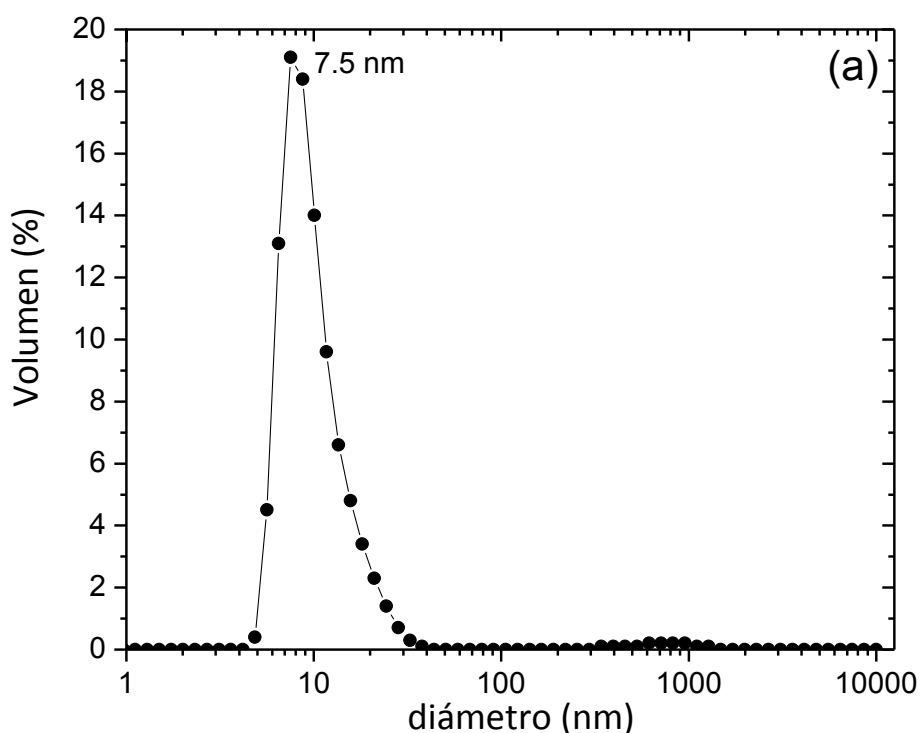
Figura IV.8. Distribución de tamaño de partícula expresada en volumen para una solución de E5LV (a) y E4M (b). Ambos a una concentración de 0,5% p/p.

Se observa además que, a igual concentración de polisacárido, las moléculas de E5LV forman clusters de menor tamaño que las de E4M. Este comportamiento puede atribuirse

al mayor peso molecular de E4M (Tabla IV.1) y a la mayor tendencia a la asociación al aumentar el peso molecular (Funami y col., 2007).

La distribución de tamaño, expresada en volumen, para el sistema mixto formado por las SB y cada HPMC (Figura IV.9), muestra en ambos casos la desaparición del pico correspondiente a los agregados micelares de SB observados en la Figura IV.7. Este comportamiento podría ser indicativo de que las SB se han unido a los polisacáridos, rompiéndose la estructura micelar característica.

Para el caso de E5LV (Figura IV.9a) al comparar la distribución de tamaño de este sistema mixto con la distribución obtenida por el polisacárido solo (Figura IV.8a), resulta que el pico correspondiente al polisacárido se mantiene casi sin cambios, lo que indicaría que si bien E5LV interfiere en el grado de interacción entre las SB, estas últimas no afectan el grado de interacción ante las moléculas de polisacárido, ya que mantiene el tamaño del cluster característico.



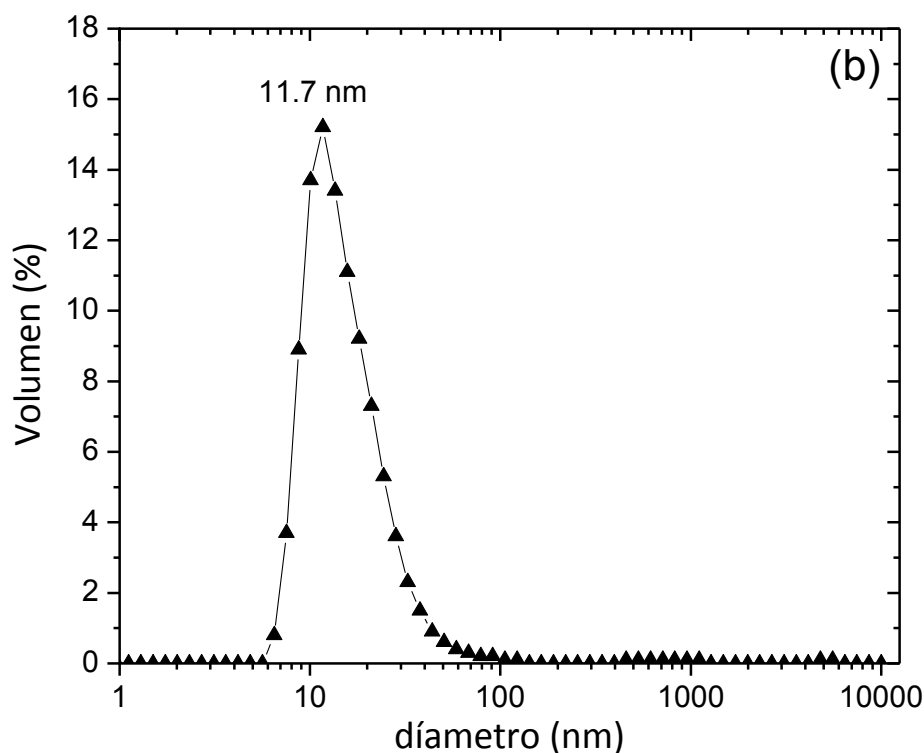


Figura IV.9. Distribución de tamaño de partícula expresada en volumen para soluciones de HPMC (0,5% p/p) mezcladas con solución de SB (5 mg/ml): E5LV (a) y E4M (b).

Por el contrario, para el sistema mixto formado por E4M y SB (Figura IV.9b) se observó, no solo que el agregado micelar de SB había desaparecido, sino que también se evidenció la casi “disolución” del cluster de mayor tamaño (18,2 nm) de E4M.

Como se indicó anteriormente, al tratarse de polisacáridos no iónicos (Camino y col., 2011), es decir, que su carga neta es “cero”, se favorece la formación de clusters de gran tamaño, ya que la repulsión electrostática entre las moléculas es prácticamente nula. Sin embargo, cuando las SB interactúan con los grupos hidrofóbicos de las moléculas de HPMC le aportan una carga negativa que hace que aumente el grado de repulsión electrostática entre estas moléculas, disminuyendo así su tendencia a la formación de grandes agregados. Este comportamiento parece ser más evidente para el caso de E4M, donde se observó la desaparición del cluster de 18,2 nm.

La diferencia en el comportamiento de ambas HPMC podría explicarse teniendo en cuenta las características fisicoquímicas de cada una, ya que según Torcello-Gomez y col. (2015) los ésteres de celulosa parecen ser más sensibles a la penetración de las SB cuanto mayor es el grado de sustitución de grupos hidroxipropilos en la molécula. De hecho, E5LV presenta una mayor relación entre grupos metilos/hidroxipropilos que E4M (Tabla

IV.1), lo que podría explicar la mayor resistencia de los clusters de E5LV frente a la disolución llevada a cabo por las SB. Por otra parte, y en concordancia con nuestros resultados, Torcello-Gomez y col. (2015) indicaron también que los geles formados por HPMC con menor cantidad de grupos metilos, son más debilitados por la presencia de SB, quienes interrumpen el grado de asociación entre las moléculas de HPMC, debilitando los parámetros elásticos que caracterizan al gel que forman.

Por lo tanto, puede concluirse que se establecen interacciones entre las HPMC y las SB en solución acuosa pero estas dependen del tipo de sustituyente y el patrón de sustitución de la celulosa.

IV.6.2. Análisis del grado de interacción entre las HPMC y las sales biliares por determinación del cloud point

Existen diferentes interpretaciones en la literatura acerca del mecanismo de gelificación de soluciones acuosas de metilcelulosas y HPMC sometidas a calentamiento. La mayoría de los trabajos coinciden en que la gelificación de estas moléculas involucra dos etapas: La *etapa I*, llamada régimen pre-gel, incluye a las interacciones hidrofóbicas que se producen entre las moléculas de polisacárido, con la consecuente formación de asociaciones o clusters (Kato y col., 1978). La *etapa II*, o régimen gel, corresponde a la gelificación propiamente dicha que ocurre a altas temperaturas dando lugar a formación de una estructura tridimensional y está comúnmente asociada con la separación de fases (Funami y col., 2007; Kobayashi, Huang y Lodge, 1999; Yuguchi, Urakawa, Kitamura, Ohno y Kajiware, 1995).

El comportamiento que presentan las moléculas de HPMC en solución frente a los aumentos de temperatura se representa, de forma esquemática, en la Figura IV.10 (Pérez, 2005). A bajas temperaturas el polímero en solución presenta moléculas de agua que se disponen rodeando a los grupos hidrofóbicos constituyendo estructuras, llamadas “tipo jaula”, que provocan el aumento en la solubilidad del polímero. Cuando la temperatura aumenta, las moléculas del polímero absorben energía translacional y las estructuras “tipo jaula” se distorsionan, eliminando el agua de hidratación. Esta desorganización favorece la exposición de regiones hidrofóbicas, induciendo la formación de agregados o clusters lo suficientemente grandes como para producir una turbidez

visible en la solución (Sarkar y Walker, 1995), dando lugar de esta forma a la *etapa I* del proceso de gelificación.

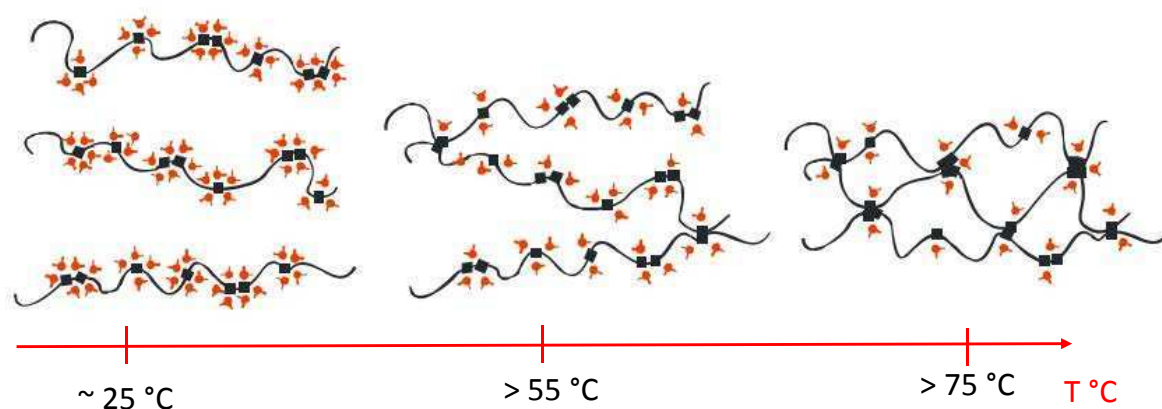


Figura IV.10. Representación esquemática de la asociación entre cadenas de HPMC en solución durante la gelificación por calor.

Por lo tanto, durante la primera etapa del proceso de gelificación, siempre y cuando la concentración de polímero lo permita, se puede observar la transición de soluciones transparentes a turbias a medida que las soluciones son calentadas. La temperatura a la cual acontece este cambio se denomina temperatura de cloud point, y es un indicativo del comienzo de las asociaciones mediadas por interacciones hidrofóbicas que darán lugar a la formación posterior del gel (Kobayashi y col., 1999).

En la Figura IV.11 se muestra el valor de temperatura en que se alcanza el cloud point determinado experimentalmente para cada una de las soluciones de HPMC (1% p/p) en presencia y ausencia de SB (1% p/p). En ausencia de SB, se observó que la temperatura de cloud point fue menor para E4M que para E5LV, lo que indica que E4M exhibe una mayor tendencia a la agregación que E5LV, lo cual está en concordancia con lo indicado por Sarkar (1979), quien reportó que los derivados de celulosas de mayor peso molecular exhiben un menor cloud point, debido a su mayor tendencia para asociarse por medio de la formación de clusters.

Previamente, Sarkar (1979) indicó que las propiedades de gelificación de derivados de celulosa pueden ser alteradas a partir de la utilización de diferentes aditivos (electrolitos, azúcares, propilenglicol), que aceleran o retardan el proceso, permitiendo que se desarrolle a diferentes temperaturas, según sean los requerimientos.

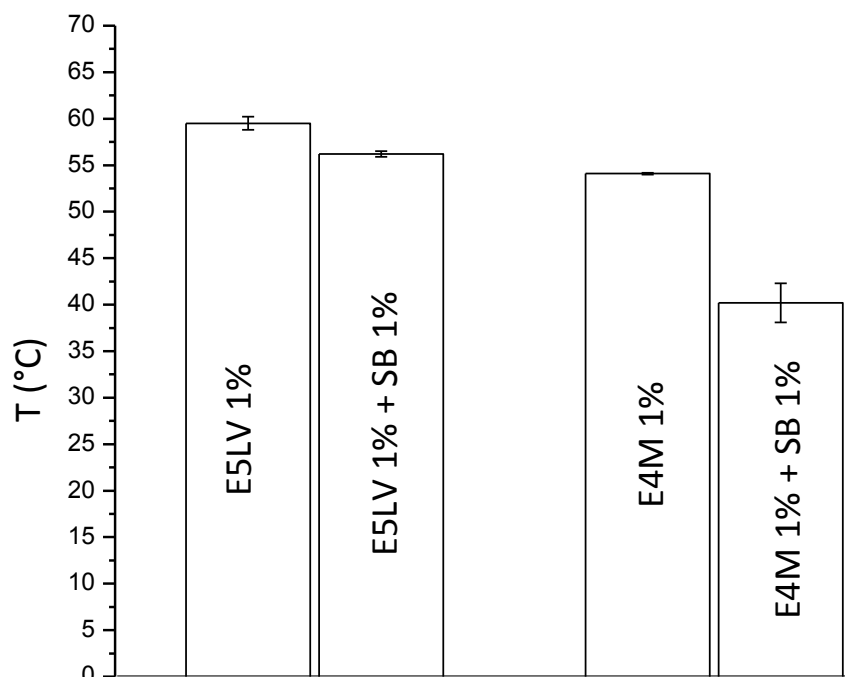


Figura IV.11. Cloud point determinado para cada HPMC y sus mezclas con SB.

En este caso, cuando las soluciones de cada HPMC fueron calentadas en presencia de SB se observó una disminución en los valores de temperatura de cloud point (Figura IV.11). El cambio en la temperatura de cloud point respecto a la observada en ausencia de SB indicaría, en principio, que las SB interfieren en las interacciones hidrofóbicas que determinan el grado de asociación entre las moléculas de cada HPMC, responsables de enturbiar las soluciones y permitir entonces la identificación del cloud point. Estos resultados concuerdan con los obtenidos al analizar el tamaño de partícula de las HPMC en presencia de SB (Figura IV.9).

Como se indicó antes, la adsorción de las SB imparte carga negativa a las moléculas de HPMC, lo que aumentaría la repulsión electrostática entre sus cadenas. Este aumento de repulsión podría facilitar el desarreglo molecular que se promueve durante el calentamiento (desintegración de la estructura “tipo jaula”) antes de que se produzca la visualización de turbidez, es decir, que podría determinar la menor temperatura de cloud point. Al comparar las HPMC entre sí, se observó que el cambio en esta temperatura en presencia de las SB fue mucho más evidente para E4M (14 °C) que para E5LV (3 °C), lo que indicaría nuevamente que este HPMC sería más susceptible a las SB.

En los últimos años se han reportado un importante número de trabajos que se enfocan en estudiar la interacción existente entre las SB y diferentes componentes (Pilosof, 2016). Si bien las metodologías utilizadas son variadas, en todos los casos el objetivo principal se centra en estudiar como la disponibilidad de SB podría impactar en la actividad de la lipasa pancreática. Respecto a estudios que involucran la interacción entre polisacáridos y SB, Torcello-Gomez y col. (2015) estudiaron la unión de SB a ésteres de celulosa utilizando calorimetría diferencial de barrido, concluyendo que las interacciones hidrofóbicas que se producen entre las SB y las moléculas de celulosa produjeron una desestructuración del polisacárido, de modo tal que aumentan su resistencia térmica. Por otra parte, Roy, Kundu, Banik, Kuchlyan y Sarkar (2015) han demostrado que las SB no solo interaccionan con macromoléculas, sino que también interfieren en el autoensamblaje de surfactantes de bajo peso molecular (plurónicos P123). Más recientemente, a partir de estudios de resonancia magnética nuclear, Gunness, Flanagan, Mata, Gilbert y Gidley (2016) han concluido que las fibras dietarias solubles pueden interaccionar con las SB, ya sea formando un complejo dinámico con las micelas de SB, o bien atrapándolas en el interior de su estructura, reduciendo así la movilidad de la micela, lo que disminuye la intensidad de la señal detectada.

En términos generales, a pesar de las diferencias en las formas de abordar los estudios, los resultados reportados hasta el momento indicarían que, en solución acuosa, las SB se unen (o más bien serían secuestradas) a las moléculas de HPMC, teniendo un rol fundamental el grado de hidrofobicidad de esta última. En particular, en este trabajo se encontró que un aumento de la hidrofobicidad de la HPMC aumentaría el efecto barrera a las SB, motivando por lo tanto una disminución del grado de lipólisis.

IV.7. Conclusiones

Las emulsiones de HPMC estudiadas presentaron diferencias en cuanto a la extensión del proceso de lipólisis. No fue posible atribuir estas diferencias a las características fisicoquímicas de estas HPMC (peso molecular, viscosidad, etc.), ni al área interfacial (O/W) disponible para la adsorción de las enzimas involucradas en el proceso, ni tampoco a las características de cada interfase. Los resultados encontrados más bien indican que la diferente susceptibilidad al proceso de lipólisis dependería de eventos moleculares que involucran la adsorción interfacial de las SB. Aunque ambas HPMC mostraron capacidades similares para “secuestrar” a las SB en solución acuosa, surgen algunas particularidades al considerar la relación de grupos metilos/hidroxipropilos que sustituyen ambas moléculas. Según Torcello-Gómez y col. (2014), aunque tanto los grupos metilo, como los hidroxipropilos podrían ligar SB, las celulosas más hidrofílicas presentan una mayor sensibilidad a la presencia de las SB en la interfase O/W. Este comportamiento es concordante con los presentes resultados, donde se vio que los agregados de E4M, la HPMC más hidrofílica (dado que presenta la menor relación de sustituyente metilos/hidroxipropilos) fueron más afectados por la presencia de SB, en comparación con los agregados formados por moléculas de E5LV más hidrofóbica (Tabla IV.1).

En base a estos resultados se podría pensar que la diferencia observada en el grado de lipólisis estaría asociada a la mayor desestructuración que producen las SB sobre la película de E4M. En la Figura IV.12 se propone un modelo para explicar con mayor claridad estas conclusiones.

El modelo planteado muestra, en primer término, que la interfase O/W se encuentra estabilizada principalmente por interacciones hidrofóbicas establecidas entre las moléculas adsorbidas de HPMC, independientemente del tipo de HPMC involucrada. En estas condiciones la carga neta de la interfase y, por lo tanto, de las gotas de aceite de la emulsión es cercana a cero. Durante la adsorción de las SB se produce una gran interrupción de estas interacciones en ambos casos, lo que determinaría que las películas pierdan su carácter elástico y las gotas de aceite adquieran carga superficial negativa. Si bien la perturbación es muy importante en ambos sistemas, al ser la película de E4M la que presenta mayor carácter hidrofílico es donde se produciría el mayor desarreglo molecular. Como consecuencia de esta mayor perturbación, las cadenas de E4M se

separan más entre sí aumentando los sitios disponibles para la adsorción de la lipasa pancreática en comparación con E5LV, mas hidrofóbica. La mayor separación de las cadenas de E4M adsorbidas y, en consecuencia la mayor adsorción de la lipasa pancreática (en asociación con la colipasa), daría lugar al mayor grado de lipólisis obtenido con las emulsiones de E4M.

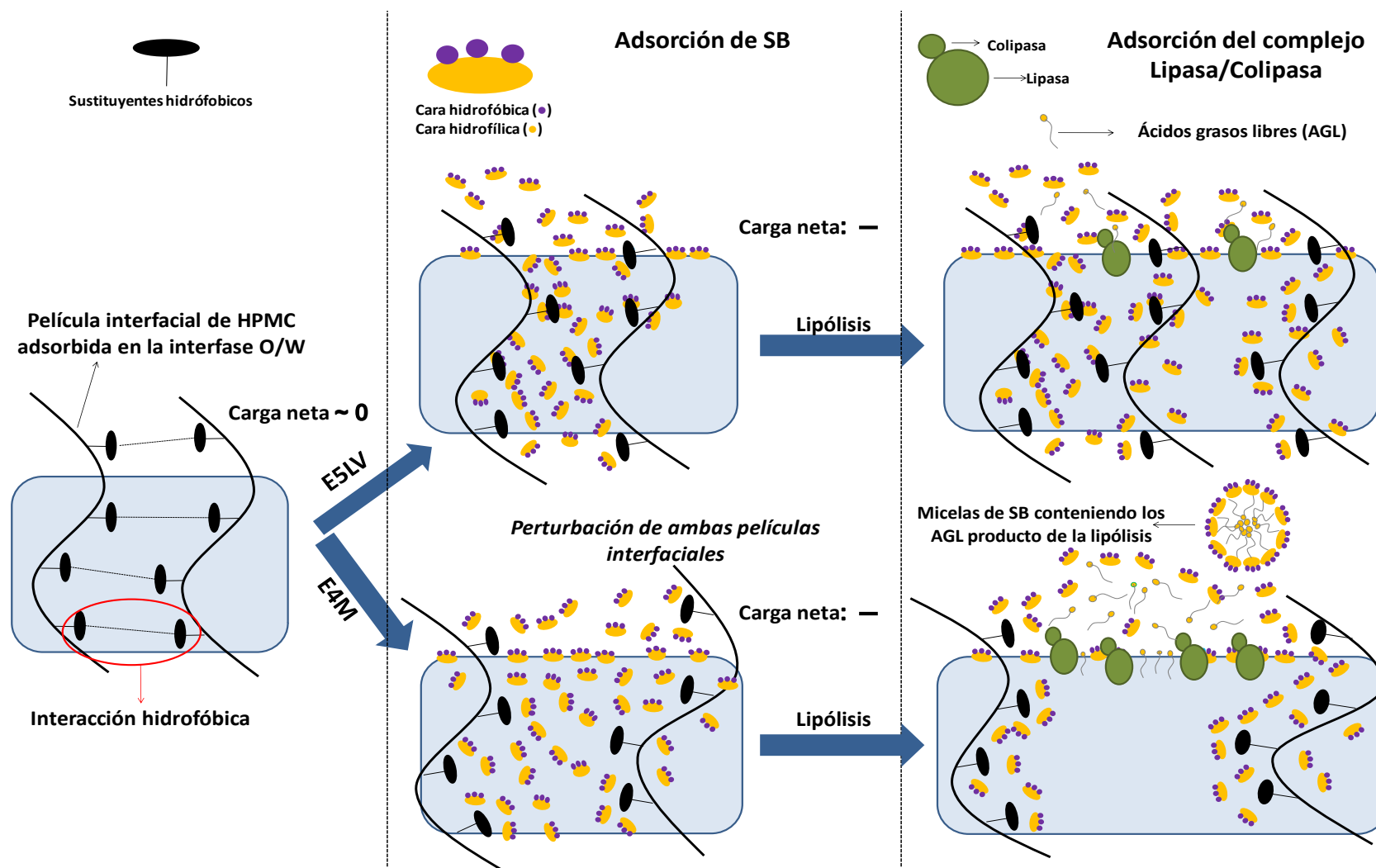


Figura IV.12. Representación esquemática del modelo propuesto: Las SB producen mayor desarreglo en E4M aumentando los sitios disponibles para la adsorción de la lipasa en mayor medida que en E5LV, lo que resulta en un mayor grado de lipólisis.

VI.8. Referencias

- Berthold, A., Schubert, H., Brandes, N., Kroh, L. y Miller, R. (2007). Behaviour of BSA and of BSA-derivatives at the air/water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 301(1-3), 16-22.
- Beysseriat, M., Decker, E. A. y McClements, D. J. (2006). Preliminary study of the influence of dietary fiber on the properties of oil-in-water emulsions passing through an in vitro human digestion model. *Food Hydrocolloids*, 20(6), 800-809.
- Camino, N. A., Pérez, O. E. y Pilosof, A. M. R. (2009). Molecular and functional modification of hydroxypropylmethylcellulose by high-intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*, 23(4), 1089-1095.
- Camino, N. A., Pérez, O. E., Sanchez, C. C., Rodriguez Patino, J. M. y Pilosof, A. M. R. (2009). Hydroxypropylmethylcellulose surface activity at equilibrium and adsorption dynamics at the air–water and oil–water interfaces. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2359-2368.
- Camino, N. A. y Pilosof, A. M. R. (2011). Hydroxypropylmethylcellulose at the oil–water interface. Part II. Submicron-emulsions as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1051-1062.
- Chang, S. A. y Gray, D. G. (1978). The surface tension of aqueous hydroxypropyl cellulose solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 67(2), 255-265.
- Chu, B.-S., Rich, G. T., Ridout, M. J., Faulks, R. M., Wickham, M. S. J. y Wilde, P. J. (2009). Modulating pancreatic lipase activity with galactolipids: effects of emulsion interfacial composition. *Langmuir*, 25(16), 9352-9360.
- Daniels, R. y Barta, A. (1994). Pharmacopoeial cellulose ethers as oilin- water emulsifiers. I. Interfacial properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 40, 128–133.
- Fathi, M., Martín, Á. y McClements, D. J. (2014). Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 39(1), 18-39.
- Funami, T., Kataoka, Y., Hiroe, M., Asai, I., Takahashi, R. y Nishinari, K. (2007). Thermal aggregation of methylcellulose with different molecular weights. *Food Hydrocolloids*, 21(1), 46-58.
- Gunness, P., Flanagan, B. M., Mata, J. P., Gilbert, E. P. y Gidley, M. J. (2016). Molecular interactions of a model bile salt and porcine bile with (1,3:1,4)-beta-glucans and arabinoxylans probed by ¹³C NMR and SAXS. *Food Chem*, 197(Pt A), 676-685.
- Hlebowicz, J., Hlebowicz, A., Lindstedt, S., Bjorgell, O., Hoglund, P., Holst, J. J., Darwiche, G. y Almer, L. O. (2009). Effects of 1 and 3 g cinnamon on gastric emptying, satiety, and postprandial blood glucose, insulin, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, glucagon-like peptide 1, and ghrelin concentrations in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*, 89(3), 815-821.
- Jódar-Reyes, A. B., Torcello-Gómez, A., Wulff-Pérez, M., Gálvez-Ruiz, M. J. y Martín-Rodríguez, A. (2010). Different stability regimes of oil-in-water emulsions in the presence of bile salts. *Food Research International*, 43(6), 1634-1641.
- Kato, Yokoyama, M. y Takahashi, A. (1978). Melting temperatures of thermally reversible gels IV. Methyl cellulose-water gels. *Colloid and Polymer Science*, 256(1), 15–21.
- Kim, H., Turowski, M., Anderson, W. H., Young, S. A., Kim, Y. y Yokoyama, W. (2011). Supplementation of hydroxypropyl methylcellulose into yeast leavened all-whole grain barley bread potentiates cholesterol-lowering effect. *J Agric Food Chem*, 59(14), 7672-7678.
- Kobayashi, K., Huang, C.-i. y Lodge, T. P. (1999). Thermoreversible Gelation of Aqueous Methylcellulose Solutions. *Macromolecules*, 32(21), 7070-7077.

- Lesmes, U., Baudot, P. y McClements, D. J. (2010). Impact of interfacial composition on physical stability and in vitro lipase digestibility of triacylglycerol oil droplets coated with lactoferrin and/or caseinate *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 7962-7969.
- Li, Y. y McClements, D. J. (2011). Inhibition of lipase-catalyzed hydrolysis of emulsified triglyceride oils by low-molecular weight surfactants under simulated gastrointestinal conditions. *Eur J Pharm Biopharm*, 79(2), 423-431.
- Loning, J., Horst, C. y Hoffmann, U. (2002). Investigation on the energy conversion in sonochemical processes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 9, 169-179.
- Madenci, D. y Egelhaaf, S. U. (2010). Self-assembly in aqueous bile salt solutions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1-2), 109-115.
- Maki, K. C., Carson, M. L., Kerr Anderson, W. H., Geohas, J., Reeves, M. S., Farmer, M. V., Turowski, M., Miller, M., Kaden, V. N., Dicklin, M. R. y Rains, T. M. (2009). Lipid-altering effects of different formulations of hydroxypropylmethylcellulose. *J Clin Lipidol*, 3(3), 159-166.
- Maki, K. C., Davidson, M. H., Torri, S., Ingram, K. A., O'Mullane, J., Daggy, B. P. y Albrecht, H. H. (2000). High-molecular-weight hydroxypropylmethylcellulose taken with or between meals is hypocholesterolemic in adult men. *J Nutr*, 130(7), 1705-1710.
- Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P., Macierzanka, A. y Mackie, A. (2011). The role of bile salts in digestion. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 36-46.
- McClements, D. J. (2010). Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. *Annu Rev Food Sci Technol*, 1, 241-269.
- McClements, D. J. (2014). Nanoparticle- and Microparticle-based Delivery Systems: Encapsulation, Protection and Release of Active Compounds. In 1 (Ed.). CRC Press.
- Moreno Esteban, B., Gargallo Fernández, M. y López de la Torre, M. (1997). *Diagnóstico y tratamiento en enfermedades metabólicas*: Díaz de Santos.
- Mun, S., Decker, E. A. y McClements, D. J. (2007). Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 40(6), 770-781.
- Mun, S., Kim, Y.-R., Shin, M. y McClements, D. J. (2015). Control of lipid digestion and nutraceutical bioaccessibility using starch-based filled hydrogels: Influence of starch and surfactant type. *Food Hydrocolloids*, 44, 380-389.
- Naslund, E., Gutniak, M., Skogar, S., Rossner, S. y Hellstrom, P. M. (1998). Glucagon-like peptide 1 increases the period of postprandial satiety and slows gastric emptying in obese men. *Am J Clin Nutr*, 68(3), 525-530.
- Pérez, O. (2005). *Funcionalidad de proteínas alimentarias: modificaciones inducidas por la aplicación de campos eléctricos pulsantes y por interacción con polisacáridos*. Buenos Aires, Argentina.
- Pérez, O. E., Sánchez, C. C., Pilosof, A. M. R. y Rodríguez Patino, J. M. (2008). Dynamics of adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 22(3), 387-402.
- Pilosof, A. M. R. (2016). Potential impact of interfacial composition of proteins and polysaccharides stabilized emulsions on the modulation of lipolysis. The role of bile salts. *Food Hydrocolloids*.
- Pilosof, A. M. R., Boquet, R. y Bartholomai, G. B. (1985). Kinetics of water uptake by food powders. *J of Food Science*, 50(1), 278-279.
- Reppas, C., Swidan, S. Z., Tobey, S. W., Turowski, M. y Dressman, J. B. (2009). Hydroxypropylmethylcellulose significantly lowers blood cholesterol in mildly hypercholesterolemic human subjects. *Eur J Clin Nutr*, 63(1), 71-77.
- Rodríguez Patino, J. M. y Pilosof, A. M. R. (2011). Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1925-1937.

- Roy, A., Kundu, N., Banik, D., Kuchlyan, J. y Sarkar, N. (2015). How does bile salt penetration affect the self-assembled architecture of pluronic P123 micelles? - light scattering and spectroscopic investigations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(30), 19977-19990.
- Sarkar, A., Horne, D. S. y Singh, H. (2010). Interactions of milk protein-stabilized oil-in-water emulsions with bile salts in a simulated upper intestinal model. *Food Hydrocolloids*, 24, 142-151.
- Sarkar, A., Ye, A. y Singh, H. (2016). On the role of bile salts in the digestion of emulsified lipids. *Food Hydrocolloids*, 60, 77-84.
- Sarkar, N. (1979). Thermal gelation properties of methyl and hydroxypropyl methylcellulose. *Journal of Applied Polymer Science*, 24(4), 1073-1087,.
- Sarkar, N. y Walker, L. C. (1995). Hydration—dehydration properties of methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose. *Carbohydrate Polymers*, 27(3), 177-185.
- Torcello-Gomez, A., Fernandez Fraguas, C., Ridout, M. J., Woodward, N. C., Wilde, P. J. y Foster, T. J. (2015). Effect of substituent pattern and molecular weight of cellulose ethers on interactions with different bile salts. *Food Funct*, 6(3), 730-739.
- Torcello-Gómez, A. y Foster, T. J. (2014). Interactions between cellulose ethers and a bile salt in the control of lipid digestion of lipid-based systems. *Carbohydrate Polymers*, 113, 53-61.
- Torcello-Gómez, A., Maldonado-Valderrama, J., Martín-Rodríguez, A. y McClements, D. J. (2011). Physicochemical properties and digestibility of emulsified lipids in simulated intestinal fluids: influence of interfacial characteristics. *Soft Matter*, 7(13), 6167-6177.
- Verde, A. V. y Frenkel, D. (2010). Simulation study of micelle formation by bile salts. *Soft Matter*, 6(16), 3815-3825.
- Warren, D. B., Chalmers, D. K., Hutchison, K., FDang, W. y Pouton, C. W. (2006). Molecular dynamics simulations of spontaneous bile salt aggregation. *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects*, 280(1), 182-193.
- Ye, A., Cui, J. y Singh, H. (2010). Effect of the fat globule membrane on in vitro digestion of milk fat globules with pancreatic lipase. *International Dairy Journal*, 20(12), 822-829.
- Yokoyama, W., Anderson, W. H., Albers, D. R., Hong, Y. J., Langhorst, M. L., Hung, S. C., Lin, J. T. y Young, S. A. (2011). Dietary hydroxypropyl methylcellulose increases excretion of saturated and trans fats by hamsters fed fast food diets. *J Agric Food Chem*, 59(20), 11249-11254.
- Yuguchi, Y., Urakawa, H., Kitamura, S., Ohno, S. y Kajiwara, K. (1995). Gelation mechanism of methylhydroxypropylcellulose in aqueous solution. *Food Hydrocolloids*, 9(3), 173-179.

CONCLUSIONES

1. Conclusiones generales

Los resultados de la presente tesis demostraron que tanto la velocidad como el grado de lipólisis de las emulsiones obtenidos durante la digestión gastroduodenal *in vitro*, dependen del tipo de emulsionante adsorbido, siendo las emulsiones estabilizadas por β lg las que mostraron mucho mayor grado de lipólisis, seguidas por las de E5LV y finalmente por las de SPI, que dieron lugar a un grado de lipólisis similar al de HPMC (Capítulo I).

Además, se comprobó que la velocidad inicial a la cual se desarrolla la lipólisis está relacionada con el área interfacial inicial de las emulsiones, pero no así la extensión del proceso que dependería de otros factores que no involucran al área interfacial ni a las propiedades reológicas de las películas.

Los factores investigados, moduladores del proceso de lipólisis, tienen que ver con el rol de las SB ya sea en: (a) La etapa de adsorción interfacial de estas moléculas para facilitar la adsorción del complejo lipasa/colipasa, o bien, (b) La etapa de desorción y transporte en forma de micelas de los productos de la lipólisis, inhibitorios de la actividad de la lipasa pancreática. Estas micelas de SB a continuación liberan los componentes solubilizados en los enterocitos para luego transitar por el remanente del intestino delgado y grueso donde son reabsorbidas. Por lo tanto, si este mecanismo falla o es lento funcionará como una autorregulación de la lipólisis.

Con respecto a la etapa (a), los estudios de co-adsorción o adsorción secuencial de las SB en cada película interfacial indicaron que en las condiciones de estudio, donde todos los emulsionantes son capaces de saturar la interfase O/W, las SB si bien penetran y desorganizan las películas no producen una desorción (al menos total) de los emulsionantes. Entre las proteínas estudiadas, las de soja fueron menos desplazadas por las SB, y a su vez presentaron mayor compatibilidad interfacial con las mismas (Capítulo III). La HPMC también presentó un alto grado de interacción con las SB, dado que si bien las películas fueron penetradas y desorganizadas estructuralmente, la celulosa permanece en la interfase, siendo capaz de apantallar la carga aportada por las SB (Capítulos III y IV). Además, en el Capítulo IV se observó que la lipólisis fue favorecida al disminuir la hidrofobicidad de la HPMC (menor relación metilos/hidroxipropilos).

Con respecto a la etapa (b), los estudios de digestión interfacial aportan información relevante con respecto a las diferentes habilidades de los emulsionantes para impedir la desorción de los productos de la lipólisis. Se observó que las películas de SPI y HPMC representan un mayor impedimento que la película de β lg (Capítulo II). Esto sugiere que tanto SPI como HPMC, podrían estar interaccionando en la interfase con las SB, de forma tal de disminuir su disponibilidad para desorber y transportar los productos de lipólisis, promoviendo la acumulación interfacial de los mismos y por ende la disminución o retardo del proceso de lipólisis.

Muy recientemente Sarkar, Ye y Singh (2016) demostraron el rol que juegan las SB en el proceso de desorción de los productos inhibitorios de la lipasa, al observar que tras la incorporación de SB a diferentes emulsiones, se incrementa en gran medida tanto la velocidad como la extensión de la lipólisis, en comparación con sistemas emulsionados por las SB. En otras palabras, cuando las SB se encuentran en el medio acuoso “libres” están disponibles para la remoción de los ácidos grasos generados, lo que favorece la actividad de la lipasa.

En la literatura existen algunos antecedentes que apoyan las interpretaciones obtenidas en la presente tesis. Por ejemplo, Anderson, Johnstone y Cook-Newell (1995) ya habían demostrado la capacidad de las proteínas de soja para reducir los niveles de colesterol en sangre tanto en humanos como en animales de laboratorios, indicándose que el mecanismo de acción de estas proteínas incluiría la disminución de la adsorción intestinal de las SB (Potter, 1998). Más tarde, Kahlon y Woodruff (2002), corroboraron que bajo condiciones de digestión duodenal *in vitro*, las proteínas de soja serían capaces de ligar ácidos biliares, lo que determinaría su potencial para disminuir los niveles de colesterol.

Experimentos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* sugieren que las SB también se unen a la fibra soluble (polisacáridos no digeribles) previniendo su readsorción (Gunnness y Gidley, 2010) e induciendo la síntesis de SB a partir del colesterol en sangre a fin de restaurar la fracción perdida. Este es uno de los mecanismos más aceptados para explicar la reducción del colesterol en sangre.

Chiappisi y Gradzielski (2015) indicaron que, en dietas suplementadas con quitosano, los niveles de colesterol bajos podrían estar asociados a la capacidad de este polisacárido para interaccionar con las SB.

Gunness, Flanagan, Mata, Gilbert y Gidley (2016) también mostraron que algunas fibras dietarias, como los glucanos o arabinoxilanos, interaccionan con las SB formando grandes agregados que reducen su disponibilidad. En particular Torcello-Gómez y Foster (2016), indicaron que la HPMC interacciona con las SB al evidenciar cambios en los termogramas de los polisacáridos obtenidos por calorimetría diferencial de barrido.

En concordancia con estos estudios, realizados en solución, en la presente tesis se ha comprobado que efectivamente estas interacciones ocurrirían también a nivel interfacial, constituyendo un mecanismo clave en la regulación de la lipólisis y asimilación de los lípidos. Algunos emulsionantes, como SPI y HPMC, serían capaces de impactar sobre la disponibilidad de las SB y por lo tanto presentan especial interés para el desarrollo de emulsiones donde se busca una inhibición o retardo de la lipólisis.

A pesar de no encontrarse una inhibición total de la lipólisis, la reducción de su extensión, resulta de crucial importancia. Actualmente se considera que la velocidad a la cual los ácidos grasos son absorbidos (niveles postprandiales de triglicéridos) resulta de importancia para la salud ya que altos niveles están asociados con la activación de reacciones inflamatorias reconocidas como factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares y diabetes (Singh y Ye, 2013).

Por último, se requieren estudios *in vivo* para apoyar las conclusiones obtenidas a partir de modelos de digestión *in vitro*, por medio de los cuales no es posible simular la complejidad real de los procesos fisiológicos que se producen en el tracto digestivo humano.

2. Referencias

- Anderson, J. W., Johnstone, B. M. y Cook-Newell, M. E. (1995). Meta-Analysis of the Effects of Soy Protein Intake on Serum Lipids. *New England Journal of Medicine*, 333(5), 276-282.
- Chiappisi, L. y Gradzielski, M. (2015). Co-assembly in chitosan–surfactant mixtures: thermodynamics, structures, interfacial properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 220, 92-107.
- Gunness, P., Flanagan, B. M., Mata, J. P., Gilbert, E. P. y Gidley, M. J. (2016). Molecular interactions of a model bile salt and porcine bile with (1,3:1,4)- β -glucans and arabinoxylans probed by ^{13}C NMR and SAXS. *Food Chemistry*, 197, Part A, 676-685.
- Gunness, P. y Gidley, M. J. (2010). Mechanisms underlying the cholesterol-lowering properties of soluble dietary fibre polysaccharides. *Food Funct*, 1(2), 149-155.
- Kahlon, T. S. y Woodruff, C. L. (2002). In vitro binding of bile acids by soy protein, pinto beans, black beans and wheat gluten. *Food Chemistry*, 79(4), 425-429.
- Potter, S. M. (1998). Soy protein and cardiovascular disease: the impact of bioactive components in soy. *Nutr Rev*, 56(8), 231-235.
- Sarkar, A., Ye, A. y Singh, H. (2016). On the role of bile salts in the digestion of emulsified lipids. *Food Hydrocolloids*, 60, 77-84.
- Singh, H. y Ye, A. (2013). Structural and biochemical factors affecting the digestion of protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(4), 360-370.
- Torcello-Gómez, A. y Foster, T. J. (2016). Influence of interfacial and bulk properties of cellulose ethers on lipolysis of oil-in-water emulsions. *Carbohydr Polym*, 144, 495-503.