



ALIMENTS FUNCIONALS:


*Estudi d'emulsions
enriquides amb β -carotè*

PSEUDÒNIM: Pi

*“Que el menjar sigui el teu aliment,
i el teu aliment la teva medicina.”*

Hipòcrates

AGRAÏMENTS

A large, empty rectangular box with a thin black border, intended for the user to write their acknowledgments. The box is currently blank.

ÍNDEX

RESUM	6
INTRODUCCIÓ	8
1. Aliments.....	8
1.1. Definició	8
1.2. Classificació dels aliments.....	9
1.2.1. Piràmide dels aliments	9
1.2.2. Classificació segons la composició.....	11
1.2.3. Classificació segons la funció	12
1.2.4. Classificació segons la varietat de nutrients que contenen	12
1.3. Composició dels aliments	13
1.3.1. Nutrients.....	13
1.3.2. Components bioactius.....	15
2. Aliments funcionals.....	22
2.1. Utilitat dels aliments funcionals.....	26
3. Nanotecnologia	31
3.1. Definició	31
3.2. Aplicació en diferents àrees.....	31
3.3. Nanoemulsions.....	33
3.3.1. Definició	33
3.3.2. Composició de les nanoemulsions.....	37
3.3.3. Mètodes d'obtenció de les nanoemulsions	40
3.3.4. Utilitat de les nanoemulsions	42
OBJECTIUS.....	43
MATERIAL I MÈTODES.....	44
1. Material	44

2. Mètodes	48
2.1. Preparació d'emulsions	48
2.1.1. Preparació de l'oli enriquit.....	48
2.1.2. Preparació de les emulsions convencionals	50
2.1.3. Formació de les nanoemulsions	52
2.2. Caracterització fisicoquímica de les emulsions.....	54
2.2.1. Mida de partícula.....	54
2.2.2. Potencial Zeta	56
2.2.3. Índex de blancor.....	57
2.3. Estabilitat de les emulsions	59
2.3.1. Estabilitat física de les emulsions	59
2.3.2. Estabilitat del color	59
2.3.3. Contingut de component bioactiu.....	60
RESULTATS I DISCUSSIÓ	62
1. Caracterització fisicoquímica de les emulsions	62
1.1. Mida de partícula	62
1.2. Potencial Zeta	66
1.3. Índex de blancor	67
2. Estabilitat de les emulsions.....	69
2.1. Estabilitat física de les emulsions	69
2.2. Estabilitat del component bioactiu	72
2.2.1. Estabilitat del color	72
2.2.2. Contingut de component bioactiu.....	74
CONCLUSIONS	76
PROPOSTES DE MILLORA.....	78
BIBLIOGRAFIA	80
ANNEXOS.....	83

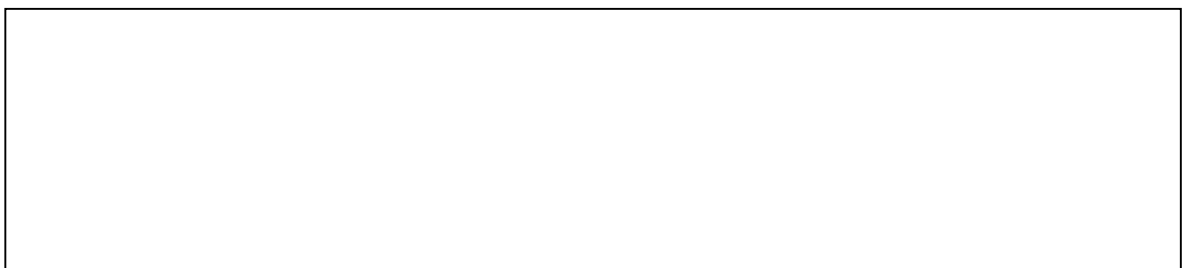
Resum

Aquest treball tracta sobre l'aplicació de la nanotecnologia per tal d'obtenir millors resultats en l'estabilitat d'emulsions que posteriorment seran utilitzades per realitzar aliments funcionals. Tot i que, a nivell general aquest tema no és molt conegut, sí que cada cop es troben més aliments d'aquest tipus en el mercat.

En un principi, el meu coneixement sobre els aliments funcionals i com es realitzaven, els seus beneficis o la polèmica que pot sorgir envers la necessitat de consumir-ne era quasi nul. Tot i així, era conscient de que hi havien aliments en el mercat que podien reduir el colesterol, per exemple, però no sabia el perquè.

La idea de realitzar aquest projecte va venir primerament per la meua inquietud per aprofundir en els meus coneixements sobre alimentació i nutrició. Aquesta curiositat va fer-me investigar i buscar informació sobre com els aliments poden afectar en la nostra salut. D'aquesta manera vaig descobrir que hi havien un tipus d'aliments, anomenats aliments funcionals, que posseïen un efecte beneficiós sobre l'organisme, més allà dels efectes nutricionals habituals, sent això rellevant per a la millora de la salut i benestar i/o la reducció del risc d'emmalaltir.

Com que crec que el tema de la salut humana relacionat amb l'alimentació és un tema important avui en dia i que ens afecta a tots vaig decidir triar-lo pel meu treball. A més, el fet de que la investigació sobre l'estabilitat d'emulsions enriquides amb components bioactius sigui un treball majoritàriament pràctic amb la realització d'un conjunt de processos de laboratori va cridar-me encara més l'atenció ja que sempre he tingut la curiositat de poder treballar en un.



Resum

Aquest seguit d'investigacions sobre l'enriquiment d'aliments i les seves conseqüents publicacions fan adonar-nos que aquests processos a seguir en el laboratori no són gens fàcils però que són necessaris per tal d'aportar una millora en la salut de la persona que ingereix aquests aliments. Tot i que crec que la ingesta d'aquests aliments quasi sempre comporta un benefici per l'organisme, penso que s'hauria de donar més informació sobre el tema a la població per a que els consumidors coneguin en quins casos és oportú consumir aliments funcionals.

Per això crec que el meu treball si més no, encara que sigui una petita part d'una via d'investigació d'aquest grup, podria aportar informació rellevant sobre aquest tema, mitjançant les dades obtingudes després de la realització del procés.

L'estudi s'ha centrat en el component bioactiu anomenat β -carotè. Aquest fitoquímic es troba dins del grup dels carotenoides, que podem trobar en vegetals i fruites de color groc, taronja fosc o verd intens. Concretament, β -carotè s'obté de la pastanaga, el mango o la papaia. Aquest té un efecte beneficiós sobre l'organisme ja que juntament amb la vitamina A, evita que les cèl·lules malignes puguin estendre ràpidament i per tant, són molt útils pels càncers, especialment pel càncer d'estomac i de pulmó.

L'objectiu principal d'aquest treball és elaborar diferents tipus de nanoemulsions i emulsions convencionals enriquides amb β -carotè i observar els beneficis que té l'ús de la nanotecnologia en la incorporació d'aquest component bioactiu en aliments.

El treball consta de dues parts: una part teòrica (introducció) realitzada per tal de conèixer i aprofundir sobre el tema del que s'investiga, i una part pràctica on s'esmenten tots els materials utilitzats i s'expliquen tots els mètodes que s'han seguit en el procés. A continuació s'expressen els resultats i les corresponents discussions, les conclusions d'acord amb els objectius marcats i es proposen possibilitats de millora del treball un cop ja valorat i acabat. Finalment s'exposen la bibliografia i els annexos.

Introducció

1. Aliments

1.1. Definició

Un **aliment** és una mescla complexa de substàncies, la majoria de les quals tenen valor nutritiu i realitzen unes funcions específiques en l'organisme humà.

El procés pel qual els éssers vius consumim diferents tipus d'aliments per obtenir nutrients necessaris per sobreviure i per realitzar totes les activitats necessàries del dia a dia és anomenat **alimentació**.

Les persones necessitem aportar al nostre cos tots els **nutrients** a través de la ingesta d'una alimentació equilibrada per tal de seguir una dieta sense carències nutritives ni desequilibris calòrics que poden produir alteracions en la salut.

Per a que la nostra alimentació sigui equilibrada, s'ha de basar en 3 principis bàsics:

- Cobrir les necessitats calòriques de l'organisme: les calories necessàries depenen de la composició corporal, de l'edat, del sexe i del grau d'activitat física. Les dietes normals de mitjana oscil·len entre les 2.000 i 3.000 kcal/dia i en tots els casos una dieta inferior a les 1.200 kcal/dia pot ser perillosa per la salut.
- Aportar els requeriments nutricionals: les quantitats de nutrients han d'estar equilibrades entre sí i han de correspondre a unes determinades proporcions respecte de l'aportació calòrica (50-60% d'hidrats de carboni, 30-35% de greixos i 10-15% de proteïnes).
- Seguir una alimentació variada: la dieta ha d'incloure aliments de tots els grups alimentaris.

1.2. Classificació dels aliments

Els aliments es poden classificar en funció de la freqüència que s'han de consumir, de la seva funció en el nostre organisme, de la seva composició o de la varietat de nutrients que contenen.

Les diferents classificacions ens poden ajudar a l'hora per tal de seguir una dieta equilibrada.

1.2.1. Piràmide dels aliments

La piràmide de l'alimentació saludable (Figura 1) es basa en els coneixements científics més actuals sobre nutrició i el seu objectiu és mostrar-los d'una manera senzilla per tal de que tots puguem incorporar una ingesta saludable a la nostra vida quotidiana.

La seva forma triangular ens indica la freqüència amb què s'han de consumir els diferents tipus d'aliments. En la base trobem els que hem de consumir en més freqüència mentre que a mesura que anem pujant en la piràmide, s'ha d'anar reduint la ingesta.



Figura 1. Piràmide dels aliments (Font: Agència de Salut Pública de Catalunya (ASPCAT))

Dins del triangle trobem tres grups d'aliments:

Aliments de consum diari:

- Farinacis: 4-6 racions diàries
- Fruites fresques: 3 racions diàries
- Hortalisses i verdures: 2 racions diàries
- Oli d'oliva: 3-6 racions diàries
- Làctics: 2-3 racions diàries

Aliments de consum setmanal:

- Carn magra: 3-4 racions setmanals
- Peix: 3-4 racions setmanals
- Ous: 3-4 racions setmanals
- Llegums: 2-4 racions setmanals
- Fruita seca: 3-7 racions setmanals

Aliments de consum ocasional:

Són aliments que tenen un alt contingut de sucre, sal i/o greixos saturats i per això se'n recomana reduir el consum.

Alguns exemples d'aquests aliments són begudes ensucrades, sucs, embotits, carns grasses, patates xips, snacks fregits, lllaminadures, galetes, brioixeria, etc.

En la piràmide també es recomana el consum de l'aigua com la beguda diària ja que aquesta és la beguda bàsica i vital i deixar la resta de begudes com begudes ocasionals i un estil de vida actiu.

1.2.2. Classificació segons la composició

La roda dels aliments (Figura 2) és un recurs didàctic en què es representen els tipus d'aliments segons els seus nutrients.



Figura 2. Roda dels aliments (Font: <http://blocs.xtec.cat/lesreceptesdelamarinailatietamontse/la-roda-dels-aliments/>)

- Grup I: Predominen els glúcids (Derivats dels cereals, patates i sucre)
- Grup II: Predominen els lípids (Mantega, oli i greixos en general)
- Grup III: Predominen les proteïnes i el calci (Llet i derivats)
- Grup IV: Predominen les proteïnes (Productes càrnics, ous, peix, llegums i fruits secs)
- Grup V: Predominen les vitamines i els elements minerals (Verdures i hortalisses)
- Grup VI: Predominen les vitamines i els elements minerals (Fruites fresques)

1.2.3. Classificació segons la funció

Segons la funció que realitzen els aliments en el nostre cos, podem trobar la següent classificació, que també podem relacionar amb la roda dels aliments (Figura 2), ja que en aquesta es troben aquests grups separats en colors:

- **Aliments plàstics o formadors:** són els aliments que aporten en la formació de l'estructura i per tant, són necessaris pel creixement i per la reparació de teixits i òrgans.
Són bàsicament les **proteïnes** que podem trobar, per exemple, en carn, ous i peix. Corresponen als grups III i IV de la roda d'aliments (grup vermell)
- **Aliments energètics:** Són els que aporten l'energia a l'organisme.
Aquest grup el formen els **hidrats de carboni**, per exemple, els farinacis i els **greixos**, per exemple, els olis. Corresponen als grups I i II de la roda d'aliments (grup groc).
- **Aliments reguladors:** Són els que ajuden a mantenir l'equilibri hidroelèctric, el pH, les reaccions enzimàtiques, la transmissió nerviosa, etc. Aquests aliments no aporten energia al cos.
Són fonamentalment **les vitamines i els minerals** que es corresponen als grups V i VI de la roda d'aliments (grup verd).

1.2.4. Classificació segons la varietat de nutrients que contenen

- **Aliments simples:** Formats per una sola substància alimentària. Per exemple, l'oli o el sucre.
- **Aliments compostos:** Formats per diferents substàncies alimentàries. Per exemple, el pa o la llet.

1.3. Composició dels aliments

Els aliments no només aporten nutrients al cos, sinó que també hi podem trobar substàncies que ens beneficien però que no són necessàries per a la salut humana. Així doncs, en els aliments, podem trobar nutrients i components bioactius.

1.3.1. Nutrients

Els nutrients són substàncies químiques que contenen els aliments i que necessita l'organisme per realitzar les funcions vitals tot i que el nombre de nutrients que podem utilitzar és limitat.

Les múltiples combinacions de nutrients donen lloc a una ampla varietat d'aliments.

Des del punt de vista energètic podem distingir dos grans grups de nutrients: els **energètics** (hidrats de carboni, greixos i proteïnes) i els **no energètics** (vitamines, minerals i aigua). (Taula 1)

Taula 1. Classificació dels nutrients (taula elaborada a partir de la informació de <http://blocs.xtec.cat/biologiamp/2010/09/13/classificacio-dels-nutrients/>)

	FUNCIÓ	APORTACIÓ D'ENERGIA	PERCENTATGE D'ENERGIA EN L'ORGANISME	FONTS PRINCIPALS
Hidrats de carbonis (Glúcids o Glícids)	Energètica	4 Kcal/g	50-60%	Cereals, lleguminoses i tubercles Remolatxa, canya de sucre Llet Closca de llavors Fruites i hortalisses
Greixos (Lípids)	Energètica	9 Kcal/g	30%	Llavors Fruits Aliments d'origen animal

Taula 1. Continuació

	FUNCIÓ	APORTACIÓ D'ENERGIA	PERCENTATGE D'ENERGIA EN L'ORGANISME	FONTS PRINCIPALS
Proteïnes	Energètica i plàstica	4 Kcal/g	10-15%	Ou, carn Lleguminoses, cereals Llet
Vitamines	Reguladora	No aporten energia	-	Llet i derivats Verdures i hortalisses Peix Llegums Carns Etc
Minerals	Reguladora i plàstica	No aporten energia	-	Quasi tots els aliments i begudes en contenen
Aigua	Plàstica i reguladora	No aporta energia	-	

Els hidrats de carboni, també coneguts com sucres, glúcids o glícids, són la principal font d'energia per al nostre organisme i la seva molècula està formada per tres elements: carboni (C), oxigen (O) i hidrogen (H). Segons la complexitat estructural els podem classificar en monosacàrids: glúcids senzills que no es poden dividir en altres; disacàrids: glúcids formats per la unió de dos monosacàrids mitjançant enllaços glicosídics; i polisacàrids: glúcids formats per la unió de molts monosacàrids.

Els greixos, també coneguts com a lípids, són els macronutrients, constituïts principalment per carboni (C) i hidrogen (H), que més energia proporcionen al cos i poden ser d'origen animal (els trobem en estat sòlid a temperatura ambient), o vegetal (líquids a temperatura ambient).

Les proteïnes són substàncies orgàniques constituïdes per carboni (C), hidrogen (H), oxigen (O) i nitrogen (N). Des del punt de vista químic, les proteïnes estan constituïdes per polímers de aminoàcids i depenent del nombre d'aquests, les cadenes són oligopèptids (menys de 10 aminoàcids), polipèptids (més de 10 aminoàcids), o proteïnes (més de 50 aminoàcids).

Cal destacar que l'organisme requereix poca quantitat de vitamines però són essencials ja que l'organisme no es capaç de sintetitzar-les (a excepció de la vitamina D). Els minerals comporten el 4% d'elements que formen el cos humà (l'altre 96% està format per C,H,O,N). Aquest 4% està constituït per 60 minerals, 21 dels quals són essencials per l'ésser humà.

1.3.2. Components bioactius

Els components bioactius són substàncies no nutritives que intervenen en el metabolisme secundari dels vegetals que no tenen una funció nutricional definida, o no son considerats essencials per a la salut humana, però que poden tenir un impacte significatiu en alguna malaltia. (Mendoza,1999)

Tot i que no se'ls pot considerar essencials per a la vida, són indispensables per a la salut ja que posseeixen un efecte protector del sistema cardíocirculatori, reductor de la pressió sanguínia, regulador de la glucèmia i la colesterolèmia, reductor del risc de càncer i que ajuda a millorar la resposta immunitària del cos.

S'estima que una dieta mixta pot arribar a contenir 60.000 – 100.000 components bioactius diferents que, aproximadament, són 1,5g/dia – 3,5g/dia.

Tot i que trobem un ampli repertori de components bioactius, podem classificar els més estudiats en 5 grups (Figura 3).

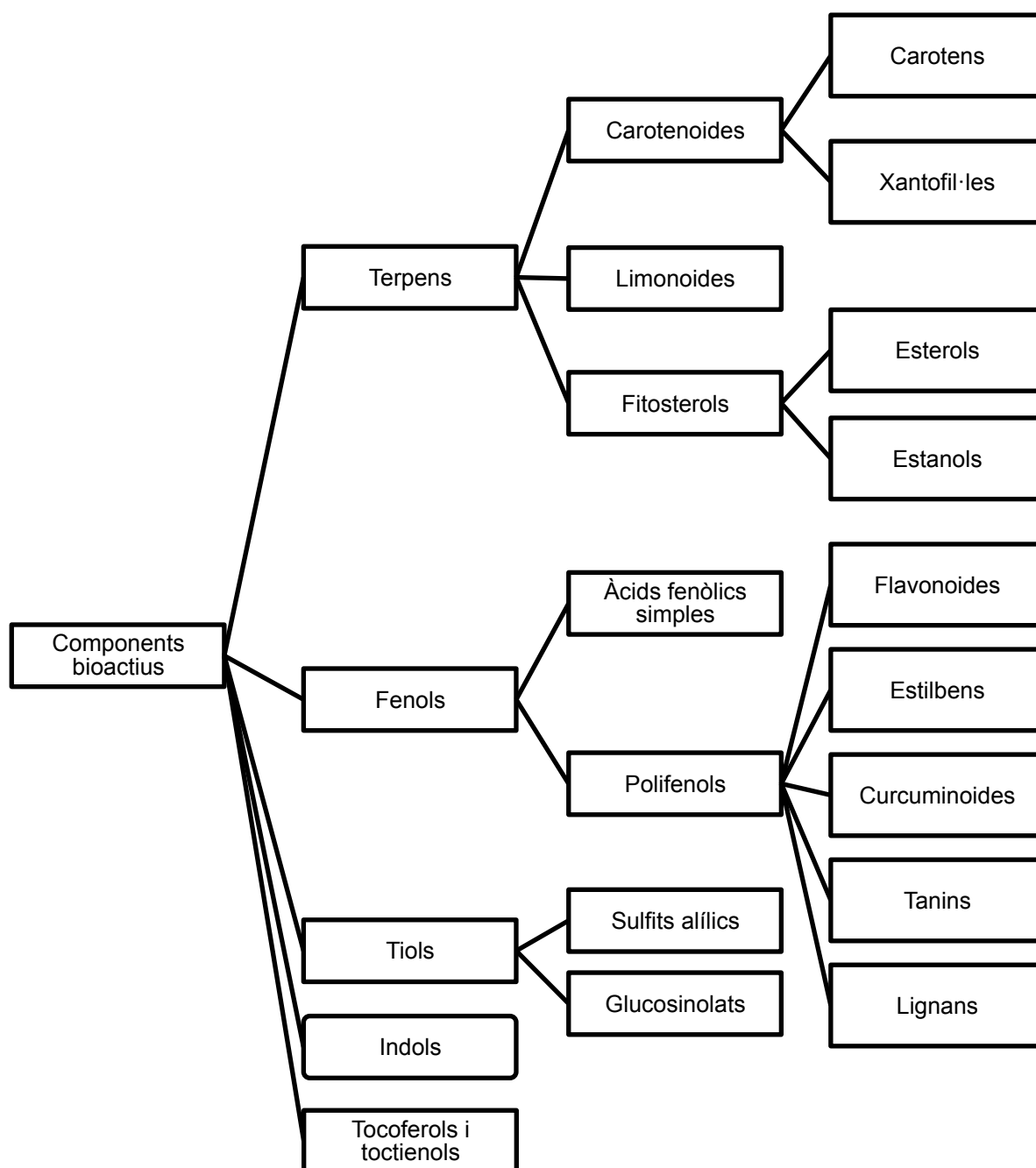


Figura 3. Classificació dels components bioactius (figura elaborada a partir de la informació de Álvarez i Bague, 2011; Mendoza,1999)

Terpens

Constitueixen una de les més àmplies classes d'aliments funcionals.

- Carotenoides: Els podem trobar en vegetals i fruites de color groc, taronja fosc o verd intens, tot i que també els podem trobar en certes espècies animals, com per exemple, en el rovell de l'ou. Actuen com antioxidants que protegeixen les membranes cel·lulars i també s'ha demostrat que són molt útils davant de determinades malalties com l'arteriosclerosi i també ajuden en la formació d'anticossos. Juntament amb la Vitamina A, els carotenoides eviten que les cèl·lules malignes puguin estendre ràpidament i per tant, són molt útils per disminuir l'aparició de malalties cròniques com el càncer.

Exemple: α - carotè(Figura 4)

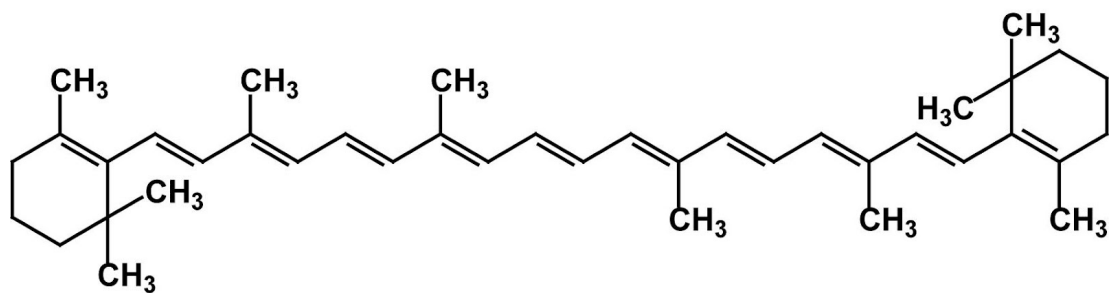


Figura 4 :Estructura de la molècula d' α - carotè

- Limonoides: Els podem trobar en cítrics i està específicament destinada a la protecció del teixit pulmonar.

Exemple: limonina (Figura 5)

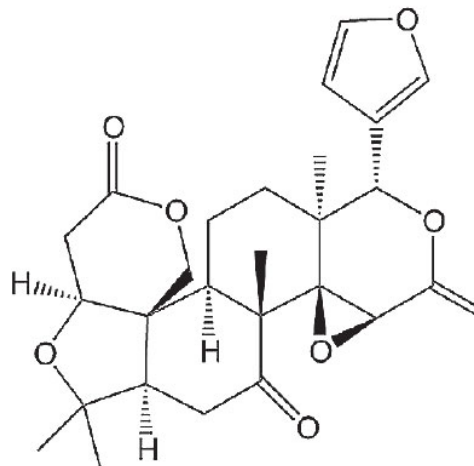


Figura 5 : Estructura de la molècula de limonina

- Fitosterols: Es troben en quasi totes les plantes tot i que només les llavors dels vegetals verds i grocs en contenen quantitats significants. Tenen la capacitat de reduir el colesterol ja que la seva estructura és molt similar però exerceixen un efecte contrari i prevenen del càncer de còlon.

Exemple: β -sitosterol (Figura 6)

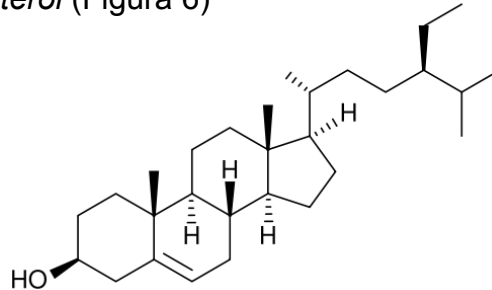


Figura 6: Estructura de la molècula de β -sitosterol

Fenols

- Àcids fenòlics simples: els trobem en cítrics, olives, fruites, hortalisses, avena, soja, fruits secs, vi, cervesa i en altres productes derivats dels vegetals. La seva activitat és principalment antioxidant.

Exemple: àcid gentísic(Figura 7)

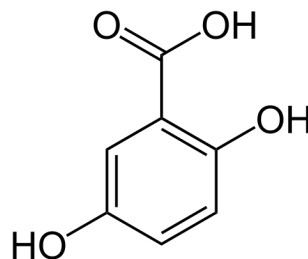


Figura 7: Estructura de la molècula d'àcid gentísic

- Polifenols: els aliments que més destaquen pel seu contingut en polifenols són el te, el vi i el cacau. La principal acció dels polifenols es deu a la seva capacitat antioxidant, fet que beneficia principalment al sistema cardiovascular. També presenten efectes antiinflamatoris.

Exemple: quercetina (Figura 8)

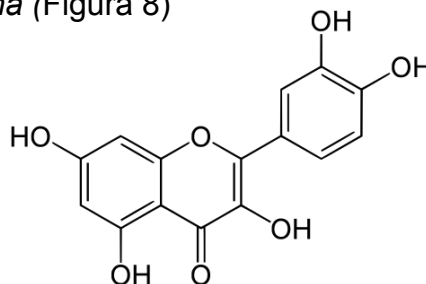


Figura 8: Estructura de la molècula de quercetina

Tiols

Aquest tipus de fitonutrients contenen sofre i es troben principalment en l'all i en vegetals de la família de les crucíferes.

- Sulfits al·lílics: els trobem en alls, cebes, porros i escalunyes principalment. Les seves propietats són bàsicament antimutagèniques i anticancerígenes, tot i que també ajuda en la prevenció del creixement de tumors, fongs, paràsits, colesterol i de factors d'adhesió de plaquetes i leucòcits. La funció d'activació dels sistemes enzimàtics de desintoxicació del fetge i el bloqueig de l'activitat de les toxines produïdes per bacteries i virus també en són característics d'aquest tipus de fitoquímics.

Exemple: al·licina (Figura 9)

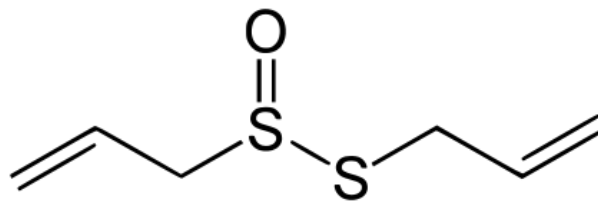


Figura 9: Estructura de la molècula d'al·licina

- Glucosinolats: Actuen activant enzims de destoxicació hepàtica i regulen les glòbuls blancs i les citocines. També bloquegen enzims que ajuden en el creixement de tumors en les glàndules mamaríes, el fetge, el còlon, els pulmons, l'estómac i l'esòfag.

Estructura general dels glucosinolats (Figura 10):

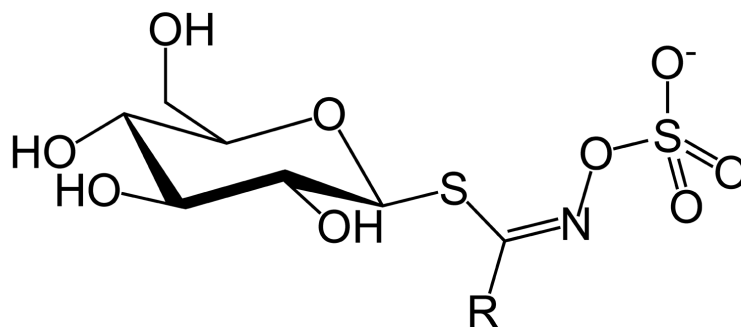


Figura 10: Estructura general dels glucosinolats

Indols

Són compostos nitrogenats que podem trobar en aliments com la col o altres vegetals de la família de les crucíferes. Aquest tipus de fitonutrients ajuden a prevenir els càncers de mama i de còlon principalment ja que s'uneixen als compostos cancerígens i activen els enzims desintoxicants.

Exemple: Indole-3-carboniol (Figura 11)

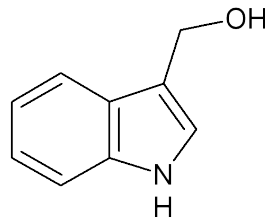


Figura 11: Estructura de la molècula d'Indole-3-carboniol

Tocoferols i tocotrienols

La **vitamina E**, entre altres compostos, agrupa els tocoferols i els tocotrienols.

Existeixen 4 tocoferols diferents que es diferencien en el nombre i posició dels grups metils que estan units a l'anell central de cromanol. L' α -tocoferol (Figura 12) es troba principalment en els cloroplasts de les cèl·lules vegetals mentre que els seus homòlegs es troben fora d'aquests. Per això, la vitamina E es localitza en una gran diversitat d'aliments, principalment vegetals, tot i que també podem trobar vitamina E en aliments d'origen animal com per exemple en el rovell d'ou.

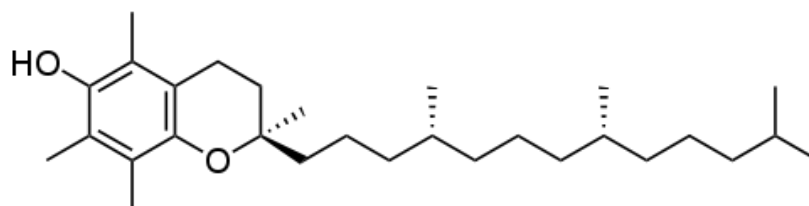


Figura 12: Estructura de la molècula d' α -tocoferol

La vitamina E actua com un antioxidant, eliminant els radicals lliures capaços de danyar les cèl·lules i el material genètic i prevenint malalties com l'arteriosclerosi o el càncer. També es troba implicada en el funcionament del sistema immunitari, la regulació de la expressió dels gens i molts altres processos metabòlics.

Biodisponibilitat dels components bioactius

Des del punt de vista nutricional, la **biodisponibilitat** fa referència a la proporció de dosis ingerida que s'excreta en l'orina, comparada amb l'excretada amb els excrements.

Es considera que el concepte de **biodisponibilitat** no es pot separar del de **bioactivitat** ja que qualsevol compost que és absorbit tindrà conseqüències metabòliques sobre l'organisme i per tant, serà bioactiu. Per tant, podem considerar que la biodisponibilitat incorpora bioaccessibilitat (disponibilitat per a l'absorció), absorció, distribució en l'organisme i bioactivitat.

La **biodisponibilitat** dels components bioactius és molt variada, ja que, per exemple, els antioxidants són fàcilment susceptibles a l'oxidació i això limita la seva estabilitat durant el procés d'emmagatzematge, processat o digestió.

Molts components bioactius, també anomenats fitoquímics, estan presents com precursors en els aliments, però han d'hidrolitzar-se per tal de poder ser absorbits. Per això, els sistemes enzimàtics que realitzen la hidròlisi poden condicionar la biodisponibilitat.

Mentre que els compostos fenòlics tenen major biodisponibilitat, ja que poden ser metabolitzats per la flora intestinal, els carotenoides són fàcilment oxidables degut a la presència d'un gran nombre d'insaturacions a la seva estructura. Només un 0,4 – 3,5% de la quantitat ingerida de fitoesterols són absorbits, malgrat la seva similitud amb el colesterol.

2. Aliments funcionals

El concepte d'**aliment funcional** va néixer al Japó durant la dècada de 1980 i gràcies a l'ajuda del govern d'aquest país es va començar a investigar i es va proposar el terme d'aliments saludables per a ús específic, en anglès "**Foods for SpecialHealthUse**" (FOSHU). Eren aliments processats que contenien ingredients que ajudaven en certes funcions específiques de l'organisme apart de ser nutritius i es podien classificar en tres categories:

- Aliments a base d'ingredients naturals.
- Aliments que han de consumir-se com a part de la dieta diària.
- Aliments, que al consumir-se, compleixen un paper específic en les funcions del cos humà com el millorament del mecanisme de defensa biològic, la prevenció o recuperació d'alguna malaltia específica, el control de les condicions físiques i mentals, i el retard en el procés d'envelliment.

L'expansió dels aliments funcionals va ser immediata, especialment als Estats Units, on ja són molt populars. Altres països on també els aliments funcionals es van posicionar ràpidament en el mercat van ser Canadà, Austràlia i Nova Zelanda. Respecte a Europa, els aliments funcionals van crear polèmica per falta d'una regulació.

Una de les principals problemàtiques dels aliments funcionals és la seva **definició** ja que no en té una de concreta. Fins ara la millor acceptada ha estat la del ILSI Europe (International Lyfe Sciences Institute in Europe) que estableix que un aliment pot ser considerat funcional si s'ha demostrat de manera satisfactòria que posseeix un **efecte beneficiós** sobre una o varies funcions específiques en l'organisme, més allà dels efectes nutricionals habituals, sent això rellevant per a la millora de la salut i benestar i/o la reducció del risc d'emmalaltir.

Introducció

També és important destacar que, els aliments funcionals, no deixen de ser aliments i per tant, no es consumiran en forma de medicament. Els resultats s'han de mostrar després d'haver ingerit l'aliment funcional en quantitats que poden ser normalment consumides en una dieta i per tant, aquest tipus d'aliments hauria de formar part d'una alimentació normal.

Segons el ILSI Europe, un aliment funcional pot ser:

- Un aliment natural.
Exemple: Peix blau (aliment amb un alt percentatge amb omega-3 que ajuda en la prevenció de malalties cardiovasculars).

- Un aliment al qual se li ha agregat o eliminat un component per mitjà d'alguna tecnologia o biotecnologia.
Exemple: Llet sense lactosa (redueix o elimina els símptomes de la intolerància a la lactosa).

- Un aliment en el qual la naturalesa d'un o més components s'ha modificat.
Exemple: Llet amb fitoesterols (ajuda a la disminució del colesterol en sang i per tant, redueix el risc a patir malalties cardiovasculars).

- Un aliment en el qual la biodisponibilitat d'un o més components ha estat modificada.
Exemple: Cereals reforçats amb fibra i minerals (ajuden a reduir el risc de càncer de colon, milloren la qualitat de la microflora intestinal, faciliten el transport d'oxigen en la sang i poden prevenir l'aparició d'anèmies).

- Qualsevol combinació de les anteriors possibilitats.

Els ingredients funcionals utilitzats en l'elaboració d'aquest aliments són (Taula 2):

Taula 2: Compostos funcionals, fonts alimentaries i les seves aplicacions (Font: Aranceta i Amarilla, 2011).

COMPOST	FONT ALIMENTARIA	APLICACIONS
Fenols, antocianidines i flavonoides	Cireres, pomes, api, te, raïm, baia, fonoll, col	Antioxidant, prevenció de colesterolèmia, càncer i envelliment cel·lular
Resveratrol	Vi negre, cacauets	Antioxidant, antimutagènic, reducció d'agregació plaquetària
Hidroxitiroso	Oli d'oliva verge	Antioxidant
Glucosinolats	Bròquil, col de Brussel·les	Anticancerigen
Compostos organosulfats	All, ceba, porro	Reducció de colesterol i C-LDL, anticancerigen
β-carotè	Pastanaga, mango, papaia	Provitamina A, prevenció de càncer i reforç immunològic
Licopè	Tomàquet, síndria	Prevenció de càncer de pròstata, antioxidant
Luteïna, zeaxantina	Espinacs, blat de moro, rovell de l'ou	Prevenció de la malaltia macular associada a l'edat, cataractes
Vitamina A	Fetge	Prevenció de ceguera nocturna i permanent, càncer i malalties cardiovasculars
Vitamina E	Nous, cacauets, ametlles, oli d'oliva	Prevenció de malalties cardiovasculars
Vitamina C	Cítrics, kiwi, pinya, bròquil	Poder antiviral, redueix el risc de càncer
Fibra dietètica insoluble	Gra integral, arròs, blat de moro, segó de blat, la majoria de fruites i hortalisses	Millora la salut intestinal, preveu de l'estrenyiment, les hemorroides i el càncer de còlon
Fibra dietètica soluble	Fruites, vegetals, avena i midó resistent	Prevenció de aterosclerosi, diabetis
Àcids grassos omega-3	Oli de peix, peix i llinosa	Prevenció de aterosclerosi i malalties cardiovasculars
DHA	Oli de peix i peix	Essencial pel funcionament i desenvolupament del cervell en fetus i nens. Disminueix el colesterol
EPA	Oli de peix i peix	Prevenció de malalties cardiovasculars
Probiòtics	logurt amb probiòtics, formatges fermentats	Millora la salut intestinal, prevenció de malalties diarreiques i millora la qualitat de la microbiota
Fitoestrògens	Soja	Prevenció de síndrome postmenopàusic, càncer de mama i osteoporosis
Fitoesterols	Nous, cacauets i ametlles	Prevenció de malalties cardiovasculars

Introducció

Podem trobar diferents tipus d'aliments funcionals, alguns exemples són aquest:

Taula 3: Alguns aliments funcionals i els possibles efectes sobre la salut(Font: Aranceta i Amarilla, 2011).

ALIMENT FUNCIONAL	COMPONENT	EFFECTES SOBRE LA SALUT
Llets enriquides	Àcid grassos omega-3	Redueixen el risc de malalties cardiovasculars, certs tipus de càncer i milloren el desenvolupament del teixit nerviós i les funcions visuals
	Àcid oleic	Ajuden a disminuir el risc de malalties cardiovasculars
	Àcid fòlic	Pot disminuir malformacions del tub neural i ajuda a reduir el risc de malalties cardiovasculars
	Calci	Ajuda al desenvolupament dels ossos i dents. Intervé en la transmissió nerviosa. Pot prevenir l'osteoporosi
	Vitamina A i D	Afavoreix la funció visual i l'absorció de calci
	Fòsfor i zinc	Ajuda al desenvolupament dels ossos i millora el sistema immunològic
	Fibra	Ajuda a reduir el càncer de còlon, millora la qualitat de la microflora intestinal
Llets infantils d'iniciació i continuació	Àcids grassos	Ajuda a millorar el desenvolupament de nens entre 0 i 3 anys
	Vitamines i minerals	Es poden consumir quan la lactància materna no es possible
Iogurts enriquits	Calci	Ajuda al desenvolupament dels ossos i dents. Intervé en la transmissió nerviosa. Pot prevenir l'osteoporosi
	Vitamina A i D	Afavoreix la funció visual i l'absorció de calci
	Probiòtics	Afavoreix el funcionament del sistema gastrointestinal, redueixen la incidència i la duració de les diarrees. Milloren la qualitat de la microflora intestinal
	Prebiòtics	Milloren la qualitat de la microflora intestinal
Suc enriquit	Vitamines i minerals	Vitamina A i D: Afavoreix la funció visual i l'absorció de calci. Calci: Ajuda al desenvolupament dels ossos i dents. Intervé en la transmissió nerviosa. Pot prevenir l'osteoporosi. Ferro: pot prevenir l'aparició d'anèmies.
Cereals fortificats	Fibra i minerals	Fibra: Ajuda a reduir el càncer de còlon, millora la qualitat de la microflora intestinal Ferro: pot prevenir l'aparició d'anèmies.
Pa enriquit	Àcid fòlic	Pot disminuir malformacions del tub neural i ajuda a reduir el risc de malalties cardiovasculars
Margarina enriquida	Fitoesterols	Ajuda a disminuir la concentració de colesterol en sang i el risc cardiovascular
Sal iodada	Iode	Ajuda a la funció de la tiroide, important en el desenvolupament físic i psíquic normal

El desenvolupament d'aliments funcionals està associat amb:

- La identificació i caracterització de fitonutrients, de la seva biodisponibilitat i dels efectes dels processament tecnològic.
- L'enteniment científic de com es modulen processos biològics involucrats en la salut.
- El descobriment i la validació de biomarcadors per ser utilitzats en l'avaluació d'aquests nous productes en proves clíniques i per determinar la seva seguretat i els possibles efectes beneficiosos sobre la salut.
- La identificació de poblacions en risc i amb possibilitat de obtenir beneficis d'aquests productes als consumir-los.

2.1. Utilitat dels aliments funcionals

Tot i que els aliments funcionals poden ser aplicats en àrees molt diverses, el ILSI ha establert prioritàries les següents en funció del benefici per la salut de la població (Aranceta i Amarilla, 2011):

Creixement i desenvolupament

En aquesta àrea es pretén estudiar les aplicacions dels aliments funcionals durant l'embaràs, el desenvolupament del fetus, la lactància i la infància.

En aquest grup es troben aliments preparats amb àcids grassos essencials, vitamines i minerals; làctics i begudes enriquides amb calci; cereals enriquits amb ferro i folats; làctics, mantegues i margarines enriquides amb vitamina A i D.

Introducció

Durant la infància i l'adolescència, els aliments funcionals poden ajudar a modular funcions relacionades amb el creixement com el desenvolupament esquelètic, el desenvolupament neural, creixement i composició corporal, funció immune o desenvolupament cognitiu i psicomotor.

També s'utilitzen per prevenir malalties que es poden manifestar en etapes posteriors ja que poden començar a desenvolupar-se abans d'acabar el creixement.

Regulació dels processos metabòlics

Dins d'aquest grup es realitzen estudis sobre els processos metabòlics influenciats pels aliments; l'aportació energètica en hidrats de carboni, greixos i proteïnes.

Algunes de les malalties amb rellevància en aquesta àrea són la diabetis tipus 2 i l'obesitat ja que els aliments que ajudin a controlar el pes, la glucèmia i els nivells de lípids en sang poder ser utilitzats per tal de complementar les recomanacions nutricionals en aquestes malalties.

En aquest grup trobem els aliments baixos en greixos i/o sucres, aliments per a diabètics, per a malalts amb problemes cardiovasculars i productes per a esportistes.

Defensa contra l'estrès oxidatiu

Els radicals lliures o les espècies reactives d'oxigen produeixen danys cel·lulars i estan implicades en les primeres fases de moltes malalties cròniques.

Els antioxidants són el ingredients funcionals més comunament utilitzats. Modulen l'acció dels radicals lliures, exercint una funció protectora. Per tant, els antioxidants redueixen el risc de desenvolupar malalties degeneratives i cròniques, com el càncer entre d'altres.

Fisiologia cardiovascular

Aquest grup es centra en els aliments capaços de modular el perfil lipídic, la hipertensió i els factors trombogènics. Per tant, els aliments estudiats en aquesta àrea són els que contenen fibra soluble, substàncies antioxidants, àcids grassos monoinsaturats i polisaturats, fitoesterols o aliments que redueixen el contingut d'àcids grassos saturats o trans.

Fisiologia digestiva

En aquesta àrea s'estudia els aliments funcionals destinats a millorar la funció intestinal, la formació d'excrements, la composició de la microbiota intestinal i el teixit limfoide associat a l'intestí, patologies com la intolerància a la lactosa, càncer de còlon o malalties intestinals cròniques. En aquest grup trobem els aliments làctics suplementats amb probiòtics i/o prebiòtics i fibra.

Rendiment cognitiu i mental

Es centra en estudiar l'apetit i la sacietat, el rendiment cognitiu, l'humor i el tractament de l'estrès. Els ingredients funcionals que s'utilitzen són la fibra, per la seva influència en l'apetit; la fenilalanina, per la depressió; i la lecitina i la colina, per l'aprenentatge.

Rendiment i millora de l'estat físic

Aquest grup es centra sobretot en la millora del nivell de desenvolupament en les activitats físiques esportives. Es fixen en els nutrients relacionats amb la retenció d'aigua, la regulació tèrmica, el rendiment físic i la postergació de la fatiga.

Tot i que el desenvolupament tecnològic dels aliments funcionals encara està en les seves fases inicials, cada vegada l'oferta és major. Els components més utilitzats per tal de ser integrats en aliments per fer-los funcionals són els antioxidants, la fibra, els fitoesterols, els carotenoides, els oligosacàrids, àcids grassos, àcid fòlic, minerals i microorganismes.

Alimentació saludable i alimentació funcional

La primera pregunta que ens ve al cap a l'hora de parlar d'alimentació funcional és si aquesta és realment compatible amb l'alimentació saludable (Aranceta i Amarilla, 2011).

Cal remarcar que, la dieta mediterrània ja compta amb alguns aliments funcionals tot i que aquests són del tipus d'aliments funcionals no modificat. Per això aquesta dieta no necessitaria ningun tipus d'aliment complementari funcional modificat ja que cobreix les necessitats nutritives. Tot i així, en els últims anys, la societat ha adoptat hàbits alimentaris poc saludables que han fet que la seva dieta sigui desequilibrada i la nutrició deficient.

Fent referència al que ja s'ha esmentat anteriorment, una alimentació saludable té un benefici sobre la salut i requereix el coneixement del conceptes que no tothom coneix. Per això, la gran pregunta que es planteja abans de treure al mercat un nou producte funcional és si el consumidor serà capaç de reconèixer la importància de llegir i entendre la informació nutricional de l'etiqueta.

Tot i que els aliments funcionals poden ajudar a mantenir una dieta variada a aquells consumidors que no ingereixen determinats aliments per raons organolèptiques o de preferència, no vol dir que els podin substituir completament ja que aquests poden no portar la mateixa quantitat de component que l'aliment substituït i per tant, crear una carència.

Exemple: El peix és una de les principals fonts d'omega-3 i es podria accedir a aquest mateix component mitjançant la llet enriquida però aquesta conté 34mg d'omega-3 per cada 100 ml de llet quan el consum recomanat és de 1,1 g/dia, per tant, la llet no seria suficient.

Encara que existeixen aliments funcionals que poden contenir la mateixa quantitat d'un component que l'aliment que estem substituint, existeix la possibilitat de que el consumidor deixi de seguir una dieta saludable justificant-se amb el consum d'aliments funcionals.

Exemple: No controlar la ingesta de colesterol justificant que es consumeix làctics amb fitoesterols.

És possible, també, que el consumidor confiï en que un aliment funcional li aportarà tota la quantitat de component bioactiu recomanada, ja que, aquest en porta més que l'aliment substituït però que això no sigui cert ja que no tots els aliments funcionals que porten més quantitat d'un component que un aliment convencional contenen la quantitat recomanada.

Exemple: Substituir la llet convencional, que conté el 38% del calci recomanat per consumir una llet enriquida que en conté el 50%. Tot i que aquesta llet conté més quantitat, no arriba a la recomanada.

Substituir un aliment saludable per un aliment suplementat amb ingredients funcionals, podria deixar fora de la dieta alguns components bioactius desconeguts que podrien ser també beneficiosos per la salut.

Un altra situació que es podria donar és quan el consumidor es fixa en els efectes beneficiosos d'un component bioactiu d'un aliment funcional deixant de banda els altres ingredients que aquest porta i que podrien ser contraproductius en altes quantitats.

Exemple: Galetes riques en fibra que estan orientades al control del pes però que estan elaborades amb altes quantitats de sucres, aportant així moltes calories.

En conclusió, els aliments funcionals, principalment els modificats, poden formar part d'una dieta saludable, complementant als aliments d'origen natural, però no n'és obligatori el consum. Tot i així, en una dieta saludable, els aliments funcionals d'origen natural sempre han tingut un paper important.

3. Nanotecnologia

3.1. Definició

És al 1959 quan per primer cop, Richard Feynman durant un discurs que va donar a Caltech, fa referència a la possibilitat de la nanociència i la nanotecnologia però no és fins al 1974 que Norio Taniguchi defineix la nanotecnologia com la tecnologia necessària per poder fabricar objectes i dispositius amb una precisió d'1nm.

Avui en dia entem la **nanotecnologia** com la ciència aplicada mitjançant la qual es poden crear petits dispositius, materials o estructures a **escala nanomètrica**, que aporten unes interessants propietats. (Ventura, 2012)

És important destacar que les propietats dels materials que coneixem varien a escala nanomètrica, atès que hi entren en joc factors com la superfície específica o els efectes quàntics. De fet, quan es redueixen a partícules de mida nanoscòpica, poden canviar de propietats òptiques o fins i tot variar la temperatura de fusió.

3.2. Aplicació en diferents àrees

Gràcies a l'estudi de la natura i a la recerca en nanociència, avui dia es poden conèixer millor les propietats dels materials a nanoescala i, per tant, aplicar la nanotecnologia en multitud de camps, com per exemple (Ventura, 2012):

- Acabats per a superfícies, que poden ser antifongs, antibacterianes, fotocatalítiques, antipol·lució, antitaques, repel·lents a l'aigua i l'oli, autonetejadores o fàcils de netejar, autoreparadores, antibaf, antireflexos o que fins i tot poden generar colors iridescents.
- Reforç de materials per obtenir materials nanocompostos. Els reforços poden ser tant nanopartícules com nanofibres, i també adquirir altres formes (sempre amb una de les dimensions dins la escala nanomètrica).

- En aplicacions tecnològiques, la nanotecnologia permet fabricar plaques solars més eficients, sistemes de filtració eficaços, petits dispositius per a monitoratge, ordinadors i telèfons mòbils més petits i més potents, etc.
- En medicina, s'està investigant l'ús de nanopartícules per generar nous sistemes de detecció i curació del càncer, per alliberar medicaments de forma localitzada i controlada (drug-delivery), etc.
- La majoria d'aquests efectes s'aconsegueixen gràcies a l'aplicació de nanomaterials: nanopartícules, nanorecobriments, superfícies nanoestructurades, etc.

Pel que fa el sector alimentari, les aplicacions són les següents:

- La creació d'envasos que incrementen el temps de conservació dels aliments.
- La incorporació de saboritzants, colorants i additius alimentaris.
- La creació d'aliments en funció de les necessitats i preferències alimentàries individuals.
- El desenvolupament d'aliments més saludables amb la reducció d'hidrats de carboni i greixos i l'increment de proteïna, vitamina i fibra.
- La formació de nanopartícules i nanoemulsions estables amb components bioactius per la seva incorporació en aliments.

3.3. Nanoemulsions

3.3.1. Definició

Les **emulsions** són dispersions termodinàmicament inestables formades per, almenys dos líquids immiscibles, normalment de naturalesa apolar i polar, en la que un d'ells forma gotes d'una mida petita (fase dispersa o interna), i l'altre forma part de la fase contínua o externa.

Segons els seus components podem classificar les emulsions de la següent forma:

- **L'emulsió oli en aigua (O/W):** També s'anomenen olio-aquoses, són petites gotes d'oli envoltades d'una fase externa aquosa (Figura 13).
- **L'emulsió aigua en oli (W/O):** També s'anomenen hidro-aquoses, i al contrari de les anteriors, són petites gotes d'aigua envoltades d'una fase externa d'oli (Figura 13)

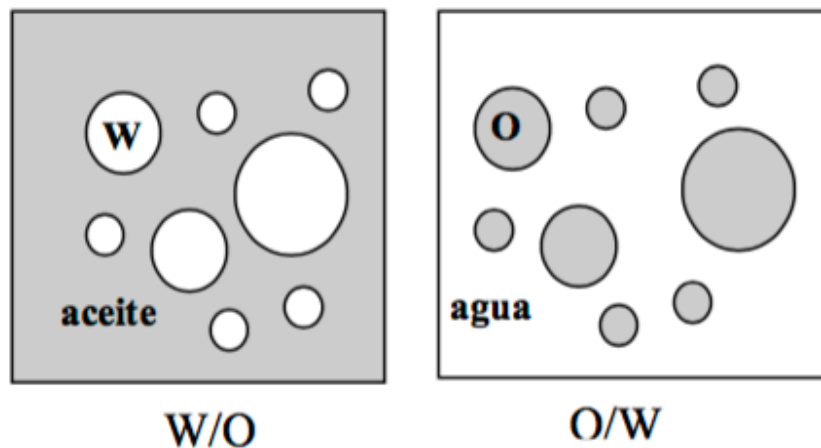


Figura 13: Emulsió aigua en oli i emulsió oli en aigua (Font: Hernández, 2004)

- **Emulsions dobles (W/O/W o O/W/O):** són emulsions on la fase dispersa conté gotes més petites que són miscibles amb la fase contínua. S'utilitzen en farmàcia i cosmètica (Figura 14).

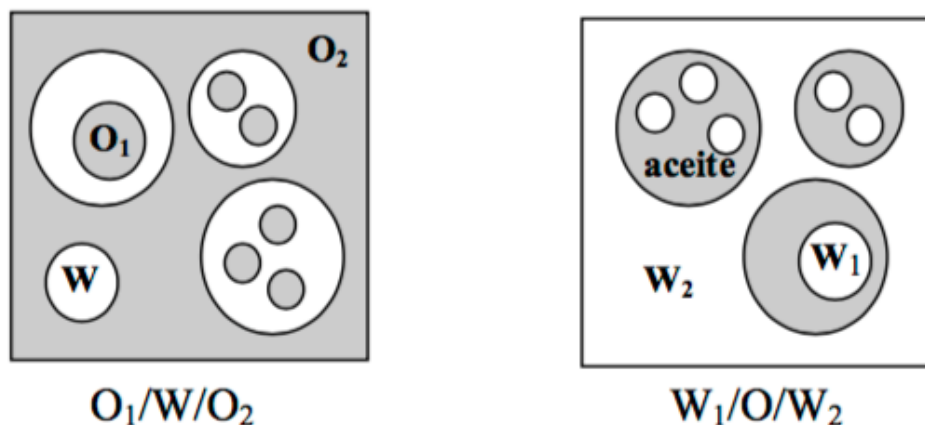


Figura 14: Emulsions O/W/O i W/O/W(Font: Hernández, 2004)

En tots els casos la fase interna i externa es troben separades físicament per una fase intermèdia immiscible.

Si les partícules d'una emulsió són de mida nanomèrica (de 1 a 500 nm), llavors parlem de **nanoemulsions**.

Es distingeixen de les emulsions en els següents factors (Taula 3):

Taula 3 : Diferències principals entre nanoemulsions i emulsions

	NANOEMULSIONS	EMULSIONS
Mida de la gota	1 – 500 nm	> 500 nm
Aspecte	Transparent	Opac
Estabilitat	Alta	Baixa

Introducció

Gràcies a les seves propietats degudes a la seva mida de gota, les nanoemulsions presenten diversos avantatges davant de les emulsions:

- No hi ha sedimentació ni cremat (separació dels components de l'emulsió basada en la densitat de les gotes) durant l'emmagatzematge, com és freqüent en les emulsions (Figura 15).
- Eviten la floculació: l'aglomeració de partícules desestabilitzades primer en microflòculs i més tard en aglomerats voluminosos anomenats flòculs (Figura 15).
- Eviten la coalescència: col·lisió i fusió irreversible de dos gotes (Figura 15).
- Les nanopartícules són sistemes que alliberen de forma controlada els compostos lipofílics encapsulats a l'interior de les seves gotes i que poden ser incorporades als aliments.
- Milloren les característiques sensorials com el color i la viscositat.
- Presenten major estabilitat metastable.
- Presenten una aparença transparent / tèrbola.
- Milloren la digestibilitat i bioaccessibilitat d'alguns compostos beneficiosos per a la salut si es comparen amb emulsions amb major grandària de partícula.
- En cremes dermatològiques, permeten dipositar els substrats uniformement en la pell, travessar la superfície aspra de la pell i l'alliberació d'ingredients actius a través de la pell.

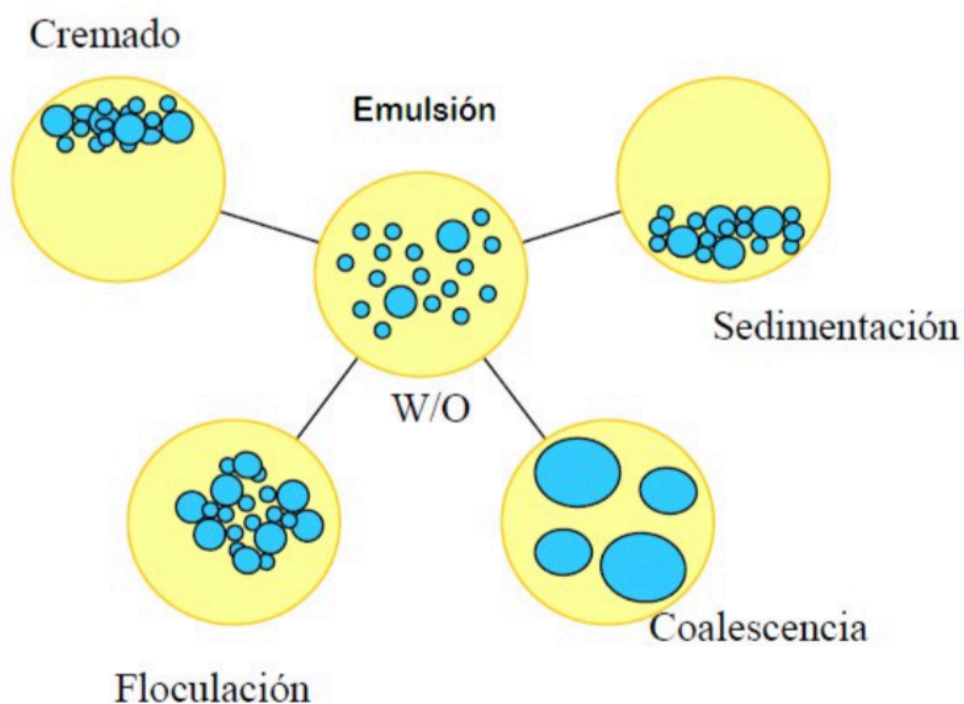


Figura 15: Principals mecanismes d'inestabilitat en una emulsió simple

Segons la seva composició, les nanoemulsions es poden classificar en directes i inverses (Taula 4):

Taula 4 : Composició dels diferents tipus de nanoemulsions (Forgiarini, Marquez i Salager, 2006)

	FASE AQUOSA (%)	FASE ORGÀNICA (%)	ESTABILITZANT (%)
Nanoemulsió directa	50 - 75	3 - 40	10 -30
Nanoemulsió inversa	3 - 35	50 - 75	10 -30

3.3.2. Composició de les nanoemulsions

Les nanoemulsions sempre estan formades a partir d'una barreja d'aigua (fase aquosa) i oli (fase orgànica) on s'hi poden afegir estabilitzants.

3.3.2.1. Oli

Com s'ha esmentat anteriorment, els olis i en general, els greixos, són molt importants en l'organisme pel seu alt contingut energètic però també perquè són els components majoritaris de les bicapes lipídiques de les membranes cel·lulars. També transporten les vitamines liposolubles dins de l'organisme.

Quan parlem de nanoemulsions, alguns exemples d'olis que es poden utilitzar són l'oli de blat de moro, l'oli d'oliva i l'oli de nous, tot i que no es tenen suficients dades d'aquest últim en referència a la seva eficàcia en nanoemulsions.

3.3.2.2. Aigua

L'aigua és imprescindible pels éssers vius i com s'ha explicat ja, compleix una funció plàstica i reguladora en l'organisme tot i que no aporta energia.

En la majoria d'emulsions dels aliments, la fase aquosa també conté components solubles en aigua com ara minerals, vitamines, sucres, etc.

3.3.2.3. Estabilitzants

L'ús d'estabilitzants en les nanoemulsions és fonamental. Aquests productes són molècules amb activitat superficial que s'adsorbeixen en la superfície de les gotes durant l'homogeneïtzació, formant una membrana protectora que evita l'agregació de les gotes i disminueix la tensió superficial en la interfase.

Normalment, els estabilitzants són molècules amfipàtiques, és a dir, que presenten regions polar i no polars en la mateixa molècula.

L'estabilitat d'una nanoemulsió també està influenciada per la concentració dels emulsionants en les fases aquoses, i en major grau, per la concentració del emulsionant liposoluble, la natura i viscositat de la fase oliosa, la naturalesa i concentració dels ingredients que s'encapsulen en la fase aquosa interna, així com l'adsorció de molècules en les interfases.

Dins dels estabilitzants trobem els surfactants que es poden definir com substàncies que s'absorbeixen en la interfase oli-aigua, formant una capa protectora al voltant de les gotes.

Per tal de saber l'equilibri entre la quantitat de grups hidrosolubles i liposolubles ideal per cada emulsionant, Griffin va crear una escala arbitrària de valors (Figura 16) per a que servissin com a mesura del balanç hidrofílic - lipofílic (HLB) dels agents superficialment actius. Així, mitjançant aquesta escala, és possible establir un interval de màxima eficàcia per cada tipus d'emulsionant, deduïnt d'aquesta escala que com major sigui el HLB, major serà el caràcter hidrofílic. (Taula 5)

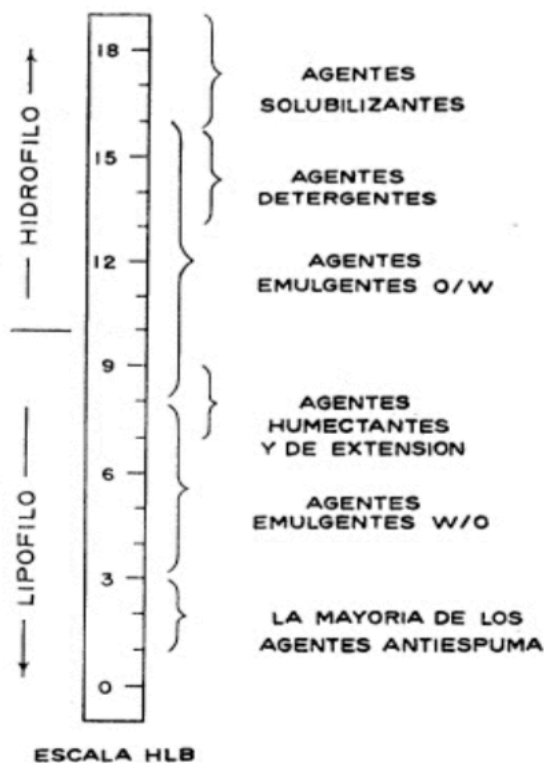


Figura 16: Classificació dels agents emulsionants segons el seu HLB

Introducció

Taula 5: HLB d'alguns agents emulsionants.

SUBSTÀNCIA	HLB
Àcid oleic	1
Monoestearat de glicerina	3,8
Monooleat de sorbitan (span 80)	4,3
Monolaurat de sorbitan (span 20)	8,6
Goma aràbiga	8
Gelatina (Farmagel B)	9,8
Metilcel·lulosa (Metocel, 15 cps)	10,5
Oleat de irietanolamina	12
Goma tragacant	13,2
Tween 80	15
Tween 20	16,7
Oleat sòdic	18
Lecitina hidroxilada	9

Alguns exemples de surfactants són:

- **El tween 20:** tensioactiu no iònic que és adequat per la producció d'emulsions O/W i també com a humectant. És estable en dissolucions d'electròlits, així com àcids i bases dèbils. (Figura 17)

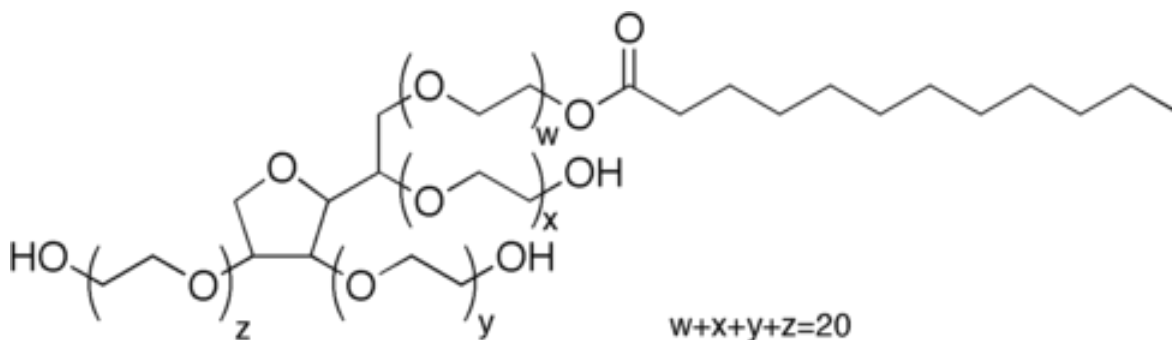


Figura 17: Estructura de la molècula de tween 20

- **La lecitina:** emulsionant que ajuda a la integració de dos substàncies poc miscibles, substàncies difícils d'unificar, facilitant l'emulsió.(Figura 18)Degut a la seva naturalesa lipídica, la lecitina es pot extreure fàcilment ja sigui químicament o bé mecànicament a partir de fonts marines, fonts de soja, ous, llet, colza, gira-sol i cotó.

Tot i que pot ser soluble en substàncies polars, la lecitina presenta propietats emulsionants molt bones i en solució aquosa pot formar, depenent de la hidratació i de la temperatura, liposomes, bicapes lipídiques, micel·les o estructures lamel·lars.

Aquest surfactant és un dels més utilitzats en emulsions lipídiques ja que és fàcil d'obtenir.

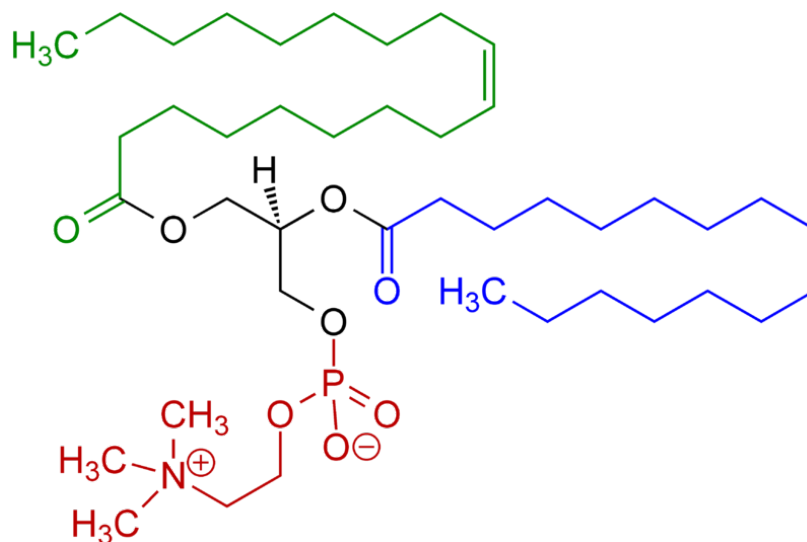


Figura 18: Estructura de la molècula de lecitina

3.3.3. Mètodes d'obtenció de les nanoemulsions

A causa de la inestabilitat de les nanoemulsions, aquestes no es poden formar espontàniament i per tant requereixen l'aplicació d'energia per a la seva formació.

Depenent del tipus d'energia que s'aplica, es troben dos mètodes d'obtenció de nanoemulsions:

- **Mètodes d'alta energia (de dispersió o força bruta):** utilitzen dispositius mecànics capaços de generar una intensa i disruptiva força que barreja i altera les fases de l'oli i l'aigua, i que comporten a la formació de petites gotes.

Entre els equips de dispersió més eficaços per produir nanoemulsions hi ha els homogeneïtzadors d'alta pressió i els generadors d'ultrasons. L'energia que subministren aquests equips produeix suficient cisalla per trencar les gotes de l'emulsió en altres més petites.

- **Mètodes de baixa energia (d'inversió de fases o fisicoquímics):** es basen en la formació espontània de petites gotes d'oli de la barreja d'oli amb fase aquosa quan les condicions ambientals, sistemes o la solució són alterades.

Entre els mètodes fisicoquímics utilitzats per obtenir nanoemulsions es troba el de la temperatura d'inversió de fases PIT (Phase Inversion Temperature), on es produeix la inversió d'una emulsió O/W a W/O (o viceversa) per disminució de temperatura (o per increment de temperatura). Un altre mètode és l'EIP (Emulsion Inversion Point), en el qual es produeix una inversió de fases W/O a O/W per addició d'aigua en sistemes constituïts per aigua, surfactant i oli sense necessitat d'una forta agitació a temperatura constant.

D'altra banda, es parla d'emulsió espontània quan l'emulsió es forma a l'entrar en contacte amb els components del sistema, en absència (o poca) agitació.

Les nanoemulsions són sistemes inestables a causa que el contacte entre les molècules d'aigua i l'oli no és favorable termodinàmicament.

El canvi d'energia lliure associada amb la formació de la nanoemulsió mitjançant els diferents mètodes determina si una nanoemulsió és o no termodinàmicament estable, però no dona una indicació de la velocitat amb què les propietats d'una nanoemulsió canvien a través del temps, ni el tipus de canvis que poden ocórrer, o els mecanismes físics responsables d'aquests canvis.

La informació sobre la dependència del temps en l'estabilitat de la nanoemulsió és particularment important pels científics en aliments, en fàrmacs i cosmetòlegs qui necessiten crear productes que retinguin les seves propietats desitjables per un temps prou llarg, sota una varietat de diferents condicions ambientals. Per aquesta raó, els investigadors s'interessen més en l'estabilitat cinètica de les nanoemulsions, que en la seva estabilitat termodinàmica.

3.3.4. Utilitat de les nanoemulsions

La principal aplicació de les nanoemulsions de tipus O/W és l'encapsulació de compostos actius poc solubles o insolubles en aigua. Les nanoemulsions d'aquest tipus han estat utilitzades en la indústria alimentària com a sistemes d'encapsulació per a la **protecció d'ingredients actius** com antioxidants, sabors, aromes, vitamines, àcids grassos o components bioactius contra factors ambientals.

Les nanoemulsions O/W també han tingut un desenvolupament actiu en la indústria farmacèutica i cosmètica. La preparació de les nanoemulsions tipus O/W, ha estat considerada com la clau per al desenvolupament de **nous cosmètics i productes farmacèutics** solubles en aigua, pel fet que són sistemes translúcids, i s'han addicionat a una gran varietat de productes com cosmètics, fragàncies, cremes, etc.

Objectius

Els objectius principals del treball són:

- Aprofundir en tècniques de laboratori específiques.
- Estudiar el concepte de component bioactiu i la seva relació amb la salut.
- Conèixer com millorar les característiques nutricionals dels aliments amb l'ús de noves tecnologies.
- Elaborar diferents tipus de nanoemulsions i determinar les seves característiques fisicoquímiques.
- Comparar les propietats fisicoquímiques de nanoemulsions amb emulsions convencionals.
- Avaluat la protecció dels components bioactius amb l'ús de les nanoemulsions.
- Observar l'estabilitat física de les nanoemulsions i les emulsions convencionals.

Material i mètodes

1. Material

Totes les emulsions es van elaborar amb oli de blat de moro (formant la fase interna), aigua milli-Q (la fase externa), i lecitina com a surfactant. Les emulsions es distingeixen entre elles per la seva concentració de lecitina i la seva mida de partícula (emulsions convencionals i nanoemulsions).

L'oli de blat de moro s'extreu del germen del blat de moro i conté àcids grassos saturats (dels quals el 79,45% és àcid palmític i el 16,67% àcid esteàric) i un 81,63% d'àcids grassos insaturats (dels quals el 34,85% són monoinsaturats i el 65,14% són poliinsaturats). L'aportació energètica és molt similar a altres tipus d'oli però destaca entre aquests pel seu alt contingut en Vitamina E (**Annex**).

Per tal d'enriquir l'oli, s'ha utilitzat β -carotè (Figura 19). Aquest component bioactiu es pot trobar en vegetals i fruites de color groc, taronja fosc o verd intens com la pastanaga, el mango o la papaia. Ajuda principalment en la prevenció del càncer i el reforç immunològic.

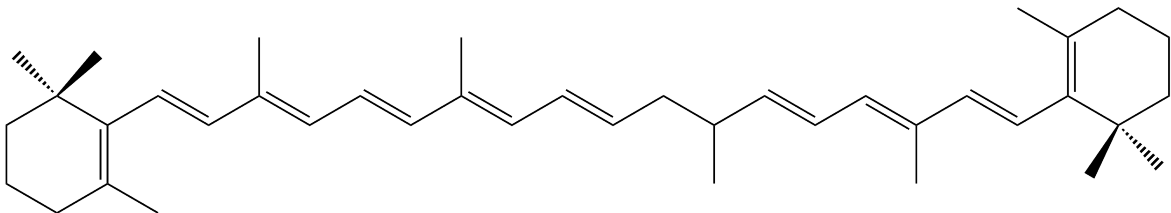


Figura 19: Estructura de la molècula de β -carotè

L'aigua milli-Q, també anomenada de tipus I, és l'aigua purificada i desionitzada en alt grau mitjançant un procés d'osmosi inversa per un sistema de purificació d'aigua fabricat per l'empresa Millipore Corporation (Figura 19). Les principals aplicacions de l'aigua milli-Q en laboratoris són la cromatografia, les tècniques de determinació de metalls traça, la genètica i bioquímica (electroforesi, PCR, etc.) i la preparació de mostres.



Figura 19: Sistema de purificació de l'empresa Millipore Corporation

El surfactant utilitzat, la lecitina com s'ha especificat abans, és un lípid saponificable que es pot extreure fàcilment ja sigui químicament o bé mecànicament a partir d'organismes marins i d'altres fonts: soja, ous, llet, colza, gira-sol i cotó. S'ha utilitzat la lecitina ja que presenta molt bones propietats emulsionants i en solució aquosa pot formar liposomes, bicapes lipídiques, micel·les o estructures lamel·lars envoltant qualsevol substància grassa i, a més, és fàcil d'obtenir.

Durant l'estudi s'ha utilitzat diferents estris i maquinaria en cadascun dels processos:

- **PREPARACIÓ DE L'OLI ENRIQUIT:**

- Balança de precisió
- Balança electrònica
- Vas de precipitats
- Vidre de rellotge
- Espàtula
- Vareta de vidre
- Termòmetre
- Placa calefactora i agitadora
- Imants
- Bany d'ultrasons
- Pots de 20 ml i 40 ml
- Congelador

- **PREPARACIÓ DE LES EMULSIONS CONVENCIONALS:**

- Balança electrònica
- Vas de precipitats
- Xeringa
- Ultra-túrrax
- Espàtula

- **FORMACIÓ DE LES NANOEMULSIONS:**

- Vas de precipitats
- Microfluiditzador
- Flascons de vidre de 500 ml

- **CONTINGUT DEL COMPONENT BIOACTIU:**

- Pipetes
- Pipetejador
- Pipetes Pasteur
- Vas de precipitats
- Parafilm
- Tubs de plàstic
- Vòrtex
- Balança electrònica
- Centrifugadora
- Cubeta de vidre especial
- Espectrofotòmetre
- Guants
- Mascareta

- **MESURA DEL COLOR:**

- Colorímetre

- **MESURA DEL POTENCIAL ZETA:**

- ZetasizerNanoZS
- Xeringa
- Cubetes amb elèctrodes
- Vas de precipitats

- **MESURA DE LA MIDA DE PARTÍCULA:**

- ZetasizerNanoZS
- Mastersizer
- Pipetes Pasteur
- Pipetes
- Cubetes de vidre específiques
- Vas de precipitats

- **AVALUACIÓ DE L'ESTABILITAT FÍSICA:**

- Gradeta
- Tubs d'assaig
- Nevera
- Pipeta
- Pipetejador
- Càmera fotogràfica

2. Mètodes

2.1. Preparació d'emulsions

2.1.1. Preparació de l'oli enriquit

En aquest treball s'ha utilitzat β -carotè com a component bioactiu per tal d'enriquir oli de blat de moro. S'ha afegit 1g de β -carotè per cada 200g d'oli i s'ha obtingut una concentració de 0,5% del component bioactiu (Figura 20).

Primer de tot, s'ha pesat el β -carotè amb la balança de precisió ja que es tracta de poca quantitat i l'oli amb una balança electrònica. Després, s'ha seguit un procés per tal d'obtenir una dissolució òptima del component bioactiu.



Figura 20: Oli amb β -carotè



Figura 21: Bany d'ultrasons

El procediment a seguir per solubilitzar la mostra consisteix en tancar la barreja d'oli i component bioactiu, ja que la mostra és fotosensible, i inicialment introduir-lo al bany d'ultrasons (Figura 21) durant 1 minut.

Material i mètodes

Un corrent elèctric transmet la seva energia a un sistema mecànic que la convertirà en vibracions d'alta intensitat que generen ones d'ultrasò. Els ultrasons generen, al seu torn, vibracions en la mostra. Això genera milions de bombolles microscòpiques, les quals pateixen rapidíssims processos d'expansió i col·lapse que ajuden en la dissolució del component sòlid de la mostra.

Seguidament, la solució s'escalfa en una placa calefactora i agitadora durant 5 minuts mentre es controla que la seva temperatura no superi els 50°C amb un termòmetre. Aquest procés s'ha realitzat dues vegades per cada mostra per tal d'assegurar la completa solubilització del component bioactiu.



Figura 22: Oli enriquit preparat per ser congelat

Després s'ha congelat la mostra en diferents pots de 20 ml i 40 ml a -30°C per tal de conservar-la fins el dia de la preparació de les emulsions (Figura 22).

2.1.2. Preparació de les emulsions convencionals

S'han preparat un total de 3 emulsions convencionals amb diferents percentatges de lecitina (2%, 4% i 8%), una proporció fixa d'oli enriquit (4%) i aigua milli-Q fins al pes total de l'emulsió (Figura 23).



Figura 23: Aigua, lecitina i oli enriquit

S'ha preparat una quantitat total de 600g per cada emulsió convencional, d'on se'n separarà la meitat per preparar les nanoemulsions. Per tant, s'obtingran un total de 6 emulsions, 3 de convencionals i 3 de nano (Taula 6).

Taula 6: Emulsions preparades

TIPUS D'EMULSIÓ	NOM	OLI ENRIQUIT	LECITINA	AIGUA MILLI-Q
Emulsió convencional	<i>A</i>	4%	2%	94%
	<i>C</i>	4%	4%	92%
	<i>E</i>	4%	8%	88%
Nanoemulsió	<i>B</i>	4%	2%	94%
	<i>D</i>	4%	4%	92%
	<i>F</i>	4%	8%	88%

Material i mètodes

Per la preparació de les emulsions convencionals s'ha començat pesant els components amb la balança electrònica. Per pesar l'oli s'ha emprat una xeringa. Per tal de no perdre mostra d'oli amb lecitina mentre s'elabora, s'ha preparat 30g d'oli per cada mostra, en lloc dels 24g totals necessaris, amb el percentatge corresponent de lecitina. Primer s'ha incorporat la lecitina a l'oli (Figura 24) ja que aquest surfactant és liposoluble. Per fer-ho, s'ha barrejat mitjançant un homogeneïtzador d'elevada velocitat, anomenat Ultra-túrrax, a 9.500rpm durant 5 minuts.



Figura 24: Oli amb diferents concentracions de lecitina. D'esquerra a dreta: 2%, 4% i 8%

Després, de la quantitat total de l'oli enriquit amb lecitina, se n'ha pesat el percentatge corresponent a cada emulsió i s'ha afegit a l'aigua milli-Q prèviament pesada (Figura 25). Per homogeneïtzar la mostra s'ha tornat a passar pel túrrax a 9.500rpm però aquest cop només 2 minuts (Figura 26). 300 ml de cada emulsió s'han emmagatzemat en flascons i s'han tapat amb paper d'alumini ja que les mostres són fotosensibles. Els altres 300 ml de cada emulsió s'utilitzaran per la formació de les nanoemulsions.

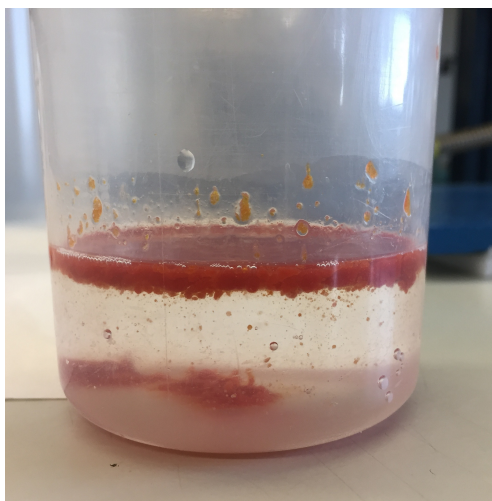


Figura 25: Aigua milli-Q amb oli i lecitina abans de passar pel túrrax

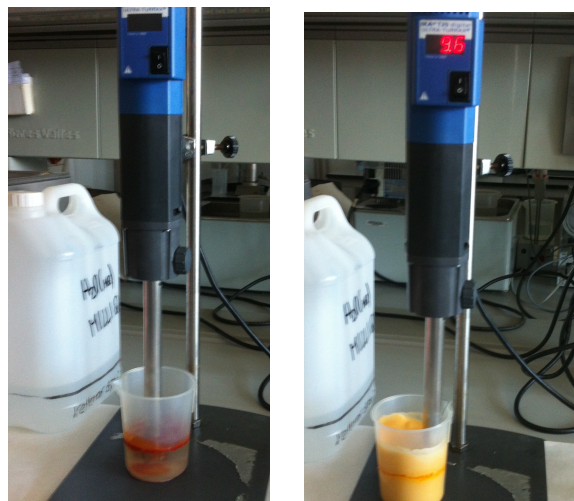


Figura 26: Mostra a l'Ultra-túrrax

2.1.3. Formació de les nanoemulsions

Una vegada obtingudes les emulsions convencionals, s'ha utilitzat la meitat de la quantitat total per formar les nanoemulsions (300 ml). Per obtenir-les s'ha fet servir l'aparell denominat microfluiditzador (Figura 27).

El microfluiditzador permet el processament de fluids a alta pressió aconseguint nivells excepcionals de reducció de mida de partícules per dispersions de nanopartícules, emulsions, liposomes i desaglomeracions que no poden ser produïdes per altres tècniques. Aquest aparell és àmpliament utilitzat en la indústria farmacèutica, biotecnològica, de tintes digitals, microelectrònica, alimentària, química i cosmètica.



Figura 27: Microfluiditzador

Abans d'engegar l'equip, es col·loca gel a la part metàl·lica per evitar l'augment de temperatura de les mostres i així no degradar el β -carotè que contenen. Una vegada col·locades les emulsions en l'embut de l'aparell, aquest condueix el producte pel seu interior, mitjançant una vàlvula, fins a una càmera de tractament que presenta microcanals de geometria fixa. L'aparell sotmet la mostra a elevades pressions, provocant xocs entre les partícules i una reducció de la seva mida. Després, la mostra obtinguda surt de l'aparell circulant per una bobina externa que té forma d'espiral.

Material i mètodes

Per tal d'obtenir les diferents nanoemulsions, s'han passat les emulsions convencionals cinc vegades per l'aparell a una pressió de 150 MPa. Una vegada obtingudes les nanoemulsions, s'han emmagatzemat en flascons de 500 ml i aquests s'han tapat amb paper d'alumini ja que les mostres son fotosensibles.

En finalitzar, es important la neteja de l'equip ja que no fer-ho podria implicar greus conseqüències ja que es tracta de material sensible. Per netejar-lo s'han de seguir els següents passos:

- Netejar amb 300 ml de detergent Laboclean al 2%.
- Netejar l'embut de vidre.
- Esbandir amb 600 ml d'aigua destil·lada i anar disminuint la pressió.
- Esbandir amb 300 ml d'aigua milli-Q.
- Desenroscar la part metàl·lica, treure el èmbol molla i netejar les restes amb paper.

2.2. Caracterització fisicoquímica de les emulsions

Després de la formació de les emulsions convencionals i de les nanoemulsions, s'ha realitzat la seva caracterització, per tal de conèixer les seves propietats del primer dia i comparar-les entre elles. S'ha analitzat la mida de partícula, el potencial zeta i el color.

2.2.1. Mida de partícula

Quan parlem de la mida de partícula fem referència al diàmetre de les partícules que es troben disperses en les emulsions. Per tal de caracteritzar les nanoemulsions el dia 0 s'ha mesurat la seva mida de partícula mitjançant la dispersió de la llum dinàmica amb l'equip làser ZetasizerNanoZS (Figura 29) ja que la seva unitat de mesura és nm i té una gran precisió en aquesta escala.

S'han diluït 100 µl de les mostres de nanoemulsions amb 900 µl d'aigua milli-Q (dissolució 1:10) amb l'ajuda de pipetes i vasos de precipitats i s'ha introduït en cubetes de vidre específiques per aquest equip (Figura 28). Per cada una de les nanoemulsions es van introduir dins l'equip 2 cubetes, de les quals va fer 3 lectures de cada una.



Figura 28: Cubeta de vidre específica per al ZetasizerNanoZS



Figura 29: Equip ZetasizerNanoZS

Material i mètodes

Després, per tal de comparar entre nanoemulsions i emulsions convencionals, es va utilitzar l'equip Mastersizer (Figura 30) que mesura la mida de partícula per mitjà de la dispersió de llum estàtica.

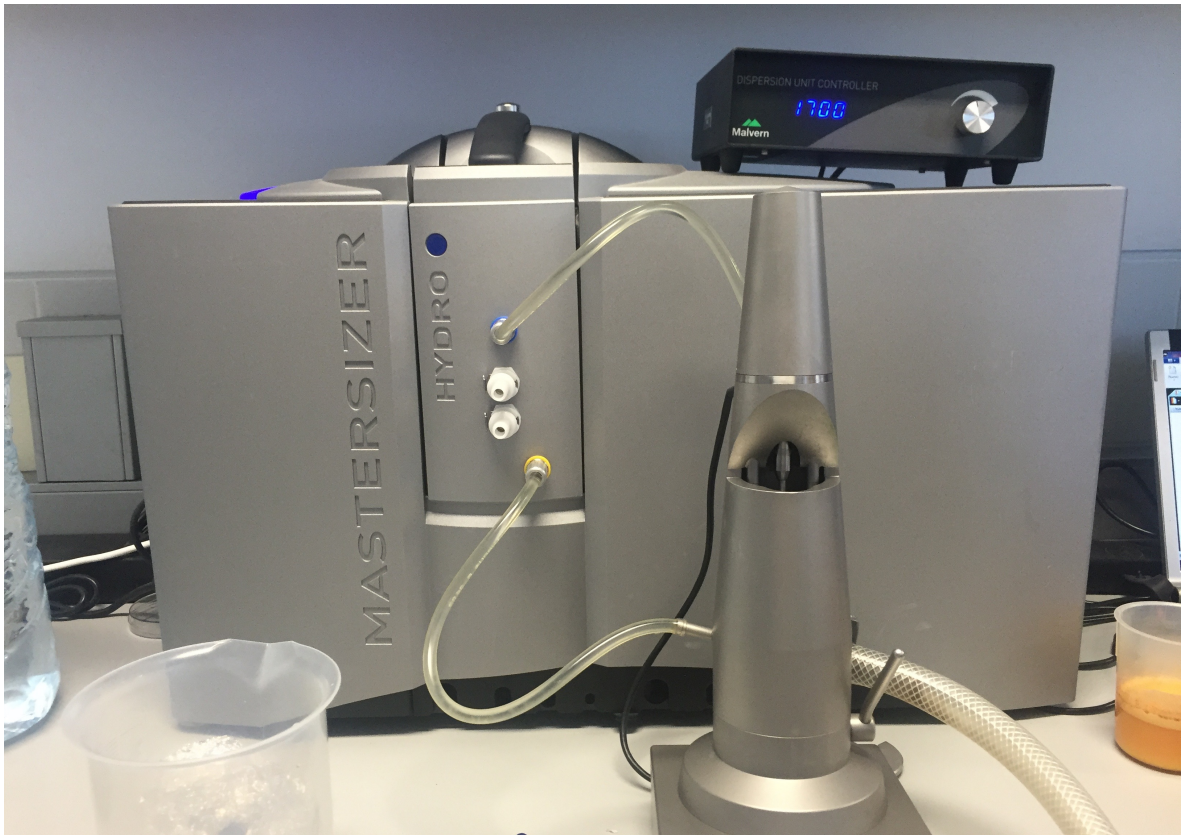


Figura 30: Equip Mastersizer

En aquest equip, la formació de la mostra és diferent ja que les mostres es dilueixen en aigua destil·lada i s'agiten en la unitat de dispersió a una velocitat de 1700 rpm. És imprescindible la neteja d'aquest equip abans d'utilitzar-lo, entre mostres i després de fer-lo servir ja que la mostra està en contacte directament amb l'equip i els resultats es podrien veure afectats.

2.2.2. Potencial Zeta

El Potencial Zeta és una mesura de la magnitud de la repulsió o atracció entre les partícules. El seu valor proporciona una idea detallada dels mecanismes de dispersió i és la clau del control de dispersió electrostàtic.

El Potencial Zeta és un paràmetre extremadament important en una gran varietat d'activitats industrials com les begudes, ceràmica, farmacèutica, medicina, processat mineral o tractament d'aigües.

El dia de la formació de les emulsions es va mesurar el Potencial Zeta ja que si aquest és suficientment alt o baix (<-30 mV o >30 mV) indica que les forces de repulsió són predominants i per tant, no es produiran fenòmens de coalescència (col·lisió i fusió irreversible de dos gotes). Això ajuda a determinar l'estabilitat de les nanoemulsions.

Es va utilitzar l'equip làser Zetasizer (Figura 31) i, en aquest cas, també es van fer servir unes cubetes especials (Figura 32) tot i que diferents de les que es van utilitzar per mesurar la mida de partícula ja que aquestes contenen dos elèctrodes situats als costats. També es van diluir les mostres 1:10 (100 μ l de mostra i 900 μ l d'aigua milli-Q) en un vas de precipitats i es va introduir la dissolució en les cubetes mitjançant una xeringa. Es van preparar 2 cubetes per cada emulsió, i l'equip va realitzar 3 lectures.

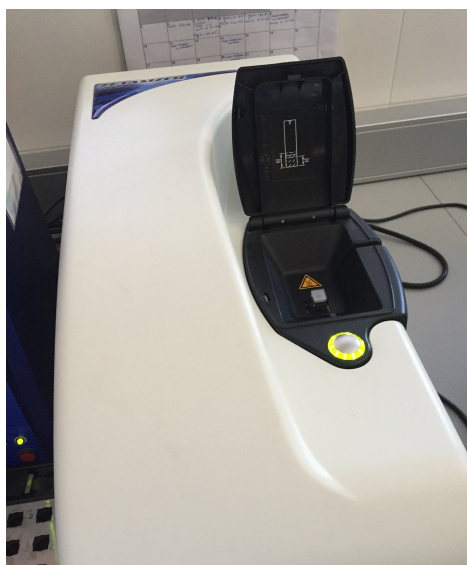


Figura 31: ZetasizerNanoZS

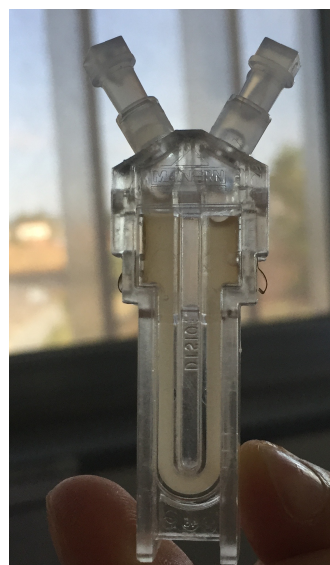


Figura 32: Cubeta amb elèctrodes

2.2.3. Índex de blancor

El color de les mostres es va mesurar mitjançant l'equip colorímetre Minolta CR-400 (Figura 33). Abans de començar el procés, es necessari calibrar l'equip ja que sinó els resultats podrien no ser els correctes. Després, la mostra s'ha de dipositar dins del vas de vidre que es col·loca damunt del capsal mesurador i l'equip fa 3 lectures i expressa la mitjana del resultats. Per cada emulsió s'han fet un total de 9 lectures.

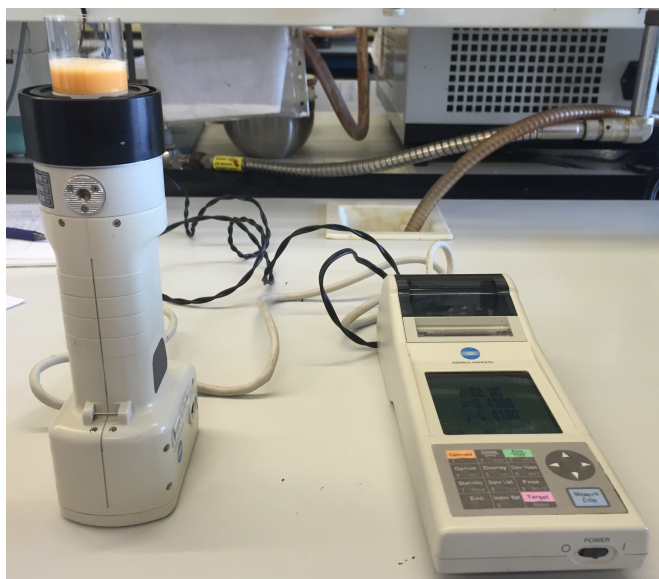


Figura 33: Colorímetre

Els resultats obtinguts s'expressen amb tres coordenades (a^* , b^* i L^*) (Figura 34) corresponents a l'espai de color de Hunter Lab.

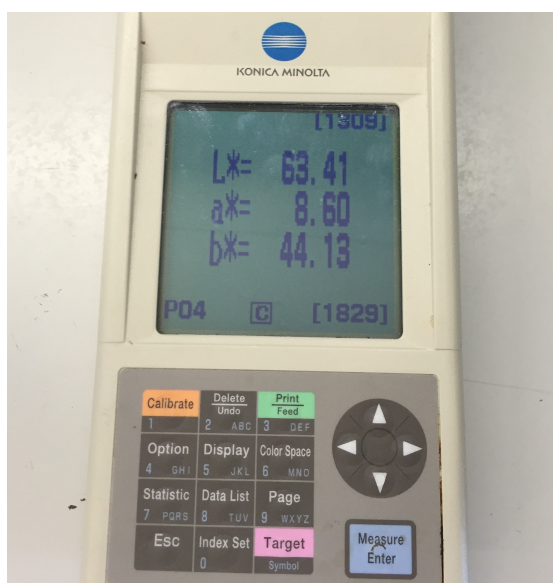


Figura 34: Exemple de resultats del colorímetre

L'espai de color Hunter Lab (Figura 35) va ser modelat en base a la teoria del color oponent que estableix que dos colors no poden ser vermell i verd al mateix temps o groc i blau al mateix temps. Per això els paràmetres d'aquest espai indiquen el següent:

- L^* (eix perpendicular al pla) = lluminositat
- a^* (eix de les abscisses) = coordenades vermell / verd (valors positius indiquen vermell i valors negatius indiquen verd)
- b^* (eix de les ordenades) = coordenades groc / blau (valors positius indiquen groc i valors negatius blau)

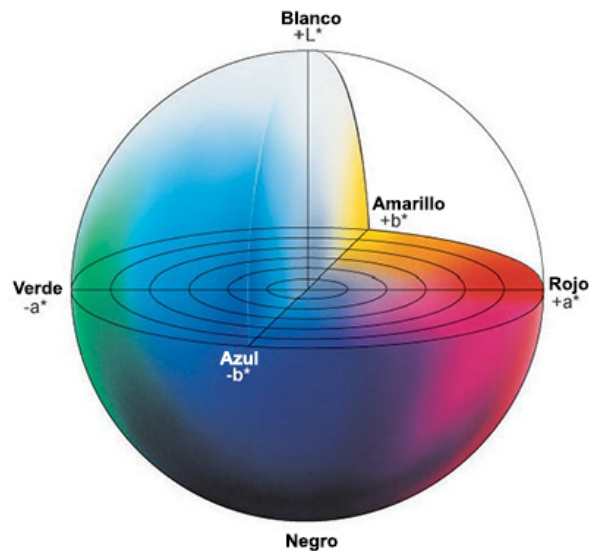


Figura 35: Espai de color de Hunter Lab

A partir d'aquests valors es pot calcular l'Índex de blancor (WI), el qual ens indica la distància a partir d'un blanc perfecte ($L^*=100$, $a^*=0$ i $b^*=0$). L'equació és la següent:

$$WI = 100 - \sqrt{((100 - L)^2 + (a^2 + b^2))}$$

2.3. Estabilitat de les emulsions

2.3.1. Estabilitat física de les emulsions

La manera més simple d'estudiar l'estabilitat d'una emulsió al llarg del temps és observar-la visualment. Per això, en aquest estudi, el dia de la formació de les emulsions es van introduir 7 ml de cada mostra en tubs d'assaig diferents amb l'ajuda d'una pipeta i d'un pipetejador.

Es van organitzar en una gradeta de tal manera que cada emulsió es va col·locar al costat de la nanoemulsió amb el seu mateix percentatge de lecitina de tal manera que per exemple, l'emulsió convencional A, amb un percentatge del 2% de lecitina, es troba al costat de la nanoemulsió B, amb la mateixa quantitat de lecitina.

Les mostres es van guardar en la nevera durant 21 dies per una millor conservació del component bioactiu i els dies 0, 3, 5, 7, 14 i 21 es van fer fotografies de les mostres per tal d'analitzar la seva estabilitat física de manera visual.

2.3.2. Estabilitat del color

Es va mesurar el color de la mateixa manera que es va fer el dia de la formació de les emulsions durant 21 dies i es van anotar els valors del paràmetre a^* .

Els valors positius del paràmetre a^* ens indiquen la intensitat de vermellor de la mostra que estem mesurant. Com que el component bioactiu utilitzat per enriquir les mostres, el β -carotè, és d'un color roig intens, una disminució del paràmetre a^* del colorímetre respecte el dia de la formació de les emulsions ens indicaria una possible pèrdua del component bioactiu en la mostra.

2.3.3. Contingut de component bioactiu

En aquest procés es van seguir unes mesures de seguretat com la mascareta, els guants o utilitzar campana extractora ja que el cloroform desprèn vapors tòxics. Per determinar el contingut de β -carotè en les emulsions s'ha seguit un procediment que comença per barrejar 5ml de mostra amb 5ml de cloroform en tubs de plàstic específics per a la centrifugadora (Figura 36). Per cada emulsió es van fer 2 repeticions

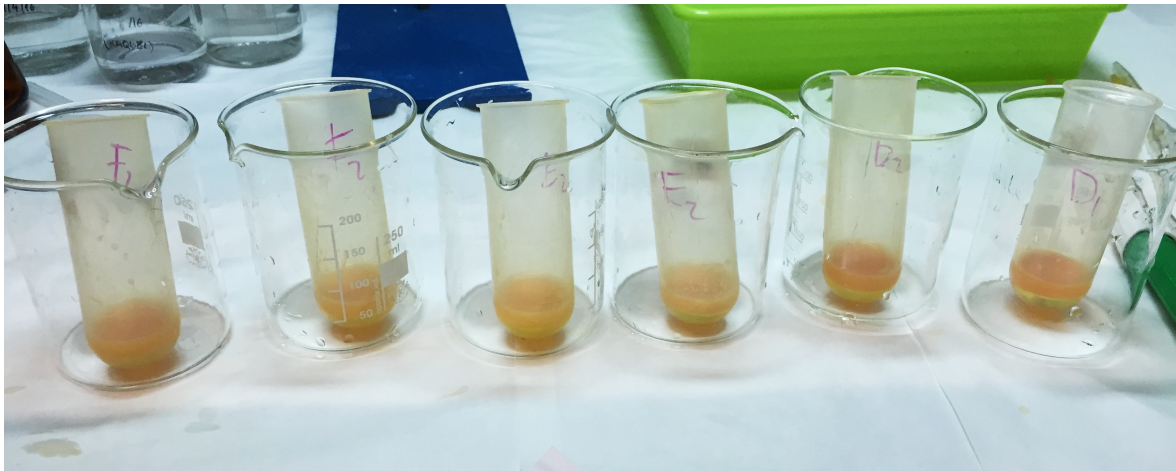


Figura 36: Tubs amb 5 ml de cloroform i 5 ml d'emulsió preparats per passar pel vòrtex

Després de tapar-ho amb parafilm, cada mostra es va vortejar durant 3 minuts a una velocitat de 1.800 rpm (Figura 37). El vòrtex és un agitador ideal per a mostres que es troben dins d'un tub gràcies al seu moviment vibratori.



Figura 37:Mostra tapada amb parafilm al vòrtex

Material i mètodes

A continuació, les mostres es van centrifugar a una velocitat de 17.500 rpm durant 20 minuts a una temperatura de 25°C (Figura 38-A). A l'acabar, es van obtenir mostres amb dues fases separades, una fase blanquinosa a la part superior i, a l'inferior, una fase rogenca que contenia l'oli i altres components (Figura 38-B). Es va extreure la part inferior de les mostres amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur i es va diluir amb cloroform per tal d'obtenir una dissolució 1:20. Es va dipositar la dissolució dins d'una cubeta de vidre especial per a l'espectrofotòmetre (Figura 38-C).

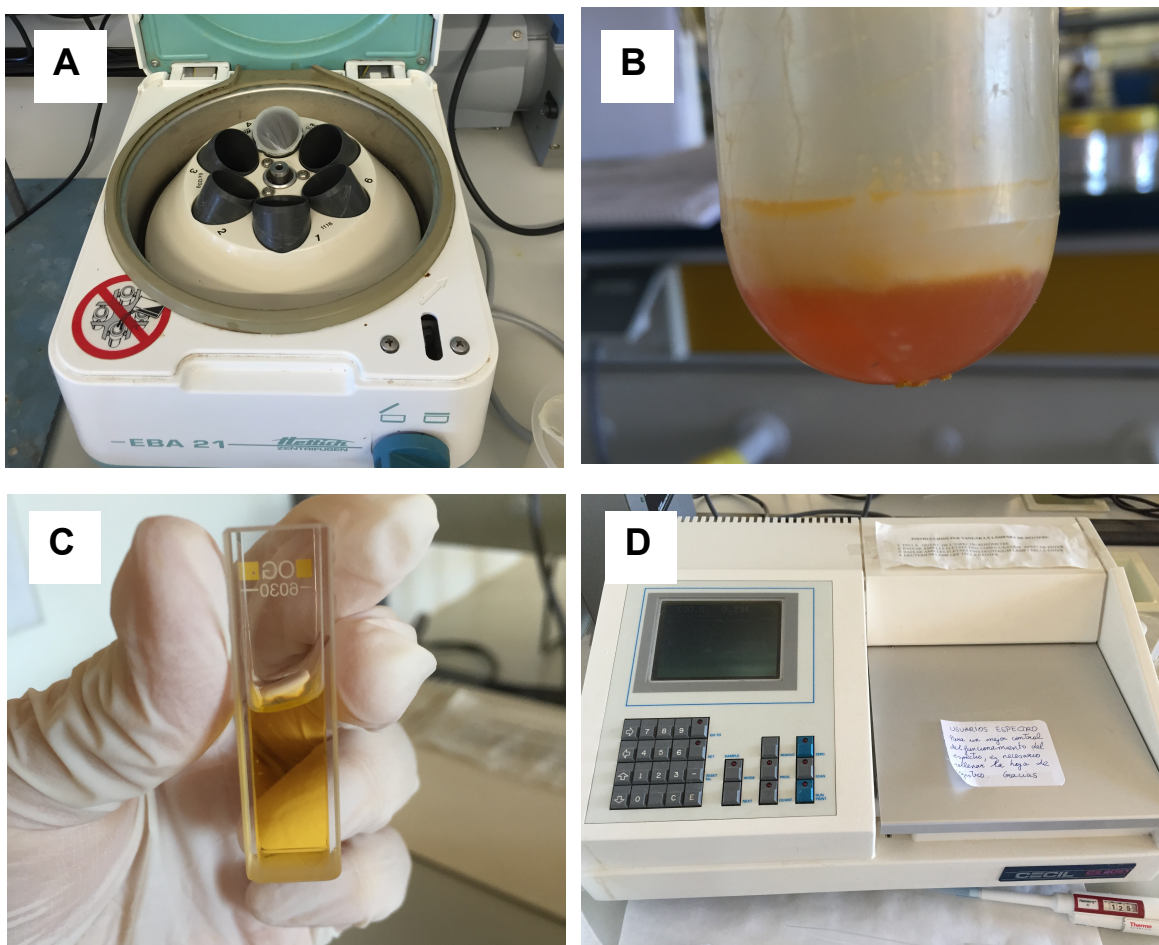


Figura 38: A: centrífuga. B: mostra després de ser centrifugada. C: cubeta de vidre amb mostra i cloroform. D: espectrofotòmetre

L'espectrofotòmetre (Figura 38-D) és un instrument emprat per a determinar l'espectre d'absorció (intensitat de l'absorció de l'energia radiant en funció de la longitud d'ona) d'una mostra de matèria, especialment a les regions de l'ultraviolat, del visible i de l'infraroig. S'ha mesurat l'absorbància de totes les mostres a 450nm ja que es la longitud d'ona amb la qual es poden detectar carotens. Per fer un percentatge del contingut de bioactiu, s'ha agafat de referència el dia 0, quan el β -carotè tenia una concentració del 100%.

Resultats i discussió

1. Caracterització fisicoquímica de les emulsions

1.1. Mida de partícula

Els resultats obtingut amb l'equip ZetasizerNanoZS el dia que es van realitzar les nanoemulsions són els següents:

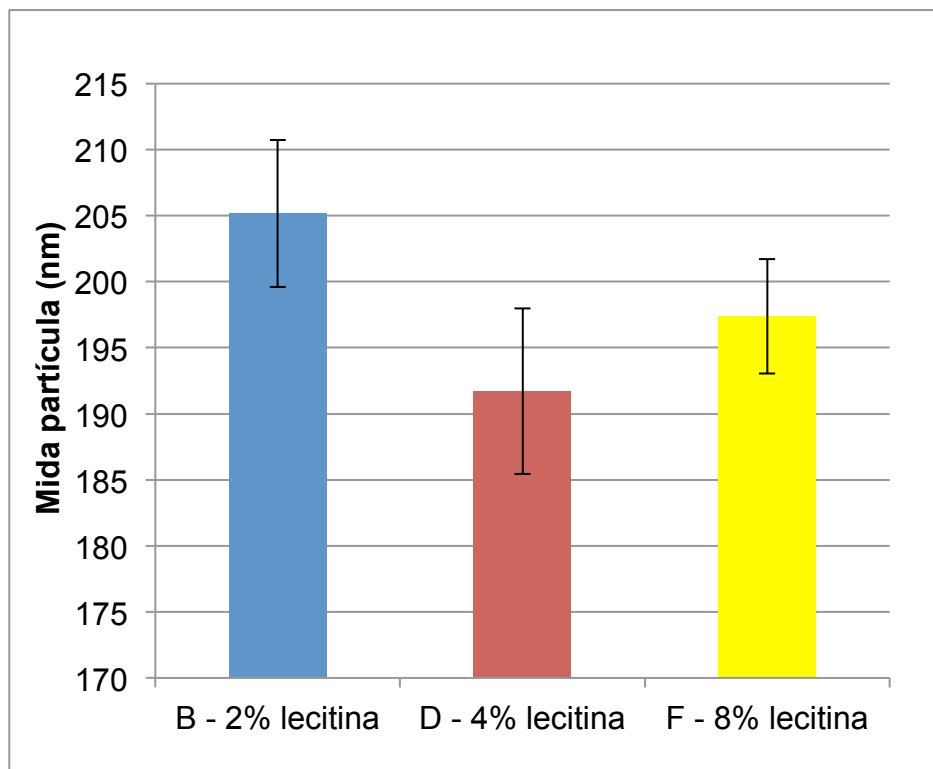


Figura 39: Mida de partícula de les nanoemulsions el dia de la seva formació mesurada amb el ZetasizerNanoZS

Com s'observa, les mides oscil·len entre els 191,7 nm i els 205,17 nm i, per tant, es troben dins de la definició de nanoemulsions esmentada anteriorment. En aquesta mesura no s'ha pogut determinar cap tipus de relació directa entre el percentatge de lecitina i la mida de partícula, ja que la nanoemulsió amb la mida de partícula més petita (D) és la que té un percentatge de lecitina del 4%.

Resultats i discussió

Per tal de comparar les emulsions convencionals i les nanoemulsions s'han realitzat les mesures amb el mateix aparell, MasterSizer, i els resultats obtinguts en aquest cas són els següents:

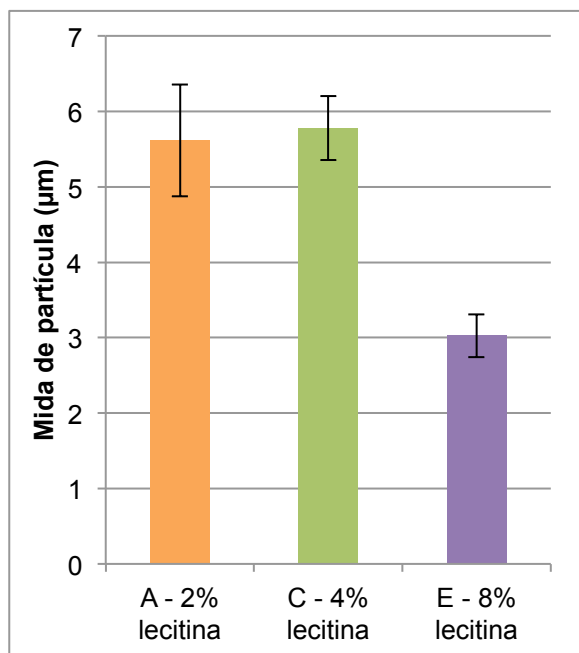


Figura 40: Mida de partícula de les emulsions convencionals el dia de la seva formació mesurades amb l'aparell Mastersizer

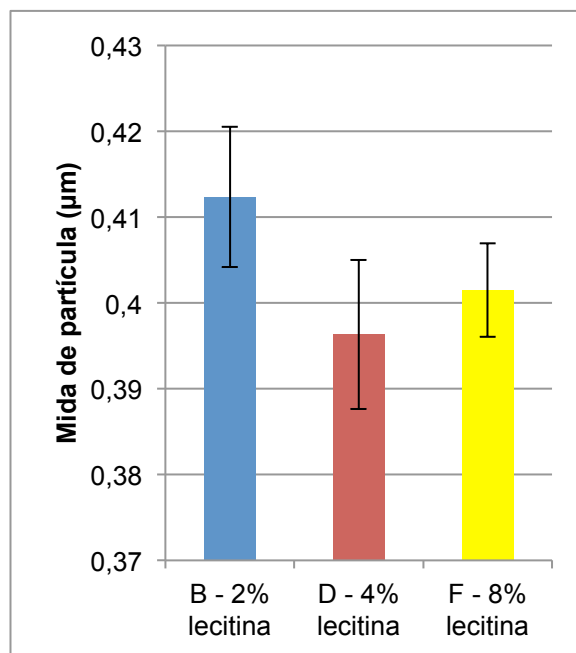


Figura 41: Mida de partícula de les nanoemulsions el dia de la seva formació mesurades amb l'aparell Mastersizer

La mida de partícula de les emulsions convencionals varia dels 3,02 µm als 5,78 µm. En la figura 40, es veu que en el gràfic destaca més l'emulsió convencional E ja que es troba molt per davall de les altres dos, que tenen un resultat molt similar i, en la figura 41, la nanoemulsió B destaca més que la D i F, que tenen un resultat molt semblant. S'observa clarament que l'emulsió convencional amb la mida de partícula més petita és l'E mentre que en les nanoemulsions només es pot deduir que la que té la mida superior és la B.

S'ha pogut observar que l'aparell Mastersizer té menys precisió per a mostres a amb una mida de partícula més petit ja que, tot i que guarda la mateixa relació amb la lecitina, la mida de partícula ha augmentat molt significativament en les nanoemulsions, uns 200 nm aproximadament.

Els resultat també s'han representat en un gràfic (Figures 42 i 43) que ens mostra la concentració de les partícules de diferents mides ja que el percentatge de mida de partícula també indica estabilitat.

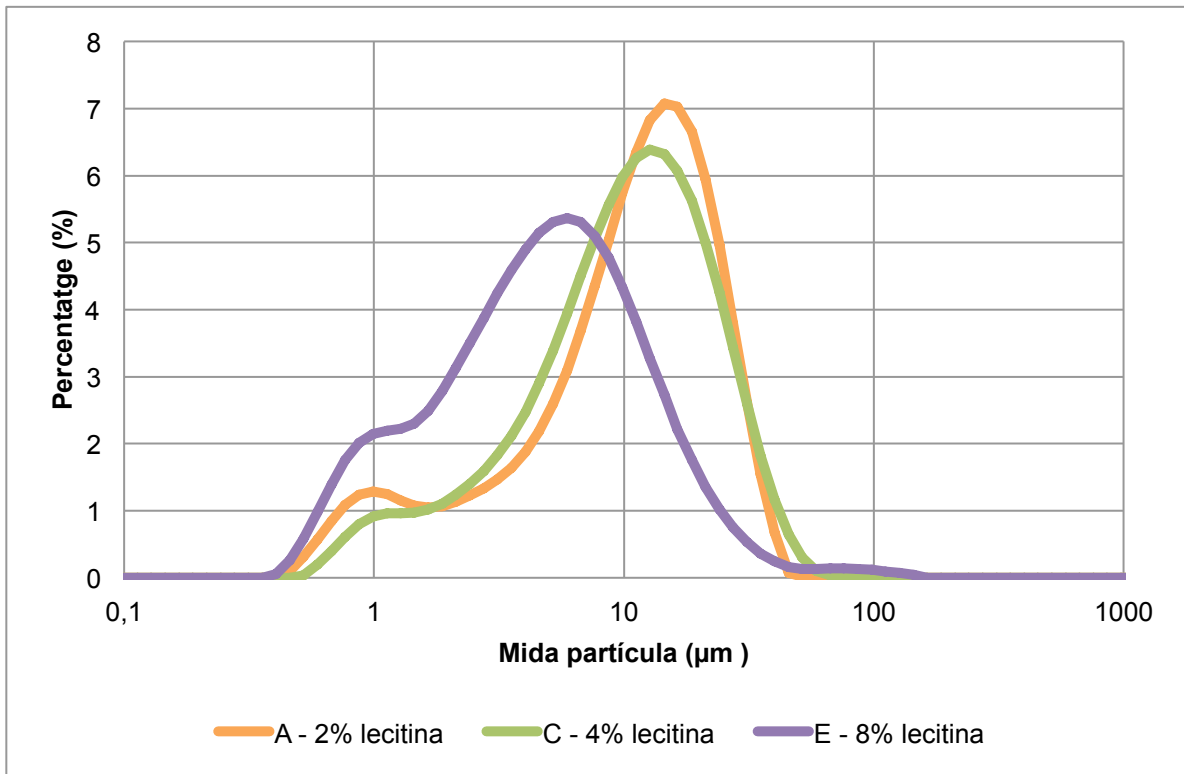


Figura 42: Distribució de la mida de partícula de les emulsions convencionals el dia 0

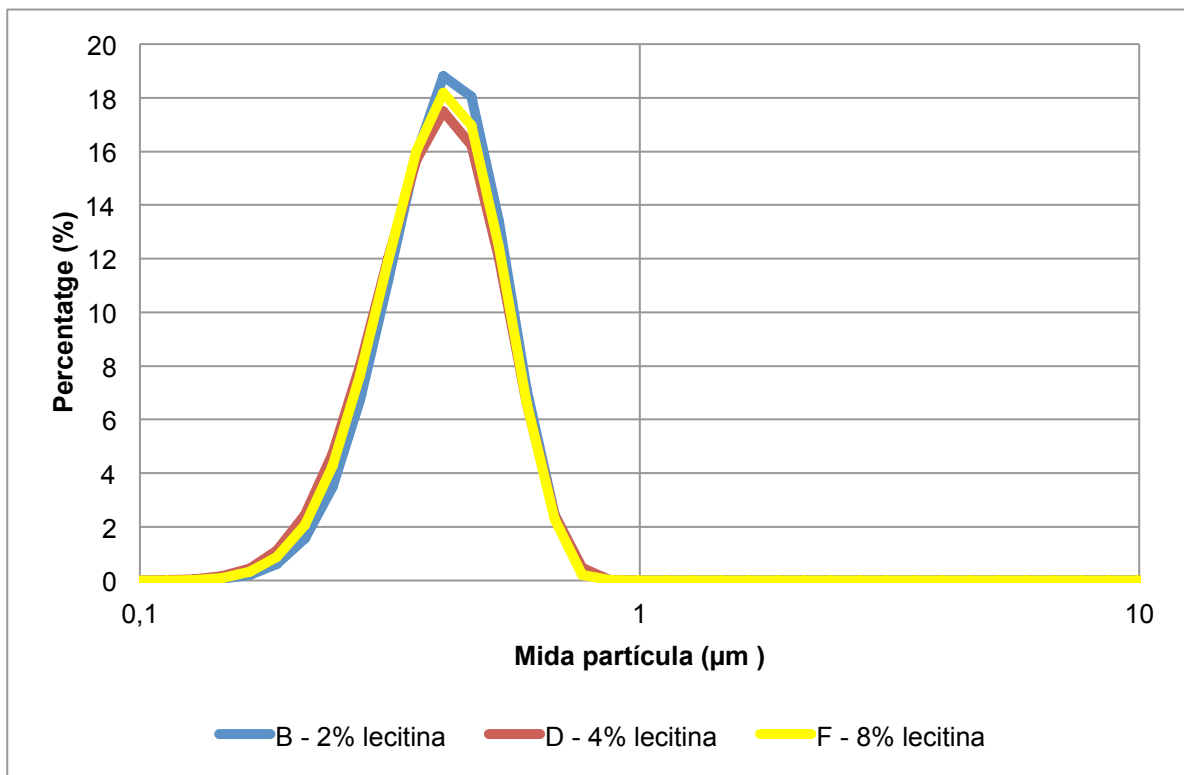


Figura 43: Distribució de la mida de partícula de les nanoemulsions el dia 0

En aquests gràfics s'observa l'homogeneïtat de les nanoemulsions en comparació amb les emulsions convencionals ja que aquestes tenen un elevat percentatge de partícules amb la mateixa mida, s'observa un únic pic, mentre que el rang de mida de partícula de les emulsions convencionals és més ampli i variat.

En la figura 42 s'observa que, tot i que per definició l'emulsió menys homogènia és la E, també és la que té la mida de partícula més petita. En el cas de les emulsions A i C es pot esmentar que, tot i tenint una mitjana de mida de partícula similars, l'A és més estable el primer dia per la seva concentració de partícules de la mateixa mida.

Tot i que en el segon gràfic els resultats són molt similars degut a la poca precisió de l'equip, es pot distingir que la nanoemulsió B (2% de lecitina) també té un percentatge de partícules amb la mateixa mida més alt i per tant, és més homogènia. D'altra banda, no es pot comparar els resultats ja que són molt semblants i l'error d'aquest equip a l'hora de mesurar partícules a escala nanomètrica pot ser significatiu.

A partir d'aquí podem arribar a la conclusió que la concentració de lecitina sí pot tenir una relació inversa amb la distribució de la mida de la partícula de les emulsions convencionals ja que a major concentració de lecitina, major és el rang de mida de partícula i per tant, més heterogènia és la mostra. El grau d'homogeneïtat de les mostres podria ser un bon indicador per l'estabilitat de la mostra ja que al tenir la mateixa mida no hi hauria el mateix perill a sofrir mecanismes d'instabilitat.

1.2. Potencial Zeta

Amb l'equip ZetasizerNanoZS es van obtenir els resultats següents del Potencial Zeta:

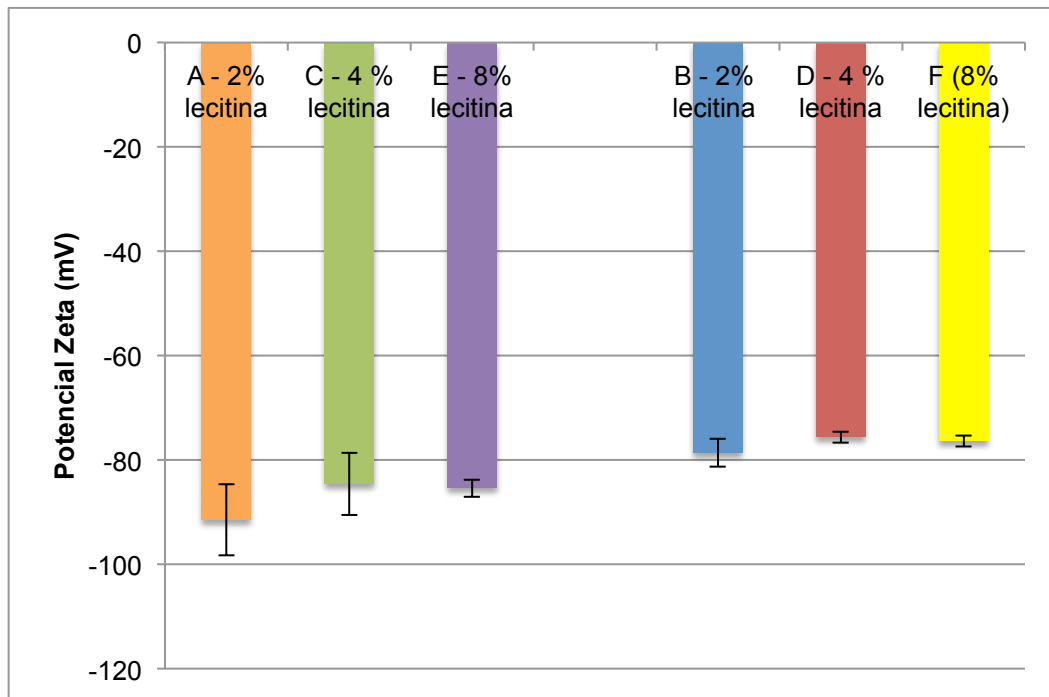


Figura 44: Potencial Zeta de cada emulsió el dia 0 (esquerra emulsions convencionals, A-C-E, i dreta nanoemulsions, B-D-F)

Com s'ha esmentat anteriorment, per a que una emulsió es consideri estable, el seu valor de Potencial Zeta ha de ser o major a +30 mV o inferior a -30mV. Per tant, podem considerar que totes les emulsions són estables ja que els valors obtinguts oscil·len entre -75,65 mV i -91,43 mV.

Els valors són molt similars entre totes les emulsions, les convencionals tenen valors més baixos tot i que no es pot considerar que siguin significatius ja que el seu error és més gran que el de les nanoemulsions. Tampoc es pot relacionar el percentatge de lecitina amb els valors obtinguts.

1.3. Índex de blancor

A partir dels resultats obtinguts amb el colorímetre, es va calcular l'índex de blancor del dia d'elaboració de les emulsions (Figura 45).

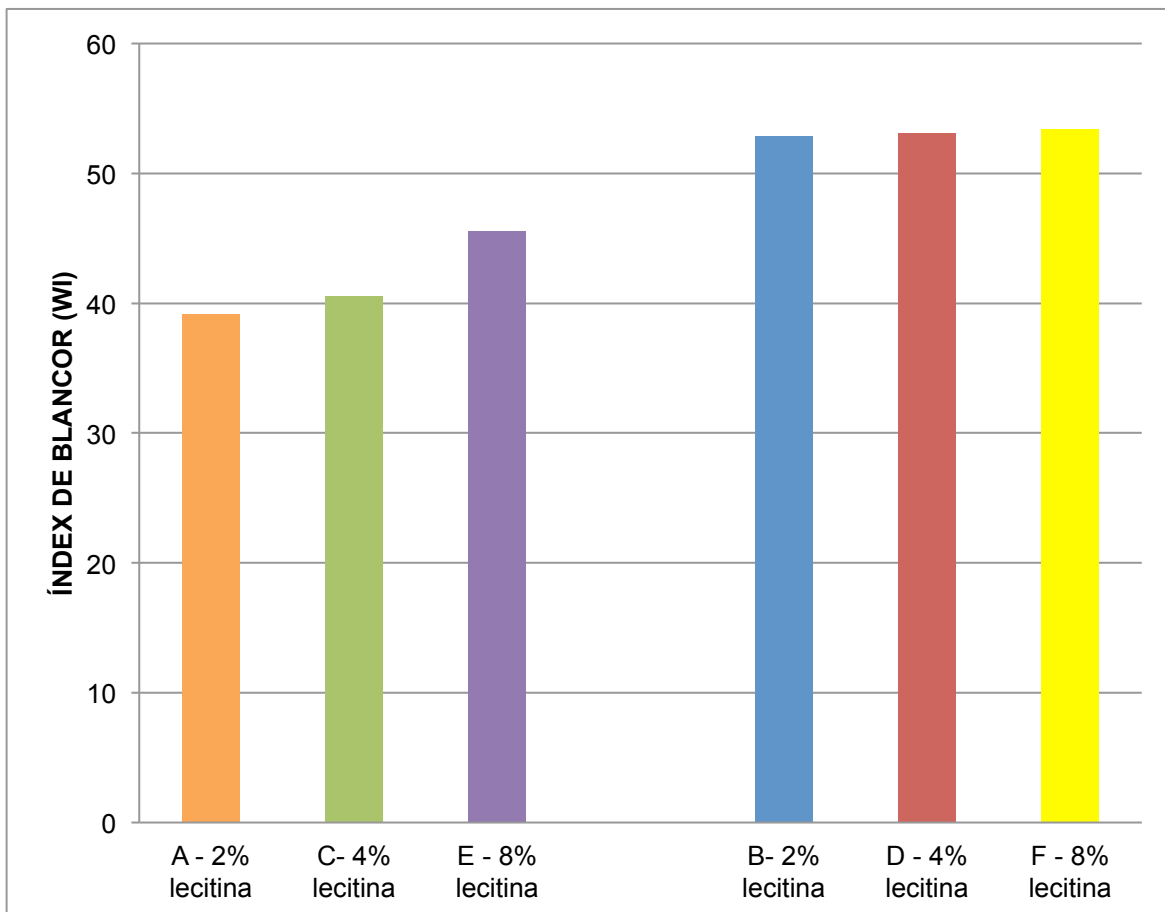


Figura 45: Índex de blancor inicial de totes les emulsions (esquerra emulsions convencionals i dreta nanoemulsions)

Com s'ha explicat anteriorment, l'índex de blancor és un paràmetre colorimètric amb valors del 0 al 100 que permet conèixer l'opacitat de l'emulsió, de manera que a major índex de blancor, major opacitat presenta l'emulsió i més blanca és.

Normalment, les partícules que són més grans dispersen més la llum que les partícules amb mides més petites i presenten un índex de blancor més alt mentre que mostres amb nanopartícules tendeixen a ser més transparents perquè no dispersen tant la llum per la seva mida de partícula.

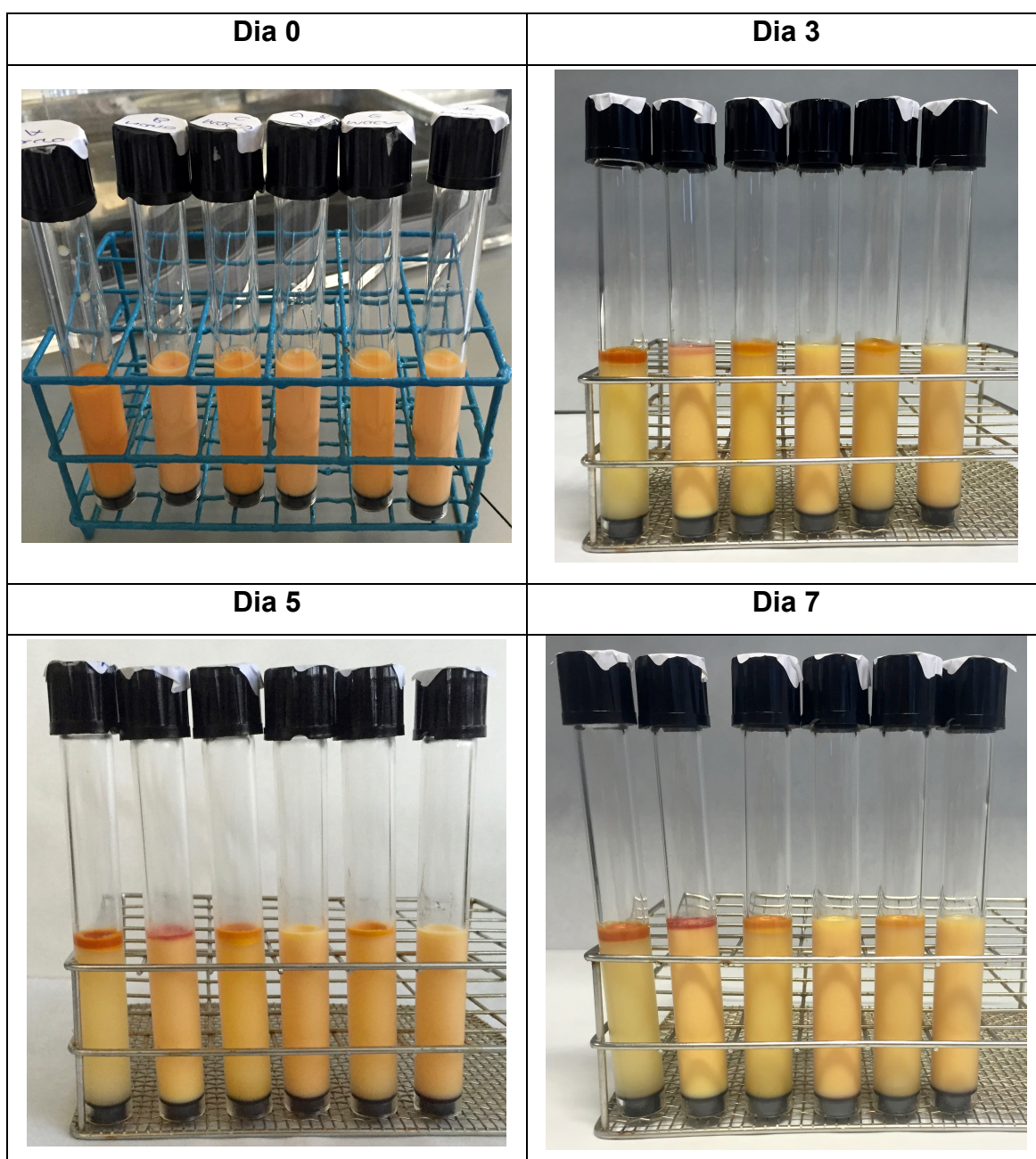
En aquest estudi, s'ha observat que el β -carotè ha alterat el color de les mostres (*com. pers*) ja que, tot i que les nanoemulsions són menys vermelles que les emulsions convencionals (fet que les faria més idònies per ser incorporades en aliments ja que no alterarien el producte visualment) la seva opacitat és major i per tant, són més blanques i alterarien igualment el producte.

Per això, s'ha deduït que aquest paràmetre no es pot aplicar per diferenciar les emulsions convencionals de les nanoemulsions i que, per tant, no se'n poden treure unes conclusions definitives en aquest aspecte. Tot i així si que podem relacionar l'índex de blancor amb el percentatge de lecitina ja que quan la lecitina augmenta també ho fa el WI de les mostres, tant en les emulsions convencionals com en les nanoemulsions (en aquestes últimes no s'aprecia tant la diferència).

2. Estabilitat de les emulsions

2.1. Estabilitat física de les emulsions

Per tal d'avaluar l'estabilitat de forma visual, es van fer fotografies de les mostres durant 21 dies (Figura 46).



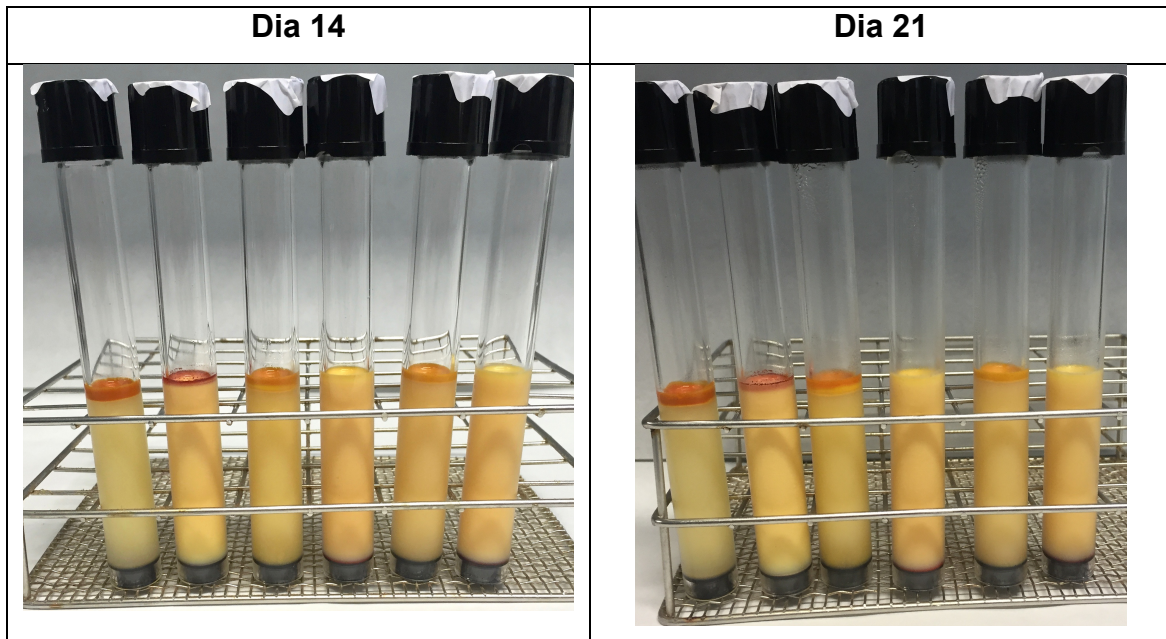


Figura 46: Imatges de totes les emulsions al llarg de 21 dies. De esquerra a dreta en totes les imatges: A i B (2% lecitina), C i D (4% lecitina) i E i F (8% lecitina). A, C i E són emulsions convencionals i B, D i F nanoemulsions .

Es va observar que, com s'havia demostrat anteriorment, les nanoemulsions el primer dia són més blanquinoses que no pas les emulsions convencionals. També s'ha pogut concloure que, existeix una relació directa entre la concentració de lecitina i l'índex de blancor.

A partir del dia 3 les nanoemulsions es distingeixen clarament de les emulsions convencionals ja que aquestes primeres no pateixen cremat ni sedimentació (separació dels components de l'emulsió basada en la densitat de les gotes). En les emulsions convencionals s'observa més separació de fases en l'A (2% de lecitina) mentre que en l'E (8% de lecitina) la separació quasi és invisible.

A partir del dia 5 es percep que, a part de que la separació de fases en les emulsions convencionals va augmentant, la nanoemulsió B (2% de lecitina) també comença a patir-ne.

A partir del dia 5 fins al 21 es veu que la separació de fases de les emulsions convencionals s'accelera i el color del cremat cada cop és més vermell i la fase aquosa cada cop més translúcida. L'emulsió B es distingeix d'aquestes perquè el seu cremat es manté constant i no pateix canvis de color.

Resultats i discussió

La pèrdua de color de les nanoemulsions del dia 0 al 3 ens pot indicar que potser han patit algun tipus de mecanisme d'inestabilitat, com coalescència, difícils de distingir a simple vista.

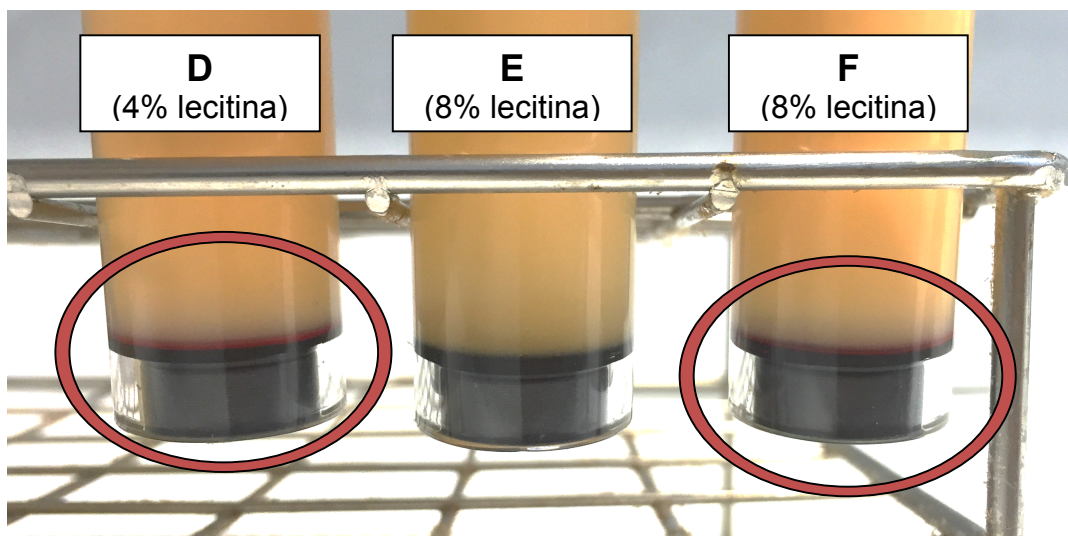


Figura 47: Separació de fases de les mostres D i F el dia 14

A partir del dia 14 (Figura 47) apareix per primer cop una fina capa de sedimentació en les nanoemulsions D (4% de lecitina) i F (8% de lecitina). Es distingeix que, en la nanoemulsió F la separació de fases és mínima, per tant, es dedueix que a major concentració de lecitina menor és la separació de fases.

Tot i que aquesta inestabilitat sorgeix després dels 14 dies de formació de les nanoemulsions, no s'observa que s'hagi incrementat el dia 21.

2.2. Estabilitat del component bioactiu

2.2.1. Estabilitat del color

S'ha analitzat el paràmetre a^* de les mostres amb el colorímetre durant 21 dies (Figures 48 i 49) ja que els valors positius d'aquest ens indica la intensitat en que es troba el color vermell en les mostres i per tant, una reducció d'aquest paràmetre indicaria una possible degradació del component bioactius, β -carotè, el qual aporta color vermell a les emulsions.

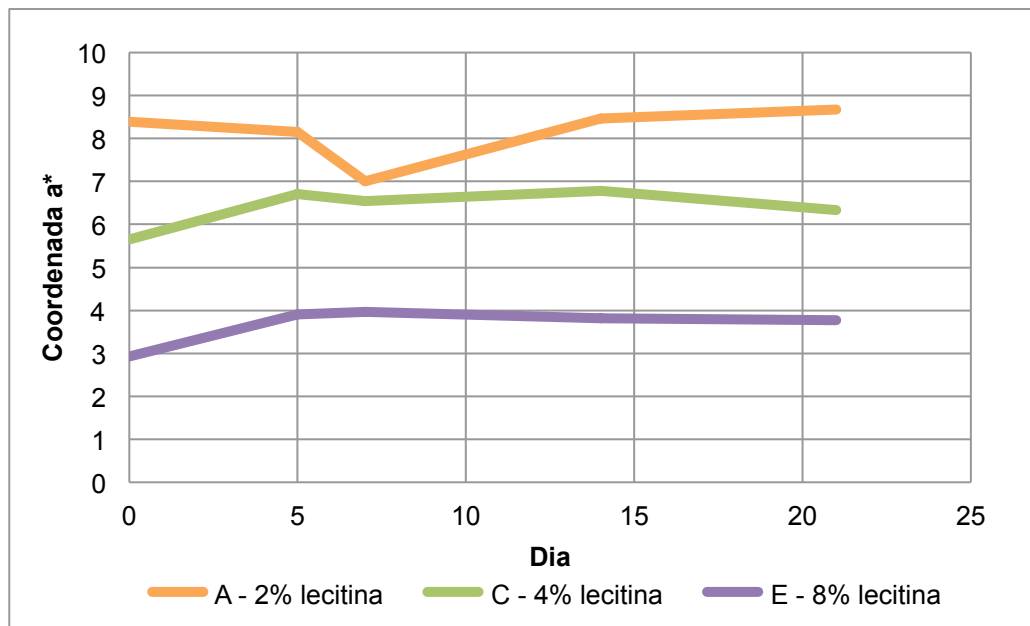


Figura 48: Paràmetre a^* de les emulsions convencionals durant 21 dies

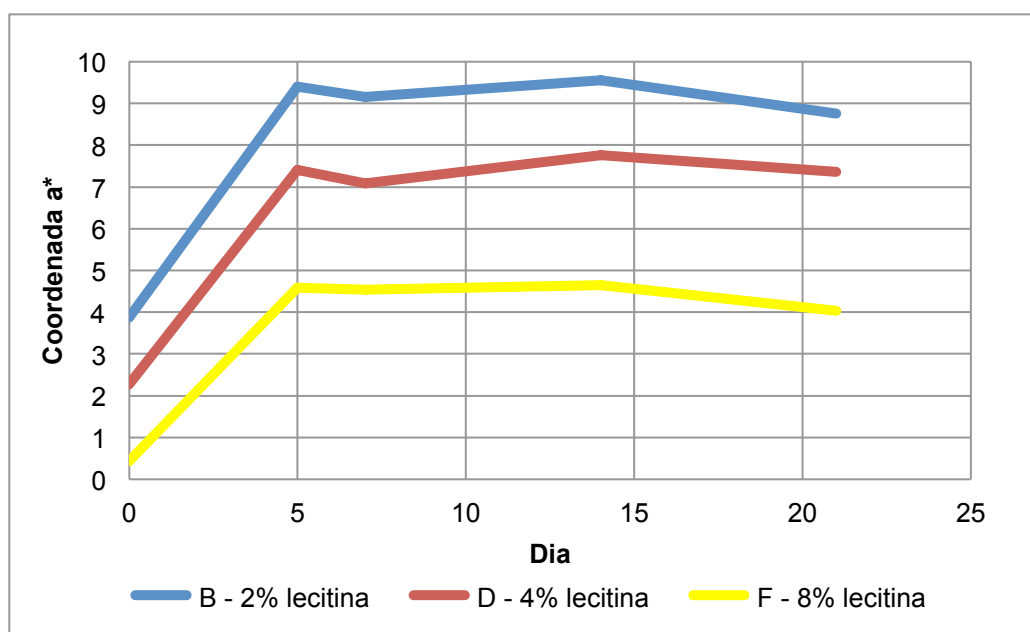


Figura 49: Paràmetre a^* de les nanoemulsions durant 21 dies

Resultats i discussió

Observant els resultats i les imatges de l'apartat dels resultats "2.1. Estabilitat física de les emulsions" es pot deduir que el dia 0 va haver-hi errors en algunes de les mesures ja que els valors són baixos respecte als altres dies. Encara que visualment es veu que la intensitat del vermell disminueix, també podem deduir l'error perquè l'únic component que influeix en el vermell de l'emulsió és el β -carotè i aquest només es va afegir el dia de la formació de les mostres.

Deixant de banda el dia 0, es percep que totes les emulsions són estables en contingut de component bioactiu en el temps tot i que disminueixen lleugerament del dia 14 al 21 encara que aquesta no variï més de 0,79 punts, que és el cas de la nanoemulsió B (2% de lécitina).

Tot i que no s'observin diferències entre emulsions i nanoemulsions o entre concentracions de lécitina a l'hora d'analitzar l'estabilitat del component bioactiu al llarg del temps, es pot destacar la relació entre la concentració de lécitina i els valors de la coordenada a^* . La coordenada a^* augmenta quan el percentatge de lécitina disminueix, per tant, a major concentració de lécitina menor és el valor de la coordenada a^* i menys vermella és la mostra, com també s'ha demostrat visualment a l'anterior apartat.

2.2.2. Contingut de component bioactiu

A partir dels resultats obtinguts mitjançant el espectrofotòmetre, es va considerar el dia 0 com el dia on el β -carotè es trobava en la seva màxima concentració, 100%, i es va fer els percentatges del dia 7, 14 i 21 (Figura 50).

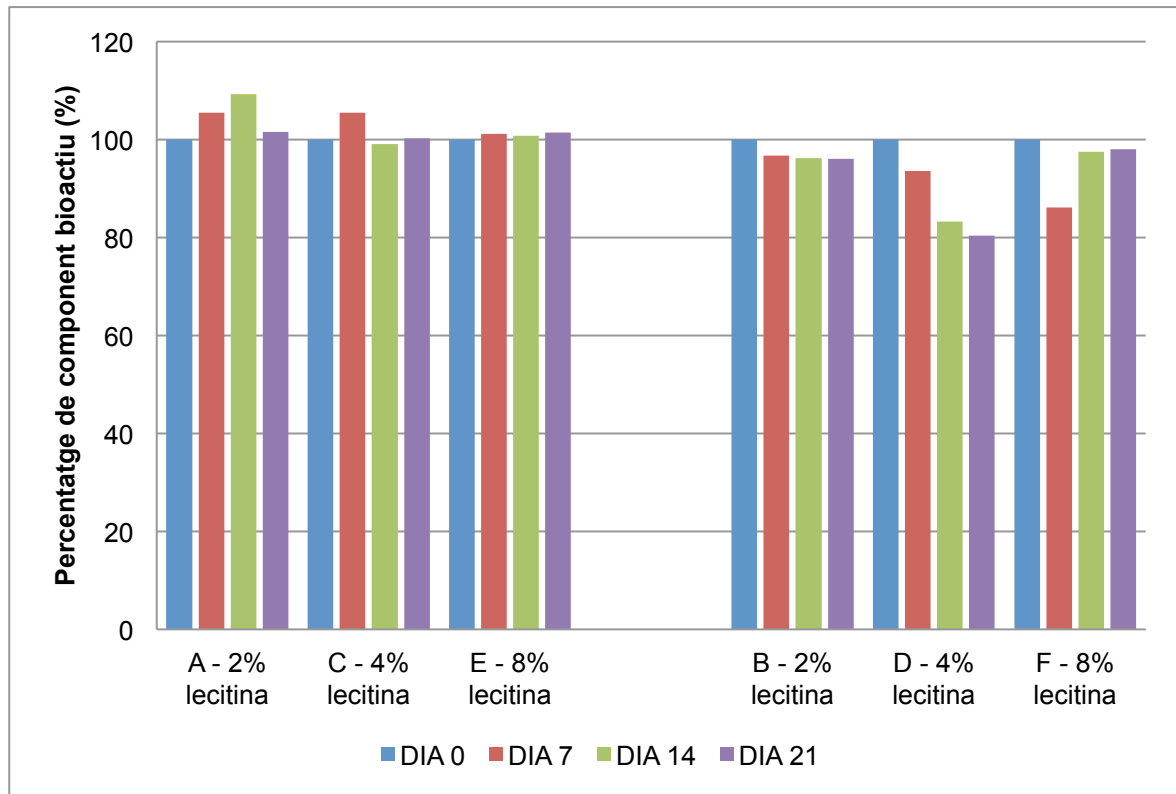


Figura 50: Contingut de β -carotè en les emulsions durant 21 dies (esquerra emulsions convencionals i dreta nanoemulsions)

Els resultats obtinguts en aquest apartat són confusos ja que en algunes mostres (el cas més visual és el de la mostra A) els resultats donen superior a 100%. Això és degut a que per arribar a ficar les mostres en l'espectrofotòmetre s'ha hagut de seguir un procés llarg i que consta de 5 passos per tal de separar el component bioactiu de la mostra i això pot donar lloc error.

Deixant de banda la mostra A, les emulsions convencionals es mantenen bastant semblants durant els 21 dies que va durar l'experiment perquè totes les mostres es mantenen estables al voltant del 100% encara que visualment són molt més inestables que les mostres a escala nanomètrica .

Resultats i discussió

En les nanoemulsions s'observa que la mostra F (8% de lecitina), que el dia 7 ha patit una baixada del 13,82% (un possible error de mesura), és la més estable durant les 21 perquè només ha baixat un 1,89% en contingut de β -carotè juntament amb la mostra B, que ha baixat un 3,92%. En canvi, la mostra D ha sofert una baixada d'un 19,6%.

El que destaca d'aquests resultats és que, en comparació amb els resultats obtinguts de l'estabilitat de l'emulsió, la mostra D hagi perdut tant component bioactiu en comparació amb les altres mostres ja que visualment és una de les mostres que més estables es mantenen durant els 21 dies.

Tot i que en els resultats obtinguts poden haver-hi errors, el percentatge de component bioactiu que s'ha degradat és molt poc significatiu en quasi totes les emulsions. Per això, es necessitaria més temps per poder comprovar realment quina és l'emulsió que realment protegeix millor el β -carotè evitant la seva degradació.

Conclusions

- I. Les nanoemulsions presenten una mida de partícula de valors nanomètrics, una mida molt menor a la de les emulsions convencionals.
- II. Les nanoemulsions són més homogènies que les convencionals el primer dia a causa de la seva distribució de la mida de partícula, el que les fa més estables.
- III. La lecitina té una relació inversa amb el grau d'homogeneïtzació en les emulsions convencionals.
- IV. El Potencial Zeta de totes les emulsions, nanoemulsions i emulsions convencionals, és inferior a -30mV i per tant, totes són estables el primer dia.
- V. El β -carotè és capaç d'alterar les mostres fent que les nanoemulsions siguin més opaques quan les seves partícules haurien de dispersar més la llum i per tant, ser més transparents.
- VI. Existeix una relació directa entre el percentatge de lecitina i l'índex de blancor.
- VII. Visualment, les emulsions convencionals són molt menys estables que les nanoemulsions ja que aquestes primeres ja pateixen separació de fases a partir del tercer dia.
- VIII. La lecitina augmenta el grau d'estabilitat de les emulsions ja que les emulsions amb un percentatge més alt de lecitina són les que tarden més en patir separació de fases.

Conclusions

- IX. L'emulsió més estable visualment és la nanoemulsió amb més percentatge de lecitina (8%) ja que no presenta cap mecanisme d'inestabilitat a simple vista fins el dia 14.
- X. La lecitina afecta en les mostres disminuint el grau de vermellor (coordenada a^*)
- XI. Les mostres es mantenen estables en la coordenada a^* del colorímetre fins el dia 21, quan pateixen una baixada, que indica una disminució del β -carotè.
- XII. Les emulsions amb major concentració de lecitina són les que pateixen una pèrdua de β -carotè més lleu tot i que es requeriria més temps en l'estudi per comprovar-ho.
- XIII. A partir del dia 21 les mostres comencen a perdre una quantitat significativa de component bioactiu.

Propostes de millora

Un cop realitzada la part pràctica del treball des d'un punt de vista objectiu i veient els resultats obtinguts s'ha vist que es podrien haver seguit diferents procediments per millorar-lo o per aconseguir més dades comparatives amb les que s'haguessin obtingut més conclusions.

El dia de la formació de les nanoemulsions se'n podrien haver fet diferents tipus, i apart de les que només contenen lecitina, també es podrien haver creat nanoemulsions amb diferents biopolímers com la pectina i l'alginat. Aquestes dues substàncies són polisacàrids que en presència d'aigua es converteixen en gel i donen estabilitat a la nanoemulsió alhora que també l'espesseixen. Així es podria haver comparat com afecten aquests a les nanoemulsions respecte a les que només tenen lecitina ja que les nanoemulsions amb biopolímers haurien de ser més estables en el temps i per tant, millor en la futura incorporació d'aquestes emulsions en aliments.

Durant el procés de caracterització inicial es podria haver mesurat la viscositat (la resistència que ofereixen tots els fluids i alguns sòlids al moviment relatiu de les seves partícules, és a dir, a canviar la seva forma sota l'acció d'algunes forces) amb l'equip SV - 10 Vibro-viscosímetre ja que la viscositat de la nanoemulsió influeix en la velocitat en la que les molècules de surfactant es mouen des de la fase orgànica a la fase aquosa. Per tant, quan la viscositat disminueix, les molècules de surfactant es poden moure més ràpidament i, per tant, es produeixen gotes de mida més petita.

Tot i que ja s'ha observat l'estabilitat al llarg del temps mitjançant el paràmetre a^* del colorímetre i de forma visual, es podria haver analitzat mitjançant l'aparell anomenat Turbiscan. Aquest equip disposa d'un capçal òptic amb una font de llum infraroja i dos detectors que recorren l'alçada de la mostra que es troba en el tub. A partir d'aquesta mesura, s'obté com a resultat uns perfils que ens permeten detectar els principals mecanismes d'inestabilitat.

Propostes de millora

Com que l'estabilitat del component bioactiu és similar per les nanoemulsions i les emulsions convencionals, potser es podria haver allargat el temps de l'estudi per detectar si realment pot arribar a haver-hi diferències significatives entre emulsions convencionals i nanoemulsions o entre diferents concentracions de lecitina.

A la vista dels resultats obtinguts, seria convenient obrir noves línies de investigació (possiblement ja es porten en pràctica) destinades a la incorporació de les nanoemulsions més òptimes (4% i 8% de lecitina) en diferents tipus d'aliments.

Per tal de trobar l'aliment més adequat per la incorporació d'aquestes nanoemulsions s'hauria de:

- Estudiar com afecta la incorporació de la nanoemulsió nutricionalment a l'aliment i analitzar l'estabilitat del component bioactiu en el temps.
- Avaluar els paràmetres d'estabilitat de la nanoemulsió incorporada en l'aliment.
- Observar visualment l'evolució de les diferents mostres d'aliments en el temps.

Bibliografia

1. Agència de Salut Pública de Catalunya (ASPCAT). (n.d.). *La piràmide de l'alimentació saludable*.
Web:http://salutpublica.gencat.cat/ca/promocio_salut/alimentacio_saludable/la-piramide-de-lalimentacio-saludable
2. Álvarez, N.S., i Bague, A.J. (2011). Los alimentos funcionales: Una oportunidad para una mejor salud. Madrid: AMV EDICIONES.
3. Aranceta, J., i Amarilla, N. (2011). Alimentación y derecho. Aspectos legales y nutricionales de la alimentación. Madrid: Panamericana.
4. Aranceta, J., Blay, G., Echevarría, F., Gil, I., Hernández, M., Iglesias, J., i López, M. (2011). Guía de buena práctica en Alimentos funcionales.
Web:https://www.cgcom.es/sites/default/files/gbpc_alimentos_funcionales.pdf
5. Barberá, J.M., i Marcos, A. (2007). Alimentos funcionales. Aproximación a una nueva alimentación. Madrid: INUTCAM.
6. Carbajal, Á. (2013). Manual de nutrición y dietética. Madrid: Universidad Complutense de Madrid
7. Chanco, M. A. (2015). Estudi de l'estabilitat i funcionalitat de nanoemulsions enriquides amb components bioactius. Lleida: Universitat de Lleida
8. Consorci d'Atenció Primària de Salut Barcelona Esquerra (CAPSBE). (n.d) L'alimentació equilibrada.
Web:http://www.caplescorts.cat/media/upload/pdf/alimentacio_equilibrada_editora_6_9_1.pdf

9. de las Cagigas, A.L., i Anesto, J. B. (2002). Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana Aliment Nutr*, 16(1), 63-68.
10. Domingo, P. A. S. (2002). Nanociencia y nanotecnología: Aspectos generales. *Encuentros Multidisciplinares*, 4(12), 2-14.
11. Euroresidentes.com. (n.d.). *Nanotecnología*.
Web: <https://www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologia/nanotecnologia.htm>
12. Febles, C., Soto, C., Saldaña, A., i García, B. E. (2002). Funciones de la vitamina E: Actualización. *Revista Cubana De Estomatología*, 39(1), 28-32.
13. Forgiarini, A., Marquez, L. i Salager, J. (2006). Nanoemulsiones.
Web: <http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S237A.pdf>
14. Hernández, M.C. (2009). Encapsulación en nanoemulsiones de extractos de *equisetum arvense*. Ciutat de Mèxic: Universitat Autònoma Metropolitana.
15. Hernández, C. (2004). Formación de nanoemulsiones o/w mediante el cambio en la composición-formulación por dilución con agua de sistemas próximos a la formulación óptima. Mérida: Universidad De Los Andes.
16. Konica Minolta. (2014) Entendiendo El Espacio de Color CIE L*A*B*.
Web: <http://sensing.konicaminolta.com.mx/2014/09/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab/>
17. iesmat.com. (n.d.). *Potencial Z*.
Web: <https://www.iesmat.com/tecnologias-potencialz.htm>
18. Mendoza, Y. (1999). Sustancias bioactivas en alimentos. Zaragoza: Universidad de Zaragoza.

19. Naudí, R. (2008) Utilització de l'extracte vegetal, Boswellia Serrata gum, en formulacions cosmètiques. Vilanova i la Geltrú: Universitat Politècnica de Catalunya.
20. Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.
21. *Universidad de Almería*. (2011) *Presentación Servicio Agua MilliQ - Servicios Centrales de Investigación*
Web: <http://cms.ual.es/UAL/universidad/serviciosgenerales/stecnicos/Pagina/SCI2070>
22. Ventura, H. (2012). Nanotecnologia il·limitada. *ELISAVA Temes de disseny*, 28, 67-75.
23. Vidal, M., Mariné, A., Veciana, T., Bover, S. i Serra, J. (n.d.). *Aliments i Salut*.
Web: <http://www.cus-usuaris.org/ais/foradubtes/foradubtes03.html>

Annexos

TABLA DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS

Valor calórico y nutricional por 100 g de producto

Aceites y grasas

Macronutrientes		Fuente	Porción comestible	kcal Energía*	g Proteínas	g Carbohidratos	g Fibra alimentaria	g Lípidos
Cod.	Nombre del alimento							
N (No disponible)								
TR (Valor traza)								
0 (Valor cero)								
* 1 kcal=4,18 kJ								
267	Aceite de cacahuete	3	1	900	0	0	0	100
268	Aceite de girasol	3	1	900	0	0	0	100
269	Aceite de maíz	3/16	1	900	0	0	0	100
270	Aceite de oliva	3	1	900	0	0	0	100
271	Aceite de soja	3	1	900	0	0	0	100
272	Manteca	-	1	670	10	N	0	70
273	Mantequilla	-	1	752	0,7	0,6	0	83
274	Margarina vegetal	-	1	752	N	0,4	0	83,5

TABLA DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS

Valor calórico y nutricional por 100 g de producto

Aceites y grasas

Ácidos grasos		g Ác. G. Saturados	g C 14:0	g C 16:0	g C 18:0	g Ác. G. Monoinsaturados	g C 16:1	g C 18:1	g Ác. G. Poliinsaturados	g C 18:2	g C 18:3	mg Colesterol	g Etanol
Cod.	Nombre del alimento												
N (No disponible)													
TR (Valor traza)													
0 (Valor cero)													
* 1 kcal=4,18 kJ													
267	Aceite de cacahuete	18,3	0,02	10	2,8	49	0,2	47,5	27,8	27,6	0,1	0	-
268	Aceite de girasol	9	N	5,2	3,3	20	0,6	19	62,8	62,8	N	0	-
269	Aceite de maíz	12,9	0	10,25	2,15	28,45	0,5	28,45	53,18	52,25	0,93	0	-
270	Aceite de oliva	14	N	10,8	2,8	72	1,05	70,4	9,2	8,6	0,6	0	-
271	Aceite de soja	14,3	0,15	10,2	3,7	22	0,3	21,8	55	48,5	6,4	0	-
272	Manteca	24,6	1,35	16,4	6,8	29	2,1	26,95	10,2	9	1,2	100	-
273	Mantequilla	48,3	9,6	26	10	23,4	2,9	20,5	1,9	1,1	0,8	250	-
274	Margarina vegetal	14,3	0,08	7,4	5,9	25,3	N	25,2	39,3	39,2	0,08	0	-

TABLA DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS

Valor calórico y nutricional por 100 g de producto

Aceites y grasas

Vitaminas N (No disponible) TR (Valor traza) 0 (Valor cero) * 1 kcal=4,18 kJ		Vit. A (retinol)	Vit. D	Vit. E (α-tocoferol)	Vit. C	Vit B ₁ (Tiamina)	Vit B ₂ (Riboflavina)	Niacina	Vit B ₆ (Pirodoxina)	Vit B ₁₂ (Cianocobalamina)	Ác. fólico
Cod.	Nombre del alimento	µgeq	µg	µgeq	mg	µg	µg	mg	µg	µg	µg
267	Aceite de cacahuete	N	0	22,5	0	0	0	0	0	0	0
268	Aceite de girasol	N	0	N	0	0	0	0	0	0	0
269	Aceite de maíz	N	0	22,5	0	0	0	0	0	0	0
270	Aceite de oliva	N	0	22,5	0	0	0	0	0	0	0
271	Aceite de soja	N	0	N	0	0	0	0	0	0	0
272	Manteca	N	N	N	N	0,5	0,2	0,3	N	0	0
273	Mantequilla	N	3	1,5	N	N	0,01	0,1	0,15	0	0
274	Margarina vegetal	600	N	20	N	N	N	N	N	N	N

TABLA DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS

Valor calórico y nutricional por 100 g de producto

Aceites y grasas

Minerales N (No disponible) TR (Valor traza) 0 (Valor cero) * 1 kcal=4,18 kJ		Sodio	Potasio	Calcio	Magnesio	Hierro	Zinc	Fósforo	Iodo	Flúor	Cobre	Selenio
Cod.	Nombre del alimento	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	µg	µg	µg	µg
267	Aceite de cacahuete	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	N
268	Aceite de girasol	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	N
269	Aceite de maíz	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	N
270	Aceite de oliva	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	N
271	Aceite de soja	0	0	0	0	0	0	0	0	N	0	N
272	Manteca	N	N	5	N	1,5	N	70	N	1700	N	N
273	Mantequilla	22	12	12	1	0,18	0,002	15	6	150	N	N
274	Margarina vegetal	106	N	N	N	N	N	6	N	N	N	N