

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA



**DISEÑO, DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE
DIFERENTES SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA
PARA LA PROTECCIÓN Y VEHICULIZACIÓN DE ÁCIDOS
GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA-3 Y CURCUMINA**

Memoria presentada por

José Antonio Vellido Pérez

Para optar al grado Internacional de

Doctor en Química por la Universidad de Granada

Granada, a 13 de Mayo de 2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: José Antonio Vellido Pérez
ISBN: 978-84-1306-934-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/69654>

Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a los dos contratos predoctorales concedidos –Programa “Contratos Predoctorales 2016” del Plan Propio de Investigación de la Universidad de Granada y Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Ref.: FPU17/03005)–; a la financiación concedida mediante el Programa “Proyectos de Investigación Precompetitivos para Jóvenes Investigadores 2018. Modalidad B – Estudiantes de Doctorado” del Plan Propio de Investigación de la Universidad de Granada, a través del proyecto “Diseño y desarrollo de estructuras oleogelificadas estables para la vehiculización y protección de la curcumina” (PPJIB2018-24) y a la financiación con cargo a fondos del Grupo de Investigación TEP-025 “Tecnología de Procesos Químicos y Bioquímicos” del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada.

*“Existen, en efecto, dos cosas: saber y creer que uno sabe.
El saber es la ciencia. Creer que uno sabe es ignorancia”*

HIPÓCRATES (460 a. C. – 370 a. C.)

*“La ciencia se compone de errores que, a su vez, son los pasos
hacia la verdad”*

JULIO VERNE (1838 – 1905)

AGRADECIMIENTOS

Llegados a este punto en el que comienza a verse la luz al final del largo y duro camino que debe recorrerse para poder concluir con éxito una Tesis Doctoral, resulta inevitable volverse, echar la vista atrás, y hacer el necesario balance de todo el esfuerzo y tiempo invertido para hacerla realidad, así como no podría ser menos, de todas aquellas personas y entidades que de una u otra forma han puesto su “granito de arena” y han sido parte indispensable de esta Tesis: me gustaría dejar constancia de todas ellas y agradecerles sinceramente su participación y su ayuda siempre tan valiosa.

En primer lugar, me gustaría expresar mi agradecimiento con mayúsculas al profesor D. Antonio Martínez Férez, por haberme brindado esta gran oportunidad en el momento adecuado, por tu apoyo constante durante todo este tiempo y por tu entusiasmo en compartir y discutir conmigo tus extensos conocimientos científicos y tu experiencia en el área de la ingeniería química. Este agradecimiento también lo hago extensivo a D. Edmundo Brito de la Fuente, por el tiempo que has dedicado a la dirección de la Tesis. Asimismo, me gustaría mostrar mi más sincera gratitud al resto de profesores de la Universidad de Granada y a todos aquellos que en algún momento pasasteis por mi vida. De todos vosotros he aprendido algo y os debo una parte de lo que hoy soy, pues me visteis y ayudasteis a crecer como persona y como profesional.

Por supuesto, no puedo ni debo olvidarme mencionar en estos agradecimientos al profesor D. Ángel Delgado Mora, del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada, por tu amabilidad, interés y colaboración en el desarrollo de esta Tesis al permitirme utilizar el Mastersizer 2000 y el Zetasizer Nano ZS, y al Grupo de “Ingeniería de Fluidos Complejos” (TEP-185) del Departamento de Ingeniería Química, Química Física y Ciencias de los Materiales de la Universidad de Huelva, y especialmente a su investigador responsable, el profesor D. José María Franco Gómez, al que me gustaría agradecer que me haya recibido en su Grupo de Investigación y me haya permitido realizar una estancia tan breve y, a la vez, tan fructífera.

Mi recuerdo también, en este momento, a mis “compañeros de fatigas” Javi Rodríguez, Carlos Rodríguez y José Antonio Morales, que habéis hecho que el camino resultase algo más liviano entre marcha y marcha de Semana Santa: vosotros bien sabéis que sin vuestra colaboración en el trabajo diario de laboratorio (nunca nadie limpiará una cubeta tan rápido y tan bien como vosotros), vuestro tiempo, disposición y buen hacer, realizar esta Tesis hubiera sido mucho más difícil. Y gracias también a mi vecino de laboratorio, compañero y amigo, Emilio Lozano, por tu sencillez y alegría cada mañana, que entre risa y risa hacías el día a día un poco más amable.

Al resto os doy las gracias por el apoyo moral, siempre estáis ahí y ya sabéis lo que ha significado vuestra ayuda en esta etapa, pero me reitero en agradecimientos:

A todos mis amigos (Ana, Laura, Cano, Francisco, Daniel, Víctor, Paco, Sandra, Roberto, Eugenia, Alba, Móni, Aida, Gema, Noe, María Jesús,... y todos aquellos que no cito pero que sabéis que os llevo en mi corazón), por vuestros ánimos en los inevitables momentos difíciles y todo lo que hemos compartido juntos. Vosotros me habéis soportado y me habéis motivado cuando lo necesitaba, me habéis acompañado durante todo este recorrido y me habéis hecho confiar en que era posible realizarlo.

A mis padres, José y Encarnita, por todo lo que habéis dado por mí a lo largo de vuestras vidas, por la educación, los consejos y el cariño que siempre he recibido, y por ser para mí un ejemplo diario de trabajo, respeto, honestidad, paciencia, nobleza y tantas otras muchas cosas más que no cabrían en unas cuantas palabras. Porque sin vosotros, esta Tesis no hubiese sido posible.

Al resto de mi familia, los que siempre estáis ahí y los que ya nos dejasteis, gracias por vuestro cariño y apoyo en todo momento, estando siempre a mi lado cuando lo he necesitado, por todo lo que me habéis enseñado en la vida y por todo lo que hemos disfrutado juntos. Y a ti, mi querida María José, que aunque no compartamos lazos sanguíneos, sabes que formas parte inseparable de mi vida y tu apoyo siempre es importante para mí.

Y, sobre todo, gracias a Dios, presente en el Santísimo Sacramento del Altar, por haberme regalado esta preciosa vida, por estar a mi lado en todo momento, por darme su aliento por medio de tanta gente maravillosa y por haber tejido perfectamente todos y cada uno de los hilos para permitirme cumplir otra meta más en mi vida académica y profesional. A Ti te lo debo todo: mi pasado, mi presente y mi vida.

DEDICATORIA

*A mis sueños, a mis padres y a todos
aquellos que creyeron en mí*

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	17
LISTA DE FIGURAS	23
LISTA DE TABLAS	37
LISTA DE ABREVIATURAS	41
LISTA DE SÍMBOLOS.....	45
RESUMEN	47
SUMMARY	57
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	65
1.1. LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA-3: LOS ÁCIDOS EICOSAPENTAENOICO Y DOCOSAHEXAENOICO	74
1.1.1. Consideraciones generales sobre el EPA y el DHA.....	75
1.1.2. Evidencias científicas de su bioactividad in vitro e in vivo	79
1.1.3. Principales limitaciones tecnológicas.....	84
1.2. LOS CURCUMINOIDES: LA CURCUMINA	89
1.2.1. Consideraciones generales sobre la curcumina	90
1.2.2. Evidencias científicas de su bioactividad in vitro e in vivo	92
1.2.3. Principales limitaciones tecnológicas.....	98
1.3. EVIDENCIAS CIENTÍFICAS DE LA ACCIÓN SINÉRGICA DE LOS PUFAS Ω -3 Y LA CURCUMINA <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	105
1.4. OPCIONES TECNOLÓGICAS PARA LA ENCAPSULACIÓN, PROTECCIÓN, VEHICULIZACIÓN Y LIBERACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS LIPOFÍLICOS POR VÍA ORAL	109
1.4.1. Sistemas de liberación basados en oleogeles.....	110
1.4.1.1. Definición y características técnicas.....	111
1.4.1.2. Clasificación	113
1.4.1.3. Principales ventajas e inconvenientes.....	114
1.4.1.4. Estudios previos en PUFAs ω -3 y curcumina	115

1.4.2. <i>Emulsion-based delivery systems</i>	120
1.4.2.1. Definition and technical characteristics	120
1.4.2.2. Classification.....	124
1.4.2.2.1. Conventional emulsions.....	126
1.4.2.2.2. Multiple emulsions	127
1.4.2.3. Main advantages and limitations.....	130
1.4.2.4. Overview of emulsion stability and destabilization processes in PUFAs-BLEs	132
1.4.2.4.1. Gravitational separation (creaming and sedimentation)	135
1.4.2.4.2. Flocculation	137
1.4.2.4.3. Coalescence	141
1.4.2.4.4. Ostwald ripening.....	143
1.4.2.4.5. Phase inversion	145
1.4.2.4.6. Specific destabilization mechanisms of multiple emulsions.....	145
1.4.2.5. Prevention of lipid oxidation in PUFAs-BLEs	155
1.4.2.6. Previous studies on ω -3 PUFAs and curcumin.....	166
1.4.2.7. Research derived publications	177
CAPÍTULO II. OBJETIVOS.....	231
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	235
3.1. MATERIALES.....	237
3.1.1. <i>Equipamiento</i>	237
3.1.2. <i>Fase acuosa</i>	240
3.1.3. <i>Emulgentes</i>	240
3.1.4. <i>Estabilizante</i>	241
3.1.5. <i>Fase oleosa</i>	241
3.1.6. <i>Gelificante</i>	242
3.1.7. <i>Antioxidante</i>	242
3.1.8. <i>Reactivos y productos químicos</i>	242
3.2. MÉTODOS	247
3.2.1. <i>Carga superficial de la goma xantana</i>	247
3.2.2. <i>Preparación de los diferentes sistemas de liberación estudiados</i>	247
3.2.2.1. <i>Oleogeles</i>	247
3.2.2.2. <i>Emulsiones W/Og</i>	248
3.2.2.2.1. <i>Mediante homogenización a alta velocidad</i>	248
3.2.2.2.2. <i>Mediante homogenización a alta presión</i>	249
3.2.2.3. <i>Emulsiones Og/W</i>	250
3.2.2.3.1. <i>Mediante homogenización a alta velocidad</i>	250
3.2.2.3.2. <i>Mediante homogenización a alta presión</i>	251
3.2.2.4. <i>Emulsiones W₁/Og/W₂</i>	251
3.2.2.4.1. <i>Emulsión primaria W₁/Og</i>	252
3.2.2.4.2. <i>Emulsión múltiple W₁/Og/W₂</i>	252
3.2.3. <i>Estudios de estabilidad frente a diferentes condiciones ambientales</i>	253
3.2.3.1. <i>pH</i>	253
3.2.3.2. <i>Fuerza iónica</i>	253
3.2.3.3. <i>Luz</i>	254
3.2.3.4. <i>Temperatura</i>	254

3.2.4. Caracterización de los diferentes sistemas de liberación estudiados.....	254
3.2.4.1. Conductividad eléctrica	255
3.2.4.1.1. Calibración del equipo.....	255
3.2.4.1.2. Proceso de medida	256
3.2.4.2. pH	257
3.2.4.2.1. Calibración del equipo.....	257
3.2.4.2.2. Proceso de medida	258
3.2.4.3. Potencial zeta	259
3.2.4.4. Tamaño de gota y distribución de tamaños de gota.....	264
3.2.4.4.1. Microscopía y análisis de imágenes	264
3.2.4.4.2. Difracción láser.....	266
3.2.4.5. Oxidación lipídica.....	268
3.2.4.5.1. Método del índice de peróxidos.....	269
3.2.4.5.2. Método del índice de <i>p</i> -anisidina	270
3.2.4.5.3. Método Rancimat®	271
3.2.4.6. Cuantificación de curcumina	273
3.2.4.6.1. Espectroscopía UV-Visible	273
3.2.4.6.2. Espectroscopía de fluorescencia.....	275
3.2.4.6.3. Cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem	276
3.2.4.7. Reología.....	278
3.2.5. Ensayos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad	286
3.2.5.1. Descripción general del equipo	287
3.2.5.2. Descripción general del ensayo	290
3.2.5.2.1. Simulación de la fase oral.....	291
3.2.5.2.2. Simulación de la fase gástrica	292
3.2.5.2.3. Simulación de la fase duodenal	292
3.2.5.2.4. Simulación de la fase de absorción intestinal	293
3.2.5.3. Descripción del protocolo de limpieza de la membrana.....	295
3.2.6. Análisis de los resultados	297
3.2.6.1. Diseño estadístico de experimentos.....	297
3.2.6.1.1. Diseños centrales compuestos	301
3.2.6.1.2. Diseño compuesto reducido de Draper-Lin.....	303
3.2.6.1.3. Diseño de Box-Behnken	304
3.2.6.2. Análisis estadístico	305
3.2.6.3. Optimización experimental.....	305
3.2.6.3.1. Metodología de superficie de respuesta.....	306
3.2.6.3.2. Metodología de superficie multi-respuesta.....	309

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 313

4.1. DISEÑO, DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN BASADO EN OLEOGELES RICO EN PUFAS Ω -3 Y CURCUMINA.....	315
4.1.1. Diseño de experimentos.....	315
4.1.2. Efecto de las variables de operación sobre la estabilidad oxidativa.....	318
4.1.3. Efecto de las variables de operación sobre la capacidad de retención de curcumina.....	348
4.1.4. Optimización multivariable de la composición y las condiciones de operación del sistema oleogelificado	353
4.1.5. Estudio reológico del oleogel óptimo.....	357

4.1.6. Estudios de estabilidad de la curcumina incorporada al oleogel óptimo con la luz y la temperatura.....	362
4.1.7. Conclusiones.....	366
4.1.8. Publicaciones derivadas de la investigación.....	369
4.2. DISEÑO, DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN BASADO EN EMULSIONES W/OG RICO EN PUFAS Ω -3 Y CURCUMINA	377
4.2.1. Diseño de experimentos	377
4.2.2. Efecto de las variables de operación sobre la estabilidad física	379
4.2.3. Efecto de las variables de operación sobre la estabilidad oxidativa	386
4.2.4. Efecto de las variables de operación sobre la capacidad de retención de curcumina	406
4.2.5. Optimización multivariable de la composición y las condiciones de operación del sistema emulsificado.....	410
4.2.6. Conclusiones.....	413
4.3. DISEÑO, DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN BASADO EN EMULSIONES OG/W RICO EN PUFAS Ω -3 Y CURCUMINA	415
4.3.1. Diseño de experimentos	415
4.3.2. Estudio y optimización de una emulsión Og/W preparada mediante homogenización a alta velocidad de cizalla.....	419
4.3.2.1. Efecto de las variables de operación sobre la estabilidad física	419
4.3.2.2. Efecto de las variables de operación sobre la estabilidad oxidativa ..	430
4.3.2.3. Efecto de las variables de operación sobre la capacidad de retención de curcumina.....	442
4.3.2.4. Optimización multivariable de la composición y las condiciones de operación del sistema emulsificado	449
4.3.3. Estudio y optimización de una emulsión Og/W preparada mediante homogenización a alta presión.....	452
4.3.3.1. Efecto de las variables de operación sobre la estabilidad física	452
4.3.3.2. Efecto de las variables de operación sobre la estabilidad oxidativa ..	461
4.3.3.3. Efecto de las variables de operación sobre la capacidad de retención de curcumina.....	471
4.3.3.4. Optimización multivariable de la composición y las condiciones de operación del sistema emulsificado	478
4.3.4. Estudio reológico de la emulsión Og/W óptima.....	481
4.3.5. Estudios de estabilidad de la emulsión Og/W óptima con el pH, la fuerza iónica y la temperatura.....	485
4.3.6. Estudios de estabilidad de la curcumina vehiculizada con la luz y la temperatura.....	489
4.3.7. Conclusiones.....	492
4.3.8. Publicaciones derivadas de la investigación.....	495
4.4. DISEÑO, DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN BASADO EN EMULSIONES W ₁ /OG/W ₂ RICO EN PUFAS Ω -3 Y CURCUMINA.....	531
4.4.1. Diseño de experimentos	531
4.4.2. Efecto de las variables de operación sobre la estabilidad física	535
4.4.3. Efecto de las variables de operación sobre la estabilidad oxidativa	546
4.4.4. Efecto de las variables de operación sobre la capacidad de retención de curcumina	560

4.4.5. Optimización multivariable de la composición y las condiciones de operación del sistema emulsificado	566
4.4.6. Estudio reológico de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima.....	569
4.4.7. Estudios de estabilidad de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima con el pH, la fuerza iónica y la temperatura	574
4.4.8. Estudios de estabilidad de la curcumina encapsulada con la luz y la temperatura	578
4.4.9. Conclusiones	581
4.5. LA BIOACCESIBILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD COMO VARIABLES DE DISEÑO EN EL DESARROLLO DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN RICOS EN PUFAS Ω -3 Y CURCUMINA	585
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	593
CHAPTER V. CONCLUSIONS	599
ANEXOS	605
ANEXO 1	607
BIBLIOGRAFÍA.....	613

Lista de figuras

Figura 1. Evolución del número de publicaciones indexadas con el término ‘functional foods’ en dos bases de datos científicas diferentes – Periodo 1994-2019.	69
Figura 2. Estructuras químicas del a) EPA y b) DHA.....	76
Figura 3. Contenido medio de ALA, EPA y DHA de pescados y mariscos (Shahidi & Ambigaipalan, 2018).....	77
Figura 4. Porcentaje medio de EPA y DHA de pescados y mariscos con respecto al total de ácidos grasos.	78
Figura 5. Reacciones del mecanismo de autooxidación de los lípidos (Shahidi & Zhong, 2010).....	86
Figura 6. Rutas para la descomposición de los hidroperóxidos y la formación de productos de oxidación secundarios (Shahidi & Zhong, 2010).....	87
Figura 7. Evolución hipotética de los productos de la oxidación lipídica con el tiempo.	88
Figura 8. Estructuras químicas de la a) curcumina, b) demetoxicurcumina y c) bisdemetoxicurcumina.	89
Figura 9. Equilibrio ceto-enólico de la curcumina.	91
Figura 10. Principales usos medicinales de la curcumina (Prasad et al., 2014a).	93
Figura 11. Productos de degradación de la curcumina en medios acuosos neutros y básicos (Wang et al., 1997).....	99
Figura 12. Productos de degradación de la curcumina a altas temperaturas (Esatbeyoglu et al., 2015).	100
Figura 13. Hipotético mecanismo de reacción propuesto para la degradación de la curcumina por vía oxidativa (Gordon et al., 2015).....	102
Figura 14. Principales productos de degradación y metabolitos de la curcumina.	103

Figura 15. Representación esquemática para explicar mecanísticamente los efectos antiinflamatorios y antioxidantes sinérgicos al combinar curcumina con EPA o DHA. (+) denota estimulación, (-) denota inhibición, (↑) denota aumento y (↔) denota interacción entre la curcumina y el EPA o el DHA (Saw et al., 2010).....	105
Figura 16. Representación esquemática de un oleogel.....	111
Figura 17. Representación esquemática de los diferentes sistemas de liberación derivados de los oleogeles (Okuro et al., 2020).	112
Figure 18. Schematic representation of an emulsion.....	121
Figure 19. Interfacial region or interface.	122
Figure 20. Scheme of the different types of emulsions according to the number of immiscible phases: a) conventional emulsions and b) multiple emulsions.	125
Figure 21. Representation of the two types of mentioned conventional emulsions: a) O/W emulsion and b) W/O emulsion.....	126
Figure 22. Representation of a) a micelle and b) a liposome.	127
Figure 23. Representation of the two types of mentioned multiple emulsions: a) W ₁ /O/W ₂ emulsion and b) O ₁ /W/O ₂ emulsion.....	128
Figure 24. Schematic representation of the main physical destabilization mechanisms presented in conventional emulsions.....	134
Figure 25. The flocculation depletion mechanism (Bengoechea-Ruiz, 2006).	139
Figure 26. Instability phenomena of conventional emulsions and multiple emulsions.	146
Figura 27. Estructuras químicas del a) Tween 20 y b) PGPR.	240
Figura 28. Representación de la doble capa eléctrica y el potencial zeta (Fernández Espín, 2018).....	260

Figura 29. Esquema del principio de funcionamiento de la microelectroforesis de efecto Doppler para la medida del potencial zeta (Albarrán Castro, 2011).	262
Figura 30. Imágenes de microscopía de fluorescencia y confocal de una emulsión W/Og conteniendo curcumina.	265
Figura 31. Esquema del principio de funcionamiento de la difracción láser para la medida del tamaño de gota y distribución de tamaños de gota (Kargar, 2014).	266
Figura 32. Reacción de los compuestos aldehídicos presentes en la muestra con la p-anisidina.	270
Figura 33. Representación esquemática del sistema Rancimat®	272
Figura 34. Esquema del principio de funcionamiento de un espectrofotómetro UV-Vis.	273
Figura 35. Curvas de fluidez típicas: (a) comportamiento dependiente del tiempo y (b) comportamiento independiente del tiempo.	280
Figura 36. Curva de viscosidad típica de un comportamiento pseudoplástico.	281
Figura 37. Espectro mecánico completo de un polímero de alto peso molecular no reticulado.....	284
Figura 38. Simulador dinámico in vitro del tracto gastrointestinal humano (SimuGIT).	286
Figura 39. Esquema del SimuGIT (Rivas-Montoya, 2014).	287
Figura 40. Simulación de la fase oral.	291
Figura 41. Simulación de la fase gástrica.	292
Figura 42. Simulación de la fase de absorción intestinal.	293
Figura 43. Interfaz de usuario del software del equipo (BioDigestor).	294
Figura 44. Equipo de membranas a escala de laboratorio para la limpieza de la membrana.....	296
Figura 45. Esquema de un proceso o sistema.....	298

Figura 46. Diseño central compuesto para 3 factores.	302
Figura 47. Diseño central compuesto centrado en las caras para 3 factores.....	302
Figura 48. Diseño de Box-Behnken para 3 factores.	304
Figura 49. Superficie de respuesta tridimensional y gráfico de contornos correspondiente.	307
Figura 50. Punto estacionario mínimo (izquierda), máximo (centro) y punto silla (derecha).	308
Figura 51. Tipos principales de deseabilidad individual para optimización de múltiples respuestas.....	311
Figura 52. Concentración de hidroperóxidos lipídicos a 23 y 40 °C en: a) día 3 y b) día 50.	321
Figura 53. Gráfica de residuos para la concentración de hidroperóxidos lipídicos a 23 °C.....	323
Figura 54. Superficie de respuesta estimada para la concentración de hidroperóxidos lipídicos a 23 °C.	324
Figura 55. Curvas de concentración de hidroperóxidos lipídicos totales a) a 23 °C y b) a 40 °C.....	328
Figura 56. Gráfica de residuos para la concentración de hidroperóxidos lipídicos totales a 40 °C.....	330
Figura 57. Superficie de respuesta estimada para la concentración de hidroperóxidos lipídicos totales a 40 °C.....	332
Figura 58. Curvas de concentración de compuestos aldehídicos totales a) a 23 °C y b) a 40 °C.....	335
Figura 59. Concentración de compuestos aldehídicos a 23 y 40 °C en dos momentos diferentes del estudio: a) día 3 y b) día 50.	336
Figura 60. Gráfica de residuos para la concentración de compuestos aldehídicos a 23 °C.....	341

Figura 61. Superficie de respuesta estimada para la concentración de compuestos aldehídicos a 23 °C.	343
Figura 62. Gráfica de residuos para la concentración de compuestos aldehídicos a 40 °C.	345
Figura 63. Superficie de respuesta estimada para la concentración de compuestos aldehídicos a 40 °C.	346
Figura 64. Capacidad de retención de curcumina de los diferentes sistemas de liberación durante el proceso de fabricación.	348
Figura 65. Gráfica de residuos para el % de curcumina retenida durante el proceso de fabricación.....	350
Figura 66. Superficie de respuesta estimada para el % de curcumina retenida durante el proceso de fabricación.	351
Figura 67. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada en los oleogeles almacenados a 23 °C.....	355
Figura 68. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada en los oleogeles almacenados a 40 °C.....	357
Figura 69. Curva de viscosidad del oleogel óptimo a 25 °C.	358
Figura 70. Barrido de esfuerzos del oleogel óptimo a 25 °C.	360
Figura 71. Espectro dinámico del oleogel óptimo a 25 °C.....	361
Figura 72. Tamaño medio de gota de las diferentes emulsiones W/Og inmediatamente después de su elaboración.	380
Figura 73. Gráfica de residuos para el tamaño medio de gota inicial de las emulsiones W/Og preparadas a alta velocidad.	382
Figura 74. Gráfica de efectos principales para el tamaño medio de gota inicial de las emulsiones W/Og preparadas a alta velocidad.	383
Figura 75. Superficie de respuesta estimada para el tamaño medio de gota inicial de las emulsiones W/Og preparadas a alta velocidad.	385

Figura 76. Concentración de hidroperóxidos lipídicos en función de la concentración de emulgente.....	389
Figura 77. Concentración de compuestos aldehídicos en función de la fracción de fase dispersa.....	390
Figura 78. Gráfica de residuos para la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.	392
Figura 79. Gráfica de efectos principales para la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.	393
Figura 80. Superficie de respuesta estimada para la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.	394
Figura 81. Gráfica de residuos para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.	396
Figura 82. Gráfica de efectos principales para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.....	397
Figura 83. Superficie de respuesta estimada para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.....	398
Figura 84. Gráfica de residuos para la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión.....	400
Figura 85. Diagrama de Pareto estandarizado para la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión.....	400
Figura 86. Superficie de respuesta estimada para la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión.....	402
Figura 87. Gráfica de residuos para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión.....	403
Figura 88. Superficie de respuesta estimada para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión.....	405
Figura 89. Capacidad de retención de curcumina de los diferentes sistemas de liberación 7 días después de su elaboración.....	406

Figura 90. Diagrama de Pareto estandarizado para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones W/Og preparadas a: a) alta velocidad y b) alta presión.....	408
Figura 91. Superficie de respuesta estimada para el % de curcumina retenida en las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad (a, b, c) y a alta presión (d, e, f).....	409
Figura 92. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada en las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.....	411
Figura 93. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada en las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión.....	413
Figura 94. Curvas de distribución de tamaños de gota de tres emulsiones Og/W, 30 días después de su elaboración.....	420
Figura 95. Tamaño de gota de las emulsiones Og/W, 30 días después de su elaboración, en función de: a) la fracción de fase dispersa, b) la concentración de emulgente, c) la concentración de estabilizante, y d) la velocidad de homogenización.....	422
Figura 96. Gráfica de residuos para el tamaño medio de gota de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.....	423
Figura 97. Diagrama de Pareto estandarizado para el tamaño medio de gota de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.....	425
Figura 98. Carga superficial de la XG en función del pH.....	429
Figura 99. Superficie de respuesta estimada para el tamaño medio de gota de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.....	430
Figura 100. Oxidación lipídica primaria de las emulsiones Og/W, 30 días después de su elaboración, en función de: a) la fracción de fase dispersa, b) la concentración de emulgente, c) la concentración de estabilizante, y d) la velocidad de homogenización.....	431
Figura 101. Oxidación lipídica secundaria de las emulsiones Og/W, 30 días después de su elaboración, en función de: a) la fracción de fase dispersa, b) la	

concentración de emulgente, c) la concentración de estabilizante, y d) la velocidad de homogenización.	432
Figura 102. Gráfica de residuos para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.	433
Figura 103. Gráfica de residuos para el porcentaje de aumento de compuestos aldehídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.	434
Figura 104. Diagrama de Pareto estandarizado para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.	434
Figura 105. Gráfica de efectos principales para el porcentaje de aumento de compuestos aldehídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.	437
Figura 106. Superficie de respuesta estimada para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.	441
Figura 107. Superficie de respuesta estimada para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.	442
Figura 108. Porcentaje de curcumina retenida en las emulsiones Og/W, 29 días después de su elaboración, en función de: a) la fracción de fase dispersa, b) la concentración de emulgente, c) la concentración de estabilizante, y d) la velocidad de homogenización.	443
Figura 109. Gráfica de residuos para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.	444
Figura 110. Diagrama de Pareto estandarizado para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.	445
Figura 111. Superficie de respuesta estimada para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.	448
Figura 112. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada del primer objetivo de optimización en las emulsiones Og/W homogenizadas a alta velocidad.	450

Figura 113. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada del segundo objetivo de optimización en las emulsiones Og/W homogenizadas a alta velocidad.	451
Figura 114. Curvas de distribución de tamaños de gota de diferentes emulsiones Og/W, 30 días después de su elaboración.	453
Figura 115. Tamaño de gota de las emulsiones Og/W, 30 días después de su elaboración, en función de: a) la fracción de fase dispersa, b) la concentración de emulgente, c) la concentración de estabilizante, y d) la presión de homogenización.....	455
Figura 116. Gráfica de residuos para el tamaño medio de gota de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.	456
Figura 117. Diagrama de Pareto estandarizado para el tamaño medio de gota de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.	458
Figura 118. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada en las emulsiones Og/W homogenizadas a alta presión.....	460
Figura 119. Oxidación lipídica primaria de las emulsiones Og/W, 29 días después de su elaboración, en función de: a) la fracción de fase dispersa, b) la concentración de emulgente, c) la concentración de estabilizante, y d) la presión de homogenización.....	461
Figura 120. Oxidación lipídica secundaria de las emulsiones Og/W, 29 días después de su elaboración, en función de: a) la fracción de fase dispersa, b) la concentración de emulgente, c) la concentración de estabilizante, y d) la presión de homogenización.....	462
Figura 121. Gráfica de residuos para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.	464
Figura 122. Gráfica de residuos para el porcentaje de aumento de compuestos aldehídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.....	464

Figura 123. Diagrama de Pareto estandarizado para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.	466
Figura 124. Gráfica de efectos principales para el porcentaje de aumento de compuestos aldehídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.	469
Figura 125. Superficie de respuesta estimada para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.	470
Figura 126. Superficie de respuesta estimada para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.	471
Figura 127. Porcentaje de curcumina retenida en las emulsiones Og/W, 30 días después de su elaboración, en función de: a) la fracción de fase dispersa, b) la concentración de emulgente, c) la concentración de estabilizante, y d) la presión de homogenización.	472
Figura 128. Gráfica de residuos para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.	473
Figura 129. Gráfica de efectos principales para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.	475
Figura 130. Superficie de respuesta estimada para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.	477
Figura 131. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada del primer objetivo de optimización en las emulsiones Og/W homogenizadas a alta presión.	479
Figura 132. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada del segundo objetivo de optimización en las emulsiones Og/W homogenizadas a alta presión.	480
Figura 133. Curva de viscosidad de la emulsión Og/W óptima a 25 °C.	481
Figura 134. Barrido de esfuerzos de la emulsión Og/W óptima a 25 °C.	483
Figura 135. Espectro dinámico de la emulsión Og/W óptima a 25 °C.	484

Figura 136. Evolución temporal de la moda de la distribución de tamaños de la emulsión Og/W óptima a distintos pH (entre 2 y 9).....	486
Figura 137. Evolución temporal de la moda de la distribución de tamaños de la emulsión Og/W óptima a diferentes concentraciones de electrolitos (de 0 a 1000 mM).	487
Figura 138. Evolución temporal de la moda de la distribución de tamaños de la emulsión Og/W óptima a dos temperaturas de almacenamiento diferentes (25 y 80 °C).....	488
Figura 139. Porcentaje de curcumina encapsulada en la emulsión Og/W óptima con el tiempo en presencia y en ausencia de luz.	490
Figura 140. Porcentaje de curcumina encapsulada en la emulsión Og/W óptima con el tiempo a dos temperaturas de almacenamiento diferentes (25 y 80 °C)....	491
Figura 141. Curvas de distribución de tamaños de gota de diferentes emulsiones $W_1/Og/W_2$, 30 días después de su elaboración.	536
Figura 142. Gráfica de residuos para el tamaño medio de gota de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.....	541
Figura 143. Gráfica de efectos principales para el tamaño medio de gota de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.....	543
Figura 144. Superficie de respuesta estimada para el tamaño medio de gota de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.....	546
Figura 145. Gráfica de residuos para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.....	549
Figura 146. Gráfica de efectos principales para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.	551
Figura 147. Superficie de respuesta estimada para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.	553

Figura 148. Gráfica de residuos para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.	556
Figura 149. Gráfica de efectos principales para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.	558
Figura 150. Superficie de respuesta estimada para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.	559
Figura 151. Capacidad de retención de curcumina de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad 30 días después de su elaboración.	560
Figura 152. Gráfica de residuos para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.	562
Figura 153. Diagrama de Pareto estandarizado para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.	564
Figura 154. Superficie de respuesta estimada para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.	565
Figura 155. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada del primer objetivo de optimización en las emulsiones $W_1/Og/W_2$ homogenizadas a alta velocidad.	567
Figura 156. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada del segundo objetivo de optimización en las emulsiones $W_1/Og/W_2$ homogenizadas a alta velocidad.	569
Figura 157. Curva de viscosidad de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima a 25 °C.	570
Figura 158. Barrido de esfuerzos de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima a 25 °C.	573
Figura 159. Espectro dinámico de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima a 25 °C.	574
Figura 160. Evolución temporal de la moda de la distribución de tamaños de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima a distintos pH (entre 2 y 9).	575
Figura 161. Evolución temporal de la moda de la distribución de tamaños de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima a diferentes concentraciones de electrolitos (de 0 a 1000 mM).	576

Figura 162. Evolución temporal de la moda de la distribución de tamaños de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima a dos temperaturas de almacenamiento diferentes (25 y 80 °C).....	577
Figura 163. Porcentaje de curcumina encapsulada en la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima con el tiempo en presencia y en ausencia de luz.	579
Figura 164. Porcentaje de curcumina encapsulada en la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima con el tiempo a dos temperaturas de almacenamiento diferentes (25 y 80 °C).580	
Figura 165. Condiciones químico-enzimáticas y tiempos de residencia en las diferentes etapas de la digestión.	586
Figura 166. Bioaccesibilidad de la curcumina vehiculizada en los distintos sistemas de liberación óptimos en las fases oral, gástrica e intestinal (residuo colónico).	588
Figura 167. Biodisponibilidad de la curcumina vehiculizada en los distintos sistemas de liberación óptimos a diferentes tiempos.	590
Figura 168. Ratio entre la cantidad de curcumina biodisponible y la bioaccesible en la fase gástrica en los distintos sistemas de liberación óptimos a diferentes tiempos.	591

Lista de tablas

Tabla 1.	Compuestos bioactivos más importantes y posibles efectos beneficiosos sobre la salud.....	71
Tabla 2.	Estudios previos acerca de sistemas de liberación basados en oleogeles para la encapsulación, protección, vehiculización y liberación de PUFAs ω -3 y curcumina.....	116
Table 3.	Types of emulsions according to the droplet size and main characteristics (Fernández-Arteaga, 2006).	124
Table 4.	Selection of some important studies on physical stability in PUFAs-BLEs.	148
Table 5.	Selection of some important studies on chemical stability in PUFAs-BLEs.	161
Table 6.	Previous studies on conventional emulsion-based delivery systems for encapsulation, protection, vehiculization and release of ω -3 PUFAs and curcumin.	167
Table 7.	Previous studies on multiple emulsion-based delivery systems for encapsulation, protection, vehiculization and release of ω -3 PUFAs and curcumin.	172
Tabla 8.	Perfil de ácidos grasos del aceite de pescado PronovaPure® 360:240 TG.	241
Tabla 9.	Matriz de experimentos del diseño de Box-Behnken para el oleogel.....	316
Tabla 10.	Concentración de hidroperóxidos lipídicos con el tiempo a 23 °C.....	318
Tabla 11.	Concentración de hidroperóxidos lipídicos con el tiempo a 40 °C.....	319
Tabla 12.	Análisis de la varianza (ANOVA) para la concentración de hidroperóxidos lipídicos a 23 °C.....	323
Tabla 13.	Análisis de la varianza (ANOVA) para la concentración de hidroperóxidos lipídicos totales a 40 °C.	331

Tabla 14.	Concentración de compuestos aldehídicos con el tiempo a 23 °C.....	333
Tabla 15.	Concentración de compuestos aldehídicos con el tiempo a 40 °C.....	334
Tabla 16.	Análisis de la varianza (ANOVA) para la concentración de compuestos aldehídicos a 23 °C.....	342
Tabla 17.	Análisis de la varianza (ANOVA) para la concentración de compuestos aldehídicos a 40 °C.....	345
Tabla 18.	Análisis de la varianza (ANOVA) para el % de curcumina retenida durante el proceso de elaboración.	350
Tabla 19.	Conjunto de condiciones óptimas para los dos objetivos de optimización de los oleogeles almacenados a 40 °C.....	356
Tabla 20.	Concentración de curcumina en el oleogel con el tiempo en presencia y en ausencia de luz.....	363
Tabla 21.	Concentración de curcumina en el oleogel con el tiempo a dos temperaturas de almacenamiento diferentes: 25 y 80 °C.....	365
Tabla 22.	Matriz de experimentos del diseño central compuesto para la emulsión W/Og homogenizada a alta velocidad.....	378
Tabla 23.	Matriz de experimentos del diseño central compuesto para la emulsión W/Og homogenizada a alta presión.....	379
Tabla 24.	Análisis de la varianza (ANOVA) para el tamaño medio de gota inicial de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.....	382
Tabla 25.	Concentración de hidroperóxidos lipídicos a los 10 días de su elaboración.	387
Tabla 26.	Concentración de compuestos aldehídicos a los 10 días de su elaboración.	388
Tabla 27.	Análisis de la varianza (ANOVA) para la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.	393
Tabla 28.	Análisis de la varianza (ANOVA) para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.....	396

Tabla 29.	Análisis de la varianza (ANOVA) para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión.	404
Tabla 30.	Conjunto de condiciones óptimas para los dos objetivos de optimización de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión.	412
Tabla 31.	Matriz de experimentos del diseño de Box-Behnken para la emulsión Og/W preparada a alta velocidad.....	417
Tabla 32.	Matriz de experimentos del diseño de Box-Behnken para la emulsión Og/W preparada a alta presión.	418
Tabla 33.	Tamaño de gota y pH de las diferentes emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad, 30 y 28 días después de su elaboración.....	421
Tabla 34.	Análisis de la varianza (ANOVA) para el tamaño medio de gota de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.	424
Tabla 35.	Análisis de la varianza (ANOVA) para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.....	435
Tabla 36.	Análisis de la varianza (ANOVA) para el porcentaje de aumento de compuestos aldehídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.....	436
Tabla 37.	Análisis de la varianza (ANOVA) para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.	445
Tabla 38.	Tamaño de gota y pH de las diferentes emulsiones Og/W preparadas a alta presión, 30 y 28 días después de su elaboración.....	454
Tabla 39.	Análisis de la varianza (ANOVA) para el tamaño medio de gota de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.	457
Tabla 40.	Análisis de la varianza (ANOVA) para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.	465

Tabla 41.	Análisis de la varianza (ANOVA) para el porcentaje de aumento de compuestos aldehídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.	468
Tabla 42.	Análisis de la varianza (ANOVA) para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.	474
Tabla 43.	Variabes estadísticamente significativas sobre cada variable respuesta considerada en la emulsión Og/W preparada a alta velocidad.	493
Tabla 44.	Variabes estadísticamente significativas sobre cada variable respuesta considerada en la emulsión Og/W preparada a alta presión.	494
Tabla 45.	Matriz de experimentos del diseño compuesto reducido de Draper–Lin para la emulsión $W_1/Og/W_2$	533
Tabla 46.	Tamaño de gota y pH de las diferentes emulsiones $W_1/Og/W_2$, 30 y 29 días después de su elaboración.	538
Tabla 47.	Análisis de la varianza (ANOVA) para el tamaño medio de gota de las emulsiones $W_1/Og/W_2$	542
Tabla 48.	Evolución de la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ con el tiempo a 25 °C.	547
Tabla 49.	Análisis de la varianza (ANOVA) para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$	550
Tabla 50.	Evolución de la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ con el tiempo a 25 °C.	554
Tabla 51.	Análisis de la varianza (ANOVA) para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$	557
Tabla 52.	Análisis de la varianza (ANOVA) para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones $W_1/Og/W_2$	563
Tabla 53.	Conjunto de condiciones óptimas para los dos objetivos de optimización de las emulsiones $W_1/Og/W_2$	568
Tabla 54.	Variabes estadísticamente significativas sobre cada variable respuesta considerada en la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$	583

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALA	Ácido α -linolénico
ANOVA	Análisis de la varianza
AP-1	Proteína activadora 1
CAS	Caseinato de sodio
CCD	Diseño central compuesto
COX	Prostaglandina-endoperóxido sintasa
cPLA2	Fosfolipasa A2 citosólica
CSTR	Reactor tipo tanque agitado continuo
DAG	Diacilglicérido
DATEM	Ésteres monoacetil y diacetil tartáricos de monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos
DHA	Ácido docosahexaenoico
DIC	Microscopía diferencial de contraste de interferencia
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMBA	7,12-dimetil-1,2-benzantraceno
DOE	Diseño de experimentos
DPA	Ácido docosapentaenoico
DPH	<i>N</i> '1, <i>N</i> '6-bis(3-(1-pirrolil)propanoil) hexanodihidrazida
DSPE	1,2-diestearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina
DSR	Diseño de superficie de respuesta
DTAB	Bromuro de dodeciltrimetilamonio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético

EFA	Ácido graso esencial
EGR-1	Proteína de respuesta de crecimiento temprano 1
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ESI	Ionización por electronebulización
FA	Ácido graso
FADS2	Ácido graso desaturasa 2
f.e.m.	Fuerza electromotriz
GG	Goma guar
GIT	Tracto gastrointestinal
HDI	Diisocianato de hexametileno
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HLB	Balance hidrofílico-lipofílico
HO-1	Hemo oxigenasa-1
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IL	Interleuquina
IR	Radiación infrarroja
LA	Ácido linoleico
LBG	Goma garrofín
LD	Difracción láser
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LOX	Lipooxigenasa
MAG	Monoacilglicérido
MMP-9	Matrix metalopeptidasa 9
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MUFA	Ácido graso monoinsaturado

NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de las células B activadas
NLC	Transportadores lipídicos nanoestructurados
NOS	Óxido nítrico sintasa
OA	Ácido oleico
OSI	Índice de estabilidad oxidativa
O/W	Aceite-en-agua
Og/W	Oleogel-en-agua
O/W/O	Aceite-en-agua-en-aceite
<i>p</i>-AnV	Índice de <i>p</i> -anisidina
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Proteína C reactiva
PEG	Polietilenglicol
PFR	Reactor tubular de flujo pistón continuo
PGE2	Prostaglandina E2
PGPR	Polirricinoleato de poliglicerol
PID	Proporcional, integral y derivativo
PKC	Proteína quinasa C
PMT	Tubo fotomultiplicador
PUFA	Ácido graso poliinsaturado
PV	Índice de peróxidos
QqQ	Analizador de triple cuadrupolo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSM	Metodología de superficie de respuesta
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFA	Ácido graso saturado

SGF	Fluido gástrico simulado
SLN	Nanopartículas lipídicas sólidas
SLS	Dispersión de luz estática
SOP	Procedimiento operativo estándar
SRM	Modo de adquisición de la reacción seleccionada
SSF	Fluido salival simulado
TCM	Triglicéridos de cadena media
TG	Triglicérido
TNF	Factor de necrosis tumoral
UDP	Uridina difosfato
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta resolución
uPA	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa
UV	Radiación ultravioleta
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
W/O	Agua-en-aceite
W/Og	Agua-en-oleogel
W/O/W	Agua-en-aceite-en-agua
W/Og/W	Agua-en-oleogel-en-agua
WPC	Concentrado de proteína de suero
WPI	Aislado de proteína de suero
XG	Goma xantana
ω-3	Omega-3
ω-6	Omega-6
ω-9	Omega-9

Lista de símbolos

A	Absorbancia
b	Ancho de la cubeta
c	Concentración del compuesto de interés
D	Deseabilidad global
$d_{[1,0]}$	Diámetro medio
$d_{[4,3]}$	Diámetro volumétrico o diámetro medio de De Brouckere
d_i	Deseabilidad individual
d_{mode}	Moda de la distribución de tamaños
E	Campo eléctrico
$f(\kappa_{RH})$	Función de Henry
G'	Módulo elástico o de almacenamiento
G''	Módulo viscoso o de pérdida
G^*	Módulo complejo
I	Intensidad de la luz transmitida
I_0	Intensidad de la luz incidente
I_i	Coefficiente de impacto
K	Índice de consistencia de flujo
n	Índice de comportamiento de flujo o índice de Ostwald
n_i	Número de gotas de un determinado tamaño
p_{DW}	Valor p del estadístico de Durbin-Watson
p_{LOF}	Valor p de falta de ajuste
p_{MOD}	Valor p del modelo ajustado
R^2	Coefficiente de determinación

U	Uniformidad
v_m	Velocidad de las partículas
α	Distancia axial
$\dot{\gamma}$	Velocidad de deformación o gradiente de velocidad
$\tan \delta$	Tangente del ángulo de desfase o tangente de pérdidas
ε	Coefficiente de absorción molar / Constante dieléctrica
ζ	Potencial zeta
η	Viscosidad dinámica o newtoniana
η_0	Viscosidad inicial (a baja velocidad de deformación)
η_∞	Viscosidad límite (a alta velocidad de deformación)
η^*	Viscosidad compleja
λ	Constante de relajación
μ_E	Movilidad electroforética
σ	Conductividad eléctrica
τ	Esfuerzo cortante
ϕ	Fracción de fase dispersa

Resumen

En su concepción más básica y tradicional, la ingesta de alimentos persigue proporcionar al organismo la materia y la energía necesarias para el mantenimiento de sus funciones fisiológicas más elementales. Sin embargo, hoy en día el concepto de alimento en los países desarrollados ha experimentado un cambio radical y, más allá de su función nutritiva habitual, el consumidor persigue un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo, una mejora del estado de salud y bienestar y/o una reducción del riesgo de contraer enfermedad. Esta nueva concepción de la alimentación y su relación con la salud ha dado lugar al concepto de “alimento funcional”, cada vez más extendido y valorado por la población, abriendo un potencial y suculento nicho de mercado para la industria alimentaria. De entre todos los ingredientes funcionales, los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (PUFAs ω -3) y la curcumina ocupan una posición preeminente y son el objeto principal de estudio del presente trabajo de investigación.

Los PUFAs ω -3 –especialmente el EPA y el DHA– son ácidos grasos esenciales que desempeñan un papel importante en la promoción de la salud y la prevención de determinadas enfermedades: cardiovasculares, oncológicas, psiquiátricas y neurodegenerativas, diabetes tipo 2, trastornos del sistema nervioso central, etc. Además, poseen propiedades antiinflamatorias que podrían ser de utilidad en el tratamiento de algunas enfermedades crónicas en las que la inflamación forma parte de la patología. Sin embargo, a pesar de su potencial terapéutico, muchos de estos lípidos bioactivos altamente insaturados son bastante inestables y susceptibles de degradarse químicamente, lo que supone una de sus principales limitaciones en cuanto a su aplicabilidad en la industria alimentaria. Uno de los procesos de degradación lipídica más habituales es la oxidación lipídica, un proceso radicalario en cadena donde, en sus primeras etapas, los PUFAs reaccionan con el oxígeno atmosférico y producen hidroperóxidos lipídicos como productos primarios de la oxidación para, en etapas posteriores, descomponerse y dar lugar a toda una serie de compuestos volátiles de olores y sabores desagradables, menor valor nutricional y una relativa toxicidad, que se conocen como productos secundarios de la oxidación (aldehídos, cetonas, alcoholes,

hidrocarburos, ácidos orgánicos volátiles, etc.). Por tanto, la oxidación lipídica supone la principal limitación tecnológica de este tipo de compuestos bioactivos y el primer desafío que debe afrontar la industria alimentaria si quiere incorporarlos en sus productos.

Por su parte, la curcumina es un compuesto polifenólico natural de origen vegetal con multitud de propiedades terapéuticas y medicinales descritas: antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias, antimicóticas, antiproliferativas, antisépticas, antiespasmódicas, antiamóbricas, hipolipidémicas, cardioprotectoras, hepatoprotectoras, neuroprotectoras, inmunomoduladoras, anticarcinogénicas, antidiabéticas, antiartríticas, etc. Sin embargo, su carácter predominantemente hidrofóbico debido a las cadenas alifáticas que separan los grupos enólicos y fenólicos la convierte en un compuesto bastante insoluble en medios acuosos y, por tanto, conseguir su incorporación efectiva en sistemas biológicos –constituidos fundamentalmente por agua– no es algo trivial y supone la primera limitación tecnológica de este tipo de compuestos. Por otra parte, la inestabilidad química frente a multitud de factores ambientales y en condiciones fisiológicas (pH, luz, temperatura, presencia de especies reactivas de oxígeno, etc.) supone otra de sus principales limitaciones en cuanto a su aplicabilidad. Y finalmente, además de todo lo anterior, su escasa biodisponibilidad –como consecuencia de su mala absorción intestinal, su rápido metabolismo mediante reacciones de reducción y conjugación hepática y su rápida eliminación del cuerpo–, también supone otra limitación tecnológica muy importante que impide que se manifiesten sus beneficios terapéuticos a nivel sistémico.

De acuerdo con todo lo anterior, hay evidencias científicas más que suficientes para considerar a los PUFAs ω -3 y la curcumina, por sí mismos, como unos agentes polifarmacológicos de interés. Sin embargo, algunos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren un posible efecto sinérgico cuando se combinan entre sí, lo que hace que su aporte conjunto sea incluso más interesante que por separado.

Para intentar superar las limitaciones tecnológicas mencionadas, la comunidad científica ha estudiado y desarrollado diferentes tipos de sistemas de liberación modificada y sistemas de transporte no acuosos, especialmente usando matrices lipídicas, para la encapsulación, protección, vehiculización y liberación de principios

activos lipofílicos por vía oral, que permitan la incorporación y utilización de estos activos en la industria de los alimentos. Algunos de los sistemas de liberación propuestos son hidrogeles, oleogeles, emulgeles, nanopartículas, SLN, NLC, micelas, liposomas y emulsiones, entre otros, cada uno de ellos con sus propias ventajas e inconvenientes en función de la estructura, composición, cinética, funcionamiento y usos principales. El presente trabajo de investigación se centra en los sistemas de liberación basados en oleogeles y en emulsiones para la protección y el transporte conjunto de PUFAs ω -3 y curcumina.

Un oleogel es una estructura continua, tridimensional, semisólida, termorreversible y termodinámicamente estable compuesta por un líquido lipofílico (normalmente un aceite comestible) inmovilizado en una red de moléculas (formada por un agente gelificante) que han sido capaces de gelificar, dando lugar a un sistema con unas características fisicoquímicas y funcionales similares a las de las grasas sólidas. Una de sus principales ventajas reside en que ofrecen características físicas distintas de los aceites líquidos, sin influir directamente en su composición química. Nótese que la oleogelificación permite modificar el comportamiento reológico, la textura y las propiedades sensoriales; reducir la migración de aceite y controlar la separación de fases en los sistemas de liberación derivados de los oleogeles y disminuir la movilidad y migración de principios activos lipofílicos de la fase oleosa. Por este motivo, los oleogeles y sus sistemas de liberación derivados se postulan como potenciales sistemas transportadores de compuestos bioactivos en la industria alimentaria. Además, al tratarse de sistemas estructurados, dificultan los procesos de difusión de oxígeno y metales prooxidantes en la fase oleosa, protegiendo de esta forma los compuestos activos lipofílicos, conformando una matriz idónea para evitar procesos de degradación a largo plazo. Entre sus inconvenientes se haya la dificultad para identificar agentes gelificantes baratos y de grado alimentario y para controlar la liberación del principio activo lipofílico.

Una emulsión es un sistema coloidal metaestable formado por dos líquidos inmiscibles, generalmente de diferente polaridad, donde uno de ellos (fase dispersa) se dispersa en forma de pequeñas gotitas en otro fluido llamado fase continua. Una de sus principales ventajas es que permiten la incorporación de una fase oleosa y una fase acuosa en un mismo producto. Así pues, dados los problemas de solubilidad e

incompatibilidad que presentan muchos compuestos bioactivos y que dificultan su efectiva incorporación en la industria alimentaria, así como su baja bioaccesibilidad y biodisponibilidad, las emulsiones permiten la fácil incorporación tanto de compuestos solubles en aceite como de compuestos solubles en agua al combinar dos fases diferentes. Asimismo, puesto que la fase que se percibe con una mayor intensidad sensorial es la fase externa, estos sistemas permiten enmascarar parcialmente los sabores y olores desagradables incorporando aromas, edulcorantes y agentes enmascarantes en esta fase externa. Adicionalmente, en el caso de las emulsiones múltiples, la separación física entre las fases acuosas interna y externa proporciona una mayor protección de los compuestos encapsulados frente a la degradación química, aislándolos así de otros ingredientes solubles en la fase acuosa externa con los que podrían reaccionar, de la acción de diferentes condiciones de procesamiento o conservación, y/o de la actividad de las enzimas en el tracto gastrointestinal. Entre sus principales limitaciones, cabe señalar que las emulsiones no son sistemas termodinámicamente estables y, por tanto, tienen una fecha de caducidad que varía en función de la calidad del diseño de la emulsión, siendo esta inestabilidad física mucho más acusada en el caso de las emulsiones múltiples.

La presente Tesis Doctoral es una contribución al conocimiento de los sistemas de liberación basados en oleogeles y en emulsiones como potenciales opciones tecnológicas para la encapsulación, protección, vehiculización y liberación de altas dosis de PUFAs ω -3 y curcumina por vía oral.

Para ello, sobre cada sistema de liberación considerado (oleogel, emulsión simple W/Og, emulsión simple Og/W y emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$), primero se seleccionaron las variables más importantes a considerar en un diseño de experimentos y sus rangos correspondientes. A partir de estas variables independientes, se aplicó un diseño que permitiese evaluar simultáneamente el efecto de todas ellas y de sus posibles interacciones sobre las variables respuesta de interés (tamaño de partícula –si procede–, oxidación lipídica primaria y secundaria, y capacidad de retención de curcumina). Además, cada diseño contó con una muestra adicional (control) que permitía evaluar el impacto del proceso de oleogelificación del aceite o de emulsificación del oleogel sobre las variables respuesta. A continuación, para ajustar cada respuesta se establecieron modelos de segundo orden con interacciones que representaron adecuadamente los

datos experimentales. Seguidamente, se identificaron todas las variables estadísticamente significativas y se analizaron sus efectos sobre la variable respuesta. Para terminar, se examinó de manera individual cada una de las respuestas de interés ajustadas para identificar el conjunto de variables de operación que conduce a su óptimo individual (máximo o mínimo). Puesto que, como era de esperar, los conjuntos de condiciones experimentales óptimas no fueron iguales en todas las respuestas, se llevó a cabo un análisis de optimización simultánea utilizando la metodología de superficie multi-respuesta para obtener los mejores resultados en términos globales. Finalmente, sobre una de las fórmulas óptimas se realizaron estudios reológicos, de estabilidad de la emulsión –si procede– y la curcumina incorporada con el tiempo frente a distintas condiciones ambientales que podrían afectarle (como el pH, la fuerza iónica, la luz o la temperatura), y de bioaccesibilidad y biodisponibilidad en condiciones fisiológicas humanas.

En primer lugar, en el apartado 4.1. se procede al estudio de un sistema de liberación basado en oleogeles fisicoquímicamente estable, analizando la influencia de las concentraciones de agente gelificante (3.0–7.0 % p/p) y curcumina (0.05–0.15 % p/p) y la temperatura de preparación del oleogel (60–80 °C) sobre su estabilidad oxidativa con el tiempo y su capacidad para proteger y estabilizar curcumina incorporada. El estudio se realiza tanto a temperatura ambiente (23 °C) como en condiciones aceleradas (40 °C), observándose un comportamiento oxidativo primario a corto y a largo plazo totalmente diferente: en los primeros días, la concentración de hidroperóxidos es entre 1.01 y 2.16 veces superior a la de los oleogeles almacenados a 23 °C; en cambio, a tiempos más prolongados, los hidroperóxidos lipídicos se descomponen y dan lugar a toda una serie de productos secundarios de la oxidación, resultando en una concentración inferior de hidroperóxidos a 40 °C. En el caso de la oxidación lipídica secundaria, se produce un mismo comportamiento en la concentración de compuestos aldehídicos de estos sistemas, independientemente del tiempo transcurrido desde su elaboración: la concentración de productos secundarios de la oxidación de las muestras a 40 °C es siempre mayor que en las muestras a 23 °C, tanto a corto como a largo plazo, aunque a corto plazo estas diferencias son mucho menores que a largo plazo. También se observa que el proceso de oleogelificación es una estrategia adecuada para reducir la oxidación lipídica primaria a largo plazo en

porcentajes comprendidos entre un 25.9 y un 90.0 %, así como para aumentar la capacidad de retención de curcumina del aceite de pescado enriquecido con PUFAs ω -3 sin gelificar e, incluso, llegar casi a duplicarla. La concentración de curcumina y la temperatura de preparación del oleogel son variables críticas para minimizar conjuntamente la oxidación lipídica primaria y secundaria de los oleogeles almacenados a 23 °C y, a su vez, maximizar la capacidad de retención de curcumina. Para alcanzar ese objetivo, las condiciones óptimas son: 7.0 % p/p de agente gelificante, 0.05 % p/p de curcumina y 66.0 °C de temperatura de elaboración del oleogel, obteniendo una concentración de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos de 3389.6 y 445.9 mg/L, respectivamente, y una capacidad de retención de curcumina durante el proceso de elaboración del 71.8 %.

A continuación, en el apartado 4.2. se analiza el sistema de liberación basado en emulsiones W/Og fisicoquímicamente estable, más que como un sistema de liberación en sí mismo, a modo de referencia para diseñar y desarrollar otros sistemas más complejos. Particularmente, se explora el impacto de las concentraciones de fase dispersa (25–35 % p/p) y emulgente hidrofóbico (PGPR, 2.0–6.0 % p/p), y la velocidad (12000–18000 rpm) o presión (6000–10000 psi) de homogenización, sobre su estabilidad física (tamaño de partícula) y oxidativa, así como sobre su capacidad para proteger y estabilizar en el tiempo curcumina vehiculizada. Este estudio revela que el método de homogenización a alta presión puede llegar a romper el oleogel de la fase continua y, por tanto, puede dar lugar a emulsiones con tamaños medios de gota mayores e inestables físicamente, y que la emulsificación de un oleogel para la obtención de emulsiones W/Og, independientemente del método de homogenización utilizado, reduce significativamente la oxidación lipídica primaria (en porcentajes superiores al 119.2 %) y secundaria (entre 1.45 y 2.19 veces). Asimismo, se determina que el proceso de emulsificación del oleogel no ejerce ningún efecto sobre la estabilidad de la curcumina vehiculizada y las emulsiones W/Og presentan porcentajes de retención de curcumina superiores a los del oleogel de partida (60.52 % en la emulsión y 48.14 % en el oleogel). La concentración de fase dispersa es la variable más importante para minimizar simultáneamente el tamaño de partícula y la oxidación lipídica primaria y secundaria y, a su vez, maximizar la capacidad de retención de curcumina de la emulsión W/Og homogenizada a alta velocidad de cizalla. Para alcanzar ese objetivo,

las condiciones óptimas son: 38.37 % p/p de fase dispersa, 7.35 % p/p de PGPR y 12600 rpm de velocidad de cizalla, obteniendo un tamaño medio de gota de 6.379 μm , una concentración de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos de 3646.9 y 349.2 mg/L, respectivamente, y una capacidad de retención de curcumina del 91.9 %.

Seguidamente, en el apartado 4.3. se recoge el estudio del sistema de liberación basado en emulsiones Og/W fisicoquímicamente estable, analizando el efecto de las concentraciones de fase dispersa (5–15 % p/p), emulgente hidrofílico (Tween 20, 1.0–5.0 % p/p) y estabilizante (0.20–0.50 % p/p), y la velocidad (6000–12000 rpm) o presión (2000–6000 psi) de homogenización, sobre su estabilidad física y oxidativa, así como sobre su capacidad para proteger y estabilizar en el tiempo curcumina vehiculizada. Este estudio revela que el método de homogenización a alta presión proporciona gotas de menor tamaño que el método de homogenización a alta velocidad y, por tanto, emulsiones más estables físicamente; y con respecto a la estabilidad oxidativa, las emulsiones a alta velocidad presentan porcentajes de aumento de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos muy superiores (6.95 % vs. 0.36 % de aumento de primarios y 20.45 % vs. –99.58 % de aumento de secundarios) a los de las emulsiones a alta presión. Al igual que en las emulsiones W/Og, el proceso de emulsificación no ejerce ningún efecto sobre la estabilidad de la curcumina vehiculizada en los sistemas Og/W y, en determinadas condiciones óptimas, se puede llegar a alcanzar una capacidad de retención de curcumina del 100 %. La fracción de fase dispersa es la variable más importante para minimizar conjuntamente el tamaño de partícula y la oxidación lipídica primaria y secundaria y, a su vez, maximizar la capacidad de retención de curcumina de la emulsión homogenizada a alta velocidad de cizalla. Para alcanzar ese objetivo, las variables de operación óptimas son: 13.9 % p/p de fase dispersa, 5.0 % p/p de Tween 20, 0.48 % p/p de XG y 12000 rpm de velocidad de homogenización, obteniendo un porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos del 47.7 y 173.0 %, respectivamente, y una capacidad de retención de curcumina del 100 %.

Para terminar, en el apartado 4.4. se examina el sistema de liberación basado en emulsiones $W_1/\text{Og}/W_2$ fisicoquímicamente estable, analizando la influencia de la concentración total de emulgente en W_1/Og (6.0–14.0 % p/p), la ratio emulgente hidrofóbico:emulgente hidrofílico (PGPR:Tween 20, 50–90 % p/p) y la velocidad de

homogenización (9000–21000 rpm) en la primaria, la concentración total de oleogel en $W_1/Og/W_2$ que determina la fracción de fase dispersa (0–20 % p/p), la concentración de emulgente (Tween 20, 5.0–13.0 % p/p) y la velocidad de homogenización (3000–7000 rpm) en la múltiple, sobre su estabilidad física y oxidativa, así como sobre su capacidad para proteger y estabilizar en el tiempo curcumina encapsulada. A pesar de estar constituidas mayoritariamente por gotas de tamaños mayores que las emulsiones Og/W a alta velocidad, presentan estabilidades físicas parecidas y ofrecen una mayor protección del oleogel frente a la oxidación lipídica primaria y secundaria, reduciendo el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos en un 28.9 % y el de compuestos aldehídicos 16.5 veces. Además, en determinadas condiciones óptimas, las emulsiones $W_1/Og/W_2$ también pueden llegar a alcanzar una capacidad de retención de curcumina del 100 %. La concentración total de emulgente en la primaria y de Tween 20 en la múltiple son variables clave para minimizar simultáneamente el tamaño de partícula y la oxidación lipídica primaria y secundaria y, a su vez, maximizar la capacidad de retención de curcumina de la emulsión $W_1/Og/W_2$ homogenizada a alta velocidad de cizalla. Para alcanzar ese objetivo, las condiciones óptimas son: en relación a la emulsión primaria W_1/Og , un 8.1 % p/p de concentración total de emulgente, 89.8 % p/p de ratio PGPR:Tween 20 y 19600 rpm de velocidad de homogenización; y con respecto a la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$, un 5.1 % p/p de concentración total de oleogel que determina la fracción de fase dispersa (W_1/Og), un 9.6 % p/p de Tween 20 en W_2 y 6400 rpm de velocidad de homogenización.

No obstante, las propiedades terapéuticas de un alimento funcional no sólo dependen de su contenido en compuestos bioactivos, sino de los cambios que experimenten durante el proceso digestivo y que repercuten en su bioaccesibilidad y biodisponibilidad. Por tanto, este trabajo concluye examinando la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de la curcumina como variables de diseño. Así, la curcumina del sistema oleogelificado es la menos bioaccesible y biodisponible, aunque el oleogel resultó ser el sistema de liberación más eficiente de todos, estando biodisponible el 41.8 % de la curcumina bioaccesible a los 180 min. Por otro lado, las emulsiones Og/W y $W_1/Og/W_2$ presentaron porcentajes de biodisponibilidad final muy similares, en torno al 20.2 %, y 1.7 veces superior al del oleogel, si bien es cierto que la curcumina de la

emulsión $W_1/Og/W_2$ se absorbe más rápidamente que la vehiculizada en la emulsión Og/W , cuya mayor velocidad de absorción se produce a partir de los 120 min.

A modo de conclusión, se puede afirmar que no existe un sistema de liberación mejor que otro: cada uno de ellos se comporta de forma diferente y, en función del objetivo perseguido, puede resultar más o menos adecuada la elección de un sistema u otro.

Summary

In its most basic and traditional conception, food intake aims to provide the organism with the matter and energy necessary for the maintenance of its most elementary physiological functions. However, nowadays the concept of food in developed countries has undergone a radical change and, beyond its usual nutritional function, the consumer pursues a beneficial effect on one or more specific functions in the organism, an improvement in the state of health and welfare and/or a reduction in the risk of illness. This new conception of food and its relationship with health has given rise to the concept of “functional food”, increasingly widespread and valued by the population, opening up a potential market opportunity for the food industry. Among all the functional ingredients, omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFAs) and curcumin occupy a preeminent position and they are the main object of study in this research work.

The ω -3 PUFAs –especially EPA and DHA– are essential fatty acids that play an important role in the promotion of health and the prevention of certain diseases: cardiovascular, oncological, psychiatric and neurodegenerative, type 2 diabetes, central nervous system disorders, etc. In addition, they have anti-inflammatory properties that could be useful in the treatment of certain chronic diseases in which inflammation is part of the pathology. However, despite their therapeutic potential, many of these highly unsaturated bioactive lipids are quite unstable and susceptible to chemical degradation, which is one of their main limitations in terms of their applicability in the food industry. One of the most common lipid degradation processes is lipid oxidation, a radical chain process where, in its first stages, PUFAs react with atmospheric oxygen and produce lipid hydroperoxides as primary oxidation products to, in later stages, decompose and give rise to a whole series of volatile compounds with unpleasant odors and tastes, lower nutritional value and relative toxicity, commonly known as secondary products of oxidation (aldehydes, ketones, alcohols, hydrocarbons, volatile organic acids, etc.). Therefore, lipid oxidation is the main technological limitation of this type of bioactive compounds and the first challenge that the food industry must face if they want to incorporate them into their products.

About curcumin, it is a natural polyphenolic compound derived from plants with a multitude of described therapeutic and medicinal properties: antibacterial, antifungal, antiparasitic, antimycotic, antiproliferative, antiseptic, antispasmodic, antiamebic, hypolipidemic, cardioprotective, hepatoprotective, anti-carcinogenic, neuroprotective, antidiabetic, antiarthritic, etc. However, its predominantly hydrophobic character due to the aliphatic chains that separate the enolic and phenolic groups makes it quite insoluble in aqueous media and, therefore, achieving its effective incorporation into biological systems –constituted mainly by water– is not something trivial, representing the first technological limitation of this type of compound. On the other hand, chemical instability under a multitude of environmental factors and physiological conditions (pH, light, temperature, presence of reactive oxygen species, etc.) is another of its main limitations in terms of its applicability. And finally, in addition to all of the previously mentioned, its low bioavailability –as a consequence of its poor intestinal absorption, its fast metabolism through hepatic reduction and conjugation reactions, and its fast elimination from the organism– also represents another important technological limitation that prevents its therapeutic benefits from being manifested at the systemic level.

Based on all of the above, there is more than enough scientific evidence to consider ω -3 PUFAs and curcumin, by themselves, as polypharmacological agents of interest. However, some studies both *in vitro* and *in vivo* suggest a possible synergistic effect when they are combined, which makes their joint contribution even more interesting than separately.

In order to try to overcome the technological limitations mentioned previously, the scientific community has studied and developed different types of modified delivery systems and non-aqueous transport systems, especially using lipid matrices, for the encapsulation, protection, transport, and release of lipophilic active principles by the oral way, allowing their incorporation and use in the food industry. Some of the proposed delivery systems are hydrogels, oleogels, emulgels, nanoparticles, SLN, NLC, micelles, liposomes, and emulsions, among others, each of them with their advantages and disadvantages depending on the structure, composition, kinetics, operation, and main uses. This research work focuses on the delivery systems based on oleogels and emulsions for the protection and joint transport of ω -3 PUFAs and curcumin.

An oleogel is a continuous, three-dimensional, semi-solid, thermoreversible, and thermodynamically stable structure composed of a lipophilic liquid (usually an edible oil) immobilized in a network of molecules (formed by a gelling agent) that have been able to gel, giving rise to a system with physicochemical and functional characteristics similar to those of solid fats. One of their main advantages is that they offer physical characteristics different from liquid oils, without directly influencing their chemical composition. The oleogelation allows modifying the rheological behavior, the texture, and the sensory properties. It reduces oil migration and control phase separation in delivery systems derived from oleogels; reducing also the mobility and migration of lipophilic active principles from the oil phase. For this reason, oleogels and their derived delivery systems are postulated as potential carrier systems for bioactive compounds in the food industry. In addition, as they are structured systems, they hinder the processes of diffusion of oxygen and pro-oxidant metals in the oil phase, thus protecting the lipophilic active compounds, forming an ideal matrix to avoid long-term degradation processes. Disadvantages include the difficulty in identifying cheap food-grade gelling agents and the control of the release of the lipophilic active principle.

An emulsion is a metastable colloidal system formed by two immiscible liquids, generally of different polarity, where one of them (dispersed phase) is dispersed in another fluid called continuous phase. One of their main advantages is that they allow the incorporation of an oil phase and a water phase in the same product. Thus, given the solubility and incompatibility problems that many bioactive compounds present and that hinder their effective incorporation into the food industry, as well as their low bioaccessibility and bioavailability, emulsions allow the easy incorporation of both oil-soluble compounds and water-soluble compounds by combining two different phases. In addition, since the phase that is perceived with the greatest sensory intensity is the external phase, these systems make it possible to partially mask unpleasant flavors and odors by incorporating aromas, sweeteners, and masking agents in this external phase. Additionally, in the case of multiple emulsions, the physical separation between the internal and external aqueous phases provides greater protection of the encapsulated compounds from chemical degradation. It is also possible to isolate them from other soluble ingredients in the external aqueous phase with which they could react, from the action of different conditions of processing or conservation, and/or of the activity of the

enzymes in the gastrointestinal tract. Among their main limitations, it should be noted that emulsions are not thermodynamically stable systems and, therefore, have an expiration date that varies depending on the quality of the emulsion design, this physical instability being much more pronounced in the case of multiple emulsions.

This Doctoral Thesis is a contribution to the knowledge of delivery systems based on oleogels and emulsions as potential technological options for the encapsulation, protection, transport, and release of high doses of ω -3 PUFAs and curcumin by the oral way.

For this purpose, for each delivery system considered (oleogel, W/Og simple emulsion, Og/W simple emulsion, and W_1 /Og/ W_2 multiple emulsion), the most important variables to have into account in an experimental design were first chosen with their corresponding ranges. From these independent variables, a design was applied to simultaneously evaluate the effect of all of them and their possible interactions on the response variables of interest (particle size –if applicable–, primary and secondary lipid oxidation, and curcumin retention capacity). In addition, each design had an additional sample (control) that made it possible to evaluate the impact of the oil oleogelification or oleogel emulsification process on the response variables. Subsequently, in order to adjust each response, second-order models with interactions that adequately represented the experimental data were established. Following this, all statistically significant variables were identified and their effects on the response variable were analyzed. Finally, each of the adjusted responses of interest was individually examined to identify the set of operating variables that leads to their individual optimum (maximum or minimum). As expected, the sets of optimal experimental conditions were not equal in all responses, a simultaneous optimization analysis was carried out using the multi-response surface methodology to obtain the best results in global terms. Finally, focusing on one of the optimal formulations, rheological studies were carried out, analysing also the stability of the emulsion –if applicable– and exploring how different environmental conditions (pH, ionic strength, light, or temperature) could influence the curcumin incorporated over time. Besides, on the optimal formulations, the bioaccessibility and bioavailability studies under human physiological conditions were carried out.

First, in section 4.1. a physicochemically stable oleogels-based delivery system is studied, analyzing the influence of the concentrations of gelling agent (3.0–7.0 wt.%) and curcumin (0.05–0.15 wt.%), and the preparation temperature of the oleogel (60–80 °C) on its oxidative stability over time and its ability to protect and stabilize incorporated curcumin. The study is carried out both at room temperature (23 °C) and under accelerated conditions (40 °C), observing different primary oxidative behavior in the short and long term. In the first days, the concentration of hydroperoxides is between 1.01 and 2.16 times higher than that of oleogels stored at 23 °C. However, at longer times, lipid hydroperoxides decompose and give rise to a whole series of secondary oxidation products, resulting in a lower concentration of hydroperoxides at 40 °C. In the case of secondary lipid oxidation, the same behavior occurs in the concentration of aldehyde compounds in these systems, independently of the time elapsed since their preparation: the concentration of secondary oxidation products of the samples at 40 °C is always higher than in the samples at 23 °C, both in the short and long term, although in the short term these differences are much smaller than in the long term. It is also observed that the oleogelation process is a suitable strategy to reduce the long-term primary lipid oxidation in percentages between 25.9 and 90.0 %, as well as to increase the curcumin retention capacity of fish oil enriched with ω -3 PUFAs without gelling and even to almost double it. Curcumin concentration and oleogel preparation temperature are critical variables to jointly minimize primary and secondary lipid oxidation of oleogels stored at 23 °C and, in turn, maximize curcumin retention capacity. To achieve this objective, the optimal conditions are: 7.0 wt.% of gelling agent, 0.05 wt.% of curcumin and 66.0 °C of oleogel production temperature, obtaining a concentration of lipid hydroperoxides and aldehyde compounds of 3389.6 and 445.9 mg/L, respectively, and a curcumin retention capacity during the manufacturing process of 71.8 %.

In section 4.2. the physicochemically stable W/Og emulsion-based delivery system is studied, rather than as a delivery system itself, as a reference to design and develop other more complex systems. In particular, the impact of the concentrations of dispersed phase (25–35 wt.%) and hydrophobic emulsifier (PGPR, 2.0–6.0 wt.%), and speed (12000–18000 rpm) or pressure (6000–10000 psi) of homogenization, on its physical (particle size) and oxidative stability, as well as on its ability to protect and

stabilize transported curcumin over time. This study reveals that the high-pressure homogenization method can break the oleogel of the continuous phase and, therefore, can produce emulsions with larger average droplet sizes and physically unstable and that the emulsification of an oleogel to obtain W/Og emulsions, independently of the homogenization method used, significantly reduces primary (in percentages greater than 119.2 %) and secondary (between 1.45 and 2.19 times) lipid oxidation. Likewise, it is determined that the oleogel emulsification process does not affect the stability of the transported curcumin, and the W/Og emulsions present curcumin retention percentages higher than those of the starting oleogel (60.52 % in the emulsion and 48.14 % on the oleogel). The dispersed phase concentration is the most important variable to simultaneously minimize the particle size and the primary and secondary lipid oxidation and, additionally, maximize the curcumin retention capacity of the W/Og emulsion homogenized at high shear rate. To achieve this objective, the optimal conditions are: 38.37 wt.% of dispersed phase, 7.35 wt.% of PGPR and 12600 rpm of shear rate, obtaining an average droplet size of 6.379 μm , a concentration of lipid hydroperoxides and aldehyde compounds of 3646.9 and 349.2 mg/L, respectively, and a curcumin retention capacity of 91.9 %.

Regarding section 4.3. this includes the study of the delivery system based on physicochemically stable Og/W emulsions, analyzing the effect of dispersed phase concentrations (5–15 wt.%), hydrophilic emulsifier (Tween 20, 1.0–5.0 wt.%), and stabilizer (0.20–0.50 wt.%), and the speed (6000–12000 rpm) or pressure (2000–6000 psi) of homogenization, on their physical and oxidative stability, as well as on their ability to protect and stabilize transported curcumin over time. This study reveals that the high-pressure homogenization method provides smaller droplets than the high-shear rate homogenization method and, therefore, more physically stable emulsions; and for oxidative stability, high-shear rate emulsions show much higher percentages of increase in lipid hydroperoxides and aldehyde compounds (6.95 % vs. 0.36 % increase in primary and 20.45 % vs. –99.58 % increase in secondary) than those of high-pressure emulsions. As in the W/Og emulsions, the emulsification process does not affect the stability of the curcumin transported in the Og/W systems and, under certain optimal conditions, a curcumin retention capacity of 100 % can be achieved. The dispersed phase fraction is the most important variable to jointly minimize the particle size and

the primary and secondary lipid oxidation and, in turn, maximize the curcumin retention capacity of the emulsion homogenized at a high shear rate. To achieve this goal, the optimal operating variables are: 13.9 wt.% of dispersed phase, 5.0 wt.% of Tween 20, 0.48 wt.% of XG, and 12000 rpm of homogenization speed, obtaining a percentage increase of lipid hydroperoxides and aldehyde compounds of 47.7 and 173.0 %, respectively, and a curcumin retention capacity of 100 %.

Finally, in section 4.4. the physicochemically stable $W_1/Og/W_2$ emulsion-based delivery system is studied, analyzing the influence of the total emulsifier concentration in W_1/Og (6.0–14.0 wt.%), the hydrophobic emulsifier:hydrophilic emulsifier ratio (PGPR:Tween 20, 50–90 wt.%) and the homogenization speed (9000–21000 rpm) in the primary emulsion, the total concentration of oleogel in $W_1/Og/W_2$ that determines the fraction of dispersed phase (0–20 wt.%), the emulsifier concentration (Tween 20, 5.0–13.0 wt.%) and the homogenization speed (3000–7000 rpm) in the multiple emulsion, on their physical and oxidative stability, as well as on their ability to protect and stabilize encapsulated curcumin over time. Despite being mostly made up of larger-sizes droplets than high-shear rate Og/W emulsions, they present similar physical stabilities and offer greater protection of the oleogel against primary and secondary lipid oxidation, reducing the percentage of increase in lipid hydroperoxides in 28.9 % and that of aldehyde compounds 16.5 times. Furthermore, under certain optimal conditions, $W_1/Og/W_2$ emulsions can also achieve a curcumin retention capacity of 100 %. The total concentration of emulsifier in the primary and of Tween 20 in the multiple are key variables to simultaneously minimize the particle size and the primary and secondary lipid oxidation and, in turn, maximize the curcumin retention capacity of the $W_1/Og/W_2$ emulsion homogenized at high-shear rate. To accomplish this objective, the optimal conditions are: for the W_1/Og primary emulsion, 8.1 wt.% of total emulsifier concentration, 89.8 wt.% of PGPR:Tween 20 ratio and 19600 rpm of homogenization speed; and concerning the $W_1/Og/W_2$ multiple emulsion, 5.1 wt.% of total oleogel concentration that determines the fraction of dispersed phase (W_1/Og), 9.6 wt.% of Tween 20 in W_2 and 6400 rpm of homogenization speed.

However, the therapeutic properties of a functional food not only depend on its content in bioactive compounds but also on the changes that it undergoes during the digestive process that affects its bioaccessibility and bioavailability. Therefore, this

work concludes by examining the bioaccessibility and bioavailability of curcumin as design variables. Thus, the curcumin of the oleogelified system is the least bioaccessible and bioavailable, although the oleogel was the most efficient delivery system of all, with 41.8 % of the bioaccessible curcumin being bioavailable at 180 min. On the other hand, the Og/W and $W_1/Og/W_2$ emulsions presented very similar final bioavailability percentages, around 20.2 %, and 1.7 times higher than that of the oleogel, although it is true that the curcumin in the $W_1/Og/W_2$ emulsion is absorbed faster than the one carried in the Og/W emulsion, whose higher absorption speed occurs after 120 min.

In conclusion, it can be stated that there is no better delivery system than another: each of them behaves differently and, depending on the objective pursued, the choice of one system or another may be more or less appropriate.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

“*Que la comida sea tu alimento y el alimento,
tu medicina*”

HIPÓCRATES (460 a. C. – 370 a. C.)

De acuerdo con el *Diccionario de la lengua española* (DLE), 23ª ed., un **alimento** es un “conjunto de sustancias que los seres vivos comen o beben para subsistir”, o también “cada una de las sustancias que un ser vivo toma o recibe para su nutrición”. Por tanto, en su concepción más básica y tradicional, la ingesta de alimentos persigue proporcionar al organismo la materia (nutrientes) y la energía necesarios para el mantenimiento de sus funciones fisiológicas más básicas y elementales. Sin embargo, en estas últimas décadas, el cambio de estrategia en la política nutricional de los países desarrollados ha propiciado un cambio radical en el concepto de alimento. Hasta bien entrada la década de los setenta del siglo XX, el objetivo principal era la lucha contra el hambre y la erradicación de las enfermedades carenciales. Posteriormente, la política nutricional se encaminó hacia la garantía de los aspectos higiénico-sanitarios de los alimentos. Fue a principios de la década de los ochenta cuando, una vez alcanzados estos dos objetivos fundamentales, se entró en una política de reducir y/o evitar alimentos por motivos de salud como, por ejemplo, la sal, los huevos, etc. En la actualidad, los esfuerzos en salud pública van orientados hacia la prevención de las enfermedades crónico-degenerativas desde un enfoque positivo; esto es, no evitando el consumo de determinados alimentos, sino incluyendo aquellos otros que ejercen una influencia activa y positiva sobre la salud. En este caso, por tanto, se quiere explotar al máximo el potencial positivo-preventivo de los alimentos y de sus componentes más allá de un mero sustento vital (Gil Hernández et al., 2005).

El término **alimento funcional** o *functional food* se comenzó a utilizar en Japón a mediados de los ochenta del pasado siglo. En aquellos años, el gobierno japonés puso en marcha el Programa FOSHU (*Foods for Specified Health Use*), una marca creada para designar a aquellos “alimentos con efectos específicos sobre la salud”, con el

objetivo de reducir el gasto sanitario. La iniciativa, pionera en el mundo, tuvo una buena acogida y gozó de una gran popularidad entre la población, llegando las primeras aprobaciones de productos FOSHU en 1991 (Saito, 2007). Desde entonces, el concepto de “alimento saludable” se ha extendido rápidamente por todo el mundo, convirtiéndose en la principal fuente de negocio para muchas empresas del sector de la alimentación.

En los últimos años, el término “alimento funcional” cada vez es más utilizado, a pesar de la ausencia de una definición o una legislación universalmente aceptada para catalogar este tipo de alimentos. Si a esto le añadimos la proliferación de nombres tales como *nutracéuticos*, *alimentos de diseño*, *alimentos* o *farmalimentos*, nos permite hacernos una idea de la complejidad a la hora de concretar y clarificar el concepto de alimento funcional, puesto que todas estas palabras aparecen con frecuencia tanto en ámbitos científicos como en el sector comercial con diversos significados o, en muchos casos, como sinónimos entre sí (Culebras et al., 2004). No obstante, sí que existe un apoyo de la comunidad científica y de las entidades líderes en nutrición más o menos unánime hacia la defensa del concepto de alimento funcional como una categoría distinta e independiente.

Hasta la fecha, una de las definiciones de alimento funcional que ha encontrado mayor respaldo y aceptación a nivel internacional es la proporcionada por la organización denominada FUFOSSE (*Functional Food Science in Europe*), en coordinación con *The International Life Sciences Institute (ILSI) Europe*, en el año 1999. Esta definición establece que un alimento puede considerarse funcional si se ha demostrado de manera satisfactoria que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, siendo esto relevante para la mejoría del estado de salud y bienestar y/o la reducción del riesgo de enfermar (Diplock et al., 1999). Asimismo conviene resaltar que para tener la consideración de alimento funcional ha de seguir siendo un alimento, por lo que no podrá consumirse en formatos tipo cápsulas, pastillas, polvos, etc. Por otro lado, hay que tener en cuenta que los alimentos funcionales deben demostrar sus resultados en cantidades que puedan ser normalmente consumidas en la dieta, por lo que tendrían que formar parte de un patrón normal de alimentación. En cualquier caso, lo más importante es que el alimento posea algún efecto beneficioso definido sobre una o varias funciones orgánicas.

Desde bien pronto, este concepto de alimento funcional fue adquiriendo importancia para una población cada vez más consciente de la relación entre la alimentación y la salud. La literatura científica avala dicha conexión, sobre todo en el caso de ciertas enfermedades de carácter crónico como, por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, obesidad, etc. Todo ello ha llevado al consumidor a considerar los alimentos más allá de una mera fuente de nutrientes y energía, sino como un elemento importante para la conservación y promoción de su salud. En definitiva, los alimentos funcionales suponen una magnífica oportunidad, tanto para la industria alimentaria como para el consumidor, para fomentar la salud a través de la nutrición, mejorando el estado de bienestar o reduciendo el riesgo de contraer una enfermedad. Hoy, los alimentos funcionales forman parte de nuestro día a día: se han hecho hueco en nuestras neveras, llenan los estantes de los supermercados y constituyen un mercado en expansión y uno de los principales motores que impulsan el desarrollo de nuevos productos alimentarios.

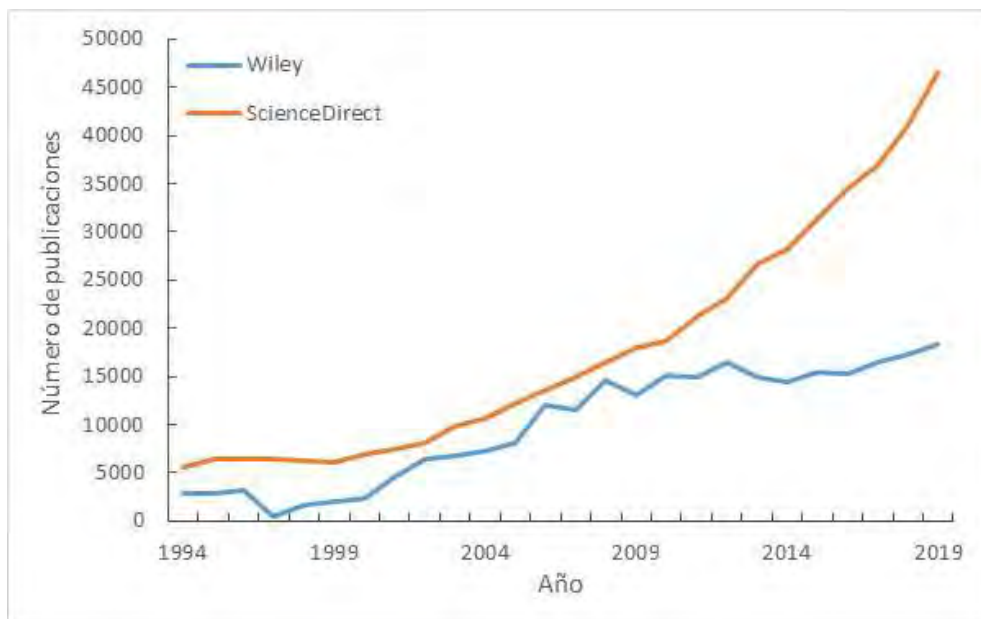


Figura 1. Evolución del número de publicaciones indexadas con el término 'functional foods' en dos bases de datos científicas diferentes – Periodo 1994-2019.

La era de los alimentos funcionales acaba de comenzar y, a pesar de sus pocos años de vida, el número de artículos, capítulos, libros y comunicaciones dedicados a ellos no deja de crecer. Para poner cifras a nuestras palabras hemos realizado una búsqueda rápida en dos de las principales bases de datos científicas como son *Wiley* y

ScienceDirect, utilizando como término de búsqueda '*functional foods*', que arrojó en el periodo 1994-2019 un total de 258502 y 463878 resultados (17/04/2020), respectivamente. De forma más visual, la Figura 1 representa el número total de publicaciones anuales indexadas en estas bases de datos en el mismo periodo de tiempo. A la vista del gráfico, consideramos queda puesto de manifiesto el interés cada vez mayor por los alimentos funcionales, tanto por parte de la comunidad científica como de la industria de los alimentos, que ve en ellos un potencial y suculento nicho de mercado.

Ante tanta cantidad de estudios y publicaciones sobre alimentos funcionales, no es de extrañar que en los últimos años estén apareciendo multitud de artículos de revisión que intentan recopilar y clasificar la información más reciente y relevante. Una de estas revisiones fue realizada por Yeung et al. (2018), quienes identificaron y analizaron mediante técnicas bibliométricas cuáles fueron los 100 artículos más buscados y más citados con esta temática en el periodo comprendido entre enero de 1990 y junio de 2018. Según estos autores, los ingredientes funcionales que más se han estudiado son los prebióticos, los probióticos y los antioxidantes. Más recientemente, Granato et al. (2020) han revisado cuáles son los ingredientes funcionales más interesantes, qué efectos producen sobre la salud y qué alternativas tecnológicas existen para su incorporación en matrices alimentarias. En la Tabla 1 hemos recogido, a modo de resumen, parte de esta información que consideramos representa de alguna manera el estado actual y las fronteras del conocimiento de este apasionante campo de la alimentación funcional.

De entre todos los ingredientes funcionales, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y, en especial, los de la serie omega-3 (ω -3), ocupan una posición preeminente. Probablemente, el hecho de que se conozcan algunas de sus propiedades saludables desde hace tiempo y que, además, sea uno de los primeros ingredientes funcionales que fueron incorporados a una matriz alimentaria como son los productos lácteos, tenga mucho que ver. En cualquier caso los PUFAs ω -3, debido a sus propiedades beneficiosas para la salud y las dificultades tecnológicas que presenta su incorporación en alimentos, son el objeto fundamental de nuestro estudio en la presente Tesis Doctoral.

Tabla 1. *Compuestos bioactivos más importantes y posibles efectos beneficiosos sobre la salud.*

Compuestos bioactivos		Matriz alimentaria		Referencias
Ácidos grasos poliinsaturados				
Ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico	Pescado azul, aceite de soja, aceite de colza, nuez, linaza, etc.	↓CVD, ↓niveles de triglicéridos en sangre, ↑HDL-C, ↑TC, ayuda al desarrollo del sistema nervioso central, ↓riesgo DM, ↓artritis reumatoide, ayuda al desarrollo cognitivo del lactante, previene enfermedades oculares, ↓riesgo de cáncer	Pinel et al. (2014); Voortman et al. (2015); Eltweri et al. (2017); Elagizi et al. (2018); Gioxari et al. (2018); Shahidi & Ambigaipalan (2018)	
Carotenoides				
β-Caroteno	Verduras y frutas de hoja amarilla, naranja y verde (ej., zanahoria, mango, naranja, etc.)	AOX, provitamina A, previene enfermedades oculares, radioprotector y antimutagénico, etc.	Kim (2015)	
Curcumina	Cúrcuma	AOX, ↓riesgo DM, ↓NDs, ↓CVD, ↓IMs	Rivera-Mancía et al. (2018); Saeidinia et al. (2018); Salehi et al. (2019)	
Licopeno	Tomate, melón, melocotón, etc.	AOX, ↓CVD, ↓riesgo de cáncer	Costa-Rodrigues et al. (2018); Rodriguez-Concepcion et al. (2018)	
Luteína	Verduras de hoja verde (ej., col rizada)	AOX, antiinflamatorio, antiaterogénico, antihipertensivo, antidiabético, antiulceroso, ↓riesgo de cáncer, previene enfermedades oculares	Kim & Park (2016)	
Zeaxantina	Yema de huevo, espinaca, col rizada, etc.	AOX, provitamina A, antiinflamatorio, mejora la función cognitiva, ↓riesgo de cáncer, ↓CVD	Buscemi et al. (2018)	
Clorofilas				
Clorofila A y B	Algas, macroalgas, etc.	AOX, ↓riesgo de cáncer	Chakdar & Pabbi (2017); Qin (2018)	

Compuestos organosulfurados

Glucosinolatos	Familia <i>Brassicaceae</i> : col de Bruselas, repollo blanco, coliflor, etc.	↓riesgo de cáncer y metástasis, protege a las células de desequilibrios redox, ↓enfermedades inflamatorias crónicas	Traka (2016)
Isoiocianatos	Familia <i>Brassicaceae</i> : col de Bruselas, repollo blanco, brócoli, etc.	↓NDS, ↓riesgo de cáncer	Giacoppo et al. (2015); Mitsiogianni et al. (2018)

Fibras alimentarias

β-Glucano	Levaduras, avena, bacterias, etc.	↓CVD, controla la diabetes, estimula el sistema inmunitario	Jayachandran et al. (2018); Bai et al. (2019); Bozbulut & Sanlier (2019)
Inulina	Espárrago, ajo, escarola, cebolla, etc.	Efecto prebiótico, ↓ateroesclerosis, ↑saciedad	Shoatb et al. (2016); Roshan et al. (2019)

Fitoesteroles

Esterol y estanol vegetal	Germen de trigo, aceite de colza, cacahuete, etc.	↓TC, ↓LDL-C, antiinflamatorio, ↓NDS	Gylling et al. (2014); Vannierlo et al. (2015); Plat et al. (2019)
---------------------------	---	-------------------------------------	--

Polifenoles

Antocianinas y proantocianidinas	Lichi, uva, arándano, cacao, etc.	AOX, previene y trata la hiperuricemia y/o gota, ↓CVD	Moriwaki et al. (2011); Li et al. (2012), (2017)
Isoflavonas	Soja, miso, tofu, alimentos a base de soja, linaza, etc.	↓CVD, ↓LDL-C, ↓osteoporosis, ↓riesgo de DM, ↓enfermedad hepática	Duru et al. (2018); de Piano et al. (2019)
Lignanos	Semilla de sésamo, brócoli, fresa, col de Bruselas, aceituna, etc.	↓CVD, ↓riesgo de cáncer hormonal	Yoder et al. (2015); Kiyama (2016); López-Biedma et al. (2016)
Resveratrol	Uva roja, arándano, mora, cacao, etc.	↓CVD, ↓LDL-C	Gambini et al. (2015); Kuršvietienė et al. (2016); Pannu & Bhatnagar (2019)

Prebióticos

Inulina, fructooligosacáridos, xilooligosacáridos	Escarola, cebolla, ajo, alcachofa de Jerusalén, diente de león, puerro, espárrago, etc.	↓síntomas de depresión, efecto bifidogénico, ↓ateroesclerosis, ↑saciedad	Shoib et al. (2016); Kazemi et al. (2019); Roshan et al. (2019)
---	---	--	---

Probióticos

<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i>	Leches fermentadas, postres, alimentos no lácteos suplementados con microorganismos probióticos	Alteración de la microbiota intestinal, ↓aumento de peso, ↓circunferencia abdominal, ↓glucosa en suero, ↓insulina y HOMA-IR, ↓LDL-C, ↑niveles de GSH en sangre, ↓productos oxidados en sangre, ↓marcadores de inflamación, ↓hipertensión, ↓hiperglucemia, ↑HDL-C	Ejtahed et al. (2019); Kassaian et al. (2019); Rezazadeh et al. (2019); Roshan et al. (2019); Salami et al. (2019)
---	---	--	--

Simbióticos

<i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>B. lactis</i> más inulina, fructooligosacáridos, xilooligosacáridos	Alimentos suplementados con ingredientes prebióticos y probióticos: helados, postres, granolas, chocolates, etc.	↓marcadores de inflamación, ↑capacidad antioxidante total en suero/plasma, ↑niveles de GSH en sangre, ↑NO, ↓riesgo de infección, ↓hipertensión, ↓hiperglucemia	Wu et al. (2018); Kassaian et al. (2019); Zheng et al. (2019)
--	--	--	---

Abreviaturas: AOX, antioxidante; CVD, enfermedad cardiovascular; DM, diabetes mellitus; GSH, glutatión; HDL-C, colesterol-lipoproteína de alta densidad; HOMA-IR, modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina; IM, mediador inflamatorio; LDL-C, colesterol-lipoproteína de baja densidad; ND, enfermedad neurológica; NO, óxido nítrico; TC, colesterol total.

1.1. Los Ácidos Grasos Poliinsaturados Omega-3: los ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico

Los **lípidos**, uno de los nutrientes constituyentes de los alimentos, son un conjunto muy heterogéneo de moléculas orgánicas –biomoléculas– que se caracterizan por ser insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos no polares. Están constituidos fundamentalmente por tres elementos: carbono, hidrógeno y oxígeno; pudiendo también aparecer, aunque en menor grado, nitrógeno, fósforo y azufre. Cuando forman parte del organismo, desempeñan tres funciones biológicas esenciales: de reserva energética, estructural (forman parte de las membranas celulares, de las vainas que recubren los nervios, de los tejidos de los órganos internos,...) y reguladora (actúan como hormonas, mensajeros intracelulares, vitaminas,...). Los lípidos pueden clasificarse en función de si tienen o no enlaces éster y, por tanto, si pueden o no hidrolizarse, en lípidos saponificables o insaponificables, respectivamente.

Uno de los componentes principales de los conocidos como lípidos saponificables son los **ácidos grasos**: moléculas de naturaleza lipídica formadas por una cadena hidrocarbonada lineal de entre cuatro y veinticuatro átomos de carbono, unida por uno de sus extremos a un grupo carboxilo. Tomando como referencia su estructura química, los ácidos grasos se pueden clasificar en: *saturados* (SFA), cuando todos sus carbonos se unen entre sí mediante enlaces sencillos; e *insaturados*, cuando hay uno (*monoinsaturados* – MUFAs) o varios (*poliinsaturados* – PUFAs) enlaces dobles entre los carbonos de la cadena hidrocarbonada. Dentro de este último tipo y atendiendo a la posición de su(s) doble(s) enlace(s), existen tres grandes grupos de ácidos grasos insaturados: un grupo cuyo primer doble enlace está entre el carbono 9 y el 10, identificado como perteneciente a la serie o familia *omega-9* (ω -9) y cuyo principal componente es el ácido oleico (18:1 ω -9, OA); un segundo grupo, que posee su primer doble enlace entre los carbonos 6 y 7, se identifica como perteneciente a la serie o familia *omega-6* (ω -6), siendo su principal componente el ácido linoleico (18:2 ω -6, LA); y, finalmente, un tercer grupo que presenta su primer doble enlace entre los carbonos 3 y 4, se identifica como serie o familia *omega-3* (ω -3), y tiene al ácido

α -linolénico (18:3 ω -3, ALA) como principal componente (Gil Hernández et al., 2005). Centrándonos en los PUFAs ω -3, estos se pueden encontrar de forma mayoritaria en las nueces, en determinadas semillas y aceites vegetales y en los organismos acuáticos, originándose principalmente en el hígado del pescado blanco como el bacalao y el fletán, en el cuerpo del pescado azul como el salmón, el arenque y la macarela, y en la grasa de mamíferos marinos como las focas y las ballenas (Mazza, 1998).

El cuerpo humano es capaz de sintetizar, a partir del ácido palmítico, prácticamente todos los ácidos grasos que necesita mediante la combinación de varios mecanismos de oxidación y elongación; son los conocidos como *ácidos grasos no esenciales*. Sin embargo, existen determinados ácidos grasos que son necesarios para el organismo y que éste no puede sintetizar, como consecuencia de las limitaciones de la enzima responsable de insertar dobles enlaces en posición *cis*: son los llamados *ácidos grasos esenciales* (EFAs). Por tanto, estos deben ser incorporados a través de la dieta. Dos de los EFAs más populares, probablemente por sus propiedades beneficiosas para la salud, son el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) que, si bien pueden ser sintetizados a partir del ALA, sus tasas de conversión son realmente bajas, especialmente en el caso del DHA (Gerster, 1998; Brenna et al., 2009). Por su interés y potencial aplicación en productos alimentarios, estos PUFAs ω -3 constituyen el núcleo central de este capítulo.

1.1.1. Consideraciones generales sobre el EPA y el DHA

El **ácido eicosapentaenoico** (*ácido (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoico, 20:5 ω -3*), de fórmula química $C_{20}H_{30}O_2$, es un PUFA ω -3 compuesto por un total de 20 átomos de carbono y 5 dobles enlaces *cis* conjugados a partir del primero, que se encuentra en el carbono número 3 (Figura 2a). El EPA actúa como precursor de algunos eicosanoides importantes como las prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos.

Por su parte, el **ácido docosahexaenoico** (*ácido (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoico, 22:6 ω -3*), de fórmula química $C_{22}H_{32}O_2$, es un

PUFA ω -3 que contiene 22 átomos de carbono y 6 dobles enlaces *cis* conjugados a partir del primero, que se encuentra también en el tercer carbono (Figura 2b). El DHA es el componente principal de la materia gris del cerebro y, en forma de fosfolípido, también es el principal componente de la retina, los testículos y los espermatozoides.

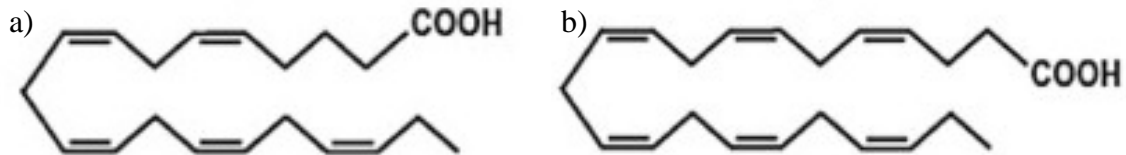


Figura 2. Estructuras químicas del a) EPA y b) DHA.

Ambos PUFAs ω -3 se pueden encontrar como ácidos grasos libres, en forma esterificada y en forma de fosfolípidos (como ocurre en las membranas celulares), o en forma de triglicéridos (como están en los lípidos de almacenamiento). La forma en que se encuentren es bastante importante, puesto que influye sobre las características y propiedades del aceite que los contiene y sobre su biodisponibilidad (Beckermann et al., 1990; Dyerberg et al., 2010). Es más, cuando se encuentran en forma de triglicéridos, la posición que ocupen dentro de la molécula de triglicérido influye sobre el proceso de absorción, siendo esta posición diferente en el caso de aceites de pescado y aceites de mamíferos marinos. Shahidi & Miraliakbari (2004) reseñaron que, en los aceites de mamíferos marinos, los PUFAs ω -3 suelen ocupar preferentemente las posiciones sn-1 y sn-3 del glicerol, en contraposición a lo que ocurre en los aceites de pescado donde suelen ocupar la posición sn-2. Según parecen indicar los últimos estudios, cuando el EPA y el DHA se encuentran en forma de triglicéridos, su biodisponibilidad es mayor que cuando se encuentran en forma de ésteres etílicos. No obstante, los científicos no se ponen de acuerdo y existe bastante controversia al respecto, pudiendo encontrar trabajos donde se afirma justo lo contrario (Wakil et al., 2010; Mozaffarian et al., 2013). Por otro lado, tampoco hay demasiada información sobre la biodisponibilidad del EPA y el DHA cuando se encuentran en forma de fosfolípidos y, la poca que hay, no es concluyente (Laidlaw et al., 2014).

En relación a las recomendaciones nutricionales sobre la ingesta de estos PUFAs ω -3, la *Sociedad Internacional para el Estudio de Ácidos Grasos y Lípidos* (ISSFAL) sugiere para la población general la cantidad de 1 g/día de ALA –como precursor del

EPA– más 0.65 g/día de DHA, cantidades que deben obtenerse a través de la dieta (Carrero et al., 2005). Entre las posibles fuentes alimentarias de EPA y DHA, como ya indicamos para el resto de PUFAs ω -3, destacan fundamentalmente los aceites y grasas procedentes de algunos animales marinos: el aceite de hígado de bacalao y los aceites

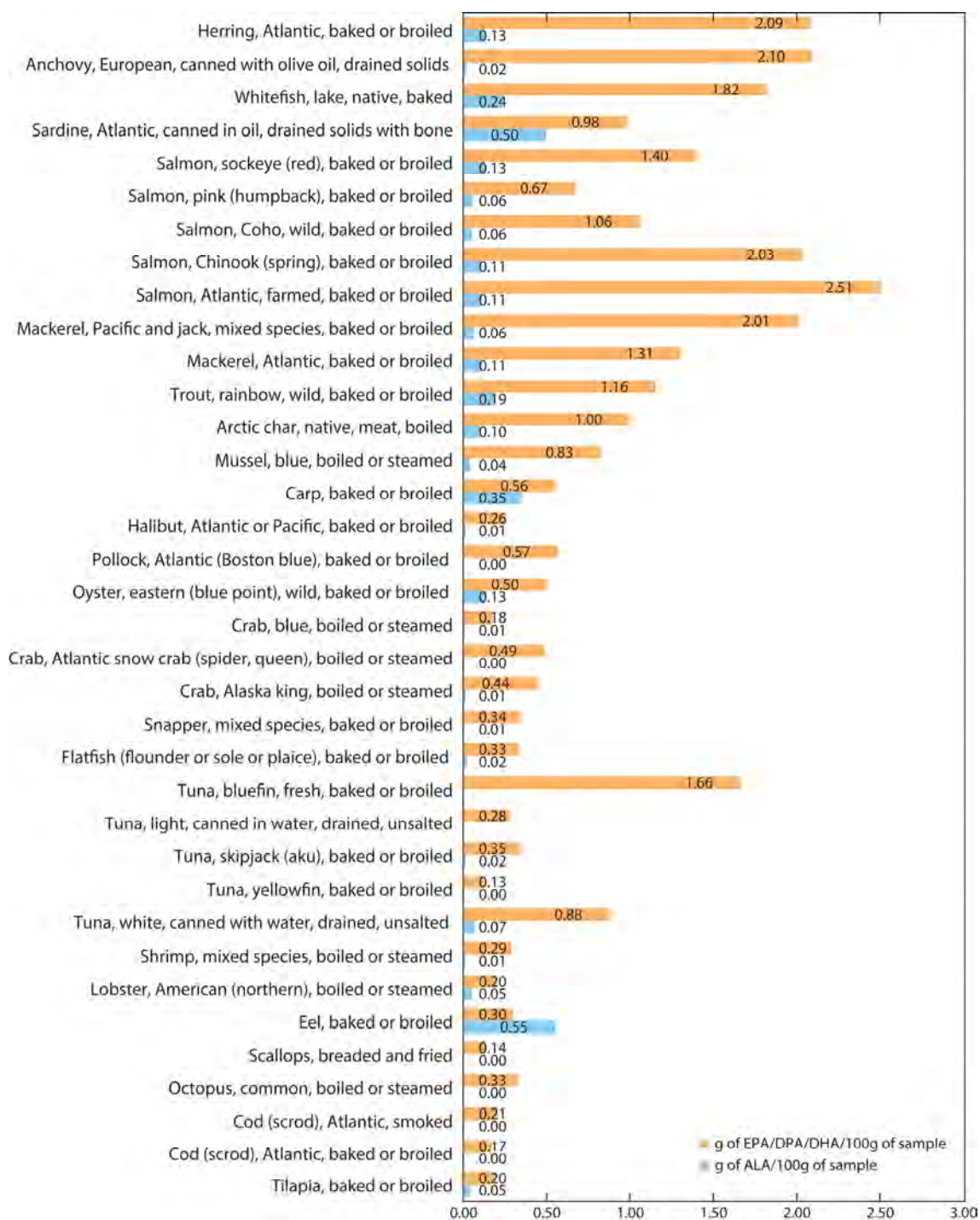


Figura 3. Contenido medio de ALA, EPA y DHA de pescados y mariscos (Shahidi & Ambigaipalan, 2018).

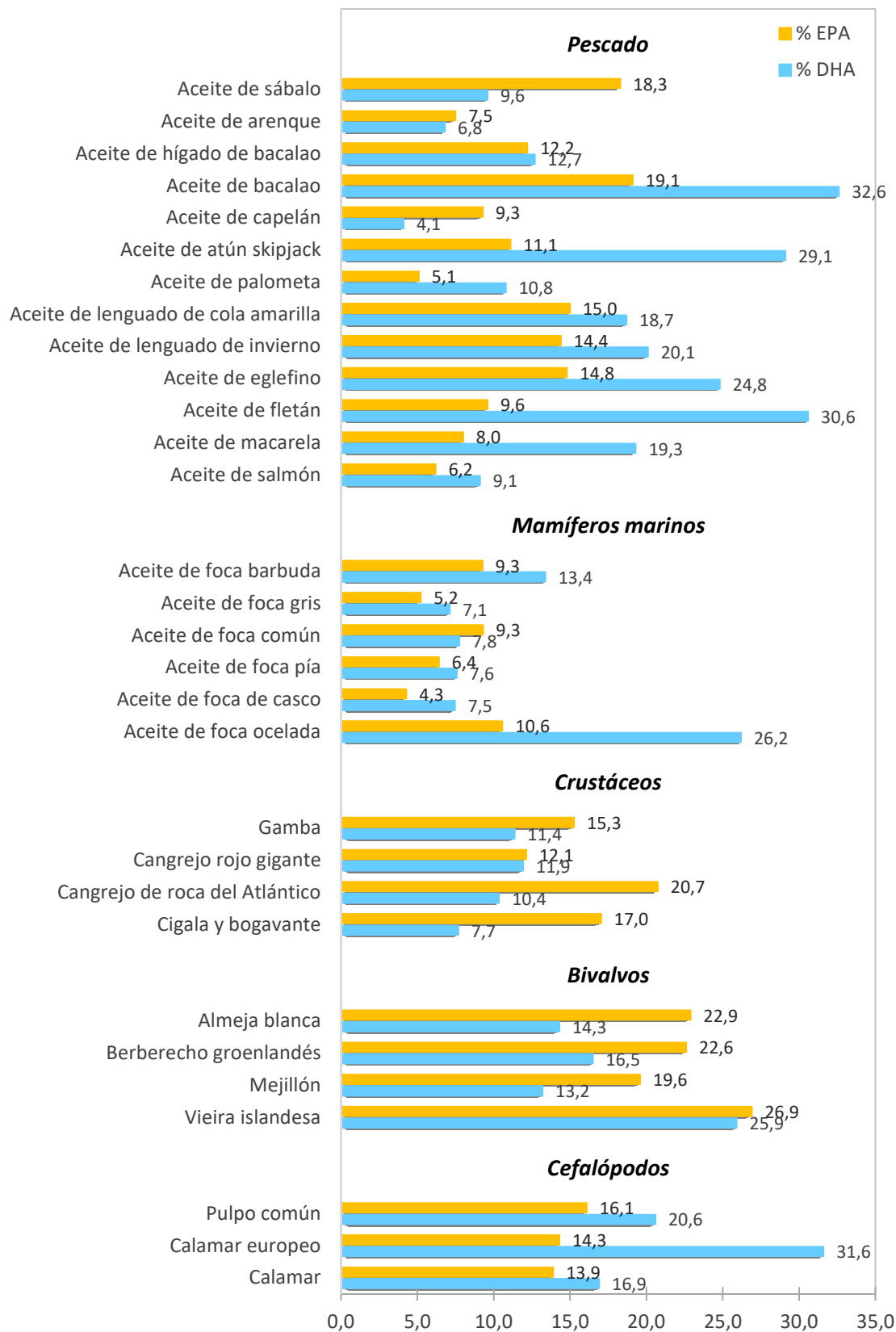


Figura 4. Porcentaje medio de EPA y DHA de pescados y mariscos con respecto al total de ácidos grasos.

de arenque, boquerón, sábalo, sardina, bacalao, macarela o salmón contienen cantidades relativamente elevadas (Figura 3). De entre todos ellos, los aceites de bacalao, fletán y atún skipjack son los que contienen mayores cantidades de DHA (en torno al 30 % del total de ácidos grasos), mientras que los aceites de bacalao, sábalo y lenguado de cola amarilla son los que contienen mayores porcentajes de EPA (entre el 15 – 19 % de los ácidos grasos totales) (Figura 4). Además, desde hace unos años el aceite de krill se está popularizando y consumiendo cada vez más, gracias a su alto contenido en EPA y DHA, presente tanto en forma de triglicéridos como de fosfolípidos. Otras posibles fuentes renovables de EPA y DHA son las microalgas y algunos microorganismos como hongos y fitoplancton (Alasalvar et al., 2002). Shahidi (2006) afirmó que las algas marinas son los productores de PUFAs ω -3 más importantes de la biosfera. Muchas de ellas ya han sido identificadas como potenciales fuentes de DHA: las especies *Cryptocodinium cohnii* y *Schizochytrium* producen aproximadamente un 55 % y un 40 % de DHA sobre el total de ácidos grasos, respectivamente.

1.1.2. Evidencias científicas de su bioactividad *in vitro* e *in vivo*

En las últimas décadas, se han llevado a cabo con éxito multitud de estudios epidemiológicos y de intervención que pretendían estudiar el papel de los PUFAs ω -3 –especialmente del EPA y el DHA– sobre la promoción de la salud y la prevención de determinadas enfermedades. En este apartado hacemos una revisión de los resultados más relevantes.

Las enfermedades cardiovasculares, habitualmente relacionadas con dietas altas en grasas, son la principal causa de muerte en los países desarrollados. Por ello se han realizado numerosos estudios sobre los efectos de los PUFAs ω -3 en las principales enfermedades cardiovasculares: infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular, cardiopatía congénita, trastorno del ritmo cardíaco, fibrilación auricular, aterosclerosis, cardiopatía coronaria, insuficiencia cardíaca, paro cardiorrespiratorio, valvulopatías y enfermedad vascular periférica (Mozaffarian et al., 2016). Albert et al. (1998)

reportaron que un consumo regular de pescado rico en PUFAs ω -3 reduce el riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular, en línea con lo que afirma la “paradoja del esquimal”. Esta paradoja hace referencia al fenómeno que observaron dos científicos daneses en la población esquimal que, a pesar de consumir en su dieta una gran cantidad de grasas y colesterol (de hasta el 40 % de su ingesta calórica), mostró una menor incidencia de enfermedad cardiovascular que la población danesa que habitaba la isla (Bang et al., 1980). Años después, se desarrollaron estudios epidemiológicos sobre las poblaciones costeras de Japón y de Alaska que también mostraron una relación inversa entre la enfermedad cardiovascular y la ingesta de PUFAs ω -3 (Davidson et al., 1993).

Ya a comienzos del siglo XXI, Uauy & Valenzuela (2000) apuntaban que los PUFAs ω -3, especialmente el EPA y el DHA, alteran factores lipídicos y hemostáticos tales como la agregación plaquetaria y el tiempo de sangrado, reduciendo así el riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular. Se ha demostrado que el DHA actúa como antiagregante plaquetario, agente antiarrítmico y, además, es capaz de reducir los niveles de triglicéridos en sangre (Kang & Leaf, 1996). Esto último también fue constatado por Mori et al. (2000) quienes, en un estudio de intervención, suplementaron la dieta de 56 hombres con 4 g/día de EPA o DHA durante seis semanas. Finalizado el estudio observaron una importante reducción en los niveles de triglicéridos (en torno al 20 %) y un incremento de los niveles de colesterol HDL. Ya más recientemente, Jones et al. (2014) encontraron una mejora significativa de los niveles de colesterol HDL, triglicéridos y presión arterial en pacientes que consumieron un nuevo aceite de colza enriquecido en DHA, reduciendo así el riesgo de padecer una cardiopatía coronaria.

Por otro lado, Kris-Etherton et al. (2002) informaron del efecto cardioprotector de los PUFAs ω -3 al reducir la probabilidad de sufrir arritmias ventriculares, retardar el crecimiento de las placas de aterosclerosis en las paredes de las arterias, promover la relajación endotelial inducida por el óxido nítrico y ejercer un efecto hipotensivo, hipotriglicéridémico y antitrombogénico. Tanto es así que, desde hace ya algunos años, se viene considerando la ratio PUFAs ω -6/PUFAs ω -3 como un biomarcador importante en la medicina cardiovascular (Simopoulos, 2002). Muchos estudios basados en ensayos clínicos han demostrado que el consumo de PUFAs ω -3 mejora los resultados de la insuficiencia cardíaca y la función vascular, disminuye la presión arterial y contribuye a la prevención del paro cardiorrespiratorio, aumentando de esta forma las tasas de

supervivencia (Burr et al., 1989; Hu et al., 2002; Shahidi & Miraliakbari, 2004; Harris et al., 2007; GISSI-HF investigators, 2008; Mozaffarian & Wu, 2011; Mozaffarian et al., 2011; MacChia et al., 2013; Colussi et al., 2017; O'Connell et al., 2017). Hace pocos años, Siscovick et al. (2017) también reportaron que la suplementación de la dieta con PUFAs ω -3 reducía la tasa de mortalidad por cardiopatía coronaria en pacientes con enfermedad coronaria previa, probablemente debido a una reducción en la incidencia del paro cardiorrespiratorio inducido por isquemia. Para otros posibles efectos sobre la salud cardiovascular, pueden consultarse las revisiones sistemáticas que llevaron a cabo Schwab et al. (2014) y Elagizi et al. (2018).

En estas últimas décadas, también han surgido algunos estudios epidemiológicos experimentales y ensayos clínicos que aseguran que los PUFAs ω -3 reducen el riesgo de cáncer. Prener et al. (1996) ya anunciaron que los PUFAs ω -3 poseen un efecto anticarcinogénico, mientras que los PUFAs ω -6 y los SFAs pueden promover el desarrollo de cáncer. En base a un estudio internacional llevado a cabo con población de Alaska, Canadá y Groenlandia entre 1969 y 1988, Prener et al. (1996) publicaron que la tasa de incidencia de cáncer de próstata en esquimales fue un 70 – 80 % menor que la de los no esquimales, fenómeno que atribuyeron a la dieta ancestral de estos –basada en el consumo de productos del mar y, por ende, ricos en PUFAs ω -3. Desde entonces, se han publicado diferentes revisiones bibliográficas sobre el tema (Terry et al., 2001; Simopoulos, 2002; Larsson et al., 2004; MacLean et al., 2006; Chen et al., 2007; Zheng et al., 2013).

Algunos otros estudios han demostrado que los PUFAs ω -3 influyen positivamente sobre varios tipos de cáncer: colorrectal, próstata, mama, pulmón, colon, piel, estómago, ovario y páncreas (Kato et al., 1997; Takezaki et al., 2003). Buena prueba de ello puede ser el estudio de Caygill et al. (1996) quienes, analizando los datos de mortalidad recopilados en 24 países europeos, detectaron una correlación inversa entre el consumo de pescado o aceite de pescado y la tasa de mortalidad en pacientes con cáncer de colon. Años más tarde, Barnés et al. (2012) observaron una inhibición del crecimiento tumoral en neuroblastomas de entre un 40 y un 70 % al sustituir las grasas dietéticas por un aceite de pescado enriquecido con PUFAs ω -3. A raíz de estos resultados, muchos estudios recomiendan el uso de EPA y DHA para el tratamiento del neuroblastoma (So et al., 2015). Otros tantos destacan el efecto positivo que la

suplementación dietética con PUFAs ω -3, α -tocoferol, ALA, fibras y fitoestrógenos ejerce en pacientes con cáncer de mama (Chen et al., 2002; Flower et al., 2013). Recientemente, Yang et al. (2017) han podido demostrar un aumento significativo de apoptosis en líneas celulares humanas de cáncer de mama al combinar con vitamina D₃ los PUFAs ω -3, y Dichwalkar et al. (2017) han encontrado que el tratamiento de los cánceres digestivos superiores con el fármaco DHA-Paclitaxel inhibe la proliferación celular, induce la muerte celular y suprime la supervivencia a largo plazo de las células tumorales.

Por otra parte, también se ha demostrado que los PUFAs ω -3 mejoran la eficacia y la tolerabilidad de las terapias oncológicas, además del estado nutricional y la función inmune del paciente (Mocellin et al., 2017; Yu et al., 2017). Así lo corroboraron Finocchiaro et al. (2012), quienes suministraron a un total de 33 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado que estaban recibiendo quimioterapia, 4 cápsulas/día (510 mg de EPA y 340 mg de DHA) durante 66 días. Una vez concluido el estudio, observaron un aumento significativo de peso corporal y un efecto antioxidante y antiinflamatorio. Poco después, de Aguiar Pastore Silva et al. (2015) apuntaban a que una suplementación de entre 600 mg y 3.6 g de PUFAs ω -3 durante los tratamientos convencionales contra el cáncer como la radioterapia, quimioterapia o quimioradioterapia, podría posiblemente prevenir la toxicidad de la terapia y mejorar la tasa de supervivencia del paciente oncológico. Además, esta suplementación con PUFAs ω -3 también podría prevenir la posterior neurotoxicidad del tratamiento (Vilar-González et al., 2017). Ya en estos últimos años, Pedrazzoli et al. (2017) descubrieron que una dieta con alto contenido de proteína y calorías y suplementada con PUFAs ω -3, ayudaba a pacientes con cáncer de cabeza y cuello sometidos a radioterapia a mantener su peso corporal y a tolerar mejor el tratamiento, aumentando su calidad de vida. Y es que según todo parece indicar, la ingesta prolongada de al menos 1.5 g/día de PUFAs ω -3 mejora los parámetros clínicos, biológicos y funcionales de los pacientes con caquexia por cáncer y, por consiguiente, su calidad de vida (Werner et al., 2017).

Aunque existen algunas discrepancias en la comunidad científica, varios estudios han demostrado que la suplementación con PUFAs ω -3 o aceite de pescado ejerce un efecto beneficioso frente a la diabetes tipo 2 (Wang et al., 2003). MacLean et al. (2004) realizaron una revisión bibliográfica y sugirieron que los PUFAs ω -3 pueden

disminuir los niveles de triglicéridos en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 o síndrome metabólico, pero no poseen ningún efecto estadísticamente significativo sobre los valores de colesterol total, HDL, LDL, glucosa en ayunas o hemoglobina glicada; tampoco parecieron afectar a la insulina en sangre o a la resistencia a la insulina. Sin embargo, Tsitouras et al. (2008) realizaron un estudio de intervención en personas mayores durante 8 semanas y sí que encontraron correlación entre el consumo de PUFAs ω -3 y la sensibilidad a la insulina.

Con respecto al efecto positivo que los PUFAs ω -3 ejercen sobre las enfermedades neurodegenerativas, hay un mayor grado de consenso. Bastantes estudios epidemiológicos han demostrado que menores consumos de PUFAs ω -3 aumentan el riesgo de sufrir deterioro cognitivo relacionado con la edad y demencia, especialmente demencia senil de tipo Alzheimer (Cole et al., 2009). También MacLean et al. (2004) recopilaron evidencias científicas suficientes para avalar la relación entre los PUFAs ω -3 y la prevención del Alzheimer. Más recientemente, Cederholm (2017) publicó que una dieta rica en pescado azul puede influir positivamente sobre la salud cognitiva de las personas mayores y, según estudios previos, la suplementación con PUFAs ω -3 también podría beneficiar a los mayores con problemas de memoria, deterioro cognitivo leve y enfermedad de Alzheimer. Otros posibles efectos sobre las enfermedades neurodegenerativas pueden consultarse en las revisiones realizadas por Cole et al. (2009) y Cunnane et al. (2009).

También existen varios estudios epidemiológicos que asocian el consumo de pescado y otros productos marinos con un menor riesgo de tener depresión (Hibbeln, 1998; Nemets et al., 2006). Por ejemplo, Puri et al. (2002) demostraron que el EPA actúa como agente antidepresivo al originar cambios estructurales en el cerebro. Posteriormente, el metanálisis realizado por Martins (2009) arrojó evidencias científicas suficientes que permiten afirmar que el EPA es más eficaz que el DHA para tratar la depresión. No obstante, un déficit de DHA durante el desarrollo infantil temprano puede afectar al sistema nervioso central y podría aumentar la vulnerabilidad a la depresión durante la edad adulta (Farquharson et al., 1995; Hibbeln, 1998). Además, se ha demostrado que la suplementación de la dieta con aceite de pescado o PUFAs ω -3 favorece la protección de los jóvenes frente a los principales trastornos depresivos (Nemets et al., 2006; Rice et al., 2016).

Y no queríamos acabar este apartado sin mencionar alguno de los numerosos efectos positivos descritos para los PUFAs ω -3 sobre la salud materna y del niño. Se ha demostrado su influencia sobre la duración del embarazo, el nacimiento prematuro, el peso al nacer, la depresión posparto, la hipertensión inducida por el embarazo, el patrón de crecimiento postnatal, el desarrollo cerebral del niño, el desarrollo neurológico y cognitivo, la agudeza visual, el trastorno del espectro del autismo, el trastorno por déficit de atención e hiperactividad, la dificultad de aprendizaje, la dermatitis atópica, las alergias, las enfermedades del aparato respiratorio,... (Newberry et al., 2016). Para ampliar la información sobre otros posibles efectos beneficiosos en la salud, pueden consultarse las revisiones de Ruxton et al. (2004), Ruxton et al. (2007), Calder & Yaqoob (2009) y Shahidi & Ambigaipalan (2018).

1.1.3. Principales limitaciones tecnológicas

En el apartado anterior hemos repasado de forma más o menos detallada los principales beneficios que se derivan del consumo de PUFAs ω -3 –fundamentalmente EPA y DHA. Sin embargo, muchos de estos lípidos bioactivos altamente insaturados son bastante inestables y susceptibles de degradarse químicamente, lo que supone una de sus principales limitaciones en cuanto a su aplicabilidad. Esta degradación lipídica puede ser de dos tipos: por un lado, los triglicéridos pueden sufrir hidrólisis química o enzimática y, por otro, los PUFAs pueden sufrir procesos oxidativos; ambos mecanismos conducen a un deterioro y a una pérdida de calidad del alimento. En el primer caso, conocido como *enranciamiento hidrolítico*, la hidrólisis de los triglicéridos se debe fundamentalmente a la acción de lipasas presentes en el producto o producidas por ciertos microorganismos; en el segundo, llamado *enranciamiento oxidativo*, la oxidación de los dobles enlaces de los PUFAs se debe al oxígeno y a la acción de lipoxigenasas. El enranciamiento hidrolítico repercute sobre las propiedades organolépticas del aceite pero nutricionalmente no tiene demasiada importancia porque, para su absorción, los lípidos tienen que hidrolizarse (al igual que ocurre en el organismo durante la digestión); sin embargo, el enranciamiento oxidativo genera compuestos volátiles con olores y sabores desagradables, menor valor nutricional y una

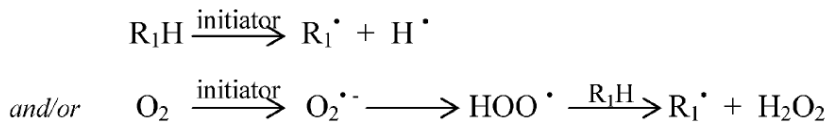
relativa toxicidad (Coupland & McClements, 1996; McClements & Decker, 2000). Por tanto, la oxidación lipídica supone la principal limitación tecnológica de este tipo de compuestos bioactivos y el primer desafío que debe afrontar la industria alimentaria si quiere incorporarlos en sus productos.

La oxidación lipídica es un proceso bastante complejo que puede ocurrir a través de diferentes mecanismos –autooxidación, fotooxidación, oxidación térmica y oxidación enzimática– y en presencia de sistemas catalíticos muy diversos –como luz, calor, enzimas, metales, metaloproteínas y microorganismos (Shahidi & Zhong, 2010). La autooxidación es el mecanismo principal de oxidación de lípidos en productos alimentarios, y se define como un proceso autocatalítico espontáneo de reacciones en cadena que transcurre a través de la formación de radicales libres. Este mecanismo puede acelerarse aumentando la temperatura, como en la oxidación térmica. La fotooxidación es un proceso de oxidación que transcurre solamente en presencia de luz y por mediación de compuestos fotosensibilizadores, diferenciándose de los anteriores en que las reacciones de formación de hidroperóxidos transcurren mediante adición directa de oxígeno al doble enlace. Finalmente la oxidación enzimática, catalizada fundamentalmente por las enzimas lipoxigenasas, da lugar a los mismos hidroperóxidos que la autooxidación, diferenciándose únicamente en la estereoquímica y en las proporciones relativas (ya que la reacción es estereoespecífica y regioselectiva) (Min & Boff, 2002; Choe & Min, 2006).

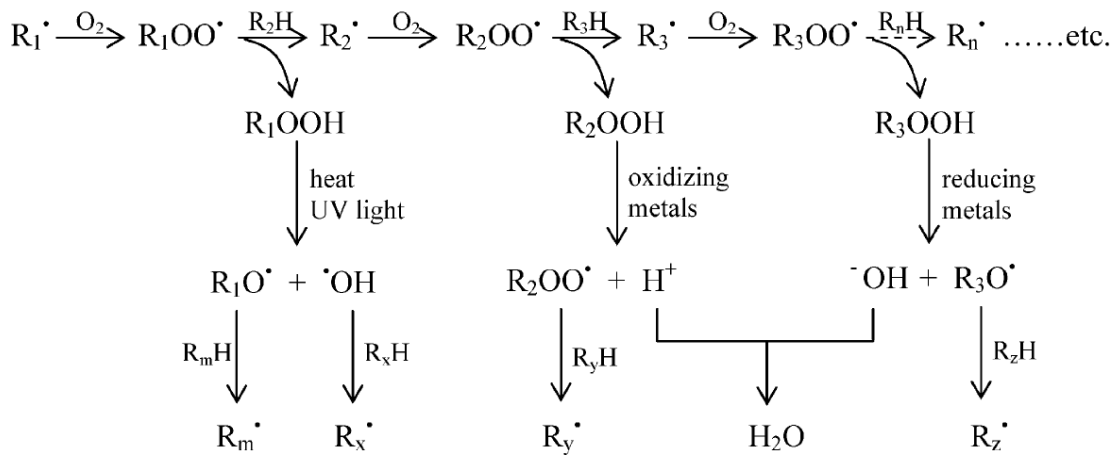
Hoy en día está más que aceptado que el proceso de autooxidación lipídica transcurre en tres fases distintas: iniciación, propagación y terminación (Budilarto & Kamal-Eldin, 2015; Barden & Decker, 2016). En primer lugar las moléculas de lípido insaturado (RH), en presencia de un iniciador como es el caso del calor, la luz, la radiación ultravioleta, los iones metálicos o las metaloproteínas, pierden un átomo de hidrógeno de alguno de los grupos metileno adyacentes al doble enlace y producen radicales libres (R^{\bullet}). A continuación, estos radicales lipídicos reaccionan con el oxígeno atmosférico para formar radicales peroxilo (ROO^{\bullet}) que, a su vez, atacan a nuevas moléculas de lípido para formar hidroperóxidos orgánicos (ROOH) y nuevos radicales lipídicos. Este proceso puede repetirse durante varios miles de veces durante la etapa de propagación, bien hasta que se agote la fuente de hidrógeno o hasta que se interrumpa la cadena, por ejemplo, por un antioxidante. Finalmente, en la etapa de terminación los

radicales se unen de nuevo por medio de sus electrones libres para formar compuestos no radicalarios estables, deteniendo así la reacción. Por tanto, la oxidación lipídica es una reacción en cadena que se propaga y se acelera por sí misma. Normalmente el proceso comienza muy despacio y, a medida que transcurre el tiempo y se va autoalimentando, su velocidad se dispara de forma exponencial. La Figura 5 recoge de forma esquemática las tres fases que hemos descrito.

Initiation:



Propagation:



Termination:

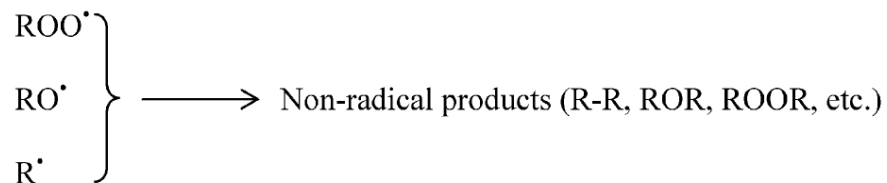


Figura 5. Reacciones del mecanismo de autooxidación de los lípidos (Shahidi & Zhong, 2010).

La etapa de iniciación es bastante compleja y, probablemente, la menos conocida de todo el proceso. Es durante las etapas de propagación y terminación cuando se generan los hidroperóxidos lipídicos como productos primarios de la oxidación. Estos hidroperóxidos son inodoros e insípidos, por lo que no afectan a la calidad sensorial de

los alimentos; sin embargo, son compuestos bastante inestables y reactivos que rápidamente se descomponen en una mezcla de radicales peroxilo (ROO^\bullet), alcoxilo (RO^\bullet), hidroxilo ($^\bullet\text{OH}$) y nuevos radicales lipídicos (R^\bullet) que alimentan la reacción y forman los productos secundarios de la oxidación (aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos, ácidos orgánicos volátiles y compuestos epoxídicos, entre otros), muchos de los cuales poseen olores desagradables que pueden detectarse fácilmente a muy bajas concentraciones. Por lo tanto, son estos productos secundarios de oxidación los responsables del deterioro organoléptico de los alimentos que sufren enranciamiento oxidativo (Kanner, 2007). En la Figura 6 detallamos las posibles rutas para la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos y la formación de productos de oxidación secundarios.

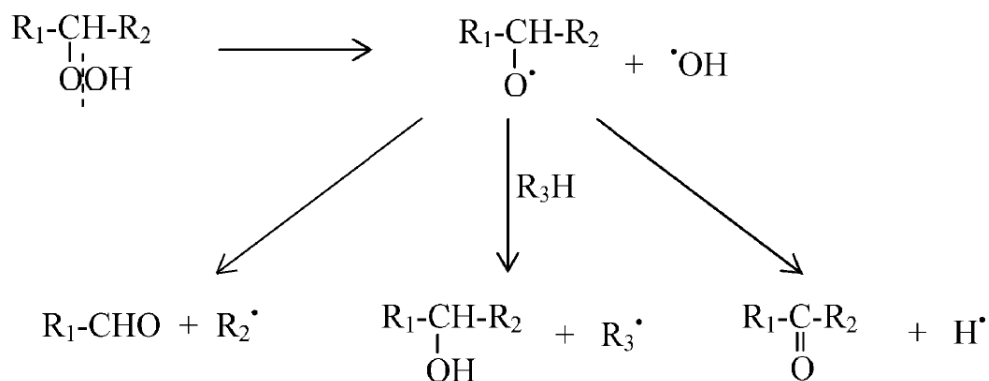


Figura 6. Rutas para la descomposición de los hidroperóxidos y la formación de productos de oxidación secundarios (Shahidi & Zhong, 2010).

A temperaturas bajas y/o moderadas, los hidroperóxidos lipídicos constituyen una fracción muy importante de los productos de oxidación. Estos hidroperóxidos se forman y se descomponen continuamente y de forma simultánea pero, durante la primera etapa de la oxidación y hasta el final del periodo de inducción, la velocidad de formación es mucho mayor que la de descomposición, pudiéndose observar un aumento significativo en la cantidad de hidroperóxidos. Cuando los niveles de hidroperóxidos son lo suficientemente elevados, su descomposición se produce más rápidamente que su formación, la cantidad de productos secundarios de oxidación aumenta de forma importante y la velocidad de oxidación crece exponencialmente (Figura 7). Según la composición de los alimentos en ácidos grasos y las condiciones de reacción, los productos secundarios de oxidación que se obtienen pueden variar; por ejemplo, la

oxidación de los PUFAs ω -3 da propanal como uno de sus principales productos de oxidación secundarios mientras que los PUFAs ω -6 dan como resultado la producción de hexanal (Shahidi & Zhong, 2010). Estos aldehídos pueden seguir oxidándose hasta dar una amplia gama de productos de oxidación volátiles y no volátiles, más o menos tóxicos, que llamamos productos secundarios.

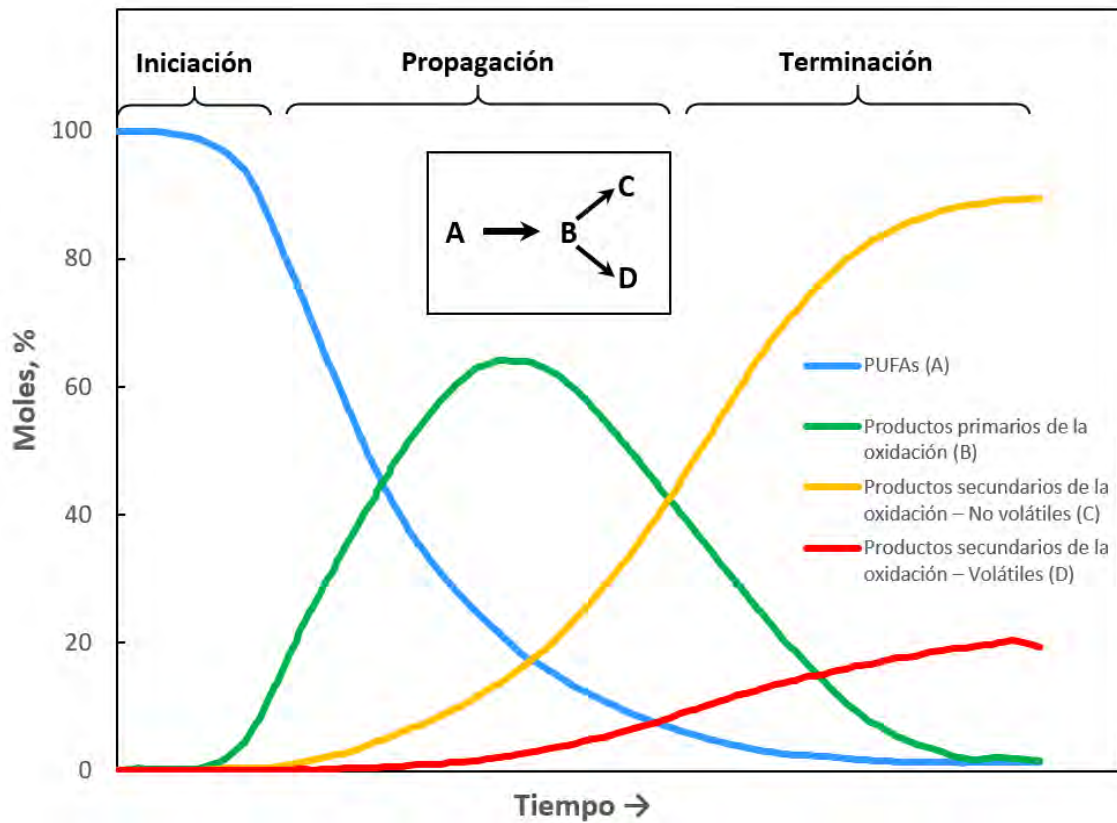


Figura 7. Evolución hipotética de los productos de la oxidación lipídica con el tiempo.

1.2. Los Curcuminoides: la curcumina

Los compuestos naturales de origen vegetal son la base de muchos alimentos funcionales (Nelson et al., 2017). La *Curcuma longa L.* o cúrcuma, como popularmente se la conoce, ha sido una de las plantas más estudiadas por sus potenciales propiedades beneficiosas para la salud. La cúrcuma, que pertenece a la familia de las zingiberáceas, es una planta tropical herbácea, perenne y rizomatosa, originaria del sur y del sudeste del continente asiático, que se cultiva y crece en las regiones tropicales y subtropicales de África, Asia y América Latina (Priyadarsini, 2014). Se viene utilizando desde la antigüedad como colorante y saborizante alimentario, como conservante y en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes enfermedades (Boga et al., 2013). Sus rizomas o tallos subterráneos, de color naranja vivo bajo una fina película marrón clara, son precisamente su parte más valiosa ya que contiene una serie de compuestos fenólicos denominados **curcuminoides** (3 – 5 %) que se utilizan ampliamente en numerosas industrias. Este grupo comprende tres compuestos principales químicamente relacionados, cuyas estructuras mostramos en la Figura 8: la curcumina (~ 77 %), la demetoxicurcumina (~ 18 %) y la bisdemetoxicurcumina (~ 5 %) (Ali et al., 2014; Araiza-Calahorra et al., 2018). En las últimas décadas se han identificado algunos otros curcuminoides como la ciclocurcumina y la calebina A, pero en cantidades mucho más pequeñas (Jayaprakasha et al., 2005).

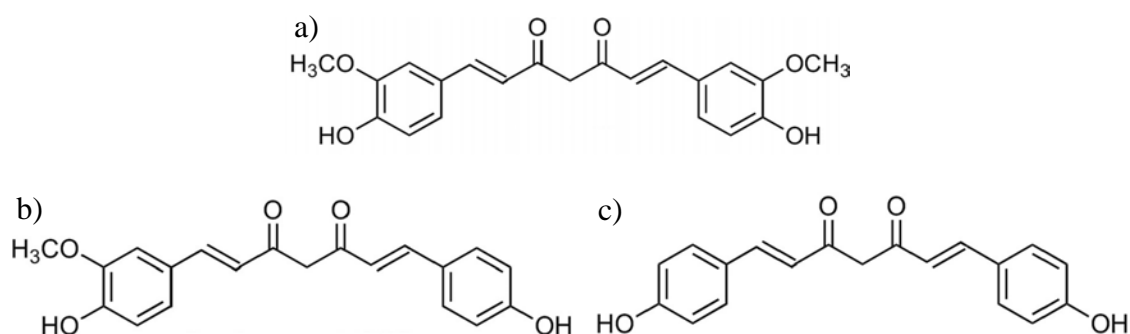


Figura 8. Estructuras químicas de la a) curcumina, b) demetoxicurcumina y c) bisdemetoxicurcumina.

Entre los diferentes curcuminoides, la curcumina es el más abundante, potente y conocido, ya que ha recibido una mayor atención gracias a sus interesantes propiedades

funcionales y nutracéuticas. Sin embargo, estudios recientes han revelado que los otros componentes, la demetoxicurcumina y la bisdemetoxicurcumina, podrían poseer un potencial bioactivo similar o incluso superior al de la curcumina (Peram et al., 2017). A modo de ejemplo, Ali et al. (2014) reportaron que la bisdemetoxicurcumina ejerce una mayor actividad anticancerígena que la demetoxicurcumina y ésta, a su vez, mayor que la de la curcumina. Además, Peram et al. (2017) informaron que la mezcla de los tres curcuminoides en una determinada proporción resultó ser más potente que los curcuminoides por separado, sugiriendo un posible efecto sinérgico entre ellos. En los apartados que siguen nos focalizamos sobre la curcumina, al tratarse del componente mayoritario y el más ampliamente estudiado; no obstante, no debe perderse de vista que, a nivel práctico, cuando hablamos de curcumina en el sector alimentario, generalmente no nos referimos al compuesto puro, sino a una mezcla de curcuminoides en una proporción más o menos similar a la del extracto.

1.2.1. Consideraciones generales sobre la curcumina

La **curcumina** (*1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona*), de fórmula química $C_{21}H_{20}O_6$, es un compuesto polifenólico natural de bajo peso molecular (368.38 g/mol) que se encuentra en algunas plantas medicinales, especialmente en los rizomas de la cúrcuma (Sharma et al., 2005). Fue aislada por primera vez por Vogel y Pelletier en 1815, quienes la describieron como un “colorante amarillo intenso”. Durante todo el siglo XIX, diferentes químicos reportaron sobre las posibles estructuras de la curcumina; sin embargo, hubo que esperar hasta casi un siglo después de su descubrimiento para que Milobedzka et al. (1910) publicaran la verdadera estructura química de esta molécula.

La curcumina se clasifica dentro de la familia de los diarilheptanoides, unos productos naturales cuyas estructuras poseen dos restos arilo, hidroxi u oxo sustituidos, unidos entre sí a través de una cadena carbonada de 7 átomos que posee una función 1,3-dicarbonílica y diversas insaturaciones. Dado que se pueden identificar dos residuos de ácido ferúlico unidos por un puente metilénico, ciertos autores se refieren a la curcumina con el nombre de ‘*diferuloilmetano*’ (Nieto Gómez, 2017). Por otra parte,

como la curcumina es una β -dicetona simétrica, solamente presenta dos tautómeros: la forma *ceto* (Figura 9a) y la forma *enol* (Figura 9b). La forma *ceto* es el tautómero predominante, tanto en estado sólido como en condiciones ácidas y neutras; sin embargo, en condiciones alcalinas predomina la forma *enol*, que es la que le proporciona su capacidad para eliminar radicales libres (Noureddin et al., 2019).

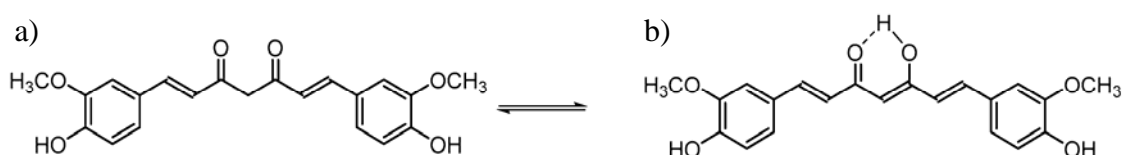


Figura 9. Equilibrio ceto-enólico de la curcumina.

En cuanto a su aspecto visual, la curcumina es un polvo amarillento-anaranjado con una estructura cristalina ordenada (monoclínica u ortorrómbica), aunque también puede presentarse de forma amorfa (Araiza-Calahorra et al., 2018). Tiene una absorbancia máxima a unos 430 nm, un punto de fusión de 183 °C y un pK_a de 8.54 (Tapal & Tiku, 2012; Kotha & Luthria, 2019). Posee, básicamente, tres sitios reactivos (el donador de hidrógeno, el aceptor de Michael y el quelante de metales) que le confieren sus características y propiedades más importantes. A nivel farmacológico, la *Agencia de Alimentos y Medicamentos* de los Estados Unidos (FDA) ha declarado a la curcumina como un compuesto seguro para la salud (no se han apreciado efectos tóxicos con dosis de hasta 5 g/Kg) (Gryniewicz & Ślifirski, 2012).

Respecto a la solubilidad, muchos estudios han publicado su coeficiente de reparto en octanol/agua, que es de 3.29 (PubChem-969516). Este valor pone de manifiesto un carácter predominantemente lipofílico que siempre se ha atribuido a las cadenas alifáticas que separan los grupos enólicos y fenólicos, altamente polares (Balasubramanian, 2006). No obstante, este carácter lipófilo no es total, mostrando en ocasiones un cierto comportamiento anfipático. Por ejemplo, la curcumina es prácticamente insoluble en agua a temperatura ambiente, tanto a pH ácido como neutro (su solubilidad es de 11 ng/mL) (Tønnesen et al., 2002). En sistemas acuosos a pH básico, el grupo fenol de la curcumina dona su hidrógeno formando el ion fenolato, que permite que la curcumina sea ligeramente soluble en estas condiciones (Tønnesen & Karlsen, 1985; Jagannathan et al., 2012). Sin embargo, sí que es altamente soluble en algunos disolventes orgánicos polares –acetona (7.75 mg/mL), etanol (5.6 mg/mL),

metanol (4.44 mg/mL), 2-propanol (3.93 mg/mL), 2-butanona (2.17 mg/mL) o 1,2-dicloroetano (0.5125 mg/mL)– y en bastantes aceites comestibles –maíz, soja, ácido oleico, oleato de etilo, ricino, triglicéridos de cadena media, cacahuete, coco u oliva (Khopde et al., 2000; Heger et al., 2014; Araiza-Calahorra et al., 2018). En este último caso, su solubilidad depende en gran medida del método y las condiciones de disolución (fundamentalmente, la temperatura y el tiempo).

1.2.2. Evidencias científicas de su bioactividad *in vitro* e *in vivo*

Hoy por hoy, dos siglos después de su descubrimiento, la curcumina sigue suscitando interés entre la comunidad científica, como atestiguan las numerosas patentes, revisiones bibliográficas, reseñas y artículos que se han publicado durante la última década. Una búsqueda rápida en el registro estadounidense [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov), utilizando como término de búsqueda ‘*curcumin*’, condujo a un total de 226 ensayos clínicos (27/05/2020). Y es que, más allá de sus usos culinarios, esta molécula continúa despertando interés por sus propiedades terapéuticas y medicinales por las que la medicina ayurvédica o medicina tradicional hindú ya la utilizaba en el siglo V a. C. En este apartado hacemos un repaso de sus principales efectos bioactivos.

Cientos de estudios y ensayos clínicos en todo el mundo han descrito para la curcumina más de 100 dianas terapéuticas diferentes (Anand et al., 2008). Se han encontrado más de 30 proteínas distintas que interactúan directamente con ella, incluyendo la ADN polimerasa, la proteína quinasa C, la 5-lipooxigenasa, la tubulina, la actina y el factor nuclear- κ B (NF- κ B), entre otras (Dhar et al., 2015). También han mostrado un elevado potencial farmacológico los complejos formados al unirse con iones metálicos divalentes de Fe, Cu, Mn o Zn (Nieto Gómez, 2017). Sin embargo, una de sus propiedades más conocidas e interesantes es su capacidad antioxidante, que le permite actuar sobre el estrés oxidativo previniendo su aparición, atrapar radicales libres del medio, interrumpir la cadena de reacción oxidativa originada por estos radicales e inhibir la peroxidación lipídica de la membrana celular –proceso clave en el inicio y

desarrollo de múltiples enfermedades (Maheshwari et al., 2006; Bhullar et al., 2013; Slavova-Kazakova et al., 2015). También son de interés sus propiedades antiinflamatorias, que están parcialmente mediadas por la inhibición de la unión del factor de transcripción NF- κ B al ADN, por lo que se reducen los niveles de citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y las interleuquinas IL-1 β , IL-6 e IL-8; o mediante la unión directa a determinadas enzimas como las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2, las lipooxigenasas o la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), afectando a la biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos y evitando de esta manera el desarrollo de procesos inflamatorios y de agregación plaquetaria (Jakopin, 2014). Además, se le atribuyen propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias, antimicóticas, antiproliferativas, antisépticas, antiespasmódicas, antiamóbricas, hipolipidémicas, cardioprotectoras, hepatoprotectoras, neuroprotectoras, inmunomoduladoras, anticarcinogénicas, antidiabéticas, antiartríticas, etc. (Suresh et al., 2006; Pulido-Moran et al., 2016; Rauf et al., 2018; Xu et al., 2018).

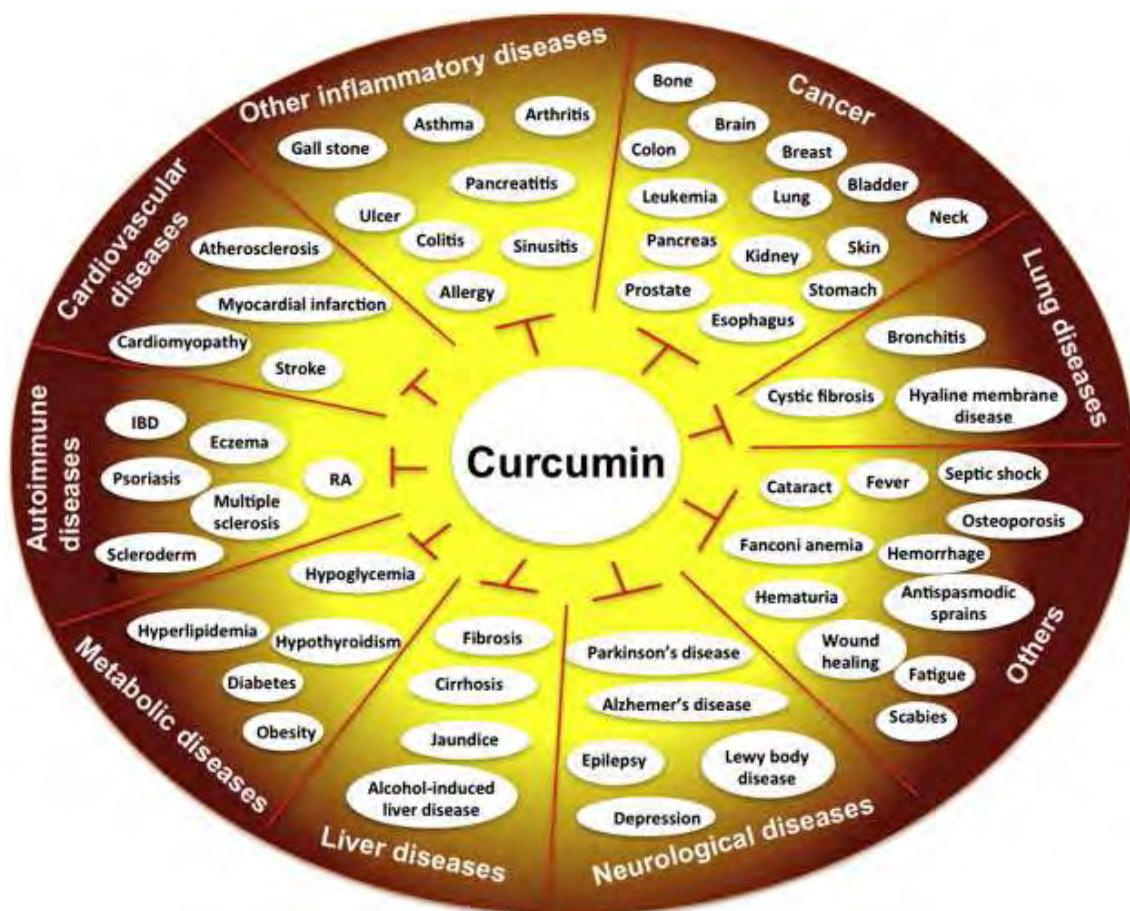


Figura 10. Principales usos medicinales de la curcumina (Prasad et al., 2014a).

En estos últimos años, las principales líneas de investigación sobre la curcumina se han centrado en explorar su potencial antiproliferativo, antitumoral y anticanceroso: la curcumina se administra por vía oral, por inyección o se prueba en sistemas tanto *in vitro* como *in vivo*, y su bioactividad se demuestra utilizando diversos modelos y midiendo algunos biomarcadores enzimáticos. Fruto de estas investigaciones, se ha confirmado su actividad preventiva y curativa frente a varios tipos de cáncer como la leucemia, el linfoma, el melanoma y el sarcoma, así como el cáncer gastrointestinal, genitourinario, neurológico, de cabeza y cuello, de mama, de ovario y de pulmón (Anand et al., 2008). En efecto, son muchos los estudios que aseguran que la curcumina actúa sobre las diferentes etapas del proceso de carcinogénesis –bloqueando la iniciación, promoción y progresión tumoral– y sobre los diferentes mecanismos del proceso metastásico (Aggarwal et al., 2003). Asimismo, la curcumina también actúa sobre los procesos asociados con la mutagénesis, la expresión de oncogenes y la regulación del ciclo celular, modulando el crecimiento de las células cancerígenas e induciendo la apoptosis (Ravindran et al., 2009). Además, se ha estudiado su efecto citoprotector y quimioprotector, obteniendo resultados bastante satisfactorios. Finalmente, la curcumina también ha demostrado una cierta actividad radioprotectora mediante la protección del sistema glioxalasa (Mesa et al., 2000).

Otro de los beneficios de la curcumina son sus propiedades cardioprotectoras, hipocolesterolémicas e hipolipidémicas; por eso, el consumirla frecuentemente previene el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Hace algunos años, un metanálisis realizado por Sahebkar (2014) demostró que al suplementar la dieta con curcumina, se observaba una disminución significativa de los niveles de PCR, un biomarcador general indicativo de riesgo cardiovascular. También se han descrito efectos beneficiosos sobre el desarrollo de la aterosclerosis: la curcumina, gracias a su capacidad antioxidante, reduce la oxidación del colesterol LDL e inhibe la proliferación de las células mononucleares de sangre periférica y las células musculares lisas vasculares, que son características de esta patología. Asimismo, la curcumina disminuye los niveles plasmáticos de colesterol total y LDL así como la concentración de triglicéridos y fosfolípidos, mejora la función endotelial, inhibe la agregación plaquetaria y reduce el riesgo de sufrir un infarto agudo de miocardio u otros accidentes cardiovasculares (Ramírez-Tortosa et al., 1999; Aggarwal & Shishodia, 2004).

Muchos estudios defienden las propiedades terapéuticas de la curcumina sobre enfermedades de la piel como la dermatitis atópica, la esclerodermia, la psoriasis y el cáncer de piel. De hecho, los estudios de Ryan et al. (2013) demostraron que la suplementación con curcumina durante la radioterapia reducía la gravedad de la dermatitis producida por la radiación ionizante en pacientes con cáncer de mama. También se ha publicado sobre los efectos beneficiosos de la curcumina en la esclerodermia y otras patologías orgánicas relacionadas, que no son más que la consecuencia de la acción protectora de la curcumina al modular la ruta de la PKC (Jimenez et al., 2001). La psoriasis, una enfermedad inflamatoria crónica de la piel de origen autoinmunitario, también podría tratarse con curcumina ya que alguno de los estudios realizados con ratones revelaba una mejora importante de la enfermedad al disminuir los niveles de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-22 y TNF- α (Sun et al., 2013). La curcumina también ha demostrado ser muy efectiva en la prevención y curación del cáncer de piel, inhibiendo el efecto de la oxidación del ADN de la epidermis y modulando la expresión génica de protooncogenes (genes cuyos productos de expresión estimulan el crecimiento y la división celular) (Mesa et al., 2000). Otros estudios nos hablan del poder cicatrizante y regenerante de la curcumina, que aumenta la formación de tejidos y favorece la deposición del colágeno (Aggarwal & Shishodia, 2004; Mohanty & Sahoo, 2017).

Según han demostrado los ensayos llevados a cabo tanto en animales como en humanos, la curcumina también reduce los niveles de glucosa en sangre y trata la diabetes mellitus tipo 2. Por ejemplo, los estudios con ratas con diabetes inducida por aloxano, estreptozocina o nicotinamida-estreptozocina de Pari & Murugan (2007) pusieron de manifiesto cómo la administración oral de varias dosis de curcumina puede prevenir la pérdida de peso; reducir los niveles de glucosa, hemoglobina y hemoglobina glicada en sangre (Arun & Nalini, 2002); y mejorar la sensibilidad a la insulina (Murugan & Pari, 2007). Por otro lado, El-Moselhy et al. (2011) pudieron demostrar que la administración oral de curcumina en ratas con resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en grasas y con diabetes tipo 2, tuvo un efecto antihiper glucémico y las ratas mostraron una sensibilidad a la insulina mejorada, hecho que atribuyeron a las propiedades antiinflamatorias de la curcumina. Por su parte, Steigerwalt et al. (2012) estudiaron los efectos de suministrar 2 cápsulas/día de una curcumina comercial (cada

cápsula contenía una mezcla de 100 mg de curcumina con fosfatidilcolina) en pacientes con una microangiopatía o una retinopatía diabética. Tras cuatro semanas de intervención, se observaron efectos muy positivos sobre la salud. Además de todo esto, se sabe que la curcumina contribuye a mejorar el síndrome metabólico en pacientes con diabetes tipo 2, disminuye la resistencia a la insulina y los niveles de triglicéridos, ácido úrico, grasa visceral y grasa corporal total, reduciendo los riesgos aterogénicos (Chuengsamarn et al., 2014).

También se le reconocen propiedades antirreumáticas y antiartríticas, como consecuencia de su ya mencionada capacidad para inhibir moléculas pro-inflamatorias como NF- κ B, AP-1, EGR-1, COX-2, LOX, NOS, MMP-9, uPA, TNF y quimiocinas (Aggarwal et al., 2003). De hecho, desde hace ya algunos años se la viene indicando para el tratamiento de la artritis reumatoide. Para corroborar estos efectos, Chandran & Goel (2012) decidieron suplementar la dieta de 45 pacientes que padecían artritis reumatoide con 500 mg/día de curcumina y observaron una reducción estadísticamente significativa de los niveles inflamatorios sin originar efecto adverso alguno. Por otro lado, Park et al. (2007) pusieron en contacto curcumina con fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide y observaron una inhibición del crecimiento de estos fibroblastos y la inducción de apoptosis. Más recientemente, los estudios *in vivo* de Huang et al. (2013) también vinieron a confirmar el potencial de la curcumina para inhibir la artritis reumatoide inducida por adyuvante completo de Freund y colágeno.

Además, bastantes estudios subrayan el potencial terapéutico de la curcumina frente a enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer o la esclerosis múltiple (Sreejayan & Rao, 1994; Aggarwal et al., 2003; Dohare et al., 2008; Lin et al., 2008). Según se ha observado en varios estudios *in vivo*, la curcumina es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y actuar directamente sobre las regiones diana previniendo el estrés oxidativo, la inflamación, los déficits cognitivos y la acumulación de placas β -amiloide, que se correlacionan con la enfermedad de Alzheimer (Yang et al., 2005). Así lo comprobaron Wang et al. (2009), quienes observaron cómo se reducían tanto los niveles de péptido β -amiloide en suero como las placas β -amiloide del cerebro, fundamentalmente en las regiones del neocórtex y el hipocampo, al administrar curcumina a una serie de ratones con Alzheimer. Este hallazgo sugiere que la curcumina podría interferir en el proceso de

formación de las placas seniles y, por consiguiente, ejercer un efecto positivo y beneficioso en aquellas personas afectadas por esta enfermedad.

La curcumina también juega un papel importante en la protección gastrointestinal, y es que se ha comprobado que inhibe la activación de algunos factores de transcripción fundamentales en la inflamación de los intestinos como el NF- κ B o la IL-8 inducida por el *Helicobacter pylori* (Taylor & Leonard, 2011). Por ello se la ha utilizado como remedio natural para estimular la secreción de jugo gástrico y pancreático y prevenir la acidez estomacal, la dispepsia, la gastritis, la úlcera y, en último término, el desarrollo de un cáncer gástrico. También ayuda a expulsar los gases y a aliviar los cólicos. Son muchos los estudios que avalan el potencial terapéutico de la curcumina para la prevención y el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Por ejemplo, Ukil et al. (2003) estudiaron los efectos de la curcumina sobre ratones afectados con este tipo de enfermedades. Para ello, suministraron a los ratones suplementos de curcumina durante un total de 10 días, observando una mejora de los síntomas y una reducción de las recidivas. Años después, Suskind et al. (2013) hicieron un estudio en humanos con pacientes con enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa a los que suministraron 500 mg de curcumina, 2 veces al día, durante 3 semanas. Concluido el estudio, los autores notaron una mejora muy significativa de los pacientes tratados y propusieron el uso de la curcumina como agente terapéutico complementario a la medicina tradicional. Paralelamente, Topcu-Tarladacalisir et al. (2013) encontraron correlación entre el consumo de curcumina y la disminución de lesiones de colon, que atribuyeron a la reducción de los procesos inflamatorios.

Para finalizar, queríamos recoger rápidamente algunos otros efectos positivos de la curcumina sobre varias enfermedades: por ejemplo, en el VIH, la curcumina actúa directamente sobre las proteínas responsables de propagar el ciclo de vida del virus, uniéndose a ellas y provocando su inhibición (Aggarwal et al., 2003; Vajragupta et al., 2005); en la fibrosis quística, la curcumina corrige la mutación del gen Delta-F508 que produce la enfermedad (Egan et al., 2004); en el sistema respiratorio, la curcumina ayuda a tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el asma y otros problemas respiratorios (Moghaddam et al., 2009; Ng et al., 2018); en la enfermedad hepática, la curcumina es un excelente tónico biliar que se utiliza para tratar la ictericia, la cirrosis

hepática y los trastornos de vesícula (Nabavi et al., 2014; Abd-Allah et al., 2016); en su justa medida, ayuda a regular la menstruación y evita los dolores de los días previos (Khayat et al., 2015); la curcumina también alivia el dolor y la inflamación de patologías como la artrosis, la fibromialgia o la osteoporosis (Sun et al., 2017; Bukhari et al., 2019); la medicina tradicional china emplea la curcumina para aumentar la producción de serotonina y tratar la depresión, la tristeza y la infelicidad, reducir los niveles de estrés y mejorar la irritabilidad y la ansiedad (Hishikawa et al., 2012; Witkin & Li, 2013); etc. Para ampliar la información sobre otros posibles efectos beneficiosos en la salud, pueden consultarse las revisiones de Esatbeyoglu et al. (2012), Gupta et al. (2012), Bukhari et al. (2013), Prasad et al. (2014a), Albadalejo et al. (2015) y Shanmugam et al. (2015).

1.2.3. Principales limitaciones tecnológicas

En el apartado anterior hemos hecho una recopilación más o menos pormenorizada de las principales propiedades terapéuticas y protectoras atribuidas a la curcumina y de sus potenciales usos en medicina. Sin embargo, como ya se indicó en el apartado 1.2.1., la curcumina es un compuesto predominantemente hidrofóbico debido a las cadenas alifáticas que separan los grupos enólicos y fenólicos y, en general, bastante insoluble en medios acuosos neutros y ácidos. Por tanto, es evidente que conseguir la incorporación efectiva de curcumina en sistemas biológicos –constituidos fundamentalmente por agua– no es algo trivial y supone la primera limitación tecnológica de este tipo de compuestos bioactivos y uno de los desafíos que debe afrontar la industria alimentaria si quiere incorporarla en sus productos.

Por otra parte, la inestabilidad química frente a multitud de factores ambientales y en condiciones fisiológicas supone otra de sus principales limitaciones en cuanto a su aplicabilidad. Por ejemplo, la molécula de curcumina es altamente susceptible a los cambios de pH: a pH ácidos, la curcumina es relativamente estable gracias al dieno que se forma, aunque poco soluble en agua; a pH neutros y básicos, la formación del anión fenilado hace que la curcumina se vuelva inestable y rápidamente se descomponga en compuestos como el *trans*-6-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-2,4-dioxo-5-hexenal, el ácido

ferúlico, el feruloilmetano y la vainillina (Figura 11) (Lestari & Indrayanto, 2014). Así lo confirmaron Wang et al. (1997), quienes estudiaron la cinética de degradación de la curcumina con el pH así como su estabilidad en condiciones fisiológicas *in vitro*. Para ello pusieron la curcumina en tampón fosfato 0.1 M o en medio sin suero, a pH 7.2 y 37 °C. Pasados 30 min, el 90 % de la curcumina inicial ya se había descompuesto siguiendo una cinética aparente de primer orden. Por tanto, la inestabilidad química de la curcumina en condiciones fisiológicas queda más que probada: aunque en las condiciones del estómago (pH 1 – 2) sí que sería estable, en el intestino delgado (pH 6.5), la sangre (pH 7.35 – 7.45) o el interior de las células (pH 7.2) ya no lo es tanto (Tønnesen & Karlsen, 1985).

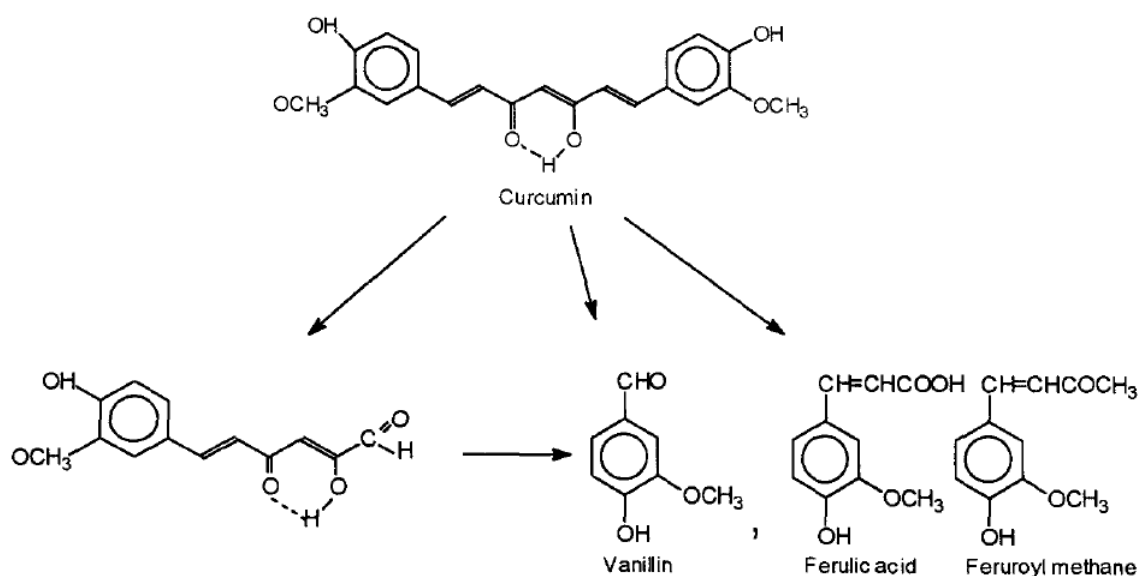


Figura 11. Productos de degradación de la curcumina en medios acuosos neutros y básicos (Wang et al., 1997).

Además de por cambios de pH, la curcumina también puede degradarse por cambios de temperatura (Lestari & Indrayanto, 2014). Los puentes dicarbonílicos son las zonas más sensibles a este parámetro, siendo el primer carbono de la cadena alquilo que conecta con el grupo fenólico el más sensible al calor. A este respecto son interesantes las aportaciones de autores como Wang et al. (2009), quienes estudiaron la estabilidad térmica de la curcumina a diferentes temperaturas y durante 10 min de exposición. Estos autores observaron que la curcumina permanece estable a temperaturas bajas y moderadas (por debajo de 70 °C) y se descompone por completo a altas temperaturas (por encima de 100 °C). A temperaturas cercanas a su punto de

fusión (183 °C), la curcumina se degrada rápidamente en diferentes compuestos más o menos volátiles como el 4-vinilguayacol, el guayacol, el isoeugenol y la vainillina (Figura 12). De hecho, Esatbeyoglu et al. (2015) comprobaron experimentalmente que a los 5 min de someter a la curcumina a una temperatura de 180 °C, la cantidad que quedaba era un 30 % de la curcumina inicial; el 70 % restante ya se había degradado a otros compuestos mediante reacciones de descarboxilación. No obstante, varios estudios aseguran que estos productos de degradación también han demostrado ser bioactivos y contribuyen a los efectos farmacológicos de la curcumina (Shen & Ji, 2012).

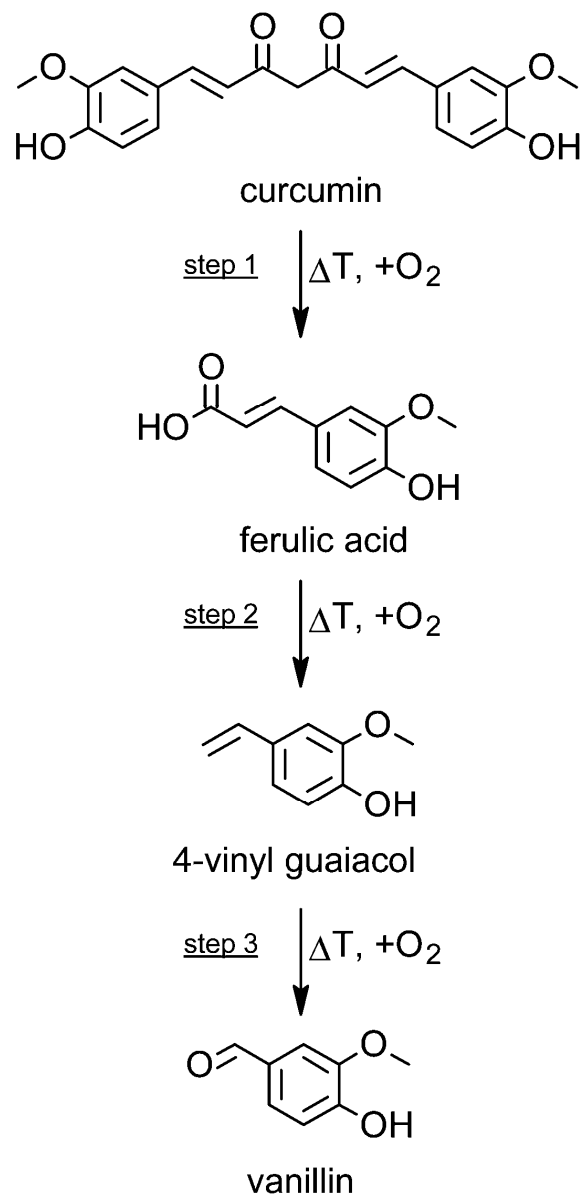


Figura 12. Productos de degradación de la curcumina a altas temperaturas (Esatbeyoglu et al., 2015).

La presencia de grupos cromóforos también hace a la curcumina fotosensible (Sowbhagya et al., 2005), siendo ésta la principal causa de degradación molecular, además de la degradación química (Kumavat et al., 2013). De hecho, son ya varios los estudios que han confirmado la degradación fotoquímica de la molécula. Por ejemplo, Mangolim et al. (2014) han demostrado que la exposición continuada de curcumina disuelta en metanol o etanol a luz de longitud de onda de entre 400 y 510 nm, produce la degradación completa de la misma tras 120 h de exposición, siguiendo una cinética de primer orden. Sin embargo, si estas disoluciones se dejan secar hasta obtener una fina película, la degradación de la curcumina pasa a tener una cinética de segundo orden. En cualquier caso, los productos de degradación que se obtienen son los mismos que citábamos anteriormente: el 4-vinilguayacol, la vainillina y el ácido ferúlico.

Con respecto a la degradación química, también bastante estudiada, podemos afirmar que se produce fundamentalmente por la acción de iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos (lo que se conoce como las ROS) y que está relacionada con la energía de disociación de los grupos funcionales de la curcumina. Así, los OH fenólicos poseen una energía de disociación de unas 80 kcal/mol, el H central, 90 kcal/mol, y el H enólico, 98 kcal/mol. Estos datos nos permiten anticipar que los OH fenólicos serán los grupos más susceptibles de ser atacados en la degradación química (Nieto Gómez, 2017). Recientemente, Schneider et al. (2015) estudiaron el mecanismo de degradación química de la curcumina, identificaron los productos formados y discutieron la relación entre degradación y metabolismo. Después de todo ello, llegaron a la conclusión de que la curcumina no se degrada a través de un proceso hidrolítico que produce la escisión de la cadena, como se venía suponiendo con anterioridad, sino a través de un proceso oxidativo que produce biclopentadionas como productos finales (Gordon & Schneider, 2012; Siddiqui, 2015). En la Figura 13 mostramos un hipotético mecanismo de reacción propuesto, que transcurriría a través de 15 intermedios de reacción, para explicar la degradación de la curcumina por vía oxidativa. De hecho, los productos intermedios que aparecen enmarcados ya fueron identificados y analizados por Gordon et al. (2015), lo que permitió respaldar este nuevo mecanismo propuesto. Además sugirieron, como ya habían hecho previamente otros autores, que el potencial polifarmacológico de la curcumina podría estar relacionado con sus numerosos productos de degradación.

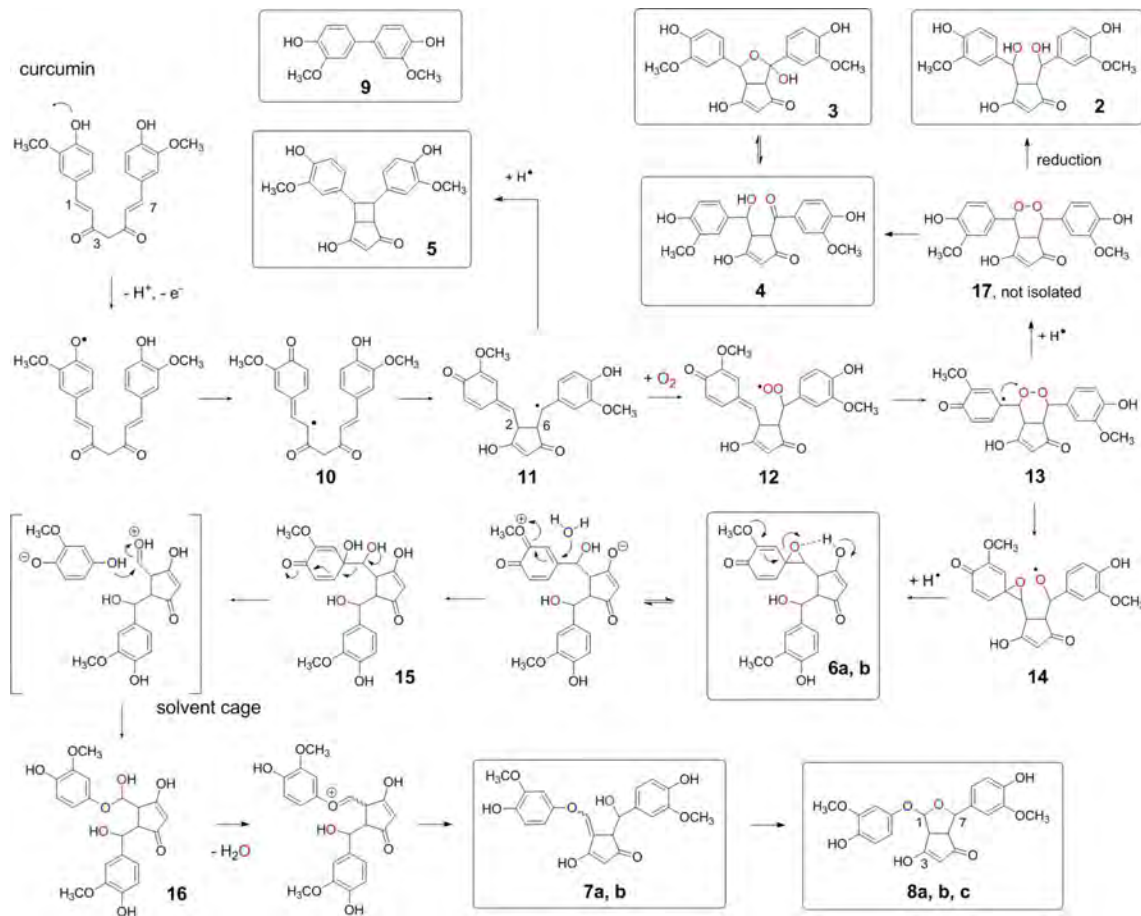


Figura 13. Hipotético mecanismo de reacción propuesto para la degradación de la curcumina por vía oxidativa (Gordon et al., 2015).

Y, además de lo anterior, su escasa biodisponibilidad –como consecuencia de su mala absorción intestinal, su rápido metabolismo mediante reacciones de reducción y conjugación hepática y su rápida eliminación del cuerpo–, también supone otra limitación tecnológica muy importante que impide que se manifiesten sus beneficios terapéuticos a nivel sistémico (Ravindranath & Chandrasekhara, 1980; Maheshwari et al., 2006; Anand et al., 2007; Epstein et al., 2010; Gryniewicz & Ślifirski, 2012; Dulbecco & Savarino, 2013). De hecho, algunas estimaciones sugieren que sólo el 2 % de la curcumina que se toma por vía oral se transporta a los tejidos a través de la sangre. Y es que la curcumina, por su baja solubilidad en agua y su carácter predominantemente lipofílico, tiende a agruparse para pasar a través del estómago alineándose con el torrente sanguíneo. A medida que el pH varía a lo largo del tubo digestivo, ésta comienza a cristalizar, inhibiendo considerablemente la absorción en el intestino y el torrente sanguíneo. La curcumina que consigue escapar de este desafortunado proceso,

es descompuesta por el hígado a través de la biotransformación. Así, Holder et al. (1978) identificaron los principales metabolitos biliares de la curcumina por espectrometría de masas, después de haberlos recogido de la bilis de ratas que recibían 50 mg/kg de curcumina intravenosa. Entre el 50 – 60 % de la dosis administrada fue excretada por la bilis en 5 h. Los principales metabolitos biliares fueron glucurónidos de la tetrahydrocurcumina y la hexahydrocurcumina (52 y 42 % de los metabolitos biliares, respectivamente); el ácido dihydroferúlico y el ácido ferúlico fueron componentes minoritarios. Esto demuestra que la mayor parte de la curcumina se reduce de forma endógena y, posteriormente, es glucuronizada por la UDP-glucuronil transferasa.

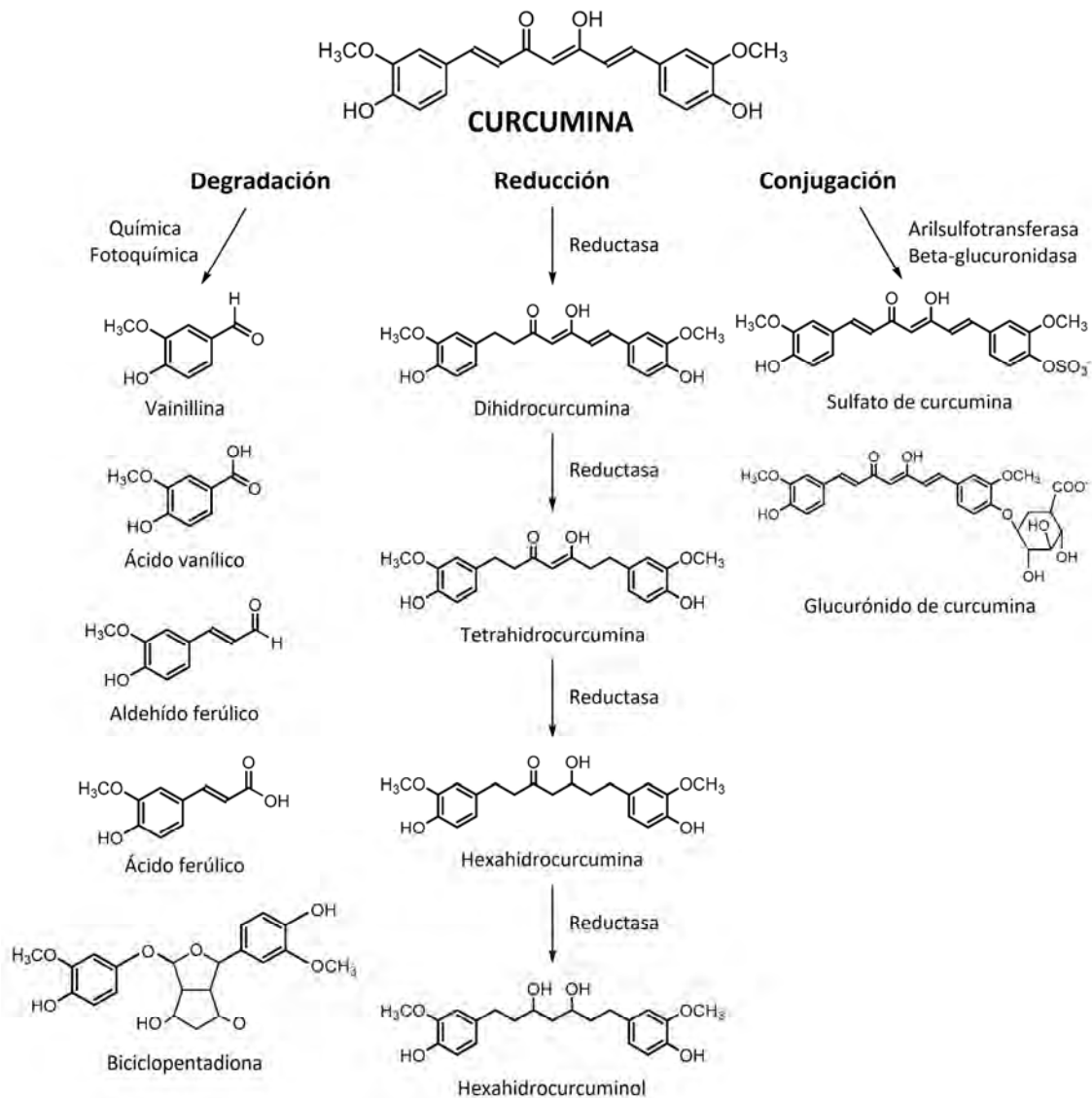


Figura 14. Principales productos de degradación y metabolitos de la curcumina.

Por tanto, la curcumina en forma libre se biotransforma primero por reacciones de reducción en dihidrocurcumina, tetrahidrocurcumina, hexahidrocurcumina y hexahidrocurcuminol y, posteriormente, estos compuestos se convierten por reacciones de conjugación en conjugados de sulfato y de glucurónido (Figura 14) (Prasad et al., 2014b). Pan et al. (1999) demostraron que el 99 % de la curcumina en el torrente sanguíneo es curcumina conjugada. Esta curcumina conjugada tiene una bioactividad significativamente menor que la curcumina libre y se excreta fácilmente por los riñones (Ireson et al., 2001; Pal et al., 2014). Su rápida eliminación a través del intestino reduce aún más su biodisponibilidad, ya que su vida media es de menos de 2 h, con poca curcumina previamente absorbida en el torrente sanguíneo (Sharma et al., 2001). Wahlström & Blennow (1978) determinaron que, cuando se administran dosis orales de 1 g/kg de curcumina marcada radiactivamente en ratas, aproximadamente el 75 % se excreta por las heces y sólo aparecen trazas en la orina (~ 6 %). Con la administración intraperitoneal de curcumina se obtienen resultados similares: el 11 % se excretó por la orina tras 72 h (Holder et al., 1978). Todavía no se conoce con exactitud la naturaleza de los metabolitos urinarios.

1.3. Evidencias científicas de la acción sinérgica de los PUFAs ω -3 y la curcumina *in vitro* e *in vivo*

Según hemos expuesto a lo largo de los apartados 1.1.2. y 1.2.2., hay evidencias científicas más que suficientes para considerar a los PUFAs ω -3 y la curcumina, por sí mismos, como unos agentes polifarmacológicos de interés. Sin embargo, algunos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* mencionan un posible efecto sinérgico cuando se combinan entre sí, lo que hace que su aporte conjunto sea incluso más interesante que por separado (Lerdchai et al., 2016; Hang et al., 2018). Así lo demostraron Saw et al. (2010), quienes observaron efectos antiinflamatorios y antioxidantes claramente sinérgicos en células RAW 264.7 al combinar curcumina con bajas dosis de EPA o DHA. De hecho presentaron hasta un mecanismo hipotético para explicar las posibles interacciones entre la curcumina, el EPA y el DHA, con las enzimas y los genes que habían investigado en su estudio (Figura 15).

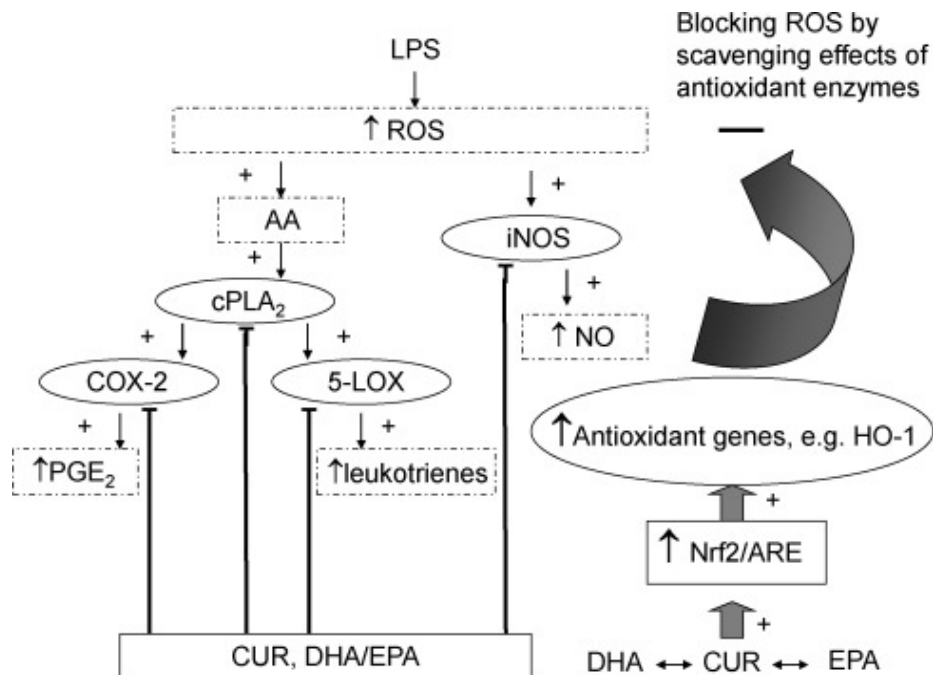


Figura 15. Representación esquemática para explicar mecanísticamente los efectos antiinflamatorios y antioxidantes sinérgicos al combinar curcumina con EPA o DHA.

(+) denota estimulación, (-) denota inhibición, (↑) denota aumento y (↔) denota interacción entre la curcumina y el EPA o el DHA (Saw et al., 2010).

Los autores proponen que la mezcla de curcumina y EPA o DHA directamente podría inhibir la actividad enzimática y/o la transcripción o traducción de las enzimas iNOS, cPLA2, COX-2 y 5-LOX. Esta inhibición también podría deberse, de forma indirecta, a la inducción de enzimas antioxidantes como la HO-1. La inducción de genes antioxidantes atenuaría la síntesis de lipopolisacáridos mediada por ROS, lo que conduciría a una disminución en la producción de iNOS y NO y a un descenso de los niveles de cPLA2, COX-2 (PGE2) y 5-LOX (Saw et al., 2010). No obstante, se necesitan estudios *in vivo* que permitan confirmar estos resultados para poder trasladarlos a nivel clínico. Poco tiempo después, un estudio de Mirza et al. (2013) verificó los efectos inmunomoduladores y sinérgicos de la mezcla curcumina/DHA sobre ratones CLN6^{ncf} con degeneración progresiva de la retina y activación glial. Y es que la curcumina ha demostrado complementar la acción del DHA en el cerebro, aumentar la producción de este PUFA ω -3 a partir de sus precursores (ALA y DPA) y elevar los niveles de DHA y de las enzimas implicadas en su síntesis (FADS2 y elongasa-2), tanto en el tejido hepático como en el cerebral. Estos resultados ponen de manifiesto cuáles son los mecanismos moleculares responsables del efecto aditivo de la curcumina y el DHA, así como sus implicaciones en la prevención de los trastornos neurocognitivos y de ansiedad (Wu et al., 2015).

Por otra parte, la migraña es un trastorno neuroinflamatorio relativamente común cuyo origen es una combinación de factores genéticos y ambientales. Dadas las propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras –de sobra conocidas– de la curcumina y los PUFAs ω -3 y en base a los estudios previos que ya hemos mencionado, algunos autores decidieron explorar la existencia de un posible efecto sinérgico en la mezcla curcumina/PUFAs ω -3 que fuese capaz de eliminar la respuesta neuroinflamatoria que da origen a esta enfermedad. Y en efecto, los diferentes estudios que se llevaron a cabo en pacientes migrañosos revelaron que el aporte de estos principios activos por separado no mostraba efectos de consideración; en cambio, el aporte conjunto demostró afectar a los factores de transcripción y disminuir de forma significativa la expresión génica de sustancias pro-inflamatorias como TNF- α , ICAM-1, IL-6, PCR, iNOS y COX-2, que se tradujo, a su vez, en una reducción de los niveles séricos de dichas sustancias (Abdolahi et al., 2017; Soveyd et al., 2017; Abdolahi et al., 2018, 2019). Por tanto, estos hallazgos sugieren de nuevo que la combinación de PUFAs ω -3 y curcumina posee un claro efecto

sinérgico, mayor que el que exhiben ambos compuestos por separado, que puede resultar interesante para el tratamiento y la prevención de muchas enfermedades como, por ejemplo, la migraña.

Asimismo, la combinación de DHA y curcumina también ha demostrado efectos aditivos, tanto *in vitro* como *in vivo*, en oncología. Buena prueba de ello la encontramos en el estudio de Altenburg et al. (2011), en el que observaron efectos antiproliferativos sinérgicos sobre la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3. Los autores atribuyeron la sinergia al DHA, que podría mejorar la permisividad celular a la absorción de curcumina, y a la aparición de algunas rutas mecanicistas que se activan en presencia de la combinación de curcumina y DHA y no lo hacen con ninguno de los compuestos por separado. De ser así, quedaría puesto de manifiesto que la sinergia observada, o parte de ella, es una propiedad emergente de la combinación específica de ambos compuestos bioactivos. Poco después, Siddiqui et al. (2013) confirmaron *in vivo* estos resultados al investigar las propiedades sinérgicas de la mezcla curcumina/DHA sobre ratones con cáncer de mama inducido por DMBA. Además señalaron que el fenotipo específico del cáncer de mama es un factor importante para predecir la eficacia de estos activos, y que la sinergia condujo a una sobreexpresión de la proteína pro-apoptótica maspina y a una menor expresión de la proteína anti-apoptótica survivina. Por otro lado, Swamy et al. (2008) investigaron *in vivo* los efectos antiproliferativos y apoptóticos de la curcumina y el DHA, de forma conjunta y separada, al ponerlos en contacto con la línea celular BxPC-3 de cáncer de páncreas. El estudio demostró un efecto sinérgico más que evidente, tanto sobre la inducción de apoptosis (unas seis veces mayor) como sobre la inhibición de la proliferación celular (~ 70 %), cuando las células tumorales se trataron conjuntamente con curcumina y DHA. Además, mientras que los ratones alimentados con aceite de pescado y curcumina (por separado) mostraron una reducción del volumen tumoral del 25 % y del 43 % respectivamente, los que lo hicieron con una mezcla de curcumina y aceite de pescado mostraron una reducción del volumen del 72 %. En esta misma dirección apuntan algunos otros estudios posteriores, que señalan cómo la combinación de curcumina con PUFAs ω -3 y antioxidantes, efectivamente, aumenta la apoptosis de las células cancerosas, potencia la actividad citotóxica de las células NK contra las células de adenocarcinoma ductal pancreático (MIA PaCa-2 y L3.6) y protege a estas células asesinas de la degradación. Sin embargo, como también han mencionado

otros estudios, la curcumina inhibe la producción de interferón- γ por parte de las células NK (Fiala, 2015; Fiala et al., 2015).

Finalmente, queríamos mencionar que en mayo de 2015 se puso en marcha un ensayo (*COP-D trial*) que pretende evaluar los efectos complementarios y/o sinérgicos del conjunto PUFAs ω -3/curcumina sobre los mediadores pro-inflamatorios y la sensibilidad a la insulina en personas con prediabetes. Y es que se cree que los niveles de inflamación elevados, especialmente en el tejido adiposo, son el desencadenante patológico primario para el desarrollo de la diabetes y sus complicaciones. De confirmarse estos efectos antiinflamatorios sinérgicos, la mezcla de curcumina y PUFAs ω -3 podría utilizarse como una alternativa farmacológica bastante económica y segura para la prevención de la diabetes mellitus tipo 2 (Thota et al., 2016).

1.4. Opciones tecnológicas para la encapsulación, protección, vehiculización y liberación de principios activos lipofílicos por vía oral

Según hemos expuesto anteriormente, hay determinados compuestos llamados ‘bioactivos’ que han demostrado poseer propiedades beneficiosas para la salud, tanto por separado como de forma conjunta: tal es el caso de los PUFAs ω -3 y la curcumina. Sin embargo, a pesar de su potencial terapéutico, presentan algunos inconvenientes relacionados con la estabilidad, la reactividad, la solubilidad o la biodisponibilidad oral, que condicionan y dificultan su uso real en la industria alimentaria. Para intentar superar estas limitaciones tecnológicas, la comunidad científica ha estudiado la modificación estructural de estas moléculas (sobre todo, de la curcumina), teniendo siempre en cuenta la relación estructura-actividad biológica, o bien la incorporación de éstas en compuestos-soporte que mejoren sus características. Por eso, en los últimos años se han sintetizado numerosos ejemplos de derivados y análogos de la curcumina, con el fin de encontrar compuestos que sean capaces de superar sus limitaciones manteniendo una baja toxicidad (Prasad et al., 2014a; Nieto Gómez, 2017). Así, por ejemplo, se ha preparado un derivado bis-glicosilado de la curcumina con excelentes propiedades como quelante de los iones de Fe(III) (Arezzini et al., 2004; Gadad et al., 2012). También se han desarrollado varios heterociclos análogos de la curcumina en los que se potencia una u otra actividad (Fadda et al., 2010; Huang et al., 2012; Khan et al., 2012; Ahsan et al., 2013). John et al. (2002) sintetizaron unos quelatos de curcuminoides y cobre para mejorar su actividad antitumoral de manera efectiva, y Baglolle et al. (2005) investigaron la incorporación de curcumina en complejos compuestos de α -, β - y γ -ciclodextrina y sus derivados hidroxipropilados. Los complejos de inclusión formados mostraron una mejora importante en la solubilidad de la curcumina en agua.

Sin embargo, los principales esfuerzos y recursos en investigación se han dirigido a proponer y desarrollar diferentes tipos de sistemas de liberación modificada y sistemas de transporte no acuosos, especialmente usando matrices lipídicas, para la encapsulación, protección, vehiculización y liberación de principios activos lipofílicos

por vía oral, que permitan la incorporación y utilización de estos activos en la industria de los alimentos. Algunos de los sistemas de liberación propuestos son hidrogeles (Gong et al., 2013; Tsubosaka et al., 2020), oleogeles (Lee et al., 2018; Li et al., 2019), emulgeles (Jeengar et al., 2016), nanopartículas (Bisht et al., 2007; Peng et al., 2018a, 2018b; Ahmad et al., 2019), SLN (Ji et al., 2016; Serini et al., 2018), NLC (Lakhani et al., 2018; Shahparast et al., 2019), micelas (Jackson et al., 2009; Wu & Wang, 2017), liposomas (Hasan et al., 2014; Lamazhapova et al., 2017; Ng et al., 2018; Peng et al., 2018c; Tian et al., 2019) y emulsiones (Kharat et al., 2018; Yesiltas et al., 2019), entre otros. Cada uno de ellos tiene sus propias ventajas e inconvenientes en función de la estructura, composición, cinética, funcionamiento y usos principales. En la presente Tesis Doctoral nos vamos a centrar en los sistemas de liberación basados en oleogeles y en emulsiones para la protección y el transporte conjunto de PUFAs ω -3 y curcumina.

1.4.1. Sistemas de liberación basados en oleogeles

El proceso de oleogelificación o formación de oleogeles es una alternativa tecnológica relativamente reciente y novedosa para mejorar el perfil lipídico en matrices alimentarias, modular la digestibilidad de las grasas y proteger, transportar y liberar nutrientes y principios activos lipofílicos (Yu et al., 2012; Osullivan et al., 2017; Ashkar et al., 2019). En él, un agente gelificante (también llamado agente estructurante) permite gelificar o estructurar una fase oleosa líquida y obtener un sistema –el oleogel– con unas características fisicoquímicas y funcionales similares a las de las grasas sólidas.

Generalmente, los oleogeles tienen un alto contenido en aceite –superior al 90 %– y se han utilizado con éxito en el procesado de diferentes alimentos (Pehlivanoglu et al., 2018); por ejemplo, para reducir la cantidad de aceite de palma en cremas de chocolate (Fayaz et al., 2017) y rellenos de bombones (Doan et al., 2016); para sustituir las grasas tipo *shortening* en tartas (Pehlivanoglu et al., 2018); en la industria cárnica, para sustituir la grasa animal en hamburguesas, patés o salchichas (Gómez-Estaca et al., 2019a; Moghtadaei et al., 2018; Wolfer et al., 2018) y en productos untables como quesos (Bemer et al., 2016; Park et al., 2018) o mantequillas (Yılmaz & Ögütçü, 2015). También se han realizado estudios sobre la efectividad del

uso de oleogel en procesos como la fritura (Lim et al., 2017) o en el enriquecimiento de alimentos con antioxidantes como el β -caroteno (Martins et al., 2017).

1.4.1.1. Definición y características técnicas

Un **oleogel** (también conocido como '*organogel*' o incluso '*lipogel*') es una estructura continua, tridimensional, semisólida, termorreversible y termodinámicamente estable compuesta por un líquido apolar inmovilizado en una red de moléculas que han sido capaces de gelificar. Por tanto, la fase continua consta de un líquido lipofílico (normalmente un aceite comestible) donde se crea una red autoensamblada (formada por un agente gelificante) que será la responsable del atrapamiento físico del líquido (Figura 16) (Marangoni & Garti, 2011; Sánchez et al., 2011). El autoensamblado se realiza mediante interacciones no covalentes que le proporcionan características fundamentales de las estructuras supramoleculares de naturaleza fibrilar (Rogers, 2009; Patel & Dewettinck, 2016). Las interacciones responsables de la gelificación incluyen puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, apilamiento π - π e interacciones electrostáticas (Okesola et al., 2015).

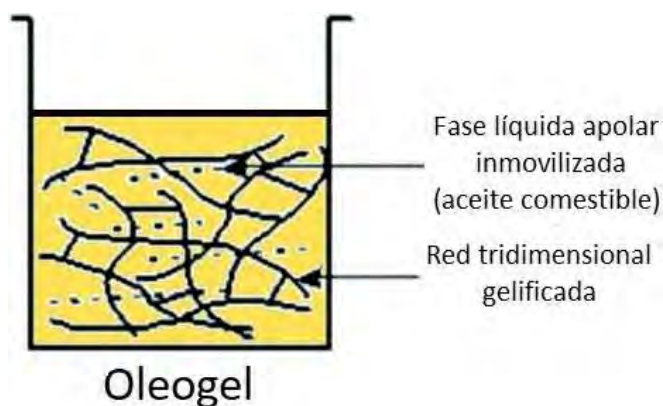


Figura 16. Representación esquemática de un oleogel.

La naturaleza dinámica y reversible de las interacciones no covalentes, que contribuyen a la formación de estos geles supramoleculares, los dota de propiedades fisicoquímicas, reológicas, viscoelásticas, sensoriales y de textura únicas, que pueden ser modificadas al cambiar las condiciones del proceso de oleogelificación (García-Andrade et al., 2019). Y es que, en efecto, existe una relación directa entre las

propiedades macroscópicas de un oleogel y su microestructura. Así pues, ya que el método de oleogelificación influye sobre ambas considerablemente, estas características no pueden considerarse por separado, sino de forma conjunta.

Por otra parte, un oleogel ya es un sistema de liberación de principios activos lipofílicos *per se*. No obstante, dependiendo de las necesidades que se tengan, de la naturaleza del compuesto bioactivo a proteger y vehiculizar y de la forma de liberación que se desee, esta estructura puede modificarse todavía más y utilizarse para obtener otros tipos más complejos de sistemas de liberación derivados de oleogeles con características y propiedades mejoradas. Para ello, existen tres posibles estrategias de diseño diferentes: la primera consistiría en mantener el aspecto y las propiedades reológicas y de textura semisólidas del oleogel (a este primer caso pertenecen los sistemas híbridos hidrogel/oleogel y las emulsiones de agua-en-oleogel y de aire-en-oleogel) (Figura 17, en azul); la segunda comprendería a los sistemas de liberación con un aspecto y unas propiedades macroscópicas similares a las de un fluido (a este caso pertenecen las emulsiones de oleogel-en-agua y las nanoemulsiones) (Figura 17, en rojo); y finalmente, la tercera estrategia incluiría todas las estructuras moldeadas y compartimentadas (micropartículas, nanopartículas y varillas a base de oleogel) (Figura 17, en verde) (Okuro et al., 2020).

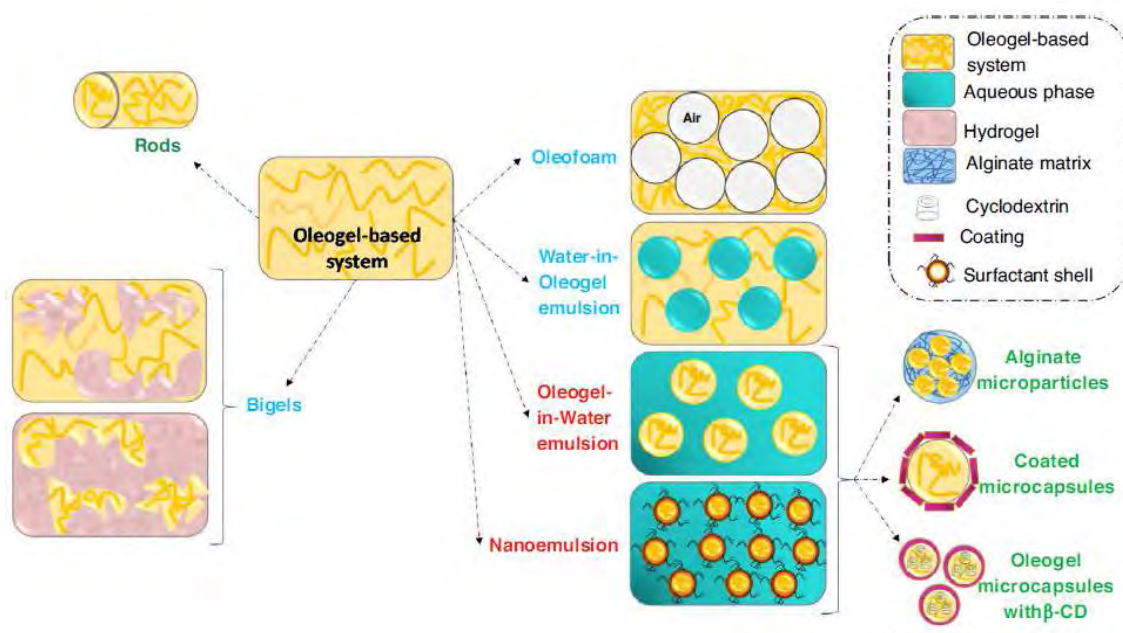


Figura 17. Representación esquemática de los diferentes sistemas de liberación derivados de los oleogeles (Okuro et al., 2020).

1.4.1.2. Clasificación

En los últimos años, se han propuesto varias formas de categorizar los oleogeles: en base al tipo de gelificante químico, estos pueden ser lipídicos o no lipídicos (Co & Marangoni, 2012); según las características moleculares del gelificante, pueden ser de bajo peso molecular o de alto peso molecular (Vintiloiu & Leroux, 2008; Patel & Dewettinck, 2015); y de acuerdo al número de gelificantes empleados en su elaboración, pueden ser sistemas de componentes individuales o mixtos (Pernetti et al., 2007a; Bot et al., 2008; Sawalha et al., 2011; Patel & Dewettinck, 2015). De entre todas ellas, la segunda forma de clasificar los oleogeles es la más comúnmente utilizada.

Ejemplos de gelificantes de bajo peso molecular capaces de estructurar aceites líquidos comestibles son los ácidos grasos de cadena larga, monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos (Pernetti et al., 2007b; Wright & Marangoni, 2007), ácidos grasos derivatizados, ácidos dicarboxílicos, alcoholes grasos, ceramidas, ceras naturales, ésteres de cera, ésteres de sorbitano, fitoesteroles, lecitinas y tocoferoles (Murdan et al., 1999). También se han utilizado ciertas combinaciones de los anteriores como los ácidos grasos + alcoholes grasos (Gandolfo et al., 2004; Schaik & van Malsen, 2007), lecitina + triestearato de sorbitano (Pernetti et al., 2007a) y fitoesteroles + γ -orizanól (Bot et al., 2008).

Ejemplos de gelificantes de alto peso molecular son algunos polímeros como la etilcelulosa, la hidroxipropilmetilcelulosa, la goma xantana y la β -lactoglobulina (Patel et al., 2013; Patel & Dewettinck, 2016); sin embargo, este grupo se encuentra mucho más limitado que el anterior debido a la escasa solubilidad en aceite de este tipo de compuestos. De todos ellos, la etilcelulosa es el único de grado alimentario que puede estructurar el aceite empleando métodos directos, es decir, que tiene afinidad por líquidos de naturaleza hidrofóbica y puede formar una red de gel mediante la dispersión directa del gelificante en aceite. Los hidrocoloides pueden actuar como agentes gelificantes pero a través de métodos indirectos, puesto que tienen carácter hidrofílico y necesitan ser hidratados antes de poder utilizarlos como agentes capaces de formar geles que atrapen de manera física los aceites líquidos comestibles.

1.4.1.3. Principales ventajas e inconvenientes

Sin lugar a dudas, una de las principales ventajas de este tipo de sistemas de liberación reside en que ofrecen características físicas distintas de los aceites líquidos, sin influir directamente en su composición química (García-Andrade et al., 2019). Y es que la oleogelificación permite modificar el comportamiento reológico, la textura y las propiedades sensoriales (Patel & Dewettinck, 2015); reducir la migración de aceite y controlar la separación de fases en los sistemas de liberación derivados de los oleogeles (Si et al., 2016) y disminuir la movilidad y migración de principios activos lipofílicos de la fase oleosa (Osullivan et al., 2017). En definitiva, los aceites gelificados proporcionan propiedades similares a las de las grasas sin necesidad de añadir grandes cantidades de grasas saturadas, y por ello se postulan como potenciales sistemas transportadores de compuestos bioactivos en la industria alimentaria. Además, al tratarse de sistemas estructurados, dificultan los procesos de difusión de oxígeno y metales prooxidantes en la fase oleosa, protegiendo de esta forma los compuestos activos lipofílicos, conformando una matriz idónea para evitar procesos de degradación a largo plazo.

Como otras ventajas de los oleogeles podemos mencionar su capacidad de proporcionar la naturaleza elástica de una grasa sólida, de soportar transiciones sol-gel, varias veces, de manera simple, por recalentamientos; la formación a bajas concentraciones de gelificante (~ 2 %) para conseguir la estructuración (Hughes et al., 2009), y el desarrollo de materiales suaves basados en aceites líquidos comestibles (Ashok R. Patel et al., 2013).

Los principales inconvenientes se hayan en la dificultad para identificar agentes gelificantes baratos y de grado alimentario; así como de un problema relacionado con el consumidor, ya que no se ha logrado obtener los atributos que proporcionan las grasas sólidas, las cuales, por su alto contenido en SFA, contribuyen a importantes propiedades organolépticas de los alimentos, incluida la palatabilidad, la lubricación y la estructura (Ceballos et al., 2014). Además, hay que tener en cuenta la imprecisión en la dosis y que su control sobre la liberación del principio activo lipofílico es limitado.

1.4.1.4. Estudios previos en PUFAs ω -3 y curcumina

A pesar de que los oleogeles y sistemas de liberación derivados son una alternativa tecnológica relativamente reciente para la encapsulación, protección, vehiculización y liberación de principios activos lipofílicos por vía oral, en la última década han proliferado las publicaciones sobre este tipo de estructuras que se han posicionado como potenciales sistemas transportadores de PUFAs ω -3 y curcumina. En la Tabla 2 hemos recogido, a modo de resumen, información relativa a todos esos estudios previos sobre sistemas oleogelificados que incorporan PUFAs ω -3 y curcumina, estudios que de alguna forma representan el estado actual y los últimos avances en este campo que parece tan prometedor.

Tabla 2. Estudios previos acerca de sistemas de liberación basados en oleogeles para la encapsulación, protección, vehiculización y liberación de PUFAs ω -3 y curcumina.

Tipo de sistema	Fase oleosa	Agente gelificante	Principales conclusiones del estudio	Referencias
PUFAs ω-3				
Oleogel	Mezcla de aceites de oliva, linaza y pescado (44.39:37.87:17.74)	<ul style="list-style-type: none"> o Etilcelulosa o Cera de abejas 	<ul style="list-style-type: none"> • Se desarrollaron nuevos patés sustituyendo parcial o totalmente la grasa de cerdo por oleogel. • La sustitución de la grasa del paté no afectó a su textura, color o estabilidad. • El proceso de oleogelificación indujo la oxidación lipídica. • Los nuevos patés experimentaron más oxidación lipídica, especialmente los de etilcelulosa. • Los patés con oleogel de cera de abejas mostraron atributos sensoriales similares al original. 	Gómez-Estaca et al. (2019a)
Oleogel	Mezcla de aceites de oliva, linaza y pescado (44.39:37.87:17.74)	<ul style="list-style-type: none"> o Etilcelulosa o Cera de abejas 	<ul style="list-style-type: none"> • Se desarrollaron nuevas hamburguesas bajas en grasa sustituyendo parcial o totalmente la grasa de cerdo por oleogel. • La sustitución de la grasa no afectó a su textura, color o estabilidad. • Las hamburguesas experimentaron más oxidación lipídica, especialmente las de etilcelulosa. • Las hamburguesas con oleogel de cera de abejas mostraron atributos sensoriales similares a las originales. 	Gómez-Estaca et al. (2019b)
Oleogel	Aceite de soja	Etilcelulosa, Avicel RC-591 y α -celulosa (67.0:16.5:16.5)	<ul style="list-style-type: none"> • Se elaboraron pastas cármicas sustituyendo totalmente la grasa de cerdo por oleogel. • Estas pastas cármicas eran más oscuras y más amarillas, y tenían una textura más dura aunque menos cohesiva. • Además, mejoró el perfil de ácidos grasos con un contenido total de grasa similar al original. 	Ferrer-González et al. (2019)
o Hidrogel O/W o Oleogel	Aceite de colza	Etilcelulosa	<ul style="list-style-type: none"> • Se prepararon pastas cármicas sustituyendo la grasa de vaca por hidrogel O/W u oleogel. • Los aceites estructurados mejoraron la textura y el color de estos productos cármicos. • También se mejoró el perfil de ácidos grasos al disminuir el contenido de grasas saturadas. • La estructuración del aceite demostró un efecto protector frente a la oxidación lipídica. 	Alejandro et al. (2019)

Oleogel	<ul style="list-style-type: none"> o Cera de abejas o γ-orizanol y β-sitosterol (60:40, m/m) 	<ul style="list-style-type: none"> • Se elaboraron nuevas salchichas fermentadas sustituyendo parcialmente la grasa de cerdo por oleogel. • Estas salchichas fermentadas mejoraron el perfil de ácidos grasos del producto original. • La sustitución de la grasa afectó a los parámetros de calidad y los atributos sensoriales. 	Franco et al. (2020)
Oleogel	<ul style="list-style-type: none"> o Cera de abejas 	<ul style="list-style-type: none"> • Se desarrollaron nuevos patés sustituyendo la grasa de cerdo por oleogel. • La sustitución de la grasa del paté disminuyó su dureza y adhesividad. • Estos patés presentaron un mejor perfil de ácidos grasos que el producto original. 	Martins et al. (2020)
o Emulgel	Mezcla de aceites de oliva y chía (80:20)	<ul style="list-style-type: none"> • Se prepararon nuevos fuets sustituyendo la grasa de cerdo por emulgel u oleogel. 	Pintado & Cofrades (2020)
o Oleogel	Cera de abejas	<ul style="list-style-type: none"> • Estos fuets presentaron un mejor perfil de ácidos grasos que el producto original. • La sustitución de la grasa no afectó ni al color ni al estado oxidativo y microbiológico. 	
Curcumina			
Oleogel	TCM	<ul style="list-style-type: none"> • Se diseñó un nuevo oleogel capaz de incorporar altas cargas de curcumina bioaccesible. • Se consiguió una alta bioaccesibilidad de la curcumina utilizando TCM como fase oleosa. • Se alcanzaron altas cargas de curcumina usando Span 20 y monoestearina como gelificantes. 	Yu et al. (2012)
Nanoemulsión oleogel-en-agua	TCM	<ul style="list-style-type: none"> • Se desarrolló una nanoemulsión capaz de incorporar altas cargas de curcumina bioaccesible. • Se alcanzó una alta bioaccesibilidad de la curcumina utilizando Tween 20 como emulgente. • La digestión de la nanoemulsión resultó ser más rápida y completa que la del oleogel. • La biodisponibilidad de la curcumina en la nanoemulsión fue 9 veces mayor que en forma libre. 	Yu & Huang (2012)
o Dispersión acuosa	Palmitato de isopropilo	<ul style="list-style-type: none"> • Se prepararon dos sistemas: una dispersión acuosa y un oleogel, ambos cargados con curcumina, como potenciales sistemas de liberación percutánea de este principio activo. 	
o Oleogel	Lecitina	<ul style="list-style-type: none"> • El oleogel mostró una penetración de la curcumina más rápida e intensa, siendo su uso adecuado en patologías que requieran una acción más inmediata. • La dispersión acuosa presentó una liberación más controlada, estando indicada para patologías que requieran una acción más prolongada en el tiempo. 	Esposito et al. (2014)

Oleogel	<i>N,N</i> -dimetilformamida	DPH	<ul style="list-style-type: none"> • Se desarrolló un nuevo oleogel con curcumina altamente fotoluminiscente. • El oleogel mostró fotosensibilidad y excitarse en un rango de longitudes de onda más amplio. • Este oleogel con curcumina mostró potenciales aplicaciones como sensor. 	Park & Lee (2015)
Oleogel	Palmitato de isopropilo	Lecitina	<ul style="list-style-type: none"> • Se sintetizó un oleogel estable a largo plazo como posible sistema de liberación percutánea de principios activos tanto lipofílicos como hidrofílicos. • La incorporación del activo no afectó a su viscosidad o a su comportamiento reológico. 	Esposito et al. (2016)
Oleogel	Aceite de maíz	<ul style="list-style-type: none"> o β-sitosterol y lecitina o Ceramida o Etilcelulosa 	<ul style="list-style-type: none"> • El tipo de gelificante utilizado influyó sobre las propiedades macroscópicas, microestructura y capacidad de carga del oleogel. • Los oleogeles de β-sitosterol + lecitina y ceramida presentaron una estructura fibrilar, siendo el primero el que mostró una mayor eficiencia de encapsulación y capacidad de carga. • El oleogel de etilcelulosa presentó una estructura granular y mayor eficiencia de encapsulación y capacidad de carga que los oleogeles anteriores. 	Liu & Wan (2016)
<ul style="list-style-type: none"> o Oleogel o Gel compuesto 	<ul style="list-style-type: none"> o Aceite mineral o Aceite de eucalipto o Otros aceites 	Glucolípidos	<ul style="list-style-type: none"> • Se diseñaron oleogeles y geles compuestos para favorecer la cicatrización de heridas. • Estos sistemas presentaron comportamiento viscoelástico, termorreversibilidad, tixotropía y naturaleza inyectable. • La incorporación de curcumina mejoró sustancialmente la viscoelasticidad del oleogel. 	Prasad et al. (2018)
Oleogel	Ácido oleico	Pluronic F-127 y Pluronic L-81	<ul style="list-style-type: none"> • Se elaboraron oleogeles plurónicos como potenciales sistemas de liberación percutánea. • El Pluronic L-81 favoreció la incorporación de curcumina en la interfase micela-micela. • La introducción de curcumina en los oleogeles con la mezcla Pluronic F-127/Pluronic L-81 afectó a su estructura y redujo tanto la relación G'/G'' como los valores de viscosidad. • Además, estos últimos oleogeles presentaron una mayor permeación de curcumina. 	Vigato et al. (2019)
Emulsión agua-en-oleogel	<ul style="list-style-type: none"> o Aceite de colza o Aceite de coco 	Myverol 18-04 K	<ul style="list-style-type: none"> • El tipo de aceite influyó sobre la estabilidad de la emulsión: los aceites de ácidos grasos de cadena larga proporcionaron una mayor estabilidad mecánica. • Las emulsiones de agua-en-oleogel cargadas con curcumina presentaron una mala permeabilidad aparente. • Al aumentar la cantidad de agua en la emulsión, se obtuvieron valores de G' mayores. 	Ojeda-Serna et al. (2019)

Oleogel	Aceite de maíz	β -sitosterol y lecitina (9:1, 8:2 y 7:3, m/m)	<ul style="list-style-type: none"> • La introducción de curcumina en el oleogel no afectó a su estructura o resistencia mecánica. • El aceite gelificado presentó menor oxidación lipídica que el aceite sin gelificar. • La bioaccesibilidad de la curcumina mejoró muy significativamente cuando fue incorporada al oleogel. 	Li et al. (2019)
o Oleogel	TCM	Phospholipon 90 H	<ul style="list-style-type: none"> • Se sintetizó un oleogel y nanogel como sistemas transportadores de curcumina por vía tópica. • Al aumentar la concentración de gelificante, mejoró la estabilidad del oleogel. • El nanogel proporcionó mayor actividad antiinflamatoria que el oleogel. 	González-Ortega et al. (2020)
o Nanogel O/W	Jeffamine ED-2003	HDI	<ul style="list-style-type: none"> • Se preparó un nuevo oleogel con aplicaciones biológicas (como sistema transportador de fármacos) y medioambientales (para la eliminación de contaminantes orgánicos del agua). • La incorporación de curcumina al oleogel alteró la microestructura de éste. 	Bonattini et al. (2020)
Oleogel	Aceite de girasol	<ul style="list-style-type: none"> o Monoglicéridos saturados o Cera de salvado de arroz o β-sitosterol y γ-orizanol (2:3, m/m) 	<ul style="list-style-type: none"> • Se diseñaron diferentes oleogel utilizando aceite de girasol enriquecido con curcumina. • Los oleogel resultantes presentaron diferentes propiedades reológicas y firmeza. • La estructura de los oleogel afectó a la cinética de la lipólisis durante la digestión <i>in vitro</i>. • El tipo de gelificante afectó a la bioaccesibilidad de la curcumina, no a la fuerza del oleogel. 	Calligaris et al. (2020)
PUFAs ω-3 y curcumina				
Oleogel	Mezcla de aceites de oliva, linaza y pescado (44.39:37.87:17.74)	<ul style="list-style-type: none"> o Etilcelulosa o Cera de abejas 	<ul style="list-style-type: none"> • Se prepararon oleogel con PUFAs ω-3 y curcumina. • Se desarrollaron nuevas hamburguesas sustituyendo totalmente la grasa de cerdo por oleogel. • La curcumina redujo la oxidación lipídica durante el almacenamiento y el cocinado. • Las hamburguesas con oleogel de cera de abejas mostraron mejores resultados que las de etilcelulosa. 	Gómez-Estaca et al. (2020)
Oleogel	Aceite de linaza	Cera de abejas	<ul style="list-style-type: none"> • Se elaboraron nuevos patés sustituyendo parcial o totalmente la grasa de cerdo por un oleogel rico en PUFAs ω-3 y curcumina. • La introducción de curcumina en el oleogel no afectó a su estructura o propiedades. • La curcumina tuvo un efecto protector frente a la oxidación lipídica durante el almacenamiento. 	Ramírez-Carrasco et al. (2020)

1.4.2. Emulsion-based delivery systems

In recent years, emulsion-based delivery systems have emerged as one of the most interesting and promising technological options as fat replacers in reformulation processes to produce low-fat foods, for improving fatty acid profiles and optimizing the presence of bioactive compounds, both hydrophilic and hydrophobic, in different foods (Garti, 1997; Sagalowicz & Leser, 2010; Dickinson, 2013). Nowadays, the use of emulsions technology for incorporating dietary active compounds for the design and development of healthier foods is a relatively common strategy and widely used in an extensive range of industries including food, cosmetic, pharmaceutical, agrochemical, paint, and petroleum (Kargar, 2014; Callender et al., 2017).

A large number of products present in daily life, whether of natural origin (such as milk, etc.) well processed, are emulsions. Within the food industry, mayonnaise, margarine, ice creams, sauces, condiments, and infant formulas are examples of foods that are presented in an emulsified state. In the cosmetics sector, creams, moisturizers, UV protectors, etc. are examples of emulsions. In the pharmaceutical sector, emulsions can serve to encapsulate active drugs and then release them when they are in the bloodstream. Besides, the introduction of new textures when presenting new products and making them more attractive to the consumer has opened up endless possibilities and has great potential when it comes to designing functional foods. In this context, emulsion-based delivery systems have been used to a great extent for the incorporation of hydrophobic active molecules such as ω -3 PUFAs or curcumin in foods, beverages, or multi-component food preparations (Lee et al., 2006; McClements et al., 2007, 2009; Sagalowicz & Leser, 2010; Dickinson, 2013; Kargar, 2014).

1.4.2.1. Definition and technical characteristics

An **emulsion** is a metastable colloidal system consisting of two immiscible liquids, usually of different polarity, where one of them (dispersed phase) is dispersed in

the form of small droplets in another fluid called continuous phase (Pal, 2011). The mean droplet size of these emulsions ranges from 100 nm to 100 μm (McClements et al., 2009). However, this is not a conditioning factor, since some of these may have sizes both larger and smaller than those described.

From a conceptual point of view, an emulsion can be considered to be made up of three regions that have different physicochemical properties: the dispersed phase, the continuous phase, and the interfacial region or interface (Figure 18) (McClements & Decker, 2000). All the molecules or components of the emulsion are distributed, according to their concentration and polarity, among the three regions mentioned above.

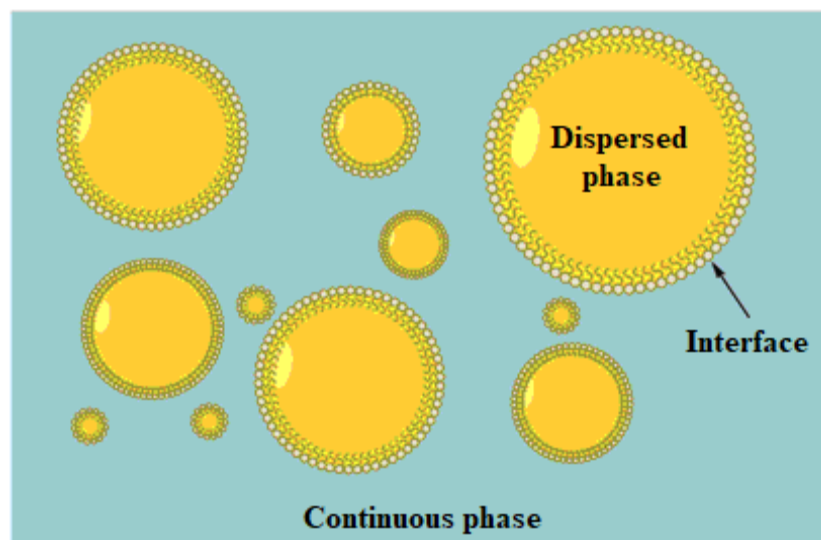


Figure 18. Schematic representation of an emulsion.

Emulsions are thermodynamically unstable systems in which, in a more or less short time, the phases separate, breaking the emulsion. The thermodynamic instability of the emulsified system is a consequence of a large amount of energy necessary for its formation due, among other things, to the surface tension between the phases that make up the mentioned systems; thus, when the energy supply ceases, the natural tendency is the separation of both phases being arranged according to their density. However, these phenomena can be reduced with the use of surfactants that kinetically stabilize the sample by lowering the interfacial tension, as well as with the application of homogenization and mixing conditions that allow the particle size to be reduced. Surfactants are adsorbed on the surface of the droplets, forming a layer that covers them and prevents them from being added again. In this Thesis, the terms ‘surfactant’ and

‘emulsifier’ will be used interchangeably, although there are some differences between them, since, strictly speaking, an emulsifier is a type of surfactant.

The addition of an emulsifier facilitates the formation of the droplets and their stability in two different ways: on the one hand, they reduce the interfacial tension (amount of energy needed to create a bonded interfacial area) between liquid phases; and on the other hand, they form an interfacial film between the dispersed droplets (internal phase) and the continuous medium (external phase), acting as a protective barrier that delays or prevents the separation of two immiscible liquids. This barrier can produce a repulsion of an electrostatic nature (adsorption of ionic emulsifiers) or steric (adsorption of non-ionic emulsifiers or polymers). The interfacial region or interface is a thin film between the phases in which there is a mixture of oil, water, and emulsifier (Figure 19). According to their polarity, the non-polar molecules will be located in the oily phase, the polar molecules will be located in the aqueous phase and the amphiphilic molecules such as surfactants will be located at the interface.

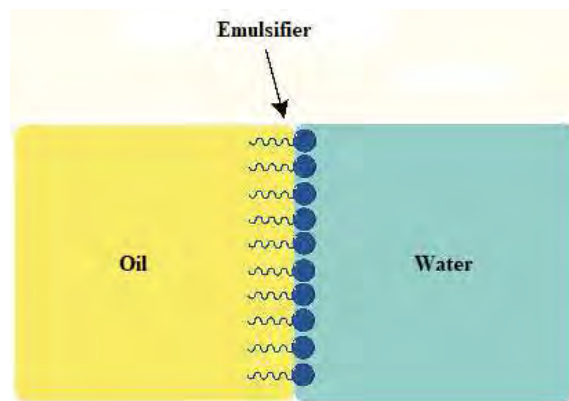


Figure 19. Interfacial region or interface.

The main characteristics of the emulsions can be summarized as follows:

- Dispersed phase fraction, ϕ . It represents the concentration of the dispersed phase droplets within the emulsion. Logically, a large dispersed phase fraction needs more energy to produce the droplet size. This parameter is closely related to appearance, texture, aromas, stability, and cost in obtaining food products-based emulsions.
- Particle size distribution. It is a very important parameter that will determine the vast majority of the properties of food products-based emulsions

(Dickinson, 1982, 1992). If all the droplets that make up the emulsion have the same size, we speak of a monodisperse emulsion and, in this case, they can be fully characterized by the radius or the diameter of the droplet. On the other hand, if the emulsion is composed of a variable number of droplet sizes, we have a polydisperse emulsion. In this case, its characterization is more complicated and we speak of an average droplet size or a range of droplet sizes.

- Properties of the interface. The interfacial region of the droplet is a very narrow region that surrounds each droplet and is composed of a mixture of oil, water, and emulsifier (Hunter, 1987, 1989). Its composition and structure will be determined by the type and concentration of the molecules with surface activity, as well as by the processes that take place during and after the formation of the emulsion.
- Droplet load. The physicochemical and organoleptic properties of many emulsions-based food products are determined by the droplet load (Dickinson, 1982). The presence or absence of charged droplets in the emulsion will be determined by the type of emulsifier used (whether it is ionic or non-ionic) and by the pH of the aqueous phase. It is a very important characteristic that will determine the physical properties (like viscosity) and chemical properties of food products-based emulsions. Moreover, electrostatic interactions can also occur between charged droplets and other substances such as antioxidants, vitamins, etc. (Dickinson, 1992; Coupland & McClements, 1996; Landy et al., 1996; Mei et al., 1998).
- Droplet aggregation state. The physical state of the droplet can influence the physical and organoleptic properties of the emulsion such as appearance, viscosity, aroma, or stability (McClements & Dickinson, 1996). An example of this is the production of butter or margarine that depends on a controlled destabilization of an oil emulsion containing partially crystallized droplets.
- Other properties of emulsions are the rheology of the emulsion (viscosity) or the transparency of the same.

1.4.2.2. Classification

Emulsified systems can be classified according to different criteria. For example, depending on the size of the droplets, we can distinguish the emulsions themselves or *macroemulsions* (with droplet sizes between 1 and 100 μm), the *miniemulsions* or *nanoemulsions* (with sizes between 20 and 500 nm), and the *microemulsions* (with droplet sizes less than 100 nm) (Fernández-Arteaga, 2006). Note that the main difference between a microemulsion and a macroemulsion does not lie in the droplet size, but their thermodynamic stability: microemulsions are thermodynamically stable systems and, therefore, stable over time, whereas macroemulsions are not (Freiría-Gándara, 2018). Table 3 lists some of the main characteristics of these systems.



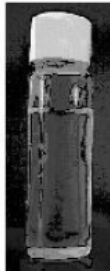
Propiedades	Emulsiones		Microemulsiones
	Nano-emulsión	Macro-emulsión	
aspecto visual			
diámetro característico típico	20-200 nm	> 1 μm	10-100 nm
estabilidad	Cinética		Termodinámica
formación	Aporte de energía		Espontánea
concentración tensioactivo	Baja		Alta

Table 3. Types of emulsions according to the droplet size and main characteristics (Fernández-Arteaga, 2006).

Emulsified systems can also be classified according to the number of immiscible phases. According to this, two types of emulsions can be differentiated: conventional emulsions and multiple emulsions (Pal, 2011).

- *Conventional emulsions* (also called *simple emulsions*): those emulsions that have two immiscible phases: one internal and another external (Figure 20a).
- *Multiple emulsions* (also called *double emulsions*, *duplex emulsions*, or *emulsions of emulsions*): those emulsions that have three immiscible phases: one inner and another outer, both separated from each other by the third phase of distinct polarity (Figure 20b).

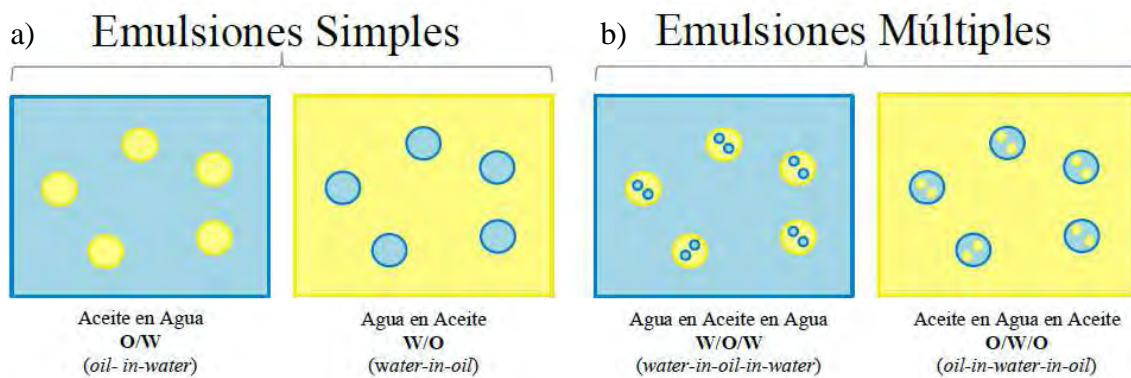


Figure 20. Scheme of the different types of emulsions according to the number of immiscible phases: a) conventional emulsions and b) multiple emulsions.

In recent years, novel types of structured emulsion-based delivery systems, including solid lipid particles, filled hydrogel particles, multilayer emulsions, and gelled emulsions, have been proposed and developed for the incorporation and use of different bioactive compounds in the food industry (McClements, 2010). For reasons of extension, we will not discuss each of these emulsified systems, although we did want to make a point about the gelled emulsions that are the object of this Thesis.

Gelled emulsions have numerous applications in the food industry aimed at the development of new products, improving their sensory attributes and their nutritional and/or functional characteristics (Weiss et al., 2005; Lobato-Calleros et al., 2008; Li et al., 2014). Therefore, this type of emulsions offers a range of interesting possibilities for the food industry since they can improve the lipid composition, encapsulate the bioactive compounds, and provide certain plastic properties. Their physical and structural characteristics (encapsulation efficiency, minimization of phase separation, stability, viscoelasticity, etc.) offer products with technological advantages to optimize the presence of bioactive compounds. Furthermore, this strategy can influence the

bioavailability and oxidation of these compounds, since they are related to their molecular structure and their physicochemical properties.

1.4.2.2.1. Conventional emulsions

Conventional emulsions can be classified according to the arrangement of the oil and water phases. According to this, there are two different types of simple emulsions:

- *Oil-in-water emulsions* (hereinafter *O/W emulsions*), where small droplets of a lipid nature are dispersed in a continuous aqueous phase (Figure 21a). An O/W emulsion will be composed of a hydrophilic emulsifier which consists of a lipophilic or hydrophobic part (long-chain alkyl residue) soluble in the oily phase and a hydrophilic part with an ionic group or a certain number of hydroxyl groups, which is soluble in the aqueous phase. In this type of emulsions, the emulsifying agent is located at the interface where the surface tension decreases, facilitating the dispersion of one phase in the other.
- *Water-in-oil emulsions* (hereinafter *W/O emulsions*), where small droplets of an aqueous nature are dispersed in a continuous lipid phase (Figure 21b). To stabilize this type of emulsions, it is necessary a hydrophobic emulsifier composed of a relatively strong lipophilic group and a weaker hydrophilic group. In this way, it will be predominantly soluble in the oily phase.

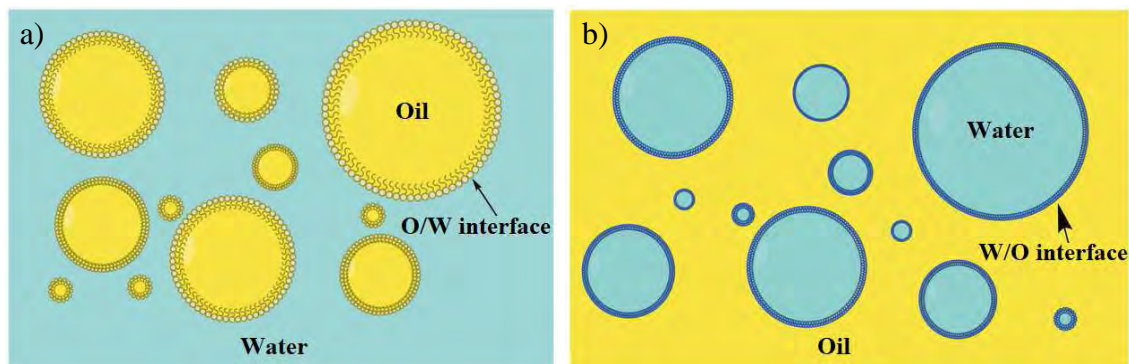


Figure 21. Representation of the two types of mentioned conventional emulsions:

a) O/W emulsion and b) W/O emulsion.

Within emulsion technology, it is also common to speak of other types of colloidal systems such as micelles and liposomes (Frankel, 2005), which we will briefly describe. Micelles are those in which a fatty acid is dispersed in water. Under these circumstances, the fatty acids acquire a micellar-like distribution within the aqueous phase (Figure 22a). In this way, the heads of the polar groups are oriented towards the aqueous phase, and the non-polar tails are oriented towards the oily phase. These emulsion types are not usually found in food since they are mainly composed of triacylglycerols and phospholipids. Small amounts of free fatty acids can be found in triacylglycerol emulsions, leading to the formation of mixed micelles and emulsions. For its part, liposomes are formed when phospholipids are naturally dispersed in water. They are naturally distributed in multilayers consisting of bilayers formed between the aqueous phase and the layer closest to the oily phase in monolayer form (Figure 22b). The phospholipids are distributed in such a way that the non-polar tails are located as far as possible from the water and the polar heads are located in contact with it.

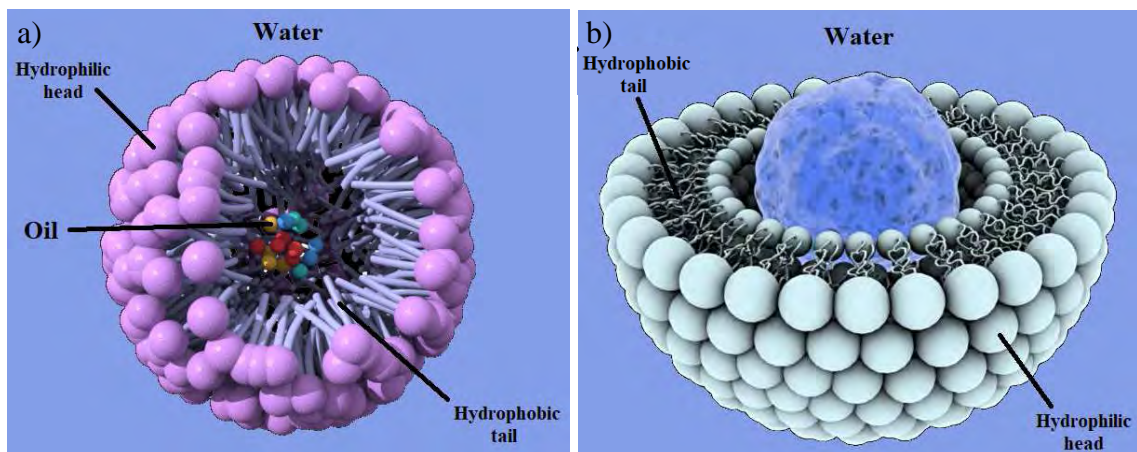


Figure 22. Representation of a) a micelle and b) a liposome.

1.4.2.2.2. Multiple emulsions

A multiple emulsion is a multi-compartmentalized system characterized by the coexistence of two conventional emulsions, a W/O emulsion and an O/W emulsion, in which the fat globules of the dispersed phase themselves include even smaller equally dispersed droplets (Garti, 1997). Multiple emulsions can also be classified according to

the arrangement of the oil and water phases into water-in-oil-in-water emulsions and oil-in-water-in-oil emulsions. The first ones are the most commonly used in the food industry where offer a series of very promising opportunities (Benichou et al., 2004; Jiménez-Colmenero, 2013).

- *Water-in-oil-in-water emulsions* (hereinafter $W_1/O/W_2$ emulsions) are made up of a W_1/O emulsion and a hydrophobic emulsifier at its interface. All of this is contained in an external aqueous phase, W_2 , where a hydrophilic emulsifying agent is found at the O/W_2 interface (Figure 23a). Since these systems are those that offer the greatest possibilities of use within the framework of the subject considered in this Doctoral Thesis, all subsequent analyses will focus on the development of $W_1/O/W_2$ emulsions, where W_1 constitutes the internal aqueous phase, O the lipid phase, and W_2 the external aqueous phase.
- *Oil-in-water-in-oil emulsions* (hereinafter $O_1/W/O_2$ emulsions) are liquid-liquid dispersed systems in which the internal phase is itself an O_1/W emulsion at the interface of which is the hydrophilic emulsifier. This emulsion is dispersed in an external lipid phase, O_2 , which contains a hydrophobic emulsifying agent at the W/O_2 interface responsible for its stability (Figure 23b).

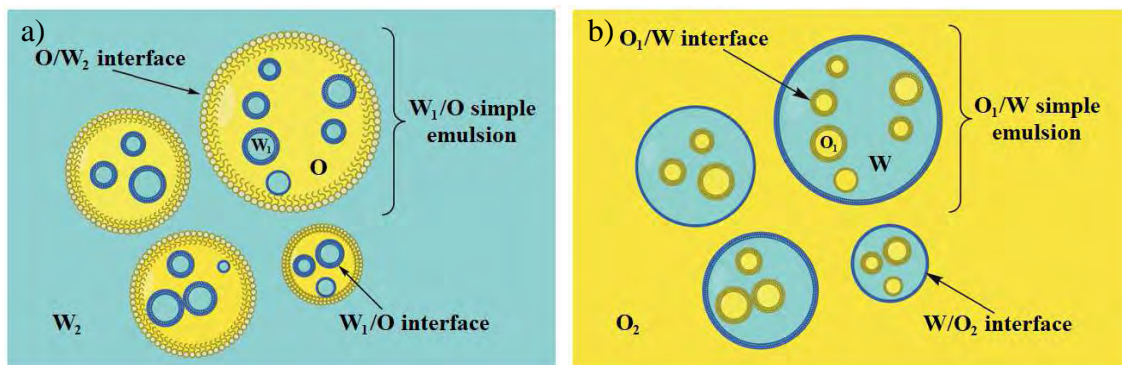


Figure 23. Representation of the two types of mentioned multiple emulsions:
a) $W_1/O/W_2$ emulsion and b) $O_1/W/O_2$ emulsion.

The internal aqueous phase, W_1 , is a solution, sometimes buffered, prepared with different components combined and that fulfills two fundamental purposes: to provide the system with thermodynamic stability and incorporate the hydrophilic bioactive

compounds to be encapsulated. To help improve the thermodynamic stability of the system, W_1 can be made up of some salts (for example, NaCl or KCl) that play a critical role in balancing the osmotic pressure between phase W_1 and W_2 (Muschiolik, 2007). To promote the mentioned stability, other compounds such as sugars, proteins, and polysaccharides can also be added (Su et al., 2006; Dickinson, 2011). Regarding the incorporation of bioactive compounds, the internal aqueous phase can incorporate different functional ingredients, including vitamins, minerals, antioxidants, microorganisms, etc., which depending on their nature, may require specific environmental conditions (Jiménez-Colmenero, 2013).

Various healthy vegetable oils rich in ω -3 PUFAs such as olive, sunflower, chia, rape, soybean, corn, flax, perilla, and others of marine origin have been used as lipid phase in the formation of food-grade $W_1/O/W_2$ emulsions for their potential application in food (Weiss et al., 2005; Su et al., 2006; Brückner et al., 2007; Surh et al., 2007; Pimentel-González et al., 2009; Márquez & Wagner, 2010; Pawlik et al., 2010; Carrillo-Navas et al., 2012; Sapei et al., 2012; Cofrades et al., 2013; Bou et al., 2014). Its composition (fatty acid profile) will determine some of the physicochemical properties of the system, including the release of encapsulated compounds. In this sense, a direct relationship between an increase in the release rate of these compounds with the percentage of saturated fatty acids that make up the oily phase has been described (Bonnet et al., 2009, 2010). Other authors point out that the viscosity of the lipid phase increases with the length of the fatty acid chain and decreases slightly with the degree of unsaturation; likewise, hydrophobicity increases with chain length and unsaturation (Phan et al., 2010). Therefore, this lipid phase will have to be chosen carefully to obtain the best conditions for the system. On the other hand, the lipid phase also allows lipophilic components such as antioxidants, fat-soluble vitamins, etc. to be incorporated within it, as described by Faridi-Esfanjani et al. (2017).

The external aqueous phase, W_2 , requires the presence of a hydrophilic emulsifying agent, the nature and concentration of which determine the properties of the $W_1/O/W_2$ emulsion. For this purpose, various types of emulsifying food proteins such as whey proteins, sodium caseinate, bovine serum albumin, etc. have been used. Different hydrocolloids such as gum arabic and modified starch have also been used. Also, various soluble polysaccharides such as pectins, alginates, gellan gum, etc. can be added

which, as described below, due to their thickening and gelling properties, act as stabilizers favoring the stability of the system (Dickinson, 2011). However, as already mentioned above, an essential aspect to favor the stability of the multiple emulsions is to maintain the osmotic balance between the W_1 and W_2 phases (Bonnet et al., 2010).

1.4.2.3. Main advantages and limitations

One of the main advantages of emulsified systems is that they allow the incorporation of an oily phase and an aqueous phase, into the same product. So, given the solubility and incompatibility problems that many bioactive compounds present and that make their effective incorporation into the food industry difficult, as well as their low bioaccessibility and bioavailability, emulsions permit the easy incorporation of both oil-soluble compounds and water-soluble compounds by combining two different phases (Calva-Estrada, 2015). Moreover, emulsion-based delivery systems tend to increase the absorption and penetration of bioactive compounds and improve their stability. For example, Sugasini & Lokesh (2017) studied the design of a PUFAs enriched-phospholipid-based nanoemulsion containing curcumin (an oil-soluble bioactive compound). They reported increased bioavailability with respect to free curcumin and also found that this nanoemulsion improved DHA serum levels. Furthermore, since the phase that occurs at a greater sensory intensity also makes up the external phase, these systems allow off-flavors and off-odors to be partially masked by incorporating flavorings, sweeteners, and masking agents in the external aqueous phase (Jeyakumari et al., 2016).

When considering their main limitations, it should be noted that emulsions are not thermodynamically stable systems and, therefore, have an expiration date that varies as a function of the quality of the emulsion design. This being said, physical instability will always be a factor that must be taken into account as its presence in these types of systems is unavoidable. As a consequence, a large effort has been dedicated to studying the different mechanisms that lead to the eventual breakdown of a conventional emulsion: gravitational separation (creaming or sedimentation), flocculation, coalescence, Ostwald ripening, and phase inversion. All these instability phenomena

can occur at the same time or happen gradually, ultimately leading to the breakdown of the emulsion (Freire-Rodríguez, 2018). To this end, other studies such as that conducted by Dey et al. (2018), have studied the design of ω -3 PUFA-enriched biocompatible nanoemulsions. Furthermore, the addition of certain amounts of emulsifying agent is essential for the formation of the emulsion itself. In most cases and depending on the emulsifier used, this produces a rather unpleasant taste and can sometimes modify the physical properties of the emulsion. Formation of the system also requires it to be subjected to aggressive external conditions. This is another important limitation since it usually leads to considerable increases in the temperature of the system which can degrade thermolabile components, accelerate oxidation reactions, and so on. Finally, the lipid oxidation process has been extensively studied and understood in homogeneous media and, despite its extreme complexity, the factors that affect the oxidation in these systems are now fairly well known. However, the lipid oxidation processes in emulsified systems are much more complex than in homogeneous systems, mainly due to the presence of the interfacial region and the distribution of components among the different regions according to their polarity; all this makes it difficult to study and control lipid oxidation in emulsions (Freiría-Gándara, 2018).

As already mentioned above, multiple emulsions have a characteristic structure that consists of compartmentalization of the different phases that make up the emulsion. Due to their characteristics, multiple emulsions have several potential advantages and limitations over conventional emulsions. These advantages include a controlled release for bioactive compounds, although these are generally more appropriate for encapsulation, transport, protection, and delivery of hydrophilic compounds (McClements et al., 2007). Multiple emulsions allow also the encapsulation of hydrophilic functional ingredients in the internal aqueous phase, improving the sensory properties through its influence on the palatability of the food and releasing them at a controlled rate or in response to specific environmental stimuli (changes in pH, ionic strength, temperature, etc.). Furthermore, encapsulated compounds are also protected against chemical degradation, thus isolating them from other ingredients soluble in the external aqueous phase with which they could react, of the action of different conditions of processing or conservation, and/or of the activity of enzymes in the gastrointestinal tract (Jiménez-Colmenero, 2013).

Thanks to their characteristics, including the capacity to hold and protect certain components and control their release from one phase to another, these emulsion-based delivery systems have been used as a means of microencapsulation in food and clinical nutrition (encapsulation of EFAs and ω -3 PUFAs), pharmacology (carriers for anticancer agents and other active ingredients), cosmetics (improving the application of creams with encapsulated compounds) and in other industrial applications (Benichou et al., 2004; Kukizaki & Goto, 2007; Muschiolik, 2007). Multiple emulsions offer a promising means of preparing micro- and nano- capsules (solids or semisolids) which can contain specific hydrophobic and hydrophilic compounds (Benichou et al., 2004).

Despite this potential, there are still few examples of multiple emulsions currently used in food products. The main reason is that multiple emulsions are highly susceptible to breakage during storage or when subjected to extreme environmental conditions often found in the food industry. The stability of conventional emulsions is more simply determined than that of multiple emulsions (Jiao et al., 2002). Several instability mechanisms are responsible for the breakdown of multiple emulsions. Some of these are similar to those found in conventional emulsions, whilst others are exclusive to multiple emulsions (for example, the non-equilibrium between the internal and external aqueous phases could produce diffusion and/or expulsion of water and, ultimately, destabilization of the system) (Garti, 1997; Jiao et al., 2002).

1.4.2.4. Overview of emulsion stability and destabilization processes in PUFAs-BLEs

The term ‘emulsion stability’ refers to the ability of an emulsion to resist changes in its properties over time: the more stable an emulsion is, the less its properties change over time (McClements, 2007). From an energy point of view, colloidal particles in a dispersed medium are always subject to Brownian motion, producing strong collisions between them. Thus, the system stability will be determined by the result of the interactions between the particles during their collisions. Interparticle forces in emulsions arise mainly due to three types of interactions: attractive, repulsive, and steric (McClements & Weiss, 2005; Peredo-Luna & Jiménez-Munguía, 2012).

- **Attractive interactions.** Among the attractive interactions, the most common are those of Van der Waals, which arise due to orientation, induction, and dispersal effects. Normally, the existence of a small number of forces of this type that leads to a weak attraction between the droplets is desirable, since it leads to the formation of the reticular structure, stabilizing the emulsion. However, the presence of strong Van der Waals interactions leads to the formation of individual aggregates, which is undesirable. At the limit, the system can be destabilized in two phases, due to the strong Van der Waals forces causing extreme flocculation, separating the aggregates and the surrounding fluid. To counteract the Van der Waals attraction, it is necessary to create a repulsive force. There are two types of repulsive interactions depending on the nature of the emulsifier used: electrostatic interaction (due to the creation of electrical double layer) and steric interaction (due to the presence of emulsifier or polymer adsorbed layers) (Rahalkar, 1992; Tadros, 2013).
- **Repulsive interactions.** This type of interaction arises mainly due to the double layer (layer of electrostatic charges that surround the droplet due to the adsorption of ions on the surface). Repulsive interactions can be classified as rigid sphere and soft sphere. Those with a rigid sphere are produced when the double layer is thin and poorly developed. In this case, when the droplets hit each other, there is little variation in the interaction energy, until at very small separations, strong repulsion occurs and the interaction energy increases rapidly to an infinite value. The soft sphere interactions occur between thick and extensive double layers, and the effective radius of the droplet may be several times its radius (Rahalkar, 1992; Peredo-Luna & Jiménez-Munguía, 2012; Tadros, 2013).
- **Steric interactions.** These are present when the particles have an adsorbed layer of emulsions and/or macromolecules. Many food emulsions contain thickeners that can act as steric stabilizers. Steric stabilization can be important even when thickeners are not added. The presence of steric stabilizers at the interface usually leads to an extended double layer, thus increasing electrostatic interactions. Due to the presence of an adsorbed

double layer, the droplets do not have sufficient contact for coagulation to occur. Thus, steric stabilization generally tends to suppress attractive interactions. Steric stabilization is very important for food emulsions due to the different thickeners and stabilizers used. Most of these molecules are polyelectrolytes. The analysis is more complicated for polyelectrolytes due to the presence of additional surface charges (Rahalkar, 1992; Peredo-Luna & Jiménez-Munguía, 2012; Tadros, 2013).

An emulsion can be destabilized through different physicochemical processes, mainly through physical mechanisms resulting from an alteration in the spatial distribution or structural organization of the molecules, among which gravitational separation (creaming or sedimentation), flocculation, coalescence, Ostwald ripening, and phase inversion can be mentioned (Figure 24) (McClements, 2007); in the case of PUFAs-based lipid emulsions (PUFAs-BLE), lipid oxidation is a common example of chemical destabilization (Coupland & McClements, 1996). In this section, the different physical mechanisms by which an emulsion can be destabilized (including those specific to multiple emulsions) are described and the various existing studies about the ω -3 PUFA-enriched emulsions stability are reviewed.

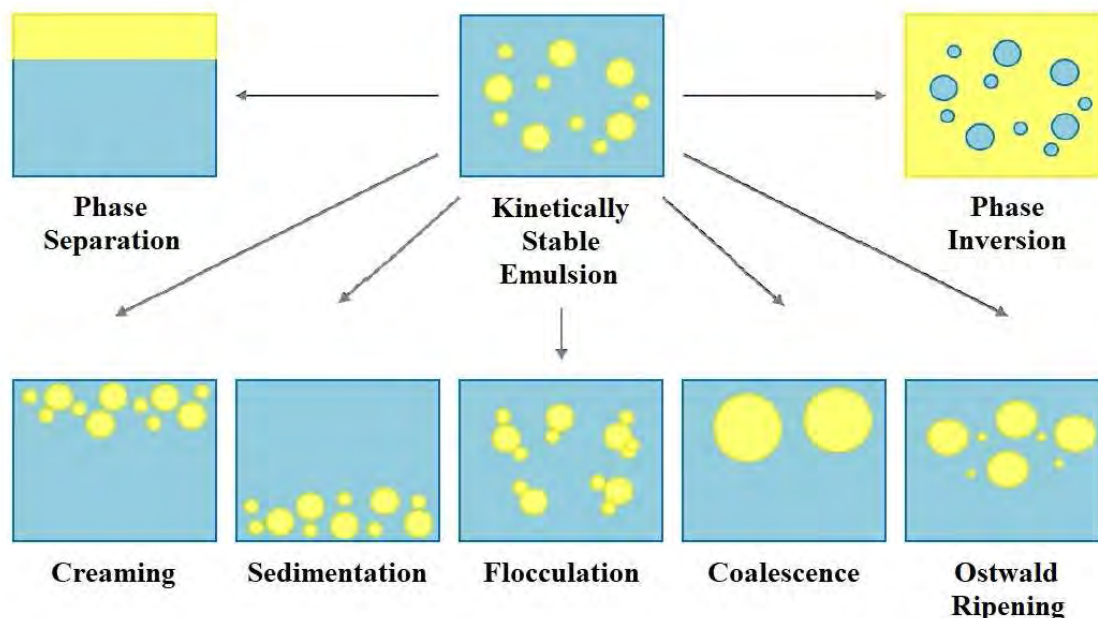


Figure 24. Schematic representation of the main physical destabilization mechanisms presented in conventional emulsions.

1.4.2.4.1. Gravitational separation (creaming and sedimentation)

Gravitational separation is a process caused by the action of gravity due to the difference in density between the droplets of the emulsion and the liquid that acts as a continuous phase, which generates a net gravitational force on them and a vertical concentration gradient of the droplets without changing their size distribution (Aranberri et al., 2006; McClements, 2007). In O/W emulsions, the droplets have a lower density than the continuous phase, so they tend to rise, a process known as *creaming* (Figure 24). On the contrary, in W/O emulsions the droplets have a higher density than the continuous phase so they tend to descend, the process being known as *sedimentation* (Figure 24). Normally, gravitational separation is considered to have an adverse effect on the quality of food emulsions, since it influences their opacity or texture. Particularly, creaming is the main process by which the dispersed phase separates from an emulsion and is a typical precursor to the coalescence process (McClements, 2015). The scientific community is working to get established the degree of creaming or sedimentation that has taken place in a product at a certain time, as well as the tendency of a food to suffer this type of instability mechanism.

In recent years, many researchers have studied the gravitational separation (both creaming and sedimentation) in PUFAs-BLEs. The rate at which a particle rises or falls through a liquid is determined by the balance of forces acting on it and can be estimated from the Stokes equation. Thus, Stokes' Law highlights different ways to retard the gravitational separation in a PUFAs-BLE (McClements, 2007). Based on this expression, creaming and sedimentation could be inhibited, for example, by decreasing the droplets' size (introducing higher energy input in the emulsion, e.g., using a high-pressure homogenizer or a high shear mixer) (Kargar, 2014), what was checked by Chanamai & McClements (2000). They studied the impact of droplet size and concentration on the rheology and creaming stability of monodisperse O/W PUFAs-BLEs and they found a strong dependence between them.

On the other hand, the physical stability of PUFAs-BLEs against gravitational separation could be increased by diminishing the density gap between the oil enriched

in PUFAs and water phases (adding to the oil enriched in PUFAs phase weighting agents or fat crystals, for example) or by increasing the viscosity of the continuous phase (incorporating to the aqueous phase thickening agents or gelling agents, e.g., xanthan gum, gum arabic or guar gum) (Kargar, 2014). Based on this, in the scientific literature, many studies indicate that changes in the rheological properties of the continuous water phase can have a fundamental impact on the storage stability of PUFAs-BLEs. For example, Taherian et al. (2007) evaluated the influence of added thickening agents (xanthan gum) and weighting agents (sucrose acetoisobutyrate (SAIB) and brominated vegetable oil (BVO)) on modified starch-based emulsions and they obtained that addition of a thickening agent into the aqueous phase increased the stability of the emulsion. The emulsion containing xanthan gum had a smaller droplet size and showed 5 and 14 times less phase separation compared to the emulsions with or without weighting agents incorporated, respectively. Therefore, the addition of suitable content of non-adsorbing hydrocolloids to O/W PUFAs-BLEs is an interesting option to increase stability against creaming.

For its part, Chivero et al. (2015) investigated the impact of guar and xanthan gums on the emergence and stability of soy soluble polysaccharide O/W PUFAs-BLEs. They verified that emulsion droplet polydispersion, droplet sizes, and creaming stability were enhanced by the addition of polysaccharide dispersions. The higher continuous phase viscosity in emulsions containing guar and xanthan gums was responsible for the improvement of the homogenization efficiency and to prevent the movement of the droplets of the emulsion, resulting in a promoted stability. On the other hand, Xu et al. (2017) studied the effect, in this case, of anionic polysaccharide addition on the physical and chemical stabilities of fish O/W emulsions coated by hydrolyzed rice glutelin under different pH conditions –where the polysaccharides and droplets had similar or opposite charges. Their results suggest that at neutral pH, the non-adsorbed xanthan gum presents in the aqueous phase promoted droplet flocculation through a depletion mechanism, and that resulting increase in particle size led to faster creaming while at acid pH, polysaccharide addition enhanced the aggregation and creaming stability of the emulsions since anionic polysaccharides can adsorb to the surfaces of cationic oil droplets and improve their aggregation stability by increasing the electrostatic and/or steric repulsion between them. Finally, Chityala et al., (2016) investigated the impact of

enzyme-modified guar (EMG) gum and xanthan gum (XG) mixtures on the physical and chemical stabilities of whey protein isolate stabilized fish O/W emulsions. They found that incorporation of XG/EMG gum mixtures considerably elevated the viscosity of the emulsions, decreased creaming, and reduced flocculation depletion of oil droplets as compared to guar gum (GG), XG, or XG/GG mixtures as expected, as we said earlier.

However, the criteria provided above are not the only ones to take into account to increase the physical stability of PUFAs-BLEs against gravitational separation. For a more exact estimation of the creaming stability of a PUFAs-BLE one requires to consider many other factors, including droplet charge, fluidity, interactions, concentration, and polydispersity; interfacial thickness and rheological behavior of the continuous phase, etc. (McClements, 2007). For example, Owens et al. (2018) investigated the influence of pH factor on the physicochemical instability of whey protein isolated-stabilized fish O/W emulsions containing locust bean gum (LBG)-xanthan gum (XG) mixtures. The results demonstrated that the emulsion stability is dependent on biopolymer type and pH. At acid pHs, emulsions containing either XG or XG-LBG mixtures presented larger particle sizes, viscosity of the continuous phase, droplet aggregation, and creaming index, leading to low physical stability which could be related to the adsorbed protein-polysaccharide interactions. At neutral pH, the XG-LBG emulsions exhibited the highest resistance to phase separation and led to more stable emulsions. Table 4 collects the most important studies about the physical instability of PUFAs-BLEs due to gravitational separation.

1.4.2.4.2. Flocculation

Flocculation is the process by which two or more droplets unite to form an aggregate, without their fusion occurring, that is, the droplets maintain their individual integrity. The flocculation process is controlled by a global balance between the Van der Waals electrostatic attractive forces and the steric and hydration repulsive forces (Aranberri et al., 2006; McClements, 2007). Flocculation causes an increase in the viscosity of the emulsion and can even lead to the formation of a gel.

Several mechanisms can cause the meeting of two particles: Brownian motion, gravitational separation (since large droplets meet small droplets, with lower ascension rate, during the creaming process), and shear stress that occurs during the flow of the emulsion during its processing or transport (Melik & Folger, 1988; McClements, 2015).

Droplet flocculation can affect the stabilization of an emulsion in different ways (Dickinson, 1988). In a dilute emulsion, flocculation generally leads to increased creaming, since large flocs move faster under the influence of gravity than individual scattered droplets. In a concentrated emulsion, extensive droplet flocculation can occur, forming a particular weak gel-like network, which can eliminate creaming (Cao et al., 1990). However, in this case, the syneresis process is possible, which in some food products is even more undesirable than normal creaming due to gravity (Dickinson, 1989). At intermediate concentrations, both situations are possible, depending on the nature of the interactions between the droplets.

Flocculation can be induced in different ways (Dickinson, 1989):

1. In the case of protein-stabilized emulsions, adjusting the pH to its isoelectric point, which decreases the net surface charge and reduces electrostatic repulsion between the droplets.
2. Adding excess electrolyte, with the aim of increasing electrostatic repulsions.
3. In protein stabilized emulsions, reducing the affinity of the absorbed protein by the continuous medium by adding, for example, alcohol, which converts steric repulsion into steric attraction.
4. Using polymer molecules with surface activity, which are adsorbed at the interface and favor flocculation by bridges between two or more droplets (Dickinson et al., 1989; Lips et al., 1991). It can be the same emulsifier or another added substance. These molecules can be absorbed, both directly to the free surfaces of the droplets, when the amount of emulsifier is insufficient (Mulder & Walstra, 1974), and to the adsorbed emulsifier molecules that form the interfacial film when it is in excess (Walstra, 1996). The result is a highly structured gel-like emulsion, with a highly elastic rheological behavior and high viscosity.

5. In the case of protein-stabilized emulsions, this phenomenon can be reinforced by favoring denaturation of the protein, by heating (thermal denaturation) (Dickinson & Casanova, 1999), or by enzymatic hydrolysis (Matsumura et al., 1993; Dickinson & Yamamoto, 1996).
6. Adding polymer molecules that do not adsorb at the interface, such as neutral polysaccharides, to cause flocculation depletion (Figure 25) (Banks & Muir, 1988). These high molecular weight polysaccharides are generally used as stabilizers, increasing the viscosity of the continuous medium. However, it has recently been shown that the addition of water-soluble polymers at certain concentrations can destabilize the emulsion, accelerating the creaming rate by a value higher than could be predicted, depending on the viscosity of the continuous medium (Gunning et al., 1986; Hibbert et al., 1987; McClements, 2015).

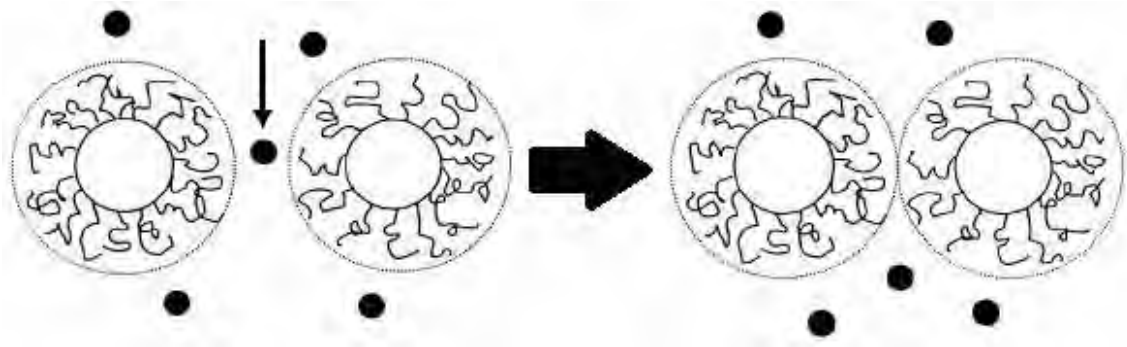


Figure 25. The flocculation depletion mechanism (Bengoechea-Ruiz, 2006).

This phenomenon has its origin in the exclusion of colloidal particles from the narrow region surrounding the droplets. The concentration of colloidal particles in this area becomes zero, concentrating in the area outside the droplets. As a consequence, there is an osmotic pressure difference that favors the movement of the solvent from this zone to the continuous medium to compensate for the concentration gradient. Therefore, the droplets experience an attractive force that leads to aggregation (Dickinson, 1989; Panagiotou & Fisher, 2012; McClements, 2015).

In addition to polysaccharides, the same emulsifier can act as a precursor agent for flocculation depletion, when it is in excess.

In recent years, many researchers have studied the flocculation in PUFAs-BLEs. Several studies have studied the physical stability of PUFAs-BLEs varying the compositions of the dispersed and continuous phases against flocculation. Jafari et al. (2007) used different emulsifiers in the aqueous phase consisted of whey protein hydrolyzed, whey protein concentrate, sodium caseinate, or modified starch (Capsul and Hi-Cap), while the oil phase including d-limonene or fish oil. Results presented a narrow size distribution. Also, adding Tween 20 (an emulsifier) contributed to decreasing the particle size considerably during microfluidization, but it leads to wide flocculation of the droplets of the dispersed phase due to emulsifier-biopolymer interactions and emulsifier displacement. Later, Taherian et al. (2011) examined the impact of pH on the ability of fish gelatin and whey protein isolate, alone and combined, to produce and stabilize fish O/W emulsions. They concluded that the highest influence on the physicochemical stability of the emulsion, retarding flocculation, was produced by deposition of fish gelatin over whey protein coated fish oil droplets. This was attributed both to electrostatic repulsion forces between the fish oil droplets and to steric effects of whey protein and fish gelatin conjugate which impede its approximation, so that conjugate fish gelatin-whey protein isolate could be used as a suitable emulsifier for designing and developing acidic food emulsions and it could have applications for the formulation of industrial emulsions to release bioactive compounds into food and beverage industries. Recently, Karthik & Anandharamakrishnan (2016) studied the influence of other different emulsifiers (sodium caseinate, soy lecithin, and Tween 40) to enhance ω -3 PUFAs nanoemulsions stability. The researchers investigated the physicochemical stability of nanoemulsions under various storage conditions and they obtained that structural characteristics of nanoemulsions containing Tween 40 were kept during storage, while that formulated with sodium caseinate resulted in flocculation and coalescence. Finally, Bai et al. (2017) studied the influence of three different polysaccharide-based emulsifiers on the production and stability of fish O/W emulsions: corn fiber gum, beet pectin, and gum arabic. They found that emulsions containing corn fiber gum were susceptible to flocculation and coalescence. Therefore, this study supplies important information for choosing polysaccharide-based emulsifiers for utilization in the food industry.

Although the influence of the emulsifier on the stability of the PUFAs-BLEs is not the only one that has been studied. Other authors modified the composition of the dispersed phase and studied their stabilities. Khor et al. (2014) used virgin coconut oil (an oil enriched in interesting fatty acids). The droplet size, pH, product chemical composition, rheological profile, texture profile, and zeta potential of these emulsions were significantly different. The virgin coconut oil emulsions were demonstrated to have a small droplet size that improved the physical stability of the emulsion, reducing flocculation and coalescence. On the other hand, Julio et al. (2015) investigated chia seed O/W emulsions to assess the impact of the homogenizer pressure level, the presence of lactose, and the sodium caseinate content on their physical and chemical properties. They obtained that rheological behavior and global stability of chia seed O/W emulsions were mostly affected by lactose addition and sodium caseinate concentration. Table 4 collects the most important studies about the physical instability of PUFAs-BLEs due to flocculation.

1.4.2.4.3. Coalescence

Coalescence is the irreversible process by which two or more droplets of liquid join together to form a single, larger droplet (Aranberri et al., 2006; McClements, 2007). It is the main mechanism by which an emulsion moves towards its most thermodynamically stable state because it entails a decrease in the contact area between the water and oil phases. Coalescence causes droplets in an emulsion to suffer creaming or sedimentation more rapidly as they increase in size. In O/W emulsions, coalescence leads to the formation of an oily layer on top of the emulsion known as '*oiling off*', while in W/O emulsions it leads to the accumulation of water at the bottom of the material.

There are two stages related to the coalescence of a pair of droplets: draining of the continuous phase of the thin film of liquid that is between the droplets until it reaches a critical thickness, followed by a rupture of the interfacial layer due to some fluctuation or local disturbance (Dickinson, 1989). Once a gap has formed at the interface, the liquid within the droplet flows rapidly through the gap, and the droplets

coalesce into a single, larger droplet. The coalescence rate, therefore, depends on the probability of such holes occurring. This can occur in different ways, depending on the type of emulsifier used and the conditions of the environment. For example, monolayers of emulsifier may spontaneously distort due to thermal fluctuations, or chemical breakdown of the emulsifier (for example, by chemical or enzymatic hydrolysis of proteins) or displacement of the emulsifier from the interfacial surface to a more active one superficially, but less resistant to breakage. The mechanism that becomes relevant in each case depends on the conditions of pH, ionic strength, interactions between the components, temperature, mechanical agitation, etc. (McClements, 2015).

Coalescence can only occur when the droplets are in close contact, so it will depend on short-range forces much more than gravitational separation or flocculation. In protein-stabilized emulsions, coalescence can occur by the collision of the droplets, by prolonged contact between the droplets, or by the formation of a “hole” in the interfacial membrane.

In recent years, many researchers have studied the coalescence in PUFAs-BLEs. Several authors have studied the physical stability of PUFAs-BLEs with different compositions of the continuous phase against coalescence. Zapata et al. (2015) studied the rheological properties and stability of a W/O emulsion prepared with buttermilk (a by-product of the dairy industry) as the emulsifier and ω -3 PUFAs as the oil phase. Other researchers have sought to increase the physical stability of PUFAs-BLEs and delay coalescence by the emulsification method or in other ways. Such is the case of Oliver et al. (2009) who studied increasing the stability of emulsions containing casein-carbohydrate fish oil microcapsules during *in vitro* digestion by Maillard reaction. Microcapsules stabilized by Maillard conjugates had more robust interfaces, so that oil droplets presented major stability to coalescence during digestion, compared to microcapsules containing mixtures of carbohydrates and casein. They proved the main role that the nature of the interface had about the emulsion stability of fish oil capsules while the medium, milk, or water, in which those were reconstituted had a secondary role. On the other hand, Qi et al. (2017) investigated the coalescence and physical separation of fish oil droplets in O/W emulsions under a new electric emulsification method: direct-current fields. The results suggest that the use of electrical fields did not decrease the time necessary for fish oil separation, but improved the coalescence

stability of oil droplets. In addition, chloride and sodium ions were better for coalescence than potassium and sulphate ions, respectively.

Finally, other studies are available in the scientific literature that study increasing the physical stability of PUFAs-BLEs and delaying coalescence to incorporate these emulsions into other food products. For example, Salminen et al. (2013) investigated the physicochemical stability of O/W emulsions including ω -3 PUFAs and their posterior addition to meat products. The physical stability of fish oil emulsions was very good and neither aggregation nor coalescence took place during storage. The results obtained demonstrated that the incorporation of the interfacial technology into complex meat matrices improves the physicochemical stability of ω -3 PUFAs enriched O/W emulsions, although this is not a trivial task and may produce deterioration and loss in quality over time. And we can also find some examples in the area of clinical nutrition: Müller et al. (2012) investigated reducing the injection volume for parenteral nutrition loaded with drugs through the development of concentrated 30 % and 40 % nanoemulsions viable on an industrial scale. This study developed a new base formulation (based on PUFAs concentrated nanoemulsions) containing legally permitted excipients, ready to encapsulate drugs. Table 4 collects the most important studies about the physical instability of PUFAs-BLEs due to coalescence.

1.4.2.4.4. Ostwald ripening

Ostwald ripening is the process by which large droplets grow at the expense of smaller ones, due to mass transport of the dispersed phase from one droplet to another through the continuous phase (Kabalnov & Shchukin, 1992; Taylor, 1995). This process occurs at a rate that is a function of the solubility of the dispersed phase in the continuous phase and is because the internal pressure of the droplets (Laplace pressure) is higher in the smaller droplets (Aranberri et al., 2006; McClements, 2007).

Contrary to what happens with other destabilization processes, the speed at which Ostwald ripening occurs increases as the droplet size decreases (Kabalnov & Shchukin, 1992). However, it must be considered that an increase in droplet size is

associated with an acceleration of other destabilization processes, such as creaming. This process is also favored by a high degree of size polydispersity.

This process is negligible in most food emulsions because the mutual solubilities of triacylglycerides and water are so low that mass transport is negligible (Dickinson & Stainsby, 1982).

In recent years, some authors have studied the physical stability of PUFAs-BLEs with distinct compositions of the continuous and dispersed phases against Ostwald ripening. For example, Erdmann et al. (2017) evaluated the influence of distinctively sized O/W emulsions loaded with rosemary extract in cooked emulsion-type sausages rich in ω -3 PUFAs. Mechanically prepared emulsions presented physical stability during the 35-day study and neither Ostwald ripening nor coalescence took place. Nejadmansouri et al. (2016) studied the production of fish oil nanoemulsions using a high-intensity ultrasound method under the influence of hydrophilic-lipophilic balance (HLB), emulsifier to oil ratio (SOR), and storage conditions and they found that Ostwald ripening was the principal destabilizing mechanism during storage of nanoemulsions at low temperature and in the early stage of nanoemulsion storage at a higher temperature. After a few weeks, other destabilizing mechanisms (such as coalescence and flocculation) showed to be more important. Walker et al. (2017) evaluated the effect, in this case, of carrier oil type (lemon oil, medium-chain triglycerides –MCT– and thyme oil) and concentration on the production and stability of fish O/W nanoemulsions. They created physically stable nanoemulsions using lemon oil and MCT across a large interval of oil compositions. Inversely, nanoemulsions formed from thyme oil containing comparatively low contents of fish oil (< 75 %) experienced rapid droplet growth. This was attributed to the relatively high solubility in water of the thyme oil, which carries to the rapid growth of droplets due to Ostwald ripening. Therefore, because of this study, it can be concluded that the selection of a suitable carrier oil type and concentration may lead to the development of fish oil nanoemulsions with acceptable physicochemical stability. Table 4 collects the most important studies about the physical instability of PUFAs-BLEs due to Ostwald ripening.

1.4.2.4.5. Phase inversion

Phase inversion is the process by which a system goes from being an O/W emulsion to a W/O emulsion, or vice versa (McClements, 2007). In many foods, this is an undesirable process because it has adverse effects on their appearance, texture, stability, and taste. It can be considered that what actually takes place when this phenomenon occurs is a coalescence of droplets of the dispersed phase and a subsequent re-emulsification.

The physicochemical basis of phase inversion is thought to be extremely complex. At the time when reversal occurs, often known as the break-even point, the system can include zones of O/W emulsion, W/O emulsion, multiple emulsion, and bicontinuous phases. It can be induced by surfactants or by fat crystallization.

There is a relationship between the type of emulsion and the internal phase volume fraction. Ostwald's theory assumes that at a dispersed phase fraction equal to 0.74, the emulsion is packed as densely as possible, and exceeding this value would result in inversion or breakage of the emulsion. In practice, this value of the internal phase volume fraction may be somewhat higher, because the deformability of the droplets allows them to be grouped more densely. Also, in polydisperse emulsions, small droplets can occupy the interstices left by large droplets (Rahalkar, 1992).

In this case, no study has been found on the physical instability of PUFAs-BLEs in whose breakdown the phase inversion mechanism intervenes.

1.4.2.4.6. Specific destabilization mechanisms of multiple emulsions

As already mentioned above, multiple emulsions can present specific destabilization mechanisms (Figure 26) in addition to those that conventional emulsions present and we have just explained (Benichou et al., 2007; Kosegarten-Conde & Jiménez-Munguía, 2012; Freire-Rodríguez, 2018). In this section, we comment on all these specific instability phenomena that can occur on the spot or happen gradually, ultimately leading to the breakage of the emulsion.

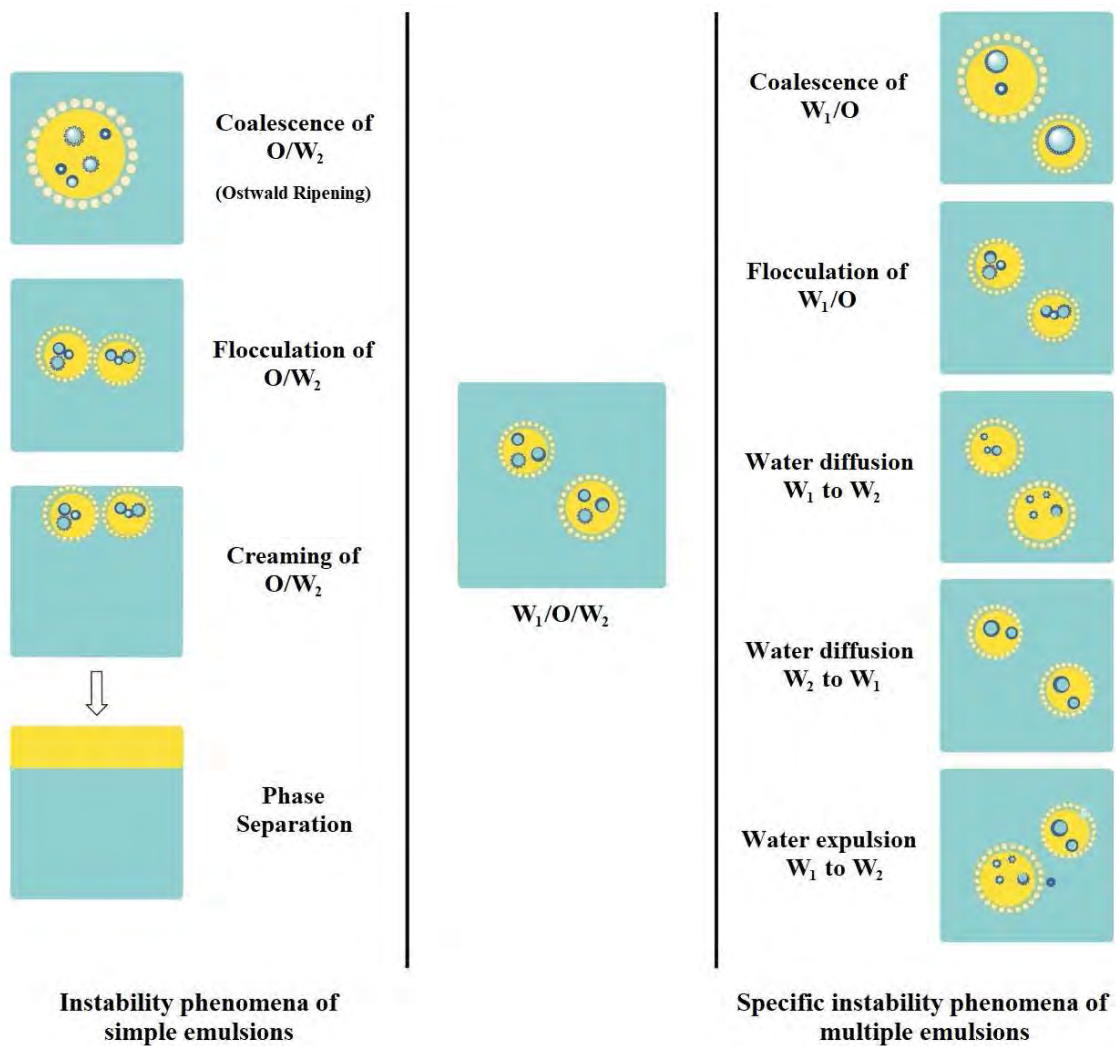


Figure 26. Instability phenomena of conventional emulsions and multiple emulsions.

Osmotic pressure can influence the stability of multiple emulsions. If the osmotic gradient is not balanced and the osmotic pressure is higher in the internal aqueous phase, water will go into this phase causing swelling and final rupture of the internal droplets with the consequent delivery of their contents into the external aqueous phase. Inversely, if the osmotic pressure in the internal aqueous phase is lower, then water will pass from the internal to the external aqueous phase producing shrinkage of the internal droplets and destabilization of the system (Jiao et al., 2002). The mentioned transport may be due to phenomena such as the diffusion of water via micellar or the formation of small sheets constituted by the emulsifier present in the oily phase (McClements, 2015). Therefore, to maintain a suitable osmotic balance between the outer and inner aqueous phases is a primordial aspect to achieve good stability for

multiple emulsions during storage. It is not strictly necessary that the osmotic pressure difference be zero to get adequate high performance and stability, although it must be low enough to avoid the coalescence or breakdown of any internal swollen droplets (Muschiolik & Dickinson, 2017).

The expulsion of the droplets that make up the internal aqueous phase towards the outside produced by different mechanisms (expulsion of W_1) and the separation of the two phases without then producing any contact between them (breakage) are other specific destabilization mechanisms of the multiple emulsions (Freire-Rodríguez, 2018).

Table 4. Selection of some important studies on physical stability in PUFAs-BLEs.

System type	Dispersed phase	Continuous phase	Emulsification method	Instability mechanism	References
O/W	<i>n</i> -Hexadecane oil, O:W = 20:80	Distilled and deionized water containing 7 mM sodium dodecyl sulphate	High-pressure homogenization using an APV-Gaulin 8.30H homogenizer (conditions not described)	Creaming	Chanamai & McClements (2000)
O/W	Structured lipid from caprylic acid and menhaden oil, O:W = 10:90	Aqueous solution composed of buffer solution (10 mM phosphate, pH 7.0) and 0.25 or 1 % emulsifier (whey protein isolate, Ryoto sugar ester (S-1670), Tween 20, lecithin or mono-/diacylglycerols)	High-pressure homogenization using an Emulsiflex-C5 homogenizer (6-stages, pressure = 50 MPa)	Creaming	Fomuso et al. (2002)
O/W	Corn oil, O:W = 5-50:95-50	Aqueous solution composed of buffer solution (5 mM sodium acetate-imidazole, pH 3.0), 0.5-5.0 wt. % protein (whey protein isolate or sodium caseinate) with and without NaCl	Pre-emulsification with a high-speed blender at setting 2 for 2 min followed by high-pressure homogenization with a APV-Gaulin homogenizer (2-stages, pressure = 5000 psi)	Creaming Flocculation	Djordjevic et al. (2004a)
O/W	Fish oil, O:W = 25:75	Deionized water containing 0.1-1.0 % (w/w) sodium caseinate	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T25 at 20500 rpm for 1.5 min followed by high-pressure homogenization with a Foss Electric Milko Tester homogenizer (4-stages, pressure = 14 MPa)	Creaming Flocculation	Day et al. (2007)
O/W	d-limonene or fish oil, O:W = 5-15:95-85	Aqueous solution composed of buffer solution (5 mM phosphate, pH 7.0), 10 wt. % emulsifier (Capsul, Hi-Cap, whey protein hydrolysate, whey protein concentrate or sodium caseinate) and 30 wt. % maltodextrin	Rotor-stator homogenization using a high-speed blender RW 20.n at the highest speed for 10 min	Flocculation	Jafari et al. (2007)
O/W	Coconut oil with and without added weighting agents (15 ppm brominated vegetable oil or 300 ppm sucrose acetate isobutyrate), O:W = 9:91	Deionized water containing 10-14 % (w/w) modified starch with and without added weighting agents (0.3 % (w/w) xanthan gum)	Pre-emulsification with a Polytron PT 10-35 homogenizer at highest speed for 3 min followed by high-pressure homogenization with an Emulsiflex-C5 homogenizer (2-stages, pressure = 3500 psi)	Creaming Flocculation Coalescence	Taherian et al. (2007)

O/W	Fish oil, O:W = 16:84	Aqueous solution composed of phosphate buffer (20 mM, pH 7.0), 0.5 wt.% Tween 20 and 0.02 wt.% sodium azide	Membrane homogenization using MG-20-5 homogenizer (5-stages, pressure = 100 kPa) with a SPG-membrane (mean pore size 8.0 μm)	Flocculation Coalescence	Choi et al. (2009)
O/W	Fish oil	Water containing casein-carbohydrate	Not available	Coalescence	Oliver et al. (2009)
O/W	Sunflower, olive or fish oils, O:W = 10:90	Aqueous solution composed of 0.5-5 % (w/w) sodium caseinate and 0-40 % (w/w) trehalose	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T18 at 20000 rpm for 1 min followed by ultrasound homogenization with a VIBRA CELL VCX model for 20 min	Creaming Flocculation Coalescence	Álvarez et al. (2010)
O/W	Menhaden oil, O:W = 2.5:97.5	Aqueous solution composed of buffer solution (10 mM phosphate, pH 7.0), 0.25 wt.% Brij 35, 0.04 wt.% sodium azide with and without added polysaccharides (0-0.1 wt.% low-methoxyl pectin, high-methoxyl pectin, sodium alginate, α -carrageenan or Chelex-100)	Pre-emulsification with a M133/1281-0 blender for 2 min followed by high-pressure homogenization with a M-110 L Microfluidizer Processor (3-stages, pressure = 68 MPa)	Creaming	Chen et al. (2010)
O/W	Corn oil, O:W = 10:90	Aqueous solution composed of buffer solution (5 mM sodium phosphate, pH 7.0), 0-0.5 wt.% β -lactoglobulin and 0.1 wt.% pectin	Pre-emulsification with a Tissue Tearor blender for 2 min followed by high-pressure homogenization with a M-110 L homogenizer (5-stages, pressure = 9000 psi)	Gravitational separation: sedimentation	Cho et al. (2010)
O/W	Fish oil, O:W = 10:90	Aqueous solution composed of buffer solution (sodium phosphate, pH 3.4 or 6.8), 1 % (w/v) whey protein isolate or fish gelatin and 0.02 % (w/v) sodium azide	Pre-emulsification with a commercial blender at high speed for 3 min followed by high-pressure homogenization with an EmulsiFlex-C5 homogenizer (3-stages, pressure = 4000 psi)	Flocculation Coalescence	Taherian et al. (2011)
O/W	Fish oil, O:W = 10-40:90-60	Aqueous solution containing egg lecithin	High-pressure homogenization (2-3-stages, pressure = 800 bar)	Coalescence	Müller et al. (2012)
W/O	Aqueous solution containing 6.9 % butter milk, W:O = 31:69	Commercial olive oil enriched with omega-3 fatty acids	Rotor-stator homogenization at 2860 rpm for 3 min	Coalescence	Salminen et al. (2013)

O/W	Virgin coconut oil containing 0.5 % (w/v) flavoring, O:W = 9.4:90.6	Deionized water containing 1 % (w/v) stevia, 0.1 % (w/v) potassium sorbate, 0.08 % (w/v) citric acid, 1 % (w/v) xanthan gum, 1.3 % (w/v) gum arabic and 1.3 % (w/v) modified starch	Rotor-stator homogenization using a high-shear homogenizer at 7000 rpm for 1.5 min	Flocculation	Khor et al. (2014)
O/W	Anchovy oil, O:W = 6:94	Distilled water containing 24 % (w/w) coating agents (gum arabic, hemicellulose and maltodextrin)	Rotor-stator homogenization using a WiseTis Homogenizer HG-15D at 15000 rpm for 10 min	Creaming	Tatar et al. (2014)
O/W	Fish oil, O:W = 1:99	Aqueous solution composed of buffer solution (5 mM sodium phosphate monobasic, pH 7.0), 0.1 wt.% sodium caseinate, 0.1 wt.% fucoidan and 0.02 wt.% sodium azide	Pre-emulsification with a M133/1281-0 blender for 2 min followed by high-pressure homogenization with a M-110L Microfluidizer (6-stages, pressure = 12 kpsi)	Creaming Flocculation	Chang & McClements (2015)
O/W	Perilla seed oil, O:W = 20:80	Distilled water containing 6 wt.% soy soluble polysaccharide, 0.03-0.3 wt.% xanthan gum or guar gum and 0.02 wt.% sodium azide	Rotor-stator homogenization using Polytron PT3100 at 15000 rpm for 3 min	Creaming Flocculation	Chivero et al. (2015)
O/W	Cod liver oil, O:W = 30:70	Deionized water containing 3.0 % (w/w) stabilizer (dodecyl succinylated alginate, native alginate or β -lactoglobulin) and 0.05 % (w/w) sodium azide	Mixing homogenization at 1500 rpm for 3 min	Creaming	Falkeborg & Guo (2015)
O/W	Soybean oil or fish oil, O:W = 10:90	Aqueous solution composed of buffer solution (50 mM sodium phosphate), 1 % porcine myofibrillar protein and 0-0.5 M NaCl	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax T25 at 13000 rpm for 7 min	Creaming	Jo et al. (2015)
O/W	Chia seed oil, O:W = 10:90	Distilled water containing 0 and 10 % (w/w) lactose; 2, 5 and 10 % (w/w) sodium caseinate; 0.0012 % (w/w) nisine and 0.1 % (w/w) potassium sorbate	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T25 at 9500 rpm for 1 min followed by high-pressure homogenization with a Panda 2K homogenizer (4-stages, pressure = 400 and 600 bar)	Creaming Flocculation	Julio et al. (2015)
O/W	Flaxseed oil and fish oil, O:W = 10:90	Water containing 0-3 % (w/w) sodium caseinate, 0-0.3 % (w/w) oat β -glucan and 0.04 % (w/w) sodium azide	Pre-emulsification with a Polytron homogenizer at 14000 rpm for 2 min followed by high-pressure homogenization with a Panda 2K homogenizer (2-stages, pressure = 80 and 8 MPa)	Creaming	Liu et al. (2015)

O/W	Fish oil ethyl esters, O:W = 1:99	Aqueous solution composed of buffer solution (10 mM sodium phosphate, pH 7) and 1.5 wt.% emulsifier (Tween 80, sodium dodecyl sulfate, lecithin or quillaja saponin)	Pre-emulsification with a M133/1281-0 mixer for 2 min followed by high-pressure homogenization with a M-110P Microfluidizer (5-stages, pressure = 20000 psi)	Creaming	Uluata et al. (2015)
W/O	Aqueous solution containing 6.9 % butter milk, W:O = 31:69	Commercial olive oil enriched with omega-3 fatty acids	Rotor-stator homogenization at 2860 rpm for 3 min	Coalescence	Zapata et al. (2015)
O/W	Fish oil, O:W = 2:98	Aqueous solution composed of buffer solution (5 mM sodium phosphate monobasic, pH 7.0), 0.1 wt.% emulsifier (caseinate or Tween 80), 0.05 wt.% mucin and 0.02 wt.% sodium azide	Pre-emulsification with a M133/1281-0 blender at 10000 rpm for 2 min followed by high-pressure homogenization with a Microfluidizer M-110 L (6-stages, pressure = 12 kpsi)	Flocculation Coalescence	Chang & McClements (2016)
O/W	Menhaden oil, O:W = 20:80	Deionized water containing 2 % (w/v) whey protein isolate, 0-0.3 % (w/v) gums (enzymatic modified guar gum, guar gum and xanthan gum) and 0.05 % sodium azide	Rotor-stator homogenization using PowerGen 500 at 30000 rpm for 5 min followed by ultrasound homogenization using VWR sonicator for 1 min	Creaming Flocculation	Chityala et al. (2016)
O/W	<i>N. sativa</i> oleoresin, O:W = 7.5:92.5	Deionized water containing 15 % (w/v) gum arabic, 15 % (w/v) maltodextrin and 1 % (w/v) Tween 80	Ultrasound homogenization using UP200S ultrasound homogenizer at 24 kHz for 20 min	Flocculation	Edris et al. (2016)
O/W	α -linolenic acid, O:W = 10:90	Distilled water containing different amounts of proteins (gelatin, soy protein isolate or whey protein concentrate) with and without Tween 20	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax T25 at 6000 rpm for 2 min; ultrasound homogenization using Bandelin electronic at 20 kHz for 2 min	Flocculation	Gómez-Mascaraque & López-Rubio (2016)
O/W	DHA algae oil, O:W = 10:90	Aqueous solution containing 1.7-3.2 % (w/w) emulsifier (Tween 40, sodium caseinate or soya lecithin)	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T18 at 1000 rpm for 10 min followed by high-pressure homogenization with a microfluidizer (5-7-stages, pressure = 900-1000 bar)	Flocculation Coalescence	Karthik & Anandharamakrishnan (2016)

O/W	Fish oil containing Span 80, O:W = 5:95	Water containing Tween 80 (different emulsifier-to-oil ratios 0.5-1.5)	Pre-emulsification with a Heidolph Silent Crusher at 20000 rpm for 5 min followed by ultrasound homogenization with a Hielscher UP 200H for 10 min	Flocculation Coalescence Ostwald ripening	Nejadmansouri et al. (2016)
O/W	Corn oil, fish oil, lemon oil or MCT, O:W = 10:90	Aqueous solution composed of buffer solution (10 mM sodium phosphate, pH 7.0) and 0.1-5.0 wt.% polysaccharide (corn fiber gum, beet pectin or gum arabic)	Pre-emulsification using a high shear mixer for 2 min followed by high-pressure homogenization using an air-driven microfluidizer (3-stages, pressure = 62-130 MPa)	Flocculation Coalescence	Bai et al. (2017)
O/W	Fish oil, O:W = 10:90	Deionized water containing emulsifier (sodium dodecyl sulphate, sodium dodecylbenzenesulfonate, sodium cholate and sodium deoxycholate) at their critical micelle concentration and 33.3 % (v/v) chitosan solution	Ultrasonic emulsification with 20 % amplitude for 5 min (pulse: 5 s on and 2 s off).	Creaming	Chatterjee & Judeh (2017)
O/W	Fish oil, O:W = 5:95	Aqueous solution composed of buffer solution (5 mM potassium phosphate, pH 7.0) and 2.5 wt.% β -cyclodextrin or octenyl succinic-modified β -cyclodextrin	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax at 24000 rpm for 3 min followed by high-pressure homogenization with a Nano DeBEE homogenizer (3-stages, pressure = 50 MPa)	Creaming	Cheng et al. (2017)
O/W	Fish oil or Miglyol 812 N mixed with rosemary extract (10 wt.%), O:W = 10:90	Aqueous solution composed of buffer solution (10 mM sodium phosphate, pH 5.0) and 2 % (w/w) Tween 80	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T10 at 24000 rpm for 5 min followed by high-pressure homogenization with an EmulsiFlex-C3 homogenizer (5-stages, pressure = 1500 bar)	Coalescence Ostwald ripening	Erdmann et al. (2017)
O/W	Fish oil	Water containing phospholipid	Not available	Coalescence	Qi et al. (2017)
O/W	Weighed amounts of fish oil and carrier oil (thyme oil, MCT or lemon oil), O:W = Not described	Aqueous solution composed of buffer solution (0.8 % citric acid, 0.08 % sodium benzoate, pH 3.0) and 1.5 wt.% Tween 80	Pre-emulsification with a Bamix ESGE Ltd mixer for 2 min followed by high-pressure homogenization with a M-110P microfluidizer (5-stages, pressure = 20000 psi)	Ostwald ripening	Walker et al. (2017)

O/W	Fish oil, O:W = 1:99	Aqueous solution composed of buffer solution (5 mM phosphate, pH 7.0), 0.3 wt.% protein (hydrolyzed rice glutelin), 0.1 wt.% polysaccharide (pectin or xanthan gum) and 0.005 wt.% sodium azide	Pre-emulsification with a M133/1281-0 mixer for 2 min followed by high-pressure homogenization with a M110Y Microfluidizer (3-stages, pressure = 12000 psi)	Creaming	Xu et al. (2017)
O/W	Fish oil, O:W = 10:90	Water containing 1 % (w/w) thiol-modified β -lactoglobulin fibrils, 0-0.5 % (w/w) chitosan and 15 % (w/w) maltodextrin	Pre-emulsification with a Silverson L4R homogenizer at 7500 rpm for 5 min followed by high-pressure homogenization with a Panda 2K homogenizer (3-stages, pressure = 750 bar)	Creaming Flocculation	Chang et al. (2018)
O/W	Menhaden oil, O:W = 10:90	Deionized water containing 2 % (w/v) whey protein isolate, 0.1 % (w/v) polysaccharides (locust bean gum or xanthan gum) and 0.04 % (w/v) sodium azide	Rotor-stator homogenization using PowerGen 500 homogenizer at 30000 rpm for 6 min	Creaming	Owens et al. (2018)
O/W	Menhaden oil, O:W = 15:85	Aqueous solution composed of phosphate buffer (5 mM, pH 7.4) and 1.5 % (w/w) caseinate/glycoconjugate solution	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T25 at 13500 rpm for 1 min followed by high-pressure homogenization with a LV1 microfluidizer (3-stages, pressure = 12000 psi)	Flocculation Coalescence	Liu et al. (2019)
O/W	Fish oil, O:W = 10:90	Water containing 3 % (w/v) duck albumen hydrolysates or duck albumen hydrolysates conjugated with epigallocatechin gallate	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T25 at 12000 rpm for 2 min followed by ultrasound homogenization at 20 kHz for 20 min	Flocculation Coalescence	Quan & Benjakul (2019)
O/W	Fish oil, O:W = 50:50	Ultrapure water containing 0.2-2.0 % gelatin solution	Rotor-stator homogenization using an Ultra-Turrax T10 at 11500 rpm for 1 min	Creaming	Ding et al. (2020)
O/W	Cod liver oil, O:W = 5:95	Aqueous solution composed of buffer solution (10 mM sodium acetate-imidazole, pH 7) and 0.2 wt.% potato peptides	Pre-emulsification with a Polytron PT1200E at 18000 rpm for 30 s followed by ultrasound homogenization with a Microson XL2000 sonicator (2-passes of 30 s)	Creaming	García-Moreno et al. (2020)

O/W	Fish oil, O:W = 1:99	Aqueous solution composed of phosphate buffer (5 mM, pH 7.0), 0.3 wt.% protein (hydrolyzed rice glutelin or whey protein isolate), 0.1 wt.% polysaccharide (pectin or xanthan gum) and 0.005 wt.% sodium azide	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T24 at 10000 rpm for 2 min followed by high-pressure homogenization with a M110Y Microfluidizer (3-stages, pressure = 12000 psi)	Flocculation	Xu et al. (2020)
O/W	Fish oil, O:W = 50:50	Aqueous solution composed of 2.0 % emulsifier (Span 80, soybean lecithin, Tween 80 or sodium dodecyl sulfate) and 0.8 % gelatin solution	Rotor-stator homogenization using an Ultra-Turrax T10 at 8000 rpm for 2 min	Creaming Coalescence	Zhang et al. (2020)

1.4.2.5. Prevention of lipid oxidation in PUFAs-BLEs

Despite the different systems designed and developed for the vehiculization and protection of ω -3 PUFAs, lipid oxidation remains as a major problem and one of the limiting factors when incorporating these compounds within the food industry. Thus, for several years the scientific community has explored different options to prevent or, at least, slow down ω -3 PUFAs lipid oxidation, especially when they are contained within BLEs.

Many studies have shown that the ingredients that make up the aqueous phase –and the possible interactions taking place between them– have an important impact on lipid oxidation. Depending on their nature, chemical properties and the environmental conditions in which they are found, these ingredients can act as antioxidants or pro-oxidants. Careful selection of the composition of the aqueous phase will, therefore, be a determining factor of the control of ω -3 PUFAs lipid oxidation.

When considering all of these ingredients, the importance of proteins which are frequently used to improve the physical stability of food emulsions should be emphasized. The proteins dissolved in the aqueous phase are electrically charged as a function of the pH of the medium and, consequently, attract or repel metal ions, catalysing oxidation reactions. In addition, certain proteins can act as free radical scavengers, transition metal chelators, activating pro-oxidant compounds or, simply, they can have antioxidant properties (as is the case of caseins, for example) (McClements & Decker, 2000). For all of these reasons, a large number of studies exist within the scientific literature targeting the design and development of protein-stabilized O/W emulsions which incorporate functional lipids that are susceptible to oxidation (e.g., ω -3 PUFAs). Djordjevic et al. (2004a) and Cho et al. (2010) have demonstrated that the oxidative stability of polyunsaturated lipids can be enhanced by integrating them into oil droplets with protein coatings. Djordjevic et al. (2004b) concluded that protein-stabilized O/W emulsions with a pH below the isoelectric point of the protein, allows it to positively charge the emulsion droplets and slow lipid oxidation by diminishing iron-lipid interactions. Thus, by controlling the pH of the medium, we can

positively and negatively load proteins and, in this way, affect both the physical and chemical stability of PUFAs-BLEs. As a result of these findings, many studies on different protein-stabilized O/W emulsions have emerged in recent years. O'Dwyer et al. (2013) evaluated the impact of sodium caseinate concentration on the chemical stability of O/W emulsions. Both primary and secondary lipid oxidation products of emulsions were found to decrease as sodium caseinate concentration increased. Similarly, sodium caseinate decreased as microfluidization pressure increased. This finding was attributed to the apparent antioxidant effect of sodium caseinate, which interacts with metal ions and scavenges the free radicals present in the aqueous phase. Similar conclusions were drawn by Liu et al. (2015), who developed a physically stable PUFAs-BLE using sodium caseinate dispersions and β -glucan rich oat products. These authors found that caseinate typically contributed to a reduction in the oxidation of ω -3 oils, though there was no significant influence of β -glucan on oxidation. Sivapratha & Sarkar (2018) also studied chemical stability and the impact of stress factors on flaxseed O/W emulsions stabilized by a sodium alginate-sodium caseinate-chitosan interfacial membrane. The results showed that the created membrane may be able to act as a physical barrier that separates the lipid phase from pro-oxidants contained in the aqueous phase. This demonstrates the possibilities of interfacial technology for developing an emulsion system with the necessary properties. Not only proteins influence lipid oxidation, protein hydrolysates and amino acids are also influential. García-Moreno et al. (2016) investigated the physicochemical stability of fish O/W emulsions stabilized with fish protein hydrolysates (FPH). Sardine hydrolysates with low degrees of hydrolysis (3 – 4 %) provided the most efficient peptides for producing physically stable emulsions with a smaller droplet size. This involved a greater protein adsorption at the interface enabling it to act as a physical barrier against pro-oxidant compounds, which could also result in a greater oxidative stability of these emulsions. These results demonstrate the possibilities of FPH as alternative protein emulsifiers in the design of chemically stable fish O/W emulsions. Similar results were obtained by Ghelichi et al. (2017), who investigated the oxidative stability of O/W emulsions fortified with common carp roe protein hydrolysates (CRPHs). These hydrolysates exhibited antioxidant properties, radical scavenging and chelating activities, all of which slowed lipid oxidation. All of these studies have shown that proteins and their

hydrolysates, which are two of the most common ingredients in ω -3 PUFAs-BLEs, significantly influence the chemical stability of emulsions. Thus, prior to designing a new emulsion, a detailed study is necessary for selecting the most appropriate protein content for reducing lipid oxidation.

Although proteins have potentially been the most studied ingredient, the type and concentration of emulsifier also has a very important role within lipid oxidation. These emulsifiers, which may have an ionic character or not, are amphiphilic in nature and can bind to both polar substances and nonpolar substances, interact with antioxidants or with pro-oxidants and, therefore, impede lipid oxidation. Fomuso et al. (2002) investigated the impact of different emulsifiers –comprising Tween 20, lecithin, whey protein isolate, mono-/diacylglycerols, and sucrose fatty acid ester– on the oxidative stability of fish oil-based structured lipid emulsions. These researchers demonstrated that the concentration and type of emulsifier influenced oxidation rate. Higher emulsifier concentrations usually showed a lower oxidation rate than lower concentrations, which in this case was attributed to a higher concentration of emulsifier creating a thicker interface that acted as a semipermeable barrier against the pro-oxidant compounds catalysing oxidation reactions. Further, the chemical structure of the emulsifier such as its ionic character, also influences permeability and, resultantly, oxidation rate. Chen et al. (2016) studied the role of different emulsifiers on lipid oxidation. These authors found that polyglycerol polyricinoleate (PGPR) promoted the oxidation of emulsion while several lecithins (defatted soybean lecithin (PC 75) or defatted lyso-lecithin (Lyso-PC)) showed a protective effect on ω -3 enriched oil. These authors associated the greater emulsifying capacity of PGPR to its worse performance protecting against oxidation. Its greater emulsifying capacity produced oil droplets of a smaller size and a greater interfacial surface area. This greater interfacial area led to the oil being more exposed to the pro-oxidants, ultimately leading to greater lipid oxidation. On the other hand, lecithins, with their lower emulsifying capacity and, in addition, a certain amount of antioxidant added, revealed a better oxidative response. Therefore, the choice of the emulsifier not only influences the physical stability of the emulsion but, by acting directly on the oil-water interface, it is another decisive ingredient for the chemical stability of ω -3 PUFAs-BLEs.

Another possibility for slowing lipid oxidation in BLEs is to add antioxidants or scavenging pro-oxidants. Many investigations have demonstrated that transition metals (pro-oxidant compounds) are mainly found in the water phase, whilst hydroperoxides are located at the oil/water interface due to the fact that hydroperoxides are surface-active compounds. Copper or iron are some of the most abundant pro-oxidant compounds which may be found in packaging materials, food ingredients and water. Thus, lipid oxidation occurs at the droplet interface, where the pro-oxidant ions of the aqueous phase come into close contact with the lipid hydroperoxide located at the droplet surface (Kargar, 2014; McClements, 2015; Waraho et al., 2011). Consequently, some studies are on track to evaluate the effect of iron encapsulation within the interior aqueous phase of W/O/W emulsions on lipid oxidation (Choi et al., 2009). Results obtained suggest that no significant changes to lipid droplet size in multiple emulsions occurred during storage. This suggests that the emulsions were resistance to flocculation and coalescence of lipid droplets, and internal water expulsion/diffusion. Multiple emulsions containing encapsulated iron did foster lipid oxidation when added to fish oil emulsions. Curiously, multiple emulsions in the absence of added iron seem to be highly effective at delaying lipid oxidation in fish oil emulsions. This may be due to their influence on the redistribution of pro-oxidants ions and reaction products in the system. Another possible alternative for delaying lipid oxidation is the addition of compounds with antioxidant properties. Chen et al. (2010) studied the antioxidant ability of selected polysaccharides (high-methoxyl and low-methoxyl pectin and others) in the continuous phase of a fish O/W emulsion. None of these polysaccharides showed any effect on the physical properties of the emulsions; however, they reduced the formation of primary and secondary lipid oxidation products. The authors attributed the lowering of lipid oxidation to the ability of these polysaccharides to bind free radicals together through the chelating effect of pro-oxidative metals. Hence, these results suggest that the addition of anionic polysaccharides to the continuous phase of O/W PUFAs-BLEs could be employed to enhance the chemical stability of O/W emulsions and in so doing, prolong their shelf-lifetime. Natural extracts have also been tested as a source of antioxidants. Karadağ et al. (2017) explored the capacity of Icelandic brown algae *Fucus vesiculosus* extracts incorporated into O/W emulsions to protect the lipid phase against lipid oxidation. These extracts, rich in polyphenolic compounds, were

found to improve the oxidative stability of the ω -3 PUFAs emulsions, and thus could provide a different natural source of new effective antioxidant compounds. Recent studies have evaluated the efficacies of lipophilized phenolic compounds as potential antioxidants in PUFAs-BLEs and they have obtained promising results. According to the cut-off effect hypothesis, the antioxidant efficacy increases with the increment of alkyl chain length until a threshold is reached. This threshold is the optimal chain length to obtain the highest efficacy of the antioxidants. To study the effect of alkyl chain unsaturation on the antioxidant activities, Pande & Akoh (2016) tested the antioxidant potential of three tyrosol-based phenolipids and they found that tyrosyl esters exhibited lower antioxidant activity than tyrosol whereas the addition of an alkyl chain enhanced the antioxidant efficiency of tyrosol in O/W emulsions.

Finally, it must always be kept in mind that the emulsification conditions, the characteristics of the medium, and the environmental conditions surrounding the emulsions also have a decisive influence on its chemical stability, regardless of the ingredients present in the ω -3 PUFAs-BLE. These will both affect the properties of the interface, its greater or lesser antioxidant capacity, and so on. For example, the emulsification method used influences the characteristics of the emulsion, such as droplet size, and this can affect the oxidative stability of the emulsion. So, Horn et al. (2012) studied the impact of homogenization equipment (microfluidizer vs. two-stage valve homogenizer) on oxidative stability of fish oil-in-water emulsions prepared with two different milk proteins: sodium caseinate and whey proteins. Emulsions were prepared at pH 7 with similar droplet sizes. Results showed that the oxidative stability of emulsions prepared with sodium caseinate was not influenced by the type of homogenizer used. Whereas, the type of homogenization equipment significantly influenced lipid oxidation when whey protein was used as emulsifier, with the microfluidizer resulting in lower levels of oxidation. They suggested that these results are related to the different distribution of protein components between the interface and the aqueous phase due to the different droplet disruption patterns in the two equipments. So, the microfluidizer produced a change in the protein composition of the interface compared to that obtained when the valve homogenizer was used. Regarding the characteristics of the medium, one of the critical factors is the pH. Owens et al. (2018) investigated the impact of the pH of the medium on the physicochemical stability of

whey protein isolated-stabilized fish O/W emulsions containing xanthan (XG)-locust bean gum (LBG) mixtures. The results obtained suggest that the net electrical charge of the protein-coated droplets can be modified according to pH. This then acts on the electrostatic interactions of the protein-polysaccharide complex to reduce lipid oxidation. In addition, they demonstrated the ability of xanthan (an anionic polysaccharide) to chelate transition metal ions at negatively charged sites, thereby preventing them from coming into close contact with the lipid phase. The presence or absence of light also influence lipid oxidation since light is necessary for the initial stage of oxidation reactions. The concentration of available oxygen represents another decisive factor as oxidation is not possible in the absence of oxygen. Finally, the storage temperature of the emulsion is clearly important. Klinkesorn & Geraldine (2012) evaluated the impact of the storage temperature on the oxidation rate of ω -3 PUFAs-BLEs during storage. The authors hypothesized regarding the kinetic reaction and evaluated the value of the kinetic constant as a function of the storage temperature. They identified that the kinetic constant was dependent upon the temperature, with greater lipid oxidation occurring at higher storage temperatures.

Table 5 presents a selection of some important studies on chemical stability in PUFAs-BLEs due to lipid oxidation.

Table 5. Selection of some important studies on chemical stability in PUFAs-BLEs.

System type	Dispersed phase	Continuous phase	Emulsification method	Aim	References
O/W	Structured lipid from caprylic acid and menhaden oil, O:W = 10:90	Aqueous solution composed of buffer solution (10 mM phosphate, pH 7.0) and 0.25 or 1 % emulsifier (whey protein isolate, Ryoto sugar ester (S-1670), Tween 20, lecithin or mono-/diacylglycerols)	High-pressure homogenization using an EmulsiFlex-C5 homogenizer (6-stages, pressure = 50 MPa)	To study the effects of emulsifiers on lipid oxidation	Fomuso et al. (2002)
O/W	Corn oil, O:W = 5-50:95-50	Aqueous solution composed of buffer solution (5 mM sodium acetate-imidazole, pH 3.0), 0.5-5.0 wt.% protein (whey protein isolate or sodium caseinate) with and without NaCl	Pre-emulsification with a high-speed blender at setting 2 for 2 min followed by high-pressure homogenization with a APV-Gaulin homogenizer (2-stages, pressure = 5000 psi)	To determine the optimum conditions for producing WPI-stabilized emulsions	Djordjevic et al. (2004a)
O/W	Algal oil or menhaden oil, O:W = 25:75	Aqueous solution composed of buffer solution (5 mM sodium acetate-imidazole, pH 3.0 or 10 mM sodium citrate, pH 3.0), 2.5 wt.% whey protein isolate or sodium caseinate and 0.2 wt.% potassium sorbate with and without added antioxidants (EDTA, sodium citrate or mixed tocopherol isomers)	Pre-emulsification with a high-speed blender at setting 2 for 2 min followed by high-pressure homogenization with a APV-Gaulin homogenizer (2-stages, pressure = 34 MPa)	To determine the optimum conditions for producing WPI-stabilized emulsions	Djordjevic et al. (2004b)
O/W	Fish oil, O:W = 16:84	Aqueous solution composed of phosphate buffer (20 mM, pH 7.0), 0.5 wt.% Tween 20 and 0.02 wt.% sodium azide	Membrane homogenization using MG-20-5 homogenizer (5-stages, pressure = 100 kPa) with a SPG-membrane (mean pore size 8.0 µm)	To examine the impact of iron encapsulated within the internal aqueous phase of multiple emulsions	Choi et al. (2009)
O/W	Menhaden oil, O:W = 2.5:97.5	Aqueous solution composed of buffer solution (10 mM phosphate, pH 7.0), 0.25 wt.% Brij 35, 0.04 wt.% sodium azide with and without added polysaccharides (0-0.1 wt.% low-methoxyl pectin, high-methoxyl pectin, sodium alginate, α-carrageenan or Chelex-100)	Pre-emulsification with a M133/1281-0 blender for 2 min followed by high-pressure homogenization with a M-110 L Microfluidizer Processor (3-stages, pressure = 68 MPa)	To investigate the antioxidant role of selected polysaccharides on lipid oxidation	Chen et al. (2010)

O/W	Com oil, O:W = 10:90	Aqueous solution composed of buffer solution (5 mM sodium phosphate, pH 7.0), 0-0.5 wt.% β -lactoglobulin and 0.1 wt.% pectin	Pre-emulsification with a Tissue Tearor blender for 2 min followed by high-pressure homogenization with a M-110 L homogenizer (5-stages, pressure = 9000 psi)	To explore a new method for forming protein-rich coatings around lipid droplets to improve lipid oxidation	Cho et al. (2010)
O/W	Tuna oil, O:W = 13:87	Water containing 2.6 wt.% lecithin and 0.52 wt.% chitosan	Pre-emulsification with a high-speed blender followed by high-pressure homogenization (2-stages, pressure = 5000 psi)	To study the influence of storage temperature on lipid oxidation	Klinkesorn & Geraldine (2012)
O/W	Sunflower oil, camelina oil or camelina:fish oil 72:28, O:W = 20:80	Distilled water containing 0.25-3.00 % sodium caseinate and 0.02 % sodium azide	Pre-emulsification with a Silverson L4RT mixer for 5 min followed by high-pressure homogenization with a M-110EH microfluidizer (pressure = 21-138 MPa)	To evaluate the effects of protein concentration and other factors on lipid oxidation	O'Dwyer et al. (2013)
O/W	Flaxseed oil and fish oil, O:W = 10:90	Water containing 0-3 % (w/w) sodium caseinate, 0-0.3 % (w/w) oat β -glucan and 0.04 % (w/w) sodium azide	Pre-emulsification with a Polytron homogenizer at 14000 rpm for 2 min followed by high-pressure homogenization with a Panda 2K homogenizer (2-stages, pressure = 80 and 8 MPa)	To study the effects of protein and polysaccharide content on lipid oxidation	Liu et al. (2015)
W/O	Double distilled water containing antioxidants and/or metal chelators, W:O = 2:98	Algae oil containing 0.15 wt.% emulsifier (PGPR, PC75, PC50, lyso-PC and MAG-DAG)	Pre-emulsification with a M133/1281-0 blender for 2 min followed by high-pressure homogenization with a M-110 L Microfluidizer Processor (3-stages, pressure = 68 MPa)	To evaluate the impact of antioxidants and emulsifiers on lipid oxidation	Chen et al. (2016)
O/W	Fish oil, O:W = 5:95	Distilled water containing 2 wt.% fish protein hydrolysates (sardine hydrolysates or small-spotted catshark hydrolysates)	Pre-emulsification with an Ystral mixer at 16000 rpm for 3 min followed by high-pressure homogenization with a M110L Microfluidizer Processor (3-stages, pressure = 9000 psi)	To investigate the effects of fish protein hydrolysates on lipid oxidation	García-Moreno et al. (2016)

O/W	Fish oil, O:W = 25:75	Aqueous solution composed of buffer solution (20 mM phosphate, pH 5.5), 0.6 % (w/v) sodium caseinate (primary emulsion), 0.4 % (w/v) chitosan (only secondary emulsion) and 0.2 wt.% seaweed extracts	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax at 10000 rpm followed by high-pressure homogenization with a Niro Soavi homogenizer (3-stages, pressure = 250 bar)	To study the ability of <i>Fucus vesiculosus</i> extracts to inhibit lipid oxidation of multilayered fish oil emulsions	Hermund et al. (2016)
O/W	Cod liver oil, O:W = 5:95	Distilled water containing 1 % (w/w) citrem and 2 mg/mL protein (common carp roe protein hydrolysate)	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T1500 at 16000 rpm for 3 min followed by high-pressure homogenization with a Panda 2K (3-stages, pressure = 250 bar)	To examine the effects of carp roe protein hydrolysate on lipid oxidation	Ghelichi et al. (2017)
O/W	Fish oil, O:W = 70:30	Water containing 10 % (w/v) sodium caseinate and 0.5-1 % (w/v) seaweed extracts	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax at 20000 rpm	To study the ability of <i>Fucus vesiculosus</i> extracts to inhibit lipid oxidation	Karadağ et al. (2017)
O/W	Menhaden oil, O:W = Not described	Aqueous solution composed of buffer solution (50 mM phosphate, pH 7), 1 wt.% emulsifier (decaglycerol monolaurate (ML750), sodium oleate or β -lactoglobulin) and 0.02 wt.% sodium azide	Four different emulsification processes were used: microchannel emulsification, premix membrane emulsification, vacuum homogenization and high-pressure homogenization	To investigate the effect of emulsification process, droplet size and storage temperature on the chemical stability	Neves et al. (2017)
O/W	Flaxseed oil, O:W = 1:99	Aqueous solution composed of buffer solution (5 mM sodium acetate, pH 3.0), 0.4 % (w/v) sodium caseinate, 0.25 % (w/v) sodium alginate, 0.05-0.4 % (w/v) chitosan and 0.01 % (w/v) sodium azide	Pre-emulsification with a blender followed by ultrasound homogenization with a QSonica 700 at 50 % amplitude for 5 min	To investigate the effect of stress factors on the lipid oxidation of multilayer protein-stabilized emulsions	Sivapratha & Sarkar (2018)
O/W	Cod liver oil, O:W = 50:50; 60:40 and 70:30	Aqueous solution composed of different amounts of sodium caseinate and/or sodium alginate	Mixing homogenization at 1200 rpm for 3 min followed by low-pressure homogenization using Stephan Universal mixer at 4 kPa for 4 min	To evaluate the oxidative stability of high-fat emulsions stabilized with combinations of sodium caseinate and sodium alginate	Yesiltas et al. (2017)

O/W	Walnut oil, O:W = 5:95	Aqueous solution composed of phosphate buffer (5 mM, pH 7.0), 1.5 % (w/w) lecithin and 0, 1.0 or 1.6 % (w/w) NaCl or KCl	Pre-emulsification with a F6/10 blender followed by high-pressure homogenization with a HP-4L homogenizer (3-stages, pressure = 9000 psi)	To understand the impact of salts on lipid oxidation of lecithin-stabilized oil-in-water emulsions	Cui et al. (2018)
O/W	Fish oil, O:W = 10:90	Ultrapure water containing 1 % (w/v) ovalbumin or ovalbumin-conjugates	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T25 at 10000 rpm for 10 min followed by high-pressure homogenization (3-stages, pressure = 60 MPa)	To evaluate the oxidative stability of emulsions prepared using novel protein-polyphenol conjugate emulsifiers	Feng et al. (2018)
O/W	Fish oil, O:W = 5:95	Ultrapure water containing 0.033 M emulsifier (rapeseed lecithins, soy lecithin or DATEM)	High-speed homogenization using PRO250 homogenizer for 2 min	To investigate the ability of rapeseed lecithins as emulsifiers and antioxidants in fish oil emulsions	Li et al. (2018)
O/W	Menhaden oil, O:W = 10:90	Deionized water containing 2 % (w/v) whey protein isolate, 0.1 % (w/v) polysaccharides (locust bean gum or xanthan gum) and 0.04 % (w/v) sodium azide	Rotor-stator homogenization using PowerGen 500 homogenizer at 30000 rpm for 6 min	To study the impact of pH on the lipid oxidation of emulsions containing protein-polysaccharides mixtures	Owens et al. (2018)
O/W	Tuna oil containing 0.7 mmol α -tocopherol and/or eugenol/kg of emulsion, O:W = 30:70	Ultrapure water containing 1 % (w/w) whey proteins or 0.5 % (w/w) Tween 80, 0.5 % (w/w) potassium sorbate and antioxidants. Emulsions were supplemented or not with guar gum (0 to 0.6 % (w/w))	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax T25 at 10000 rpm for 5 min; ultrasound homogenization at 20 kHz for 20 min with alternating sonication/rest cycles (10 s sonication/10 s rest)	To understand the impact of compositional and structural parameters of emulsions rich in omega-3 on oxidative stability	Permin et al. (2019)
O/W	Cod liver oil, O:W = 50:50; 60:40 and 70:30	Aqueous solution composed of different amounts of sodium caseinate (CAS) and/or phosphatidylcholine (PC) and 0.05 % (w/w) sodium azide	Mixing homogenization at 1200 rpm for 3 min followed by low-pressure homogenization using Stephan Universal mixer at 4 kPa for 4 min	To study the effect of fish oil content, total CAS and PC content, and the ratio of CAS to PC on the oxidative stability	Yesiltas et al. (2019)

O/W	Echium seed oil, O:W = 3:97	Aqueous solution composed of phosphate buffer (10 mM, pH 7.0) and 1 wt.% emulsifier (sodium dodecyl sulfate, dodecyltrimethylammonium bromide or Tween 20), with and without added antioxidants (sinapic acid ester)	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax at 5500xg for 2 min followed by high-pressure homogenization with a Homolab A-10 homogenizer (2-stages, pressure = 500 bar)	To study the effect of sinapic acid esters concentration and chain length, the electrical charge of the emulsifier and emulsion pH on the oxidative stability	da Silveira et al. (2020)
O/W	Fish oil, O:W = 5:95	Aqueous solution composed of phosphate buffer (10 mM, pH 7.0), 1 wt.% enzymatic degraded polysaccharides from <i>Enteromorpha prolifera</i> and 1 wt.% emulsifier (Tween 80, gum arabic or lecithin)	Pre-emulsification with a high-speed blender at 20000 rpm for 2 min followed by high-pressure homogenization with a M110-P Microfluidizer (3-stages, pressure = 15000 psi)	To explore the potential application of enzymatic degraded polysaccharides from <i>Enteromorpha prolifera</i> as antioxidant in fish oil emulsions	Shi et al. (2020)

1.4.2.6. Previous studies on ω -3 PUFAs and curcumin

Although emulsions and structured emulsion-based delivery systems are a relatively recent technological alternative for the encapsulation, protection, vehiculization, and release of lipophilic active principles orally, in recent decades, publications on this type of systems have proliferated and they have been positioned as potential transporter systems for ω -3 PUFAs and curcumin. Tables 6 and 7 collect, as a summary, information related to all those previous studies on emulsified systems that incorporate ω -3 PUFAs and curcumin, studies that in some way represent the current state and the latest advances in this field that looks so promising.

Table 6. Previous studies on conventional emulsion-based delivery systems for encapsulation, protection, vehiculization and release of ω -3 PUFAs and curcumin.

System type	Dispersed phase	Continuous phase	Emulsification method	References
ω-3 PUFAs				
O/W	Sandeel oil with and without antioxidants (ascorbic acid, lecithin, and tocopherol), O:W = 10:90	Water containing 10 % sodium caseinate and 10 % carbohydrate (lactose or maltodextrin)	High-pressure homogenization (1-3-stages, pressure = 100-400 bar)	Heinzelmann & Franke (1999)
O/W	Fish oil, O:W = 20-50:80-50	Water containing 10-40 % <i>n</i> -octenylsuccinate-derivatized starch (with different viscosities)	High-pressure homogenization using a Panda 2K homogenizer (2-stages, pressure = 50 bar)	Drusch & Schwarz (2006)
O/W	Refined cod liver oil or refined rapeseed oil without added antioxidants, O:W = 50:50	Water containing 1.5 wt.% denatured whey protein and 0.1 wt.% potassium sorbate	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax for 1 min followed by high-pressure homogenization with a Panda 2K homogenizer (2.5 min recirculation, pressure = 150 MPa)	Let et al. (2007)
Solid emulsion gel (SEG)	Herring oil containing different volume proportions of protein solution (120 mg/mL soy protein solution in 0.16 M sodium hydroxide)	Aqueous solution of activated poly(ethylene glycol) (PEG)	Polymerization	Shingel et al. (2008)
O/W	Soybean oil and fish oil, O:W = Not described	Milli-Q water containing different amounts of emulsifier (polyglycerol fatty acid esters L-7D, L-10D and L-20D and sucrose fatty acid ester L-1695)	High-pressure homogenization followed by ultrasound homogenization	Azuma et al. (2009)
O/W	Coconut, olive, soybean, linseed and fish oils, O:W = 1:99	Aqueous solution composed of buffer solution (10 mM sodium acetate-imidazole, pH 7.0) and 0.1 % Tween 20	Pre-emulsification using a two-speed hand-held homogenizer (M 133/128 I-0) at the highest speed setting followed by ultrasound homogenization at 0.5 s pulses for 10 min	Decker et al. (2010)

O/W	Cod liver oil, O:W = 70:30	Aqueous solution composed of 27.2 % buffer solution (10 mM sodium acetate-imidazole), 2.8 % emulsifier (whey protein isolate, soy lecithin, sodium caseinate, milk phospholipid (20 %) or milk phospholipid (75 %)) and 0.05 % (w/v) sodium azide	Mixing homogenization at 1200 rpm for 3 min followed by low-pressure homogenization using Stephan Universal mixer at 4 kPa for 4 min	Horn et al. (2011)
O/W	Cod liver oil, O:W = 20:80	Aqueous solution consisting of buffer solution (10 mM phosphate buffer and 17 mM Brij 35, pH 7.0)	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax T18 at 24000 rpm for 2 min followed by ultrasound homogenization using Branson Sonifier 250 at level 3 for 5 min	Larsson et al. (2012)
O/W	Mixture of different combinations of 0, 1.5, 4.0 and 5.0 % tristearin and 0 and 1.0 % omega-3 fish oil	Aqueous solution composed of buffer solution (4 mM sodium phosphate, 6 mM sodium diphosphate, pH 7), 0.02 % sodium azide and a combination of 0.3 % (w/w) sodium taurodeoxycholatehydrate and 1.2 % (w/w) lecithin as emulsifiers	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax at 24000 rpm for 1 min followed by high-pressure homogenization with a M-110EH-30 Microfluidizer Processor (3-stages, pressure = 10000 psi)	Salminen et al. (2013a)
O/W	Mixture of different amounts of fish oil (0-10 wt.%), MCT or lemon oil (0-10 wt.%) and Tween 80 (2.5-10 wt.%), O:W = 20:80	Aqueous solution composed of buffer solution (0.8 % citric acid, 0.08 % sodium benzoate, pH 3.0) mixed with different amounts of propylene glycol, glycerol or ethanol (0-50 wt.%)	Mixing homogenization at 500 rpm for 15 min	Gulotta et al. (2014)
O/W	Flaxseed oil, O:W = 12.5:87.5	Distilled water containing different amounts of whey protein concentrate (WPC-80), sodium caseinate, lactose and ascorbyl palmitate as antioxidant	Low-pressure homogenization (20 LPH, pressure = 69 bar) followed by high-pressure homogenization (20 LPH, pressure = 241.31 bar)	Goyal et al. (2015)
O/W	Fish oil, O:W = 10-50:90-50	Aqueous solution composed of buffer solution (5 mM sodium phosphate, pH 7.0) and emulsifier (Tween 80, rhamnolipids or quillaja saponins) keeping the emulsifier-to-oil ratio fixed at 1:10	High-pressure homogenization using Microfluidics PureNano (pressure = 13 kpsi)	Liu et al. (2016)
O/W	Algae oil, O:W = 10:90	Aqueous solution composed of buffer solution (10 mM sodium phosphate, pH 7) and 0.25-5 % (w/w) protein concentrate (pea, lentil and faba bean)	Pre-emulsification with a MI 33/1281-0 mixer at 10000 rpm for 2 min followed by high-pressure homogenization with a PureNano Microfluidizer (3-stages, pressure = 10000 psi)	Gumus et al. (2017)
O/W	Chia seed oil, O:W = 5:95	Aqueous solution composed of buffer solution (98 mM acetic acid, 2 mM sodium acetate, pH 3.0), 1 wt.% emulsifier (phosphatidylcholine-enriched lecithin or deoiled lecithin), 0.2 wt.% powdered chitosan, 20 wt.% maltodextrin, 0.0012 wt.% nisine and 0.1 wt.% potassium sorbate	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T25 at 10000 rpm for 2 min followed by high-pressure homogenization with a Panda 2K (4-stages, pressure = 600 bar)	Julio et al. (2018)

O/W	Cod liver oil, O:W = 50-70:50-30	Distilled water containing different amounts of sodium caseinate (CAS) and phosphatidylcholine (PC) (total CAS + PC content = 1.4, 2.1 and 2.8 % (w/w); ratio of CAS to PC = 0.4, 1.2 and 2.0 (w/w)) and 0.05 % (w/w) sodium azide	Pre-emulsification with a Stephan Universal mixer at 1200 rpm for 3 min followed by an emulsification for additional 2 min × 2 min under reduced pressure (approximately 40 kPa)	Yesiltas et al. (2019)
O/W	Olive oil and fish oil, O:W = 10:90	Deionized water containing different unspecified quantities of Tween 80	Pre-emulsification with a Polytron PT 1600 E at 20000 rpm for 2 min followed by high-pressure homogenization with a LM20 Microfluidizer (3-stages, pressure = 137.5 MPa)	Costa et al. (2020)
O/W	Cod liver oil, O:W = 70:30	Distilled water containing different amounts of sodium caseinate (CAS) and DATEM (total CAS + DATEM content = 2.8 % (w/w); ratio of CAS to DATEM = 0.7 and 2.0 (w/w))	Pre-emulsification with a Stephan Universal mixer at 1200 rpm for 3 min followed by an emulsification for additional 2 min × 2 min under reduced pressure (approximately 40 kPa)	Yesiltas et al. (2021)
Curcumin				
O/W	Curcumin-enriched corn oil (0.15 wt.%), O:W = 10:90	Aqueous solution composed of phosphate buffer (5 mM, pH 7) containing 1 wt.% β-lactoglobulin	Pre-emulsification with a M133/1281 high-speed blender for 2 min followed by high-pressure homogenization with a M-110Y Microfluidizer (5-stages, pressure = 9000 psi)	Ahmed et al. (2012)
O/W	Curcumin-enriched palm oil, O:W = 20:80	Deionized water containing 1 % Tween 80 and Span 80 as co-surfactant	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax at 11000 rpm for 90 min followed by high-pressure homogenization (at three different inlet operating pressures)	Parthasarathy et al. (2013)
O/W	Curcumin-enriched soy oil (0.004 wt.%) with or without addition of piperine at a 10:1 ratio, O:W = 40:60	Water containing 4 % Tween 20 or 4 % Poloxamer 407	Pre-emulsification with a Power Gen 125 at 30000 rpm for 1 min followed by high-pressure homogenization with an Emulsiflex C5 homogenizer (5-stages, pressure = 750 bar)	Gülseren et al. (2014)
O/W	Curcumin-enriched corn oil (30 % w/v), O:W = 10:90	Aqueous solution composed of buffer solution (10 mM phosphate-buffered saline, pH 6.5) and 1 % (w/w) Tween 80	Pre-emulsification with a M133/1281-0 blender for 2 min followed by high-pressure homogenization with a M110Y microfluidizer (5-stages, pressure = 9000 psi)	Zou et al. (2015)

O/W	Curcumin-enriched MCT oil (0.01 wt.%), O:W = 5:95	Aqueous solution composed of phosphate buffer (10 mM, pH 7.0) containing 0-1.2 wt.% microcrystalline cellulose, 0.9 wt.% papain hydrolysate of soybean isolate protein and 0.01 wt.% sodium azide	Pre-emulsification with a two-speed hand-held homogenizer for 3 min followed by high-pressure homogenization with a 110-PS Microfluidizer Processor (3-stages, pressure = 50 MPa)	Xu et al. (2016)
O/W	MCT, linseed or canola oils containing 1.2 % (w/v) curcumin, O:W = 20:80	Deionized water containing different amounts of emulsifier (Tween 80, lecithin, acacia senegal or whey protein)	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T25 at 10000 rpm for 6 min followed by high-pressure homogenization with a Niro Soavi homogenizer (3-stages, pressure = 60 MPa)	Ma et al. (2017)
O/W	Refined palm olein containing 1 wt.% curcumin in ethanol solution (1 mg/mL)	Water containing 0.25-1 wt.% Tween 80	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T18 at 7000 rpm for 1 h followed by high-pressure homogenization with an air driven bench-top microfluidizer (1-12-stages, pressure = 150-450 bar)	Raviadaran et al. (2018)
O/W	Curcumin-enriched corn oil (0.2 wt.%), O:W = 10:90	Aqueous solution composed of phosphate buffer (10 mM, pH 7.0) containing 2.0 wt.% emulsifiers (succinic anhydride modified whey protein isolate or whey protein hydrolysates)	Rotor-stator homogenization using a high-shear rate blender at 20000 rpm for 3 min	Pan et al. (2019)
O/W	MCT oil containing 1.701 % (w/v) curcumin, O:W = 10:90	Aqueous solution composed of phosphate buffer (10 mM, pH 6) containing 1 wt.% lecithin, 0.25-0.75 wt.% Tween 80, 0-0.375 wt.% chitosan solution (2.5 wt.% chitosan powder into 1 wt.% acetic acid), 25 wt.% maltodextrin and 0.01 wt.% sodium azide	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax T18 at 20000 rpm for 10 min	Hamad et al. (2020)
O/W	Curcumin-enriched MCT oil (0.01 wt.%) containing oil-soluble antioxidants (ascorbic acid 6-palmitate or α -tocopherol), O:W = 10:90	Aqueous solution composed of phosphate buffer (5 mM, pH 7.0) containing 1 wt.% quillaja saponins liquid extract and different amounts of water-soluble antioxidants (ascorbic acid or Trolox)	Pre-emulsification with a M133/1281-0 mixer for 2 min followed by high-pressure homogenization with a M110L-Microfluidizer (3-stages, pressure = 12000 psi)	Kharat et al. (2020)
O/W	Curcumin-enriched MCT oil (0.1 wt.%) containing 0.6 wt.% carboxymethyl cellulose and quaternized chitosan complexes, O:W = 20:80	Deionized water containing 0.02 wt.% sodium azide	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax T25 at 10000 rpm for 4 min	Zhu et al. (2021)

ω-3 PUFAs and curcumin

O/W	Fish oil and DALDA peptide alone or with curcumin, O:W = 20:80	Aqueous solution composed of 2.4 % (w/v) egg phosphatidylcholine (Lipoid® E80), 1 % (v/v) Tween 80 and 0.3 % (w/v) 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy-(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG ₂₀₀₀)	Pre-emulsification with a Silverson homogenizer at 6000 rpm for 2 min followed by ultrasound homogenization with a VIBRA CELL VC505 for 10 min	Shah et al. (2014)
O/W	Coconut, corn, fish, flaxseed or sunflower oils containing curcumin, O:W = 10:90	Aqueous solution composed of phosphate buffer (10 mM, pH 6.5) containing 1 % (w/w) Tween 80	Pre-emulsification with a M133/1281-0 blender for 2 min followed by high-pressure homogenization with a M110Y Microfluidizer (3-stages, pressure = 12000 psi)	Zou et al. (2016)
O/W	Coconut, sunflower or linseed oils containing 0.2 wt.% curcumin, O:W = 1:99	Distilled water containing 0.075 % Lipoid S75-3, 3 % polyethylene glycol and 0.9 % NaCl	Pre-emulsification with a Silverson L4RT mixer at 6000 rpm for 5 min followed by high-pressure homogenization with a Panda homogenizer (11-stages, pressure = 900 bar)	Sugasini & Lokesh (2017)
O/W	Flaxseed oil or fish oil with and without curcumin (5 mg in 10 mL absolute ethanol), O:W = 4:96	Distilled water containing 2 % Tween 80	Rotor-stator homogenization using X520 homogenizer at 16000 rpm for 3 min followed by ultrasound homogenization using a sonicator at 60 % of amplitude for 10 min	Hashim et al. (2019)
O/W	MCT, corn or fish oils containing 0.32 wt.% curcumin, O:W = 10:90	Aqueous solution composed of phosphate buffer (5 mM, pH 7.0) containing 1 wt.% emulsifier (Tween 80 or whey protein isolate)	Pre-emulsification with a M133/1281-0 blender for 2 min followed by high-pressure homogenization with a M110Y Microfluidizer (3-stages, pressure = 8000 and 12000 psi)	Shen et al. (2019)
O/W	Curcumin-enriched MCT oil (0.25 wt.%) containing 1 % Kolliphor® EL, O:W = 3:97	Water containing 1 % emulsifier enzymatically prepared (monoacylglycerides and diacylglycerides structured with three bioactive lipids: conjugated linoleic acid, medium-chain fatty acids or ω-3 fatty acids) and 50 % glycerol	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T25 at 20000 rpm for 3 min followed by ultrasound homogenization with a Branson Digital S-450D at 20 or 30 % amplitude for 2 or 3 min	Esperón-Rojas et al. (2020)
O/W	Chia seed oil containing curcumin, O:W = 25:75 or 16.7:83.3	Water containing maltodextrin and gum arabic in different ratios (1:1, 3:1 and 1:3)	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax T18 at 18000 rpm for 5 min	Firtin et al. (2020)

Table 7. Previous studies on multiple emulsion-based delivery systems for encapsulation, protection, vehiculization and release of ω -3 PUFAs and curcumin.

System type	Inner phase	Middle phase	Primary emulsification method	Continuous phase	Secondary emulsification method	References
ω-3 PUFAs						
O/W/O	Distilled water containing 6 % (w/w) sodium caseinate and 0.0005 % (w/w) methylene blue dye; O1/W = 20:80	Cold pressed orange oil containing 0.03 % (w/w) Sudan III red dye	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T25 at 20500 rpm for 2 min followed by high-pressure homogenization with a TM 110 Microfluidizer (pressure = 1000 bar)	[Dispersed phase: 50 wt.% primary emulsion and 50 wt.% lactose monohydrate (14 wt.%)] Rape seed oil containing 50 wt.% polyglycerol ester of interesterified ricinoleic acid (Triodan R 90); Dispersed phase: O2 = 62.5:37.5	Stir using a magnetic stirrer for 50 min	Edris & Bergnstahl (2001)
W/O/W	Aqueous solution composed of 2.8 mg/mL insulin, 0.18 % NaCl and 4 % Abil® EM-90; W1/O = 75:25	Miglyol® 810N or fish oil	Rotor-stator homogenization at 3000 rpm for 30 min	Aqueous solution of Arlatone® F127G (1 %); (W1/O):W2 = 80:20	Rotor-stator homogenization	Courmarie et al. (2004)
W/O/W	Aqueous solution composed of buffer solution (20 mM phosphate, pH 7.0), 15 wt.% whey protein isolate, 0.02 wt.% sodium azide and either 0 or 0.1 wt.% iron; W1:O = 20:80	Corn oil containing 8 wt.% PGPR	Pre-emulsification with a Tissu-Tearor blender for 2 min followed by high-pressure homogenization with a 110L Microfluidizer (5-stages, pressure = 42 ψ)	Aqueous solution composed of buffer solution (20 mM phosphate, pH 7.0), 0.5 wt.% Tween 20 and 0.02 wt.% sodium azide; (W1/O):W2 = 20:80	Membrane homogenization using MG-20-5 homogenizer (5-stages, pressure = 100 kPa) with a SPG-membrane (mean pore size 8.0 μ m)	Choi et al. (2009)

W/O/W	Distilled water containing 30 % (w/w) ascorbic acid, 0.50 % (w/w) gellan gum and 8 % (w/w) Panodan SDK; W1:O = 20:80	Chia essential oil containing 32 % (w/w) Grindsted PGPR 90	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax T50 at 5200 rpm for 5 min	Aqueous solution containing biopolymers blends in different proportions (mesquite gum, maltodextrin DE-10 and whey protein concentrate, ratios 66:17:17 and 17:66:17); (W1/O):W2 = 1:2.12 and 1:4.12	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax T50 at 7600 rpm for 6 min	Carrillo-Navas et al. (2012)
O/W/O	Camelina:fish oil 85:15 with and without added antioxidant (250 mg/kg dl- α -tocopherol); O1:W = 50:50	Distilled water containing 6 wt. % NaCl and 6 wt. % sodium caseinate with and without added antioxidant (0.75 g/kg green tea extract)	Pre-emulsification with a Silverson L4RT mixer for 5 min followed by high-pressure homogenization with a Niroy Soavi homogenizer (2-stages, pressure = 17.24 and 3.45 MPa)	Palm:rapeseed oil 42:58 containing 0.5 wt. % polyglycerol polyricinoleate and 0.016 wt. % beta-carotene with and without added antioxidant (500 mg/kg dl- α -tocopherol) ; (O1/W):O2 = 50:50	Rotor-stator homogenization using Silverson L4RT mixer	O'Dwyer et al. (2012)
O/W/O	Camelina oil, fish oil and blends; O1:W = 50:50	Distilled water containing 6 wt. % NaCl and 6 wt. % sodium caseinate	Pre-emulsification with a Silverson L4RT mixer for 5 min followed by high-pressure homogenization with a Niroy Soavi homogenizer (2-stages, pressure = 17.24 and 3.45 MPa)	Palm:sunflower oil 42.65:57.36 containing 0.5 wt. % polyglycerol polyricinoleate and 0.016 wt. % beta-carotene; (O1/W):O2 = 50:50	Rotor-stator homogenization using Silverson L4RT mixer	O'Dwyer et al. (2013); O'Dwyer et al. (2013b)
O/W/O	Cod liver oil stabilized with tocopherols; O1:W = 20:80	Distilled water containing 6 wt. % sodium caseinate	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax T18 at 20000 rpm for 10 min	[Dispersed phase: 50 wt. % primary emulsion and 50 wt. % lactose monohydrate (14 wt. %)] Extra virgin olive oil containing 50 wt. % PGPR; Dispersed phase:O2 = 62.5:37.5	Stir using a magnetic stirrer	Jiménez-Martín et al. (2015, 2016)

W/O/W	Water containing 0.50 mg/mL phenolic compound (sinapic acid or rutin); W1:O = 1:2	Echium seed oil containing 0.5 wt.% PGPR 90	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax at 12000 rpm for 4 min	Aqueous solution composed by 7.5 wt.% polymers (gelatin and arabic gum, ratio 1:1); (W1/O):W2 = 50-100:50-0	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax at 10000 rpm for 3 min	Comunian et al. (2016)
W/O/W	Distilled water containing 0.584 % (w/v) NaCl, 0.04 % (w/v) sodium azide and 0.375 % (w/v) hydroxytyrosol; W1:O = 20:80	Perilla oil containing 6 % (w/w) PGPR	Pre-emulsification with a Thermomix food processor TM-31 at 3250 rpm for 15 min followed by high-pressure homogenization with a Panda Plus 1000 homogenizer (2-stages, pressure = 55 and 7 MPa)	Distilled water containing 0.5 % (w/v) sodium caseinate, 0.584 % (w/v) NaCl and 0.04 % (w/v) sodium azide; (W1/O):W2 = 40:60	Pre-emulsification with a Thermomix food processor TM-31 at 700 rpm followed by high-pressure homogenization with a Panda Plus 1000 homogenizer (2-stages, pressure = 15 and 3 MPa)	Flaiz et al. (2016)
O/W/O	Echium oil with and without added antioxidant (500 and 800 ppm quercetin)	Sodium alginate aqueous solution with and without added antioxidant (0.025 and 0.050 g/g sinapic acid)	Microfluidic homogenization or gelation homogenization	Corn oil containing 2 % (w/w) soy lecithin	Microfluidic homogenization or gelation homogenization	Comunian et al. (2017)
W/O/W	Distilled water containing 0.584 % (w/v) NaCl and 0.375 % (w/v) hydroxytyrosol; W1:O = 20:80	Perilla oil containing 6 % (w/w) PGPR	Pre-emulsification with a Thermomix food processor at setting 6 for 15 min followed by high-pressure homogenization with a Panda Plus 2000 homogenizer (2-stages, pressure = 55 and 7 MPa)	Distilled water containing 0.584 % (w/v) NaCl and 0.04 % (w/v) sodium azide; (W1/O):W2 = 40:60	Pre-emulsification with a Thermomix food processor at setting 3 followed by high-pressure homogenization with a Panda Plus 2000 homogenizer (2-stages, pressure = 15 and 3 MPa)	Cofrades et al. (2017)
W/O/W	Distilled water containing 0.584 % (w/v) NaCl, 0.125 % (w/v) hydroxytyrosol and 0.04 % (w/v) sodium azide; W1:O = 20:80	Perilla oil containing 6 % (w/w) PGPR	High-pressure homogenization with a Panda Plus 2000 homogenizer (2-stages, pressure = 7 and 55 MPa)	Distilled water containing 0.5 % (w/v) sodium caseinate, 0.584 % (w/v) NaCl and 0.04 % (w/v) sodium azide; (W1/O):W2 = 40:60	High-pressure homogenization with a Panda Plus 2000 homogenizer (2-stages, pressure = 3.5 and 15 MPa)	Freire et al. (2017)

W/O/W	Water containing 2 – 225 mg/kg gallic acid and NaCl to prevent diffusion phenomena; W1:O = 20:80	Blend of olive, linseed and fish oils (70:20:10) containing 6 % (w/w) PGPR	Pre-emulsification with a Thermomix food processor at 3250 rpm for 5 min followed by high-pressure homogenization with a Panda Plus 2000 homogenizer (2-stages, pressure = 7977 and 1015 psi)	Water containing 2 – 225 mg/kg quercetin, NaCl to prevent diffusion phenomena and 0.5 % (w/w) sodium caseinate; (W1/O):W2 = 40:60	Pre-emulsification with a Thermomix food processor at 700 rpm for 5 min followed by high-pressure homogenization with a Panda Plus 2000 homogenizer (2-stages, pressure = 2175 and 435 psi)	Silva et al. (2018)
W/O/W	Deionized water containing 10 % (w/w) fish protein hydrolysate, 3.33 % (w/w) NaCl and 3.33 % (w/w) vitamin B ₁₂ ; W1:O = 30:70	Fish liver oil containing 6 to 10 % (w/w) PGPR	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax T25 at 20000 rpm for 5 min	Aqueous solutions prepared adding different whey protein concentrate(40 % w/w)/inulin(3 % w/w) weight ratios, included 1:1, 1.608:1, 2.5:1, 3.39:1 and 4:1; (W1/O):W2 = 2 to 5	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax T25 at 10000 rpm for 3 min	Jamshidi et al. (2019)
W/O/W	Deionized water containing 8.60 % (w/w) fish protein hydrolysate and 1.98 % (w/w) NaCl; W1:O = 30:70	Fish oil containing 10.26 % (w/w) PGPR	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T25 at 20000 rpm for 5 min followed by high-pressure homogenization with a APV-200a homogenizer (pressure = 700-1500 bar)	Aqueous solutions prepared adding 26.58 % (w/w) whey protein concentrate and 1.66 % (w/w) inulin, weight ratio of 1.94:1; (W1/O):W2 = 1:2.67	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T25 at 10000 rpm for 3 min followed by high-pressure homogenization with a APV-200a homogenizer (pressure = 700-1500 bar)	Jamshidi et al. (2020)
Curcumin						
O/W/O	Oil phase containing 1 % curcumin in 100 % ethanol at 60 °C, natural cooling; O1:W = Not described	Water phase containing 3 % chitosan solution in 2 % acetic acid, natural cooling, and 5 % (w/v) Tween 80	Rotor-stator homogenization at 24000 rpm	Mineral oil containing 1.5 % Span 80; (O1/W):O2 = 1:9 (v/v)	Rotor-stator homogenization at 24000 rpm for 10 min	Tanthapanichakoon et al. (2007)
W/O/W	Water containing 3 wt.% gelatin, 2 wt.% NaCl and 0.2 wt.% ascorbic acid; W1:O = 25:75	Olive oil containing 0.1 % (w/v) curcumin and 5 wt.% PGPR	Stir with a magnetic stirrer at 1500 rpm for 2 min followed by ultrasound homogenization with a Probe Sonicator at 20 kHz for 4 min	Water containing 1 wt.% Tween 80, 2 wt.% NaCl and 0.2 wt.% ascorbic acid; (W1/O):W2 = 25:75	Stir with a magnetic stirrer at 1500 rpm for 15 min followed by ultrasound homogenization with a Probe Sonicator at 20 kHz for 2 min	Aditya et al. (2015a)

W/O/W	Water containing 3 wt.% gelatin, 2 wt.% NaCl and 0.2 wt.% ascorbic acid; W1:O = 25:75	Olive oil containing 0.1 % (w/v) curcumin and 5 wt.% PGPR	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T25 at 6000 rpm for 8 min followed by ultrasound homogenization with a Probe Sonicator at 20 kHz for 4 min	Water containing 1 wt.% Tween 80, 2 wt.% NaCl and 0.2 wt.% ascorbic acid; (W1/O):W2 = 25:75	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T25 at 2000 rpm for 4 min followed by ultrasound homogenization with a Probe Sonicator at 20 kHz for 2 min	Aditya et al. (2015b)
W/O/W	Aqueous solution composed by 5 % (w/w) red dragon fruit extract (containing betacyanin) and 0.3 % (w/w) CaCl ₂ ; W1:O = 30:70	Corn oil containing 3 % (w/w) temulawak extract (containing curcumin), 2 % (w/w) PGPR and 1 % (w/w) Span 20	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax T24 at 13000 rpm for 5 min	Aqueous solution composed by 1 – 1.5 % (w/w) Tween 80; (W1/O):W2 = 15-30:85-70	High-pressure homogenization with a Panda Plus 2000 homogenizer (3-stages, pressure = 250-300 bar)	Harimurti et al. (2021)
W/O/W	Water containing 5 % (w/v) gelatin and 60 mg betanin; W1:O = 20:80	MCT containing 5 % (w/v) PGPR and 0.75 mg/mL curcumin	High-pressure homogenization with a Nano homogenizer (5-stages, pressure = 60 MPa)	Aqueous solution composed of phosphate buffer (5 mM, pH 7) containing 0.5 – 2.0 wt.% sugar beet pectin-bovine serum albumin nanoparticles; (W1/O):W2 = 10:90	Rotor-stator homogenization using a SilentCrusher M at 7000 rpm for 3 min	Tang et al. (2021)
<i>ω-3 PUFAs and curcumin</i>						
No paper found						

1.4.2.7. Research derived publications

The publication derived from this research work is attached below:



Novel emulsions-based technological approaches for the protection of omega-3 polyunsaturated fatty acids against oxidation processes – A comprehensive review

J.A. Vellido-Perez^{a,*}, J.M. Ochando-Pulido^b, E. Brito-de la Fuente^b, A. Martínez-Ferez^a

^a Department of Chemical Engineering, Faculty of Sciences, University of Granada, Avenue Fuente Nueva s/n, 18071 Granada, Andalucía, Spain

^b Innovation & Development Centers China & Germany Business Unit Parenteral Nutrition, Ketonaologies & IV Fluids Pharmaceuticals & Devices Division, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Siemensstraße 27, D-61352 Bad Homburg, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:
Bioactive lipid
Omega-3
PUFA
Emulsion
Stability
Lipid oxidation

ABSTRACT

Over recent decades, the therapeutic properties and health beneficial effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids (omega-3 PUFAs) have been identified. These also contain a number of double bonds which make them highly reactive and, as a consequence, they are susceptible to oxidation. This is one of the main limitations when incorporating them into food matrices. This review article presents the state-of-the-art on the preparation of simple or multiple omega-3 PUFA-based lipid emulsions and other novel systems that have been developed, such as self-assembling systems or solid lipid nanoparticles. Furthermore, the main factors that impact lipid oxidation rate are comprehensively reviewed, highlighting the importance of proteins for increasing the physical stability of food emulsions. Currently, there are several works focused on simple emulsions enriched with omega-3 PUFAs that seek the definition of strategies to allow the control of lipid oxidation. Multiple emulsions and other novel systems are beginning to be considered as a possible alternative to conventional emulsions. This knowledge can be used to facilitate selection of the most appropriate system for the food industry.

1. Therapeutic properties of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids

Thanks to their beneficial effects on health, lipids, in particular polyunsaturated fatty acids, are amongst the bioactive compounds (functional ingredients) to receive greatest attention, both in qualitative and quantitative terms. This is because of their interesting potential for design and development of healthier products in food industry (Jiménez-Colmenero, 2013a). Among the different polyunsaturated fatty acids, those of the omega-3 series – comprising α -linolenic acid (ALA; 18:3 ω -3), eicosapentaenoic acid (EPA; 20:5 ω -3) and docosahexaenoic acid (DHA; 22:6 ω -3) – stand out because of their important roles in health promotion and disease risk reduction (Stalinski & Ambigaipalan, 2018).

During the last four decades, hundreds of studies have reported the potential therapeutic effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids (omega-3 PUFAs) in the prevention of cardiovascular diseases (atrial fibrillation), circulatory system disorders (atherosclerosis, inflammation, thrombosis) and heart failure (sudden cardiac death) (Bucher,

Hengstler, Schindler, & Meier, 2002; Elagzi et al., 2018; Filion et al., 2010; Mohi, Palacios, Bell, & Totli, 2017; Mami & Varon, 2009; Musa-Veloso et al., 2011).

Although greatest attention has been focused on their effects on the cardiovascular system, other possible physiological effects and/or therapeutic properties are currently being explored. Over the past decade a large amount of research comprised of experimental and epidemiological studies, have been carried out to explore the different health benefits of omega-3 PUFAs. For example, higher fetal omega-3 PUFAs levels have been found to be related to better cognitive and neurological development in newborns (Dijk-Brouwer et al., 2005; Harris & Buack, 2015). This seems to be related to the singular structural properties of the DHA molecule, which appear to provide optimal conditions for a wide range of cell membrane functions, especially in grey matter (Brubaker, 2011). Other studies have also associated a lower intake of omega-3 PUFAs with an increased risk of dementia and with age-related cognitive decline, especially in the case of Alzheimer's disease, although some authors have not obtained conclusive results in this respect (Cadenbols & Palmblad, 2010; Cole, Ma, & Frautschy, 2009).

* Corresponding author.

E-mail address: jvellido@ugr.es (J.A. Vellido-Perez).

<https://doi.org/10.1016/j.fostr.2021.100175>

Received 24 February 2020; Received in revised form 31 December 2020; Accepted 2 January 2021

Available online 9 January 2021

2213-3291/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1 **Novel emulsions–based technological approaches**
2 **for the protection of omega–3 polyunsaturated**
3 **fatty acids against oxidation processes – A**
4 **comprehensive review**

5
6 J.A. Vellido-Perez^{1,*}, J.M. Ochando-Pulido¹, E. Brito-de la Fuente², A. Martinez-Ferez¹

7
8 ¹ Department of Chemical Engineering, Faculty of Sciences, University of Granada,
9 18071 Granada, Spain

10 ² Innovation & Development Center, CF&PT, Pharmaceuticals Division, Fresenius
11 Kabi Deutschland GmbH, Rathausplatz 12, D-61352 Bad Homburg, Germany

12
13 **Highlights**

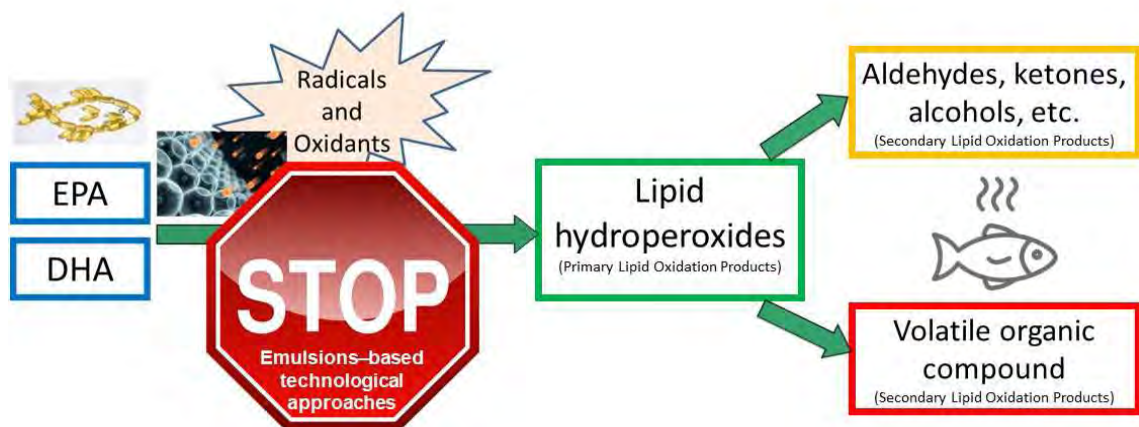
- 14 • Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids need to be protected against lipid
15 oxidation
16 • Different PUFA-Based Lipid Emulsions and other novel systems have been
17 developed
18 • The main factors that impact the lipid oxidation rate are comprehensively
19 reviewed

* Corresponding author.
E-mail address: javellido@ugr.es (J.A. Vellido-Perez).

20 **Abstract**

21 Over recent decades, the therapeutic properties and health beneficial effects of
22 omega-3 polyunsaturated fatty acids (omega-3 PUFAs) have been identified. These also
23 contain a number of double bonds which make them highly reactive and, as a
24 consequence, they are susceptible to oxidation. This is one of the main limitations when
25 incorporating them into food matrices. This review article presents the state-of-the-art
26 on the preparation of simple or multiple omega-3 PUFA-based lipid emulsions and
27 other novel systems that have been developed, such as self-assembling systems or solid
28 lipid nanoparticles. Furthermore, the main factors that impact lipid oxidation rate are
29 comprehensively reviewed, highlighting the importance of proteins for increasing the
30 physical stability of food emulsions. Currently, there are several works focused on
31 simple emulsions enriched with omega-3 PUFAs that seek the definition of strategies to
32 allow the control of lipid oxidation. Multiple emulsions and other novel systems are
33 beginning to be considered as a possible alternative to conventional emulsions. This
34 knowledge can be used to facilitate selection of the most appropriate system for the
35 food industry.

36 **Graphical abstract**



37

38 *Keywords:* Bioactive lipid; Omega-3; PUFA; Emulsion; Stability; Lipid
39 oxidation

40

41 **1. Therapeutic properties of dietary omega-3 polyunsaturated** 42 **fatty acids**

43 Thanks to their beneficial effects on health, lipids, in particular polyunsaturated
44 fatty acids, are amongst the bioactive compounds (functional ingredients) to receive
45 greatest attention, both in qualitative and quantitative terms. This is because of their
46 interesting potential for design and development of healthier products in food industry
47 (Jiménez-Colmenero, 2013b). Among the different polyunsaturated fatty acids, those of
48 the omega-3 series – comprising α -linolenic acid (ALA; 18:3 ω -3), eicosapentaenoic
49 acid (EPA; 20:5 ω -3) and docosahexaenoic acid (DHA; 22:6 ω -3) – stand out because
50 of their important roles in health promotion and disease risk reduction (Shahidi &
51 Ambigaipalan, 2018).

52 During the last four decades, hundreds of studies have reported the potential
53 therapeutic effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids (omega-3 PUFAs) in the
54 prevention of cardiovascular diseases (atrial fibrillation), circulatory system disorders
55 (atherosclerosis, inflammation, thrombosis) and heart failure (sudden cardiac death)
56 (Bucher, Hengstler, Schindler, & Meier, 2002; Marik & Varon, 2009; Filion et al.,
57 2010; Musa-Veloso et al., 2011; Maki, Palacios, Bell, & Toth, 2017; Elagizi et al.,
58 2018).

59 Although greatest attention has been focused on their effects on the
60 cardiovascular system, other possible physiological effects and/or therapeutic properties

61 are currently being explored. Over the past decade a large amount of research comprised
62 of experimental and epidemiological studies, have been carried out to explore the
63 different health benefits of omega-3 PUFAs. For example, higher fetal omega-3 PUFAs
64 levels have been found to be related to better cognitive and neurological development in
65 newborns (Dijck-Brouwer et al., 2005; Harris & Baack, 2015). This seems to be related
66 to the singular structural properties of the DHA molecule, which appear to provide
67 optimal conditions for a wide range of cell membrane functions, especially in grey
68 matter (Bradbury, 2011). Other studies have also associated a lower intake of omega-3
69 PUFAs with an increased risk of dementia and with age-related cognitive decline,
70 especially in the case of Alzheimer's disease, although some authors have not obtained
71 conclusive results in this respect (Cole, Ma, & Frautschy, 2009; Cederholm &
72 Palmblad, 2010). Thus, omega-3 PUFAs are essential fatty acids necessary from
73 conception, throughout pregnancy, during infancy and, doubtless, throughout life.

74 In contrast, recent studies have found important evidence that omega-3 PUFAs
75 contribute to the reduction of inflammation levels in both healthy individuals and in
76 people exhibiting features of metabolic syndrome (Robinson & Mazurak, 2013; Li,
77 Huang, Zheng, Wu, & Li, 2014; Serhan & Levy, 2018). Precisely, due to their
78 hypolipemic and anti-inflammatory effects, omega-3 PUFAs could exert beneficial
79 effects when treating diseases such as rheumatoid arthritis – a chronic inflammatory
80 autoimmune disease. Indeed, evidence has been found of a moderate benefit of omega-3
81 PUFAs on “joint swelling and pain, duration of morning stiffness, global assessments of
82 pain and disease activity” (Miles & Calder, 2012). Although the role of omega-3
83 PUFAs in the control of chronic diseases is somewhat controversial, important studies
84 demonstrate that consumption of diets rich in omega-3 PUFAs exert beneficial effects

85 in the prevention of diseases such as metabolic syndrome, type 2 diabetes and obesity.
86 In these cases, omega-3 PUFAs activate peroxisome proliferator-activated alpha
87 receptors (PPAR α) by stimulating lipid oxidation and decreasing insulin resistance and
88 hepatic steatosis (Lalia & Lanza, 2016). Omega-3 PUFAs have also demonstrated
89 beneficial effects in relation to other types of ailments, for instance reducing the
90 frequency, severity, and duration of migraines (Maghsoumi-Norouzabad, Mansoori,
91 Abed, & Shishehbor, 2018). Moreover, these PUFAs have long been studied for their
92 therapeutic potential in the context of autism, attention-deficit/hyperactivity disorder,
93 dyslexia, and other developmental disabilities, where it has been concluded that omega-
94 3 PUFAs offer a promising approach to complement standard treatments (Richardson,
95 2006). In addition, there is some evidence that omega-3 PUFAs impact upon mental
96 health (Perica & Delaš, 2011) and that EPA and DHA act as anti-depressive agents
97 which causes structural changes in the brain, including a reduction in the lateral
98 ventricular volume and a reduction in the neuronal PL turnover. Several
99 epidemiological studies have associated a higher intake of fish with a lower risk of
100 depression, whilst others studies report that EPA is more effective than DHA in the
101 treatment of this disease (Nemets, Nemets, Apter, Bracha, & Belmaker, 2006).

102 Furthermore, researchers have hypothesized that increased consumption of
103 omega-3 PUFAs might reduce the risk of cancer due to their anti-inflammatory effects
104 and their potential to inhibit cell growth factors. Several clinical studies have shown that
105 suppression of nuclear factor- κ B, modulation of cyclooxygenase (COX) activity,
106 activation of AMPK/SIRT1, and up-regulation of novel anti-inflammatory lipid
107 mediators such as protectins, maresins, and resolvins, are the main mechanisms of the
108 antineoplastic effect of omega-3 PUFAs (Greene, Huang, Serhan, & Panigrahy, 2011;

109 Huerta-Yépez, Tirado-Rodríguez, & Hankinson, 2016; Sulciner et al., 2018). In patients
110 who already have cancer, some research papers suggest that certain omega-3 PUFAs,
111 alone or in combination with chemotherapeutic drugs, exert tumoricidal actions and
112 improve the cytotoxic action of anticancer agents specifically on drug-resistant tumour
113 cells (Das & Madhavi, 2011). Omega-3 PUFAs have also been shown to affect several
114 types of cancer such as breast, colon, colorectal, lung, ovarian, pancreatic, prostate, skin
115 and stomach cancers (Gerber, 2009, 2012; Shahidi & Ambigaipalan, 2018). In addition
116 to this, omega-3 PUFAs have been reported to improve the tolerability and efficacy of
117 chemotherapy, as well as improving quality of life (Mocellin, Camargo, Fabre, &
118 Trindade, 2017). In patients with cancer cachexia, supplementation with omega-3
119 PUFAs is associated with improved biological, clinical, functional and quality of life
120 parameters (Colomer et al., 2007; Werner et al., 2017).

121 In summary, the key therapeutic properties of omega-3 PUFAs make them stand
122 out as important components of a well-balanced diet. Despite this, the enrichment of
123 food products with these types of ingredients is not a simple task as many of them are
124 highly susceptible to oxidation and may, therefore, lose their therapeutic properties.
125 Therefore, the ongoing search for strategies which enable control of lipid oxidation is of
126 paramount importance and will be reviewed in the present paper.

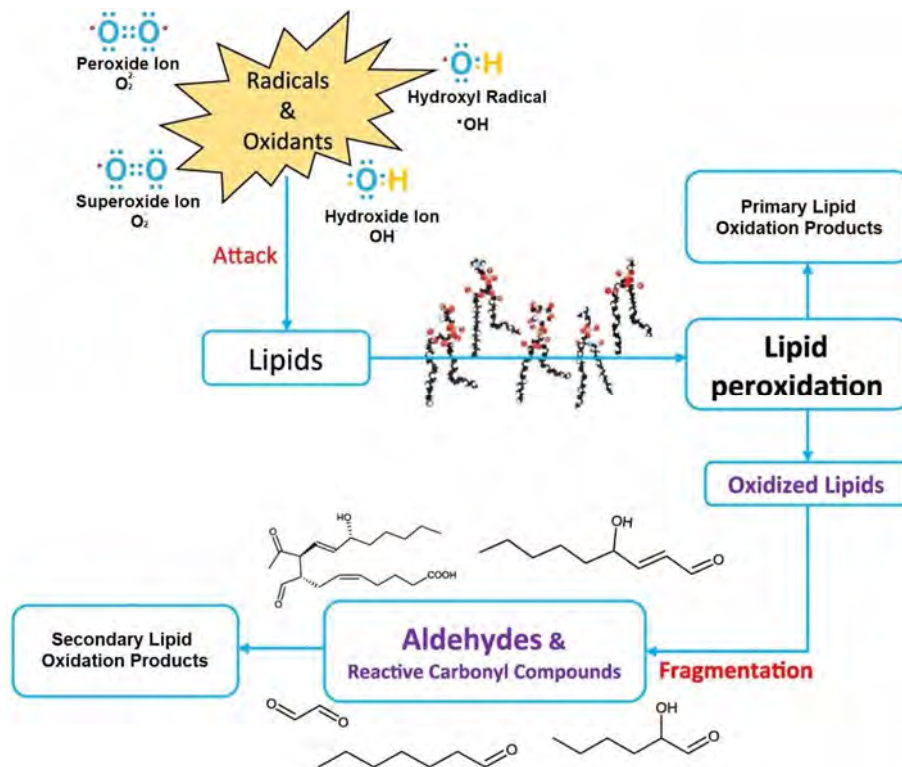
127

128 **2. Lipid oxidation of omega-3 polyunsaturated fatty acids**

129 The term *lipid oxidation* refers to a highly complex series of chemical reactions
130 which take place between unsaturated lipids and oxygen, and ultimately leads to the
131 formation of a complex mixture of reaction products, including aldehydes and ketones,

132 alcohols and hydrocarbons (Figure 1). Lipid oxidation is one of the most important and
133 common mechanisms of (chemical) instability in food products containing lipids
134 (McClements, 2015). It is also the most important cause of deterioration and quality loss
135 in PUFA-based lipid products (Coupland & McClements, 1996). As a result, lipid
136 oxidation is a huge problem for the food industry since it impairs appearance, taste,
137 texture, nutritional profile and shelf-life. It also promotes undesirable “off-flavours”
138 (rancid smell), potentially toxic reaction products and, ultimately, leads to unstable food
139 products (it could even lead to the physical instability of certain emulsions containing
140 PUFAs) (Kargar, 2014; McClements, 2015; Coupland & McClements, 1996). In
141 summary, lipid oxidation presents a serious handicap for the food industry, which is
142 therefore committed to investigating novel techniques for avoiding or, at least, delaying
143 its occurrence in food products.

144 *Figure 1. Lipid Oxidation Process.*



145

146 Although lipid hydroperoxides are the primary lipid oxidation products, they are
147 not the primary cause of off-flavour and rancidity in food products. Lipid
148 hydroperoxides are unstable and they can easily decompose into a wide variety of
149 volatile and non-volatile low-molecular-weight compounds (known as secondary lipid
150 oxidation products), such as aldehydes, ketones, alcohols, and hydrocarbon compounds.
151 These secondary lipid oxidation products are more stable than lipid hydroperoxides and
152 are responsible for (fishy) off-flavours and off-odours (Kargar, 2014). Environmental
153 factors such as light, heat and oxygen concentration, and factors intrinsic to the system
154 itself, such as the chemical structure of lipids, and the presence of antioxidants or pro-
155 oxidants drastically influence the rate of lipid oxidation. This undesirable process is so
156 influential that extensive research has been promoted in this area over recent years
157 (McClements, 2015).

158 The food industry has been looking for a feasible and reliable formulation to
159 include these marine omega-3 rich oils in food matrices. Emulsions, in their different
160 variants (simple, multiple, etc.), are among the most promising technological processes
161 used to design and develop functional foods of this type (Fustier, Taherian, &
162 Ramaswamy, 2010; Kargar, 2014).

163

164 **3. Different systems for the vehiculization and protection of** 165 **omega-3 polyunsaturated fatty acids against lipid oxidation**

166 Over recent decades, research efforts have been devoted towards developing
167 different stable aqueous systems for better protection and improved vehiculization of
168 omega-3 PUFAs against lipid oxidation. Amongst all of these developed systems, the

169 various forms of emulsion systems stand out for their importance. Below are some
170 examples of various types of these systems tested, including simple and multiple
171 emulsions, liposomes, self-assembling emulsions and solid lipid nanoparticles
172 emulsions.

173

174 **3.1. PUFA-based lipid emulsions**

175 In this review, the term “PUFA-based lipid emulsions (PUFAs BLEs)” refers to
176 those emulsions containing a dispersed phase enriched by PUFAs. PUFAs BLEs have
177 been classified into two broad groups as a function of the number of liquid immiscible
178 phases included: *simple* emulsions and *multiple* emulsions (Pal, 2011). Next, some of
179 the other systems used will be briefly discussed.

180 **3.1.1. Simple PUFA-based lipid emulsions**

181 In recent years, different systems have been proposed for the delivery of
182 hydrophilic and hydrophobic bioactive compounds in foods and beverages (Flaiz et al.,
183 2016). In this context, O/W emulsions have been widely employed in the food industry
184 for the protection and release of hydrophobic compounds, including antioxidants and
185 omega-3 fatty acids (Lee et al., 2006; McClements, Decker, & Park, 2009).

186 One of the main advantages of simple PUFAs BLEs is that they allow the
187 incorporation of an oil phase enriched in omega-3 PUFAs and an aqueous phase, into
188 the same product. In combining two different phases, they permit the easy incorporation
189 of both oil-soluble compounds and water-soluble compounds. For example, Sugasini
190 and Lokesh (2017) studied the design of a PUFAs enriched-phospholipid based
191 nanoemulsion containing curcumin (an oil-soluble bioactive compound). They reported

192 increased bioavailability with respect to free curcumin and also found that this
193 nanoemulsion improved DHA serum levels. In addition, since the phase that occurs at a
194 greater sensory intensity also makes up the external phase of the simple emulsion, these
195 systems allow off-flavours and off-odours of fish oil to be partially masked by
196 incorporating flavorings, sweeteners and masking agents in the external aqueous phase
197 (Jeyakumari, Janarthanan, Chouksey, & Venkateshwarlu, 2016). When considering
198 their main limitations, it should be noted that simple PUFAs BLEs are not
199 thermodynamically stable and, therefore, have an expiration date that varies as a
200 function of the quality of the emulsion design. This being said, physical instability will
201 always be a factor that must be taken into account as its presence in these types of
202 systems is unavoidable. As a consequence, a large effort has been dedicated to studying
203 the different mechanisms that lead to the eventual breakdown of a simple emulsion:
204 gravitational separation (creaming/sedimentation), flocculation, coalescence, partial
205 coalescence and Ostwald ripening. To this end, other studies such as that conducted by
206 Dey, Banerjee, Chatterjee, and Dhar (2018), have studied the design of omega-3 PUFA-
207 enriched biocompatible nanoemulsions. Furthermore, addition of certain amounts of
208 emulsifier is essential for formation of the emulsion itself. In most cases and depending
209 on the emulsifier used, this produces a rather unpleasant taste and can sometimes
210 modify the physical properties of the emulsion. Finally, formation of the system also
211 requires it to be subjected to aggressive external conditions. This is another important
212 limitation since it usually leads to considerable increases in the temperature of the
213 system which can degrade thermolabile components, accelerate oxidation reactions and
214 so on.

215 Many examples of simple PUFAs BLEs can be found in the scientific literature.
216 Traditionally, the vast majority of studies have used fish oil as a source of omega-3
217 PUFAs when making their simple PUFAs BLEs (García-Moreno, Guadix, Guadix, &
218 Jacobsen, 2016). However, over recent years, the scientific community has been trying
219 to find alternative sources of fish oil to incorporate omega-3 into products. As a result,
220 more and more studies on simple PUFAs BLEs are appearing in which other sources of
221 omega-3 are being used (algal, chia seed, flaxseed, canola or perilla seed oils, for
222 example) (Cofrades et al., 2011). Further, different emulsifiers have also been tested to
223 make simple PUFAs BLEs: lecithin (Santhanam, Lekshmi, Chouksey, Tripathi, &
224 Gudipati, 2015), Tween 80 (Uluata, McClements, & Decker, 2015), citrem (Ghelichi,
225 Sørensen, García-Moreno, Hajfathalian, & Jacobsen, 2017), sodium caseinate (Karadağ
226 et al., 2017), whey protein (Owens, Griffin, Khouryeh, & Williams, 2018), amongst
227 others. Simple PUFAs BLEs can be found both with and without added antioxidants
228 (Mbatia, Kaki, Mattiasson, Mulaa, & Adlercreutz, 2011), and both with and without
229 added stabilizers and thickeners (Chivero, Gohtani, Yoshii, & Nakamura, 2015), etc.
230 Finally, different emulsification methods have been used to make simple PUFAs BLEs:
231 stirring (He et al., 2017), high-speed shearing (principally the rotor-stator machine)
232 (Kristinova, Mozuraityte, Aaneby, Storrø, & Rustad, 2014), high-pressure
233 homogenization (Komaiko, Sastrosubroto, & McClements, 2016), microfluidization
234 (Horn, Nielsen, Jensen, Horsewell, & Jacobsen, 2012), (ultra)sonication (Pazos, Alonso,
235 Sánchez, & Medina, 2008) or combinations of the aforementioned methods (Gadeyne et
236 al., 2015), when performing testing in different operating conditions. Table 1 briefly
237 summarizes some phases compositional information published during the last decade

238 for a selection of simple PUFAs BLEs, alongside some examples of previous
239 compilations.

Table 1. Phases compositional information for a selection of simple PUFAs BLEs.

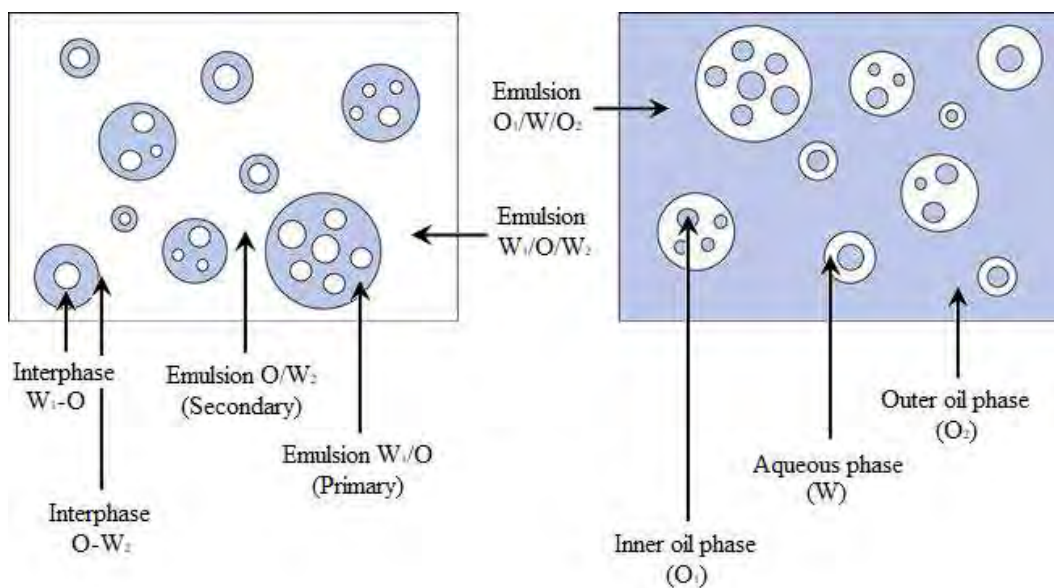
Type	Dispersed phase	Continuous phase	Emulsification method	Reference
O/W	Flaxseed oil, O:W = 12.5:87.5	Distilled water containing different amounts of whey protein concentrate (WPC-80), sodium caseinate, lactose and ascorbyl palmitate as antioxidant	Low-pressure homogenization (20 LPH, pressure = 69 bar) followed by high-pressure homogenization (20 LPH, pressure = 241.31 bar)	Goyal et al. (2015)
O/W	Flaxseed oil and fish oil, O:W = 10:90	Water containing 0-3 % (w/w) sodium caseinate, 0-0.3 % (w/w) oat β -glucan and 0.04 % (w/w) sodium azide	Pre-emulsification with a Polytron homogenizer at 14000 rpm for 2 min followed by high-pressure homogenization with a Panda 2K homogenizer (2-stages, pressure = 80 and 8 MPa)	Liu, Singh, Wayman, Hwang, & Phaner (2015)
O/W	Menhaden oil, O:W = 20:80	Deionized water containing 2 % (w/v) whey protein isolate, 0-0.3 % (w/v) gums (xanthan gum, guar gum and enzymatic modified guar gum) and 0.05 % sodium azide	Rotor-stator homogenization using PowerGen 500 at 30000 rpm for 5 min followed by ultrasound homogenization using VWR sonicator for 1 min	Chityala, Khouryieh, Williams, & Conte (2016)
O/W	Fish oil, O:W = 10-50:90-50	Aqueous solution composed of buffer solution (5 mM sodium phosphate, pH 7.0) and emulsifier (Tween 80, rhamnolipids or quillaja saponins) keeping the emulsifier-to-oil ratio fixed at 1:10	High-pressure homogenization using Microfluidics PureNano (pressure = 13 kpsi)	Liu et al. (2016)
O/W	Fish oil containing Span 80, O:W = 5:95	Water containing Tween 80 (different emulsifier-to-oil ratios 0.5-1.5)	Pre-emulsification with a Heidolph Silent Crusher at 20000 rpm for 5 min followed by ultrasound homogenization with a Hielscher UP 200H for 10 min	Nejadmansouri, Hosseini, Niakosari, Yousefi, & Golmakani (2016)
O/W	Corn oil, MCT, fish oil or lemon oil, O:W = 10:90	Aqueous solution composed by buffer solution (10 mM sodium phosphate, pH 7.0) and 0.1-5.0 wt.% polysaccharide (gum arabic, corn fiber gum or beet pectin)	Pre-emulsification using a high shear mixer for 2 min followed by high-pressure homogenization using an air-driven microfluidizer (3-stages, pressure = 62-130 MPa)	Bai, Huan, Li, & McClements (2017)
O/W	Fish oil, O:W = 5:95	Aqueous solution composed by buffer solution (5 mM potassium phosphate, pH 7.0) and 2.5 wt.% β -cyclodextrin or octenyl succinimodified β -cyclodextrin	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax at 24000 rpm for 3 min followed by high-pressure homogenization with a Nano DeBEE homogenizer (3-stages, pressure = 50 MPa)	Cheng et al. (2017)
O/W	Fish oil or Miglyol 812 N mixed with rosemary extract (10 wt.%), O:W = 10:90	Aqueous solution composed by buffer solution (10 mM sodium phosphate, pH 5.0), 2 % (w/w) Tween 80	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T10 at 24000 rpm for 5 min followed by high-pressure homogenization with an EmulsiFlex-C3 homogenizer (5-stages, pressure = 1500 bar)	Erdmann, Lautenschlaeger, Zeeb, Gibis, & Weiss (2017)

O/W	Algae oil, O:W = 10:90	Aqueous solution composed of buffer solution (10 mM sodium phosphate, pH 7) and 0.25-5 % (w/w) protein concentrate (pea, lentil and faba bean)	Pre-emulsification with a M133/1281-0 mixer at 10000 rpm for 2 min followed by high-pressure homogenization with a PureNano Microfluidizer (3-stages, pressure = 10000 psi)	Gumus, Decker, & McClements (2017)
O/W	Weighted amounts of fish oil and carrier oil (MCT, lemon oil or thyme oil), O:W = Not described	Aqueous solution composed by buffer solution (0.8 % citric acid, 0.08 % sodium benzoate, pH 3.0) and 1.5 wt.% Tween 80	Pre-emulsification with a Bamix ESGE Ltd mixer for 2 min followed by high-pressure homogenization with a Microfluidics M-110P (5-stages, pressure = 20000 psi)	Walker, Gumus, Decker, & McClements (2017)
O/W	Fish oil, O:W = 1:99	Aqueous solution composed by buffer solution (5 mM phosphate, pH 7.0), 0.3 wt.% protein (hydrolyzed rice glutelin), 0.1 wt.% polysaccharide (pectin or xanthan gum) and 0.005 wt.% sodium azide	Pre-emulsification with a M133/1281-0 mixer for 2 min followed by high-pressure homogenization with a M110Y Microfluidizer (3-stages, pressure = 12000 psi)	Xu, Liu, Luo, Liu, & McClements (2017)
O/W	Fish oil, O:W = 10:90	Water containing 1 % (w/w) thiol-modified β -lactoglobulin fibrils, 0-0.5 % (w/w) chitosan and 15 % (w/w) maltodextrin	Pre-emulsification with a Silverson L4R homogenizer at 7500 rpm for 5 min followed by high-pressure homogenization with a Panda 2K homogenizer (3-stages, pressure = 750 bar)	Chang et al. (2018)
O/W	Chia seed oil, O:W = 5:95	Aqueous solution composed of buffer solution (98 mM acetic acid, 2 mM sodium acetate, pH 3.0), 1 wt.% emulsifier (phosphatidylcholine-enriched lecithin or deoiled lecithin), 0.2 wt.% powdered chitosan, 20 wt.% maltodextrin, 0.0012 wt.% nisine and 0.1 wt.% potassium sorbate	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T25 at 10000 rpm for 2 min followed by high-pressure homogenization with a Panda 2K (4-stages, pressure = 600 bar)	Julio, Copado, Diehl, Ixtaina, & Tomás (2018)
O/W	Menhaden oil, O:W = 10:90	Deionized water containing 2 % (w/v) whey protein isolate, 0.1 % (w/v) polysaccharides (xanthan gum or locust bean gum) and 0.04 % (w/v) sodium azide	Rotor-stator homogenization using PowerGen 500 homogenizer at 30000 rpm for 6 min	Owens, Griffin, Houryeh, & Williams (2018)
O/W	Cod liver oil, O:W = 50-70:50-30	Distilled water containing different amounts of sodium caseinate (CAS) and phosphatidylcholine (PC) (total CAS + PC content = 1.4, 2.1 and 2.8 % (w/w); ratio of CAS to PC = 0.4, 1.2 and 2.0 (w/w)) and 0.05 % (w/w) sodium azide	Pre-emulsification with a Stephan Universal mixer at 1200 rpm for 3 min followed by an emulsification for additional 2 min \times 2 min under reduced pressure (approximately 40 kPa)	Yesiltas, García-Moreno, Sørensen, Akoh, & Jacobsen (2019)

242 3.1.2. Multiple PUFA-based lipid emulsions

243 The use of multiple PUFAs BLEs within the food sector may offer interesting
244 possibilities. *Multiple* PUFAs BLEs (also called *double emulsions*, *duplex emulsions* or
245 *emulsions of emulsions*) are multi-compartmentalized systems, characterized by the
246 coexistence of two simple emulsions: water-in-oil (W/O) and oil-in-water (O/W), in
247 which the droplets of the dispersed phase are smaller and more equally dispersed (Garti,
248 1997). This singular structure poses a number of advantages: it provides a potentially
249 useful strategy for producing reduced fat and low-calorie products, it prevents oxidation
250 and enhances the sensorial properties of foods, it masks flavours, and controls and
251 protects the delivery of sensitive ingredients during the processing and preservation of
252 food products, or even the action of certain enzymatic activity after ingestion. These
253 PUFA-based lipid systems can also be used in food, taking advantage of the external
254 aqueous phase that is more acceptable in terms of palatability (Dickinson, 2011;
255 Kukizaki & Goto, 2007).

256 *Figure 2. Structure of water-in-oil-in-water and oil-in-water-in-oil PUFAs BLEs.*



257

258 There are two main types of multiple PUFAs BLEs. The most common form is
259 water-in-oil-in-water (W/O/W) PUFAs BLEs, although oil-in-water-in-oil (O/W/O)
260 PUFAs BLEs can also be employed in some applications. Water-in-oil-in-water PUFAs
261 BLEs consists of tiny water droplets (W1) dispersed inside fat droplets – PUFA
262 enriched oils – (O), which are, in turn, dispersed in a continuous aqueous phase (W2)
263 (Figure 2). As a result, a system (W1/O/W2) consisting of three phases is formed, two
264 aqueous phases (one outer and another inner, normally with different compositions) and
265 a lipid phase enriched in PUFAs. The lipid phase is located between the aqueous phases
266 and the two are separated from each other by two types of interfaces which are
267 stabilized by means of emulsifiers: one hydrophobic (or lipophilic), designed to
268 stabilize the interface of the internal emulsion (W1/O) and another hydrophilic, to
269 stabilize the outer interface of the PUFA-enriched fat globules (for W1/O/W2 PUFAs
270 BLE) (Jiménez-Colmenero, 2013a).

271 As already mentioned, multiple PUFAs BLEs have potential advantages over
272 simple PUFAs BLEs. These include delivery systems for bioactive compounds,
273 although these are generally more appropriate for encapsulation, vehiculization,
274 protection, and delivery of hydrophilic compounds (McClements, Decker, & Weiss,
275 2007). Due to their characteristics, including the capacity to hold and protect certain
276 components and control their release from one phase to another, these PUFAs BLEs
277 have been used as a means of microencapsulation in food and clinical nutrition
278 (encapsulation of essential fatty acids and omega-3 polyunsaturated fatty acids),
279 pharmacology (carriers for anticancer agents and other active ingredients), cosmetics
280 (improving the application of creams with encapsulated compounds) and in other
281 industrial applications (Benichou, Aserin, & Garti, 2004; Kukizaki & Goto, 2007;

282 Muschiolik, 2007). Multiple PUFAs BLEs offer a promising means of preparing micro-
283 and nano- capsules (solids or semisolids) which can contain specific lipophilic and
284 hydrophilic compounds (Benichou, Aserin, & Garti, 2004). Despite this potential, there
285 are still few examples of multiple PUFAs BLEs currently used in food products. The
286 main reason is that multiple PUFAs BLEs are highly susceptible to breakage during
287 storage or when subjected to extreme environmental conditions often found in the food
288 industry. The stability of simple PUFAs BLE is more simply determined than that of
289 multiple PUFAs BLEs (Jiao, Rhodes, & Burgess, 2002). Several instability mechanisms
290 are responsible for the breakdown of multiple PUFAs BLE. Some of these are similar to
291 those of found in simple PUFAs BLEs, whilst others are exclusive to multiple PUFAs
292 BLEs (for example, the non-equilibrium between the internal and external aqueous
293 phases could produce destabilization of the system) (Jiao, Rhodes, & Burgess, 2002).

294 In the scientific literature, there are some examples of multiple PUFAs BLEs.
295 However, due to the complexity of these types of emulsions, investigation into them has
296 only been initiated recently and, consequently, only a small number of studies are
297 identified. Comunian, Ravanfar, Dando, Favaro-Trindade, and Abbaspourrad (2017)
298 and Flaiz et al. (2016) reviewed the most recent studies on W/O/W multiple PUFAs
299 BLEs, using echium seed oil and perilla oil as a source of omega-3. Table 2 contains the
300 compositional information for a selection of multiple PUFAs BLEs published during the
301 last decade, alongside relevant examples taken from previous research.

Table 2. Phases compositional information on a selection of multiple PUFAs BLEs.

302

Type	Inner phase	Middle phase	Primary emulsification method	Continuous phase	Secondary emulsification method	Reference
O/W/O	Cod liver oil stabilized with tocopherols; O1:W = 20:80	Distilled water containing 6 wt.% sodium caseinate	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax T18 at 20000 rpm for 10 min	[Dispersed phase: 50 wt.% primary emulsion and 50 wt.% lactose monohydrate (14 wt.%)] Extra virgin olive oil containing 50 wt.% polyglycerol polyricinoleate (PGPR); Dispersed phase: O2 = 62.5:37.5	Stir using a magnetic stirrer	Jiménez-Martín, Gharsallaoui, Pérez-Palacios, Ruiz, & Antequera (2015); Jiménez-Martín, Antequera, Gharsallaoui, Ruiz, & Pérez-Palacios (2016)
W/O/W	Water containing 0.50 mg/mL phenolic compound (sinapic acid or rutin); W1:O = 1:2	Echium seed oil containing 0.5 wt.% polyglycerol ricinoleic acid (PGPR 90)	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax at 12000 rpm for 4 min	Aqueous solution composed by 7.5 wt.% polymers (gelatin and arabic gum, ratio 1:1); (W1/O): W2 = 50-100:50-0	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax at 10000 rpm for 3 min	Comunian, Boillon, Thomazini, Nogueira, & Favaro-Trindade (2016)
W/O/W	Distilled water containing 0.584 % (w/v) NaCl, 0.04 % (w/v) sodium azide and 0.375 % (w/v) hydroxytyrosol; W1:O = 20:80	Perilla oil containing 6 % (w/w) PGPR	Pre-emulsification with a Thermomix food processor TM-31 at 3250 rpm for 15 min followed by high-pressure homogenization with a Panda Plus 1000 homogenizer (2-stages, pressure = 55 and 7 MPa)	Distilled water containing 0.5 % (w/v) sodium caseinate, 0.584 % (w/v) NaCl and 0.04 % (w/v) sodium azide; (W1/O):W2 = 40:60	Pre-emulsification with a Thermomix food processor TM-31 at 700 rpm followed by high-pressure homogenization with a Panda Plus 1000 homogenizer (2-stages, pressure = 15 and 3 MPa)	Flaiz et al. (2016)
O/W/O	Echium oil with and without added antioxidant (500 and 800 ppm quercetin)	Sodium alginate aqueous solution with and without added antioxidant (0.025 and 0.050 g/g sinapic acid)	Microfluidic homogenization or gelation homogenization	Corn oil containing 2 % (w/w) soy lecithin	Microfluidic homogenization or gelation homogenization	Comunian, Ravanfar, Dando, Favaro-Trindade, & Abbaspourrad (2017)

W/O/W	Distilled water containing 0.584 % (w/v) NaCl, 0.125 % (w/v) hydroxytyrosol and 0.04 % (w/v) sodium azide; W1:O = 20:80	Perilla oil containing 6 % (w/w) PGPR	High-pressure homogenization with a Panda Plus 2000 homogenizer (2-stages, pressure = 7 and 55 MPa)	Distilled water containing 0.5 % (w/v) sodium caseinate, 0.584 % (w/v) NaCl and 0.04 % (w/v) sodium azide; (W1/O):W2 = 40:60	High-pressure homogenization with a Panda Plus 2000 homogenizer (2-stages, pressure = 3.5 and 15 MPa)	Freire, Bou, Cofrades, & Jiménez-Colmenero (2017)
W/O/W	Distilled water containing 0.584 % (w/v) NaCl and 0.375 % (w/v) hydroxytyrosol; W1:O = 20:80	Perilla oil containing 6 % (w/w) PGPR	Pre-emulsification with a Thermomix food processor at setting 6 for 15 min followed by high-pressure homogenization with a Panda Plus 2000 homogenizer (2-stages, pressure = 55 and 7 MPa)	Distilled water containing 0.584 % (w/v) NaCl and 0.04 % (w/v) sodium azide; (W1/O):W2 = 40:60	Pre-emulsification with a Thermomix food processor at setting 3 followed by high-pressure homogenization with a Panda Plus 2000 homogenizer (2-stages, pressure = 15 and 3 MPa)	Cofrades et al. (2017)
W/O/W	Water containing 2 – 225 mg/kg gallic acid and NaCl to prevent diffusion phenomena; W1:O = 20:80	Blend of olive, linseed and fish oils (70:20:10) containing 6 % (w/w) PGPR	Pre-emulsification with a Thermomix food processor at 3250 rpm for 5 min followed by high-pressure homogenization with a Panda Plus 2000 homogenizer (2-stages, pressure = 7977 and 1015 psi)	Water containing 2 – 225 mg/kg quercetin, NaCl to prevent diffusion phenomena and 0.5 % (w/w) sodium caseinate; (W1/O):W2 = 40:60	Pre-emulsification with a Thermomix food processor at 700 rpm for 5 min followed by high-pressure homogenization with a Panda Plus 2000 homogenizer (2-stages, pressure = 2175 and 435 psi)	Silva et al. (2018)
W/O/W	Deionized water containing 0.1 % (w/w) fish protein hydrolysate, 0.033 % (w/w) NaCl and 0.033 % (w/w) vitamin B ₁₂ ; W1:O = 30:70	Fish liver oil containing 6 to 10 % (w/w) PGPR	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax T25 at 20000 rpm for 5 min	Aqueous solutions prepared by adding different whey protein concentrate(40 % w/w)/inulin(3 % w/w) weight ratios, included 1:1, 1.608:1, 2.5:1, 3.39:1 and 4:1; (W1/O):W2 = 2:5	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax T25 at 10000 rpm for 3 min	Jamshidi, Shabanpour, Pourashouri, & Raeisi (2019)

303

304 **3.2. PUFA-based lipid self-assembling systems**

305 A self-assembling system could be defined as a dynamic system composed of
306 different interacting components from which, without the need for external intervention,
307 a completely spontaneous large-scale structure emerges by virtue of the local
308 interactions taking place within its own constituents. The large-scale emergence of this
309 structure does not take place by accident. In fact, if the system were reset to its initial
310 state, the aforementioned structures would likely reappear. Amongst the advantages of
311 the system, it should be noted that the way in which it is formed minimizes the total
312 energy of the system and it is, therefore, usually a reasonably stable system.
313 Nevertheless, it is difficult to find ingredients with self-assembling properties, which
314 limits its practical application. This is the reason why there are very few existing studies
315 on PUFA-based lipid self-assembling systems; however, some will be presented here.
316 Zheng, Liu, Wang, and Baoyindugurong (2011) were the first (to the author's
317 knowledge) to develop self-assembling fish oil microemulsions using exclusively food-
318 grade ingredients and to study their physical properties. From the results obtained, the
319 authors proposed these self-assembling systems as interesting and promising ways to
320 deliver and release fish oil. Some years later, Calligaris, Ignat, Biasutti, Innocente, and
321 Nicoli (2015) synthesized saturated monoglyceride-based self-assembly structures and
322 explored the feasibility of using these structures for the incorporation of omega-3
323 PUFAs into the production of fortified cheese. More recently, Yaghmur, Al-Hosayni,
324 Amenitsch, and Salentinig (2017) and Shao, Bor, Al-Hosayni, Salentinig, and Yaghmur
325 (2018) studied the structural characteristics of self-assemblies based on differently
326 synthesized omega-3 PUFA monoglycerides following excessive exposure to water.

327 They showed that their unique structural properties held promise for future drug and
328 functional food delivery applications.

329

330 **3.3. PUFA-based lipid liposomes**

331 Liposomes (or *lipid vesicles*) are spherical structures composed of at least one
332 lipid bilayer that enclose a number of aqueous or liquid compartments. Due to their
333 particular structure, liposomes have some interesting properties with great potential.
334 Furthermore, different liposomes have characteristics that can be adapted for various
335 applications, especially in the food and pharmaceutical industries. Thus, liposomes have
336 been extensively studied in recent decades as model membranes and drug and nutrient
337 delivery systems, including omega-3 PUFAs. Some of the latest work on the
338 encapsulation of omega-3 PUFAs using liposomes was developed by Ghorbanzade,
339 Jafari, Akhavan, and Hadavi (2017) who effectively encapsulated nano-liposomes
340 containing fish oil. Further, Rasti, Erfanian, and Selamat (2017) prepared nano-
341 liposomes using omega-3 PUFAs and soybean-PLs as liposomal ingredients under
342 previously optimized preparation conditions.

343

344 **3.4. PUFA-based solid lipid nanoparticles**

345 Colloidal particles between 10 and 1000 nm in size are known by the name of
346 nanoparticles. When these nanoparticles are composed of solid lipids, they are referred
347 to as solid lipid nanoparticles (SLNs). Among their main advantages, one that stands out
348 is the chemical protection they provide to the incorporated bioactive compounds,
349 controlling their release for several weeks and improving the bioavailability of the

350 enclosed drug. In recent years, this type of system has become increasingly important,
351 emerging as a possible alternative to encapsulate omega-3 PUFAs and protect them
352 against lipid oxidation. As proof of this we must highlight the works of Salminen,
353 Helgason, Kristinsson, Kristbergsson, and Weiss (2017) and Yang and Ciftci (2017).
354 The former prepared solid lipid nanoparticles using different ratios of tristearin as the
355 carrier lipid and fish oil as the incorporated liquid lipid. The latter developed hollow
356 solid lipid nanoparticles formed from fully hydrogenated soybean oil in order to
357 encapsulate fish oil. Both authors concluded that the oxidative stability of fish oil
358 encapsulated in these types of systems increased significantly when compared to the
359 free fish oil.

360

361 **3.5. Nanostructured PUFA-based lipid carriers**

362 Nanostructured lipid carriers (NLCs) are delivery systems in which partially
363 crystallized lipid particles –with sizes smaller than 100 nm– are dispersed in an aqueous
364 phase containing emulsifiers. If the partially-crystallized lipid is enriched with PUFAs,
365 it creates a useful system for the release of these fatty acids in the body. The main
366 difference between this type of delivery system and that of SLNs is that NLCs combine
367 solid lipid and liquid lipid, i.e. oil, in order to enhance their drug-loading capacity.
368 These systems offer some advantages in comparison to other colloidal carriers: NLCs
369 may improve consumer acceptability, functionality, safety, shelf-life and nutritional
370 value of food systems, improve bioavailability and increase stability of many bioactive
371 compounds, and provide controlled release of encapsulated materials. Similarly to
372 SLNs, this type of delivery system has become increasingly important in recent years as
373 it combines the advantages of other lipid nanocarriers, whilst avoiding some of their

374 disadvantages. As a result, NLCs offer a potential alternative for encapsulating omega-3
375 PUFAs and protecting them against lipid oxidation. Huang, Wang, Li, Xia, and Xia
376 (2017) encapsulated omega-3 PUFA and quercetin-enriched linseed oil into NLCs using
377 a high pressure homogenization method and found a lower lipid oxidation than seen in a
378 conventional linseed oil emulsion. In addition, research on stability has produced
379 positive outcome. Azizi, Kierulf, Connie Lee, and Abbaspourrad (2018) investigated the
380 role of different lipid carriers in echium oil encapsulation. Both studies suggest that
381 NLCs could be a promising vehicle for delivery of hydrophobic bioactive compounds
382 and omega-3 PUFAs within the food industry.

383

384 **4. Prevention of lipid oxidation in omega-3 PUFAs BLEs**

385 Despite the different systems designed and developed for the vehiculization and
386 protection of omega-3 PUFAs, lipid oxidation remains as a major problem and one of
387 the limiting factors when incorporating these compounds within the food industry.
388 Thus, for several years the scientific community has explored different options to
389 prevent or, at least, slow down omega-3 PUFAs lipid oxidation, especially when they
390 are contained within BLEs.

391 Many studies have shown that the ingredients that make up the aqueous phase –
392 and the possible interactions taking place between them – have an important impact on
393 lipid oxidation. Depending on their nature, chemical properties and the environmental
394 conditions in which they are found, these ingredients can act as antioxidants or pro-
395 oxidants. Careful selection of the composition of the aqueous phase will, therefore, be a
396 determining factor of the control of omega-3 PUFA lipid oxidation.

397 When considering all of these ingredients, the importance of proteins which are
398 frequently used to improve the physical stability of food emulsions should be
399 emphasized. The proteins dissolved in the aqueous phase are electrically charged as a
400 function of the pH of the medium and, consequently, attract or repel metal ions,
401 catalysing oxidation reactions. In addition, certain proteins can act as free radical
402 scavengers, transition metal chelators, activating pro-oxidant compounds or, simply,
403 they can have antioxidant properties (as is the case of caseins, for example)
404 (McClements & Decker, 2000). For all of these reasons, a large number of studies exist
405 within the scientific literature targeting the design and development of protein-stabilized
406 O/W emulsions which incorporate functional lipids that are susceptible to oxidation
407 (e.g., omega-3 polyunsaturated fatty acids). Djordjevic, Kim, McClements, and Decker
408 (2004) and Cho, Decker, and McClements (2010) have demonstrated that the oxidative
409 stability of polyunsaturated lipids can be enhanced by integrating them into oil droplets
410 with protein coatings. Djordjevic, McClements, and Decker (2004) concluded that
411 protein-stabilized O/W emulsions with a pH below the isoelectric point of the protein,
412 allows it to positively charge the emulsion droplets and slow lipid oxidation by
413 diminishing iron-lipid interactions. Thus, by controlling the pH of the medium, we can
414 positively and negatively load proteins and, in this way, affect both the physical and
415 chemical stability of PUFAs BLEs. As a result of these findings, many studies on
416 different protein-stabilized O/W emulsions have emerged in recent years. O'Dwyer,
417 O'Beirne, Eidhin, and O'Kennedy (2013) evaluated the impact of sodium caseinate
418 concentration on the chemical stability of O/W emulsions. Both primary and secondary
419 lipid oxidation products of emulsions were found to decrease as sodium caseinate
420 concentration increased. Similarly, sodium caseinate decreased as microfluidization

421 pressure increased. This finding was attributed to the apparent antioxidant effect of
422 sodium caseinate, which interacts with metal ions and scavenges the free radicals
423 present in the aqueous phase. Similar conclusions were drawn by Liu, Singh, Wayman,
424 Hwang, and Fhaner (2015), who developed a physically stable PUFAs BLE using
425 sodium caseinate dispersions and β -glucan rich oat products. These authors found that
426 caseinate typically contributed to a reduction in the oxidation of omega-3 oils, though
427 there was no significant influence of β -glucan on oxidation. Sivapratha and Sarkar
428 (2017) also studied chemical stability and the impact of stress factors on flaxseed O/W
429 emulsions stabilized by a sodium alginate-sodium caseinate-chitosan interfacial
430 membrane. The results showed that the created membrane may be able to act as a
431 physical barrier that separates the lipid phase from pro-oxidants contained in the
432 aqueous phase. This demonstrates the possibilities of interfacial technology for
433 developing an emulsion system with the necessary properties. Not only proteins
434 influence lipid oxidation, protein hydrolysates and amino acids are also influential.
435 García-Moreno, Guadix, Guadix, and Jacobsen (2016) investigated the physicochemical
436 stability of fish O/W emulsions stabilized with fish protein hydrolysates (FPH). Sardine
437 hydrolysates with low degrees of hydrolysis (3 – 4 %) provided the most efficient
438 peptides for producing physically stable emulsions with a smaller droplet size. This
439 involved a greater protein adsorption at the interface enabling it to act as a physical
440 barrier against pro-oxidant compounds, which could also result in a greater oxidative
441 stability of these emulsions. These results demonstrate the possibilities of FPH as
442 alternative protein emulsifiers in the design of chemically stable fish O/W emulsions.
443 Similar results were obtained by Ghelichi, Sørensen, García-Moreno, Hajfathalian, and
444 Jacobsen (2017), who investigated the oxidative stability of O/W emulsions fortified

445 with common carp roe protein hydrolysates (CRPHs). These hydrolysates exhibited
446 antioxidant properties, radical scavenging and chelating activities, all of which slowed
447 lipid oxidation. All of these studies have shown that proteins and their hydrolysates,
448 which are two of the most common ingredients in omega-3 PUFAs BLEs, significantly
449 influence the chemical stability of emulsions. Thus, prior to designing a new emulsion,
450 a detailed study is necessary for selecting the most appropriate protein content for
451 reducing lipid oxidation.

452 Although proteins have potentially been the most studied ingredient, the type
453 and concentration of emulsifier also has a very important role within lipid oxidation.
454 These emulsifiers, which may have an ionic character or not, are amphiphilic in nature
455 and can bind to both polar substances and nonpolar substances, interact with
456 antioxidants or with pro-oxidants and, therefore, impede lipid oxidation. Fomuso,
457 Corredig, and Akoh (2002) investigated the impact of different emulsifiers – comprising
458 Tween 20, lecithin, whey protein isolate, mono-/diacylglycerols, and sucrose fatty acid
459 ester – on the oxidative stability of fish oil-based structured lipid emulsions. These
460 researchers demonstrated that the concentration and type of emulsifier influenced
461 oxidation rate. Higher emulsifier concentrations usually showed a lower oxidation rate
462 than lower concentrations, which in this case was attributed to a higher concentration of
463 emulsifier creating a thicker interface that acted as a semipermeable barrier against the
464 pro-oxidant compounds catalysing oxidation reactions. Further, the chemical structure
465 of the emulsifier such as its ionic character, also influences permeability and,
466 resultantly, oxidation rate. Chen, Rao, Ding, McClements, and Decker (2016) studied
467 the role of different emulsifiers on lipid oxidation. These authors found that
468 polyglycerol polyricinoleate (PGPR) promoted the oxidation of emulsion while several

469 lecithins (defatted soybean lecithin (PC 75) or defatted lyso-lecithin (Lyso-PC)) showed
470 a protective effect on omega-3 enriched oil. These authors associated the greater
471 emulsifying capacity of PGPR to its worse performance protecting against oxidation. Its
472 greater emulsifying capacity produced oil droplets of a smaller size and a greater
473 interfacial surface area. This greater interfacial area led to the oil being more exposed to
474 the pro-oxidants, ultimately leading to greater lipid oxidation. On the other hand,
475 lecithins, with their lower emulsifying capacity and, in addition, a certain amount of
476 antioxidant added, revealed a better oxidative response. Therefore, the choice of the
477 emulsifier not only influences the physical stability of the emulsion but, by acting
478 directly on the oil-water interface, it is another decisive ingredient for the chemical
479 stability of omega-3 PUFAs BLEs.

480 Another possibility for slowing lipid oxidation in BLEs is to add antioxidants or
481 scavenging pro-oxidants. Many investigations have demonstrated that transition metals
482 (pro-oxidant compounds) are mainly found in the water phase, whilst hydroperoxides
483 are located at the oil/water interface due to the fact that hydroperoxides are surface-
484 active compounds. Copper or iron are some of the most abundant pro-oxidant
485 compounds which may be found in packaging materials, food ingredients and water.
486 Thus, lipid oxidation occurs at the droplet interface, where the pro-oxidant ions of the
487 aqueous phase come into close contact with the lipid hydroperoxide located at the
488 droplet surface (Kargar, 2014; McClements, 2015; Waraho, McClements, & Decker,
489 2011). Consequently, some studies are on track to evaluate the effect of iron
490 encapsulation within the interior aqueous phase of W/O/W emulsions on lipid oxidation
491 (Choi, Decker, & McClements, 2009). Results obtained suggest that no significant
492 changes to lipid droplet size in multiple emulsions occurred during storage. This

493 suggests that the emulsions were resistance to flocculation and coalescence of lipid
494 droplets, and internal water expulsion/diffusion. Multiple emulsions containing
495 encapsulated iron did foster lipid oxidation when added to fish oil emulsions. Curiously,
496 multiple emulsions in the absence of added iron seem to be highly effective at delaying
497 lipid oxidation in fish oil emulsions. This may be due to their influence on the
498 redistribution of pro-oxidants ions and reaction products in the system. Another possible
499 alternative for delaying lipid oxidation is the addition of compounds with antioxidant
500 properties. Chen, McClements, and Decker (2010) studied the antioxidant ability of
501 selected polysaccharides (high-methoxyl and low-methoxyl pectin and others) in the
502 continuous phase of a fish O/W emulsion. None of these polysaccharides showed any
503 effect on the physical properties of the emulsions; however, they reduced the formation
504 of primary and secondary lipid oxidation products. The authors attributed the lowering
505 of lipid oxidation to the ability of these polysaccharides to bind free radicals together
506 through the chelating effect of pro-oxidative metals. Hence, these results suggest that
507 the addition of anionic polysaccharides to the continuous phase of O/W PUFAs BLEs
508 could be employed to enhance the chemical stability of O/W emulsions and in so doing,
509 prolong their shelf-lifetime. Natural extracts have also been tested as a source of
510 antioxidants. Karadağ et al. (2017) explored the capacity of Icelandic brown algae
511 *Fucus vesiculosus* extracts incorporated into O/W emulsions to protect the lipid phase
512 against lipid oxidation. These extracts, rich in polyphenolic compounds, were found to
513 improve the oxidative stability of the omega-3 PUFAs emulsions, and thus could
514 provide a different natural source of new effective antioxidant compounds. Recent
515 studies have evaluated the efficacies of lipophilized phenolic compounds as potential
516 antioxidants in PUFAs BLEs and they have obtained promising results. According to

517 the cut-off effect hypothesis, the antioxidant efficacy increases with the increment of
518 alkyl chain length until a threshold is reached. This threshold is the optimal chain length
519 to obtain the highest efficacy of the antioxidants. To study the effect of alkyl chain
520 unsaturation on the antioxidant activities, Pande and Akoh (2016) tested the antioxidant
521 potential of three tyrosol-based phenolipids and they found that tyrosyl esters exhibited
522 lower antioxidant activity than tyrosol whereas the addition of an alkyl chain enhanced
523 the antioxidant efficiency of tyrosol in O/W emulsions.

524 Finally, it must always be kept in mind that the emulsification conditions, the
525 characteristics of the medium, and the environmental conditions surrounding the
526 emulsions also have a decisive influence on its chemical stability, regardless of the
527 ingredients present in the omega-3 PUFAs BLE. These will both affect the properties of
528 the interface, its greater or lesser antioxidant capacity, and so on. For example, the
529 emulsification method used influences the characteristics of the emulsion, such as
530 droplet size, and this can affect the oxidative stability of the emulsion. So, Horn,
531 Nielsen, Jensen, Horsewell, and Jacobsen (2012) studied the impact of homogenization
532 equipment (microfluidizer vs. two-stage valve homogenizer) on oxidative stability of
533 fish oil-in-water emulsions prepared with two different milk proteins: sodium caseinate
534 and whey proteins. Emulsions were prepared at pH 7 with similar droplet sizes. Results
535 showed that the oxidative stability of emulsions prepared with sodium caseinate was not
536 influenced by the type of homogenizer used. Whereas, the type of homogenization
537 equipment significantly influenced lipid oxidation when whey protein was used as
538 emulsifier, with the microfluidizer resulting in lower levels of oxidation. They
539 suggested that these results are related to the different distribution of protein
540 components between the interface and the aqueous phase due to the different droplet

541 disruption patterns in the two equipments. So, the microfluidizer produced a change in
542 the protein composition of the interface compared to that obtained when the valve
543 homogenizer was used. Regarding the characteristics of the medium, one of the critical
544 factors is the pH. Owens, Griffin, Khouryieh, and Williams (2018) investigated the
545 impact of the pH of the medium on the physicochemical stability of whey protein
546 isolated-stabilized fish O/W emulsions containing xanthan (XG)-locust bean gum
547 (LBG) mixtures. The results obtained suggest that the net electrical charge of the
548 protein-coated droplets can be modified according to PH. This then acts on the
549 electrostatic interactions of the protein-polysaccharide complex to reduce lipid
550 oxidation. In addition, they demonstrated the ability of xanthan (an anionic
551 polysaccharide) to chelate transition metal ions at negatively charged sites, thereby
552 preventing them from coming into close contact with the lipid phase. The presence or
553 absence of light also influence lipid oxidation since light is necessary for the initial
554 stage of oxidation reactions. The concentration of available oxygen represents another
555 decisive factor as oxidation is not possible in the absence of oxygen. Finally, the storage
556 temperature of the emulsion is clearly important. Klinkesorn and Geraldine (2012)
557 evaluated the impact of the storage temperature on the oxidation rate of omega-3
558 PUFAs BLEs during storage. The authors hypothesized regarding the kinetic reaction
559 and evaluated the value of the kinetic constant as a function of the storage temperature.
560 They identified that the kinetic constant was dependent upon the temperature, with
561 greater lipid oxidation occurring at higher storage temperatures.

562 Table 3 presents a selection of important studies on the chemical instability of
563 PUFAs BLEs due to lipid oxidation.

Table 3. Selection of important studies on the chemical instability of PUFAs BLEs.

Type	Dispersed phase	Continuous phase	Emulsification method	Aim	Reference
O/W	Flaxseed oil and fish oil, O:W = 10:90	Water containing 0-3 % (w/w) sodium caseinate, 0-0.3 % (w/w) oat β -glucan and 0.04 % (w/w) sodium azide	Pre-emulsification with a Polytron homogenizer at 14000 rpm for 2 min followed by high-pressure homogenization with a Panda 2K homogenizer (2-stages, pressure = 80 and 8 MPa)	To study the effects of protein and polysaccharide content on lipid oxidation	Liu, Singh, Wayman, Hwang, & Phaner (2015)
W/O	Double distilled water containing antioxidants and/or metal chelators, W:O = 2:98	Algae oil containing 0.15 wt.% emulsifier (PGPR, PC75, PC50, lyso-PC and MAG-DAG)	Pre-emulsification with a M133/1281-0 blender for 2 min followed by high-pressure homogenization with a M-110 L Microfluidizer Processor (3-stages, pressure = 68 MPa)	To evaluate the impact of antioxidants and emulsifiers on lipid oxidation	Chen, Rao, Ding, McClements, & Decker (2016)
O/W	Fish oil, O:W = 5:95	Distilled water containing 2 wt.% fish protein hydrolysates (sardine hydrolysates or spotted catshark hydrolysates)	Pre-emulsification with an Ystral mixer at 16000 rpm for 3 min followed by high-pressure homogenization with a M110L Microfluidics (3-stages, pressure = 9000 psi)	To investigate the effects of fish protein hydrolysates on lipid oxidation	García-Moreno, Guadix, Guadix, & Jacobsen (2016)
O/W	Cod liver oil, O:W = 5:95	Distilled water containing 1 % (w/w) citrem and 2 mg/mL protein (common carp roe protein hydrolysate)	Pre-emulsification with an Ultra-Turrax T1500 at 16000 rpm for 3 min followed by high-pressure homogenization with a Panda 2K (3-stages, pressure = 250 bar)	To examine the effects of carp roe protein hydrolysate on lipid oxidation	Ghelichi, Sørensen, García-Moreno, Hajfathalian, & Jacobsen (2017)
O/W	Fish oil, O:W = 70:30	Water containing 10 % (w/v) sodium caseinate and 0.5-1 % (w/v) seaweed extracts	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax at 20000 rpm	To study the ability of <i>Fucus vesiculosus</i> extracts to inhibit lipid oxidation	Karadağ et al. (2017)
O/W	Flaxseed oil, O:W = 1:99	Aqueous solution composed of buffer solution (5 mM sodium acetate, pH 3.0), 0.4 % (w/v) sodium caseinate, 0.25 % (w/v) sodium alginate, 0.05-0.4 % (w/v) chitosan and 0.01 % (w/v) sodium azide	Pre-emulsification with a blender followed by ultrasound homogenization with a QSonica 700 at 50 % amplitude for 5 min	To investigate the effect of stress factors on the lipid oxidation of multilayer protein-stabilized emulsions	Sivapraha & Sarkar (2017)
O/W	Walnut oil, O:W = 5:95	Aqueous solution composed of phosphate buffer (5 mM, pH 7.0), 1.5 % (w/w) lecithin and 0, 1.0 or 1.6 % (w/w) NaCl or KCl	Pre-emulsification with a F6/10 blender followed by high-pressure homogenization with a HP-4L homogenizer (3-stages, pressure = 9000 psi)	To understand the impact of salts on lipid oxidation of lecithin-stabilized oil-in-water emulsions	Cui, Fan, Sun, Zhu, & Yi (2018)

Diseño, desarrollo y optimización de diferentes sistemas de liberación modificada para la protección y vehiculización de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y curcumina

O/W	Menhaden oil, O:W = 10:90	Deionized water containing 2 % (w/v) whey protein isolate, 0.1 % (w/v) polysaccharides (locust bean gum or xanthan gum) and 0.04 % (w/v) sodium azide	Rotor-stator homogenization using PowerGen 500 homogenizer at 30000 rpm for 6 min	To study the impact of pH on the lipid oxidation of emulsions containing protein-polysaccharides mixtures	Owens, Griffin, Khouryieh, & Williams (2018)
O/W	Tuna oil containing 0.7 mmol α -tocopherol and/or eugenol/kg of emulsion, O:W = 30:70	Ultrapure water containing 1 % (w/w) whey proteins or 0.5 % (w/w) Tween 80, 0.5 % (w/w) potassium sorbate and antioxidants. Emulsions were supplemented or not with guar gum (0 to 0.6 % (w/w))	Rotor-stator homogenization using Ultra-Turrax T25 at 10000 rpm for 5 min; ultrasound homogenization at 20 kHz for 20 min with alternating sonication/rest cycles (10 s sonication/10 s rest)	To understand the impact of compositional and structural parameters of emulsions rich in omega-3 on oxidative stability	Pernin, Bosc, Soto, Roux, & Maillard (2019)

5. Conclusions and future trends

Omega-3 polyunsaturated fatty acids are sensitive to oxidation. This is an undesirable process in the food industry as it leads to the deterioration of food. Understanding the mechanisms and factors by which this lipid oxidation occurs is key to its control, reduction and elimination. Within this context, a wide range of research studies on lipid oxidation have been published in the last decades, trying to shed light on this extremely complex process. However, extensive research is still needed to better understand this process in its entirety.

Currently, there is a wide variety of different systems available for the protection and vehiculization of bioactive lipids, with each presenting their own advantages and disadvantages. This review article tries to evaluate and update state-of-the-art research relating to use of the main simple and multiple omega-3 PUFAs BLEs as novel alternative encapsulation systems. Nowadays, simple oil-in-water emulsions are the most widely used systems for encapsulating omega-3 PUFAs. However, their capacity to encapsulate and protect PUFAs against lipid oxidation, one of the main problems posed to food manufacturers, is rather limited. As a result, the food industry requires alternative delivery methods. Other lipid-based delivery systems technologies such as multiple emulsions, solid lipid nanoparticle emulsions, liposomes, and self-assembling emulsions hold some advantages over traditional emulsions. However, they are not simple to prepare and can sometimes be even more unstable than simple emulsions due to the additional instability mechanisms they possess. In this sense, although multiple PUFAs BLEs have begun to be studied in recent years, there is still only a small number of studies available and none have been conducted on an industrial scale. Further

research on lipid oxidation and multiple PUFAs BLEs is therefore necessary, in addition to exploring new types of emulsions capable of encapsulating omega-3 PUFAs.

Acknowledgments

The Ministry of Education, Culture and Sport (MECD) is deeply grateful for supporting the grant FPU17/03005 of Mr. Vellido-Perez.

References

- Azizi, M., Kierulf, A., Connie Lee, M., & Abbaspourrad, A. (2018). Improvement of physicochemical properties of encapsulated echium oil using nanostructured lipid carriers. *Food Chemistry*, 246, 448-456.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.009>
- Bai, L., Huan, S., Li, Z., & McClements, D. J. (2017). Comparison of emulsifying properties of food-grade polysaccharides in oil-in-water emulsions: Gum arabic, beet pectin, and corn fiber gum. *Food Hydrocolloids*, 66, 144-153.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.019>
- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2004). Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109, 29-41.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.013>

- Bradbury, J. (2011). Docosahexaenoic Acid (DHA): An Ancient Nutrient for the Modern Human Brain. *Nutrients*, 3(5), 529-554. <https://doi.org/10.3390/nu3050529>
- Bucher, H. C., Hengstler, P., Schindler, C., & Meier, G. (2002). N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Medicine*, 112(4), 298-304. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(01\)01114-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(01)01114-7)
- Calligaris, S., Ignat, A., Biasutti, M., Innocente, N., & Nicoli, M. C. (2015). Cheese fortification using saturated monoglyceride self-assembly structures as carrier of omega-3 fatty acids. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(9), 2129-2134. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12877>
- Cederholm, T., & Palmblad, J. (2010). Are omega-3 fatty acids options for prevention and treatment of cognitive decline and dementia? *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 13(2), 150. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328335c40b>
- Chang, H. W., Tan, T. B., Tan, P. Y., Abas, F., Lai, O. M., Wang, Y.,..., Tan, C. P. (2018). Physical properties and stability evaluation of fish oil-in-water emulsions stabilized using thiol-modified β -lactoglobulin fibrils-chitosan complex. *Food Research International*, 105, 482-491. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.034>
- Chen, B., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2010). Role of continuous phase anionic polysaccharides on the oxidative stability of menhaden oil-in-water emulsions.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(6), 3779-3784.

<https://doi.org/10.1021/jf9037166>

Chen, B., Rao, J., Ding, Y., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2016). Lipid oxidation in base algae oil and water-in-algae oil emulsion: Impact of natural antioxidants and emulsifiers. *Food Research International*, 85, 162-169.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.038>

Cheng, J.-H., Hu, Y.-N., Luo, Z.-G., Chen, W., Chen, H.-M., & Peng, X.-C. (2017). Preparation and properties of octenyl succinate β -cyclodextrin and its application as an emulsion stabilizer. *Food Chemistry*, 218, 116-121.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.019>

Chityala, P. K., Khouryieh, H., Williams, K., & Conte, E. (2016). Effect of xanthan/enzyme-modified guar gum mixtures on the stability of whey protein isolate stabilized fish oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 212, 332-340.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.187>

Chivero, P., Gohtani, S., Yoshii, H., & Nakamura, A. (2015). Effect of xanthan and guar gums on the formation and stability of soy soluble polysaccharide oil-in-water emulsions. *Food Research International*, 70, 7-14.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.025>

Cho, Y.-H., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2010). Formation of protein-rich coatings around lipid droplets using the electrostatic deposition method. *Langmuir*, 26(11), 7937-7945. <https://doi.org/10.1021/la904823b>

Choi, S. J., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2009). Impact of iron encapsulation within the interior aqueous phase of water-in-oil-in-water emulsions on lipid

oxidation. *Food Chemistry*, 116(1), 271-276.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.045>

Cofrades, S., Salcedo, S., Delgado-Pando, G., López-López, I., Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2011). Antioxidant activity of hydroxytyrosol in frankfurters enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Chemistry*, 129(2), 429-436. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.095>

Cofrades, S., Bou, R., Flaiz, L., Garcimartín, A., Benedí, J., Mateos, R.,..., Jiménez-Colmenero, F. (2017). Bioaccessibility of hydroxytyrosol and n-3 fatty acids as affected by the delivery system: Simple, double and gelled double emulsions. *Journal of Food Science and Technology*, 54(7), 1785-1793. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2604-x>

Cole, G. M., Ma, Q.-L., & Frautschy, S. A. (2009). Omega-3 fatty acids and dementia. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 81(2-3), 213-221. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2009.05.015>

Colomer, R., Moreno-Nogueira, J. M., García-Luna, P. P., García-Peris, P., García-de-Lorenzo, A., Zarazaga, A.,..., Casimiro, C. (2007). n-3 Fatty acids, cancer and cachexia: A systematic review of the literature. *British Journal of Nutrition*, 97(5), 823-831. <https://doi.org/10.1017/S000711450765795X>

Comunian, T. A., Boillon, M. R. G., Thomazini, M., Nogueira, M. S. de C., & Favaro-Trindade, C. S. (2016). Protection of echium oil by microencapsulation with phenolic compounds. *Food Research International*, 88, 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.008>

- Comunian, T. A., Ravanfar, R. de C., Dando, R., Favaro-Trindade, C. S., & Abbaspourrad, A. (2017). Improving oxidative stability of echium oil emulsions fabricated by Microfluidics: Effect of ionic gelation and phenolic compounds. *Food Chemistry*, 233, 125-134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.085>
- Coupland, J. N., & McClements, D. J. (1996). Lipid oxidation in food emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 7(3), 83-91. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(96\)81302-1](https://doi.org/10.1016/0924-2244(96)81302-1)
- Cui, L., Fan, J., Sun, Y., Zhu, Z., & Yi, J. (2018). The prooxidant activity of salts on the lipid oxidation of lecithin-stabilized oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 252, 28-32. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.094>
- Das, U. N., & Madhavi, N. (2011). Effect of polyunsaturated fatty acids on drug-sensitive and resistant tumor cells in vitro. *Lipids in Health and Disease*, 10, 159. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-159>
- Dey, T. K., Banerjee, P., Chatterjee, R., & Dhar, P. (2018). Designing of ω -3 PUFA enriched biocompatible nanoemulsion with sesame protein isolate as a natural surfactant: Focus on enhanced shelf-life stability and biocompatibility. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 538, 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.10.066>
- Dickinson, E. (2011). Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophysics*, 6(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11483-010-9188-6>
- Dijck-Brouwer, D. A. J., Hadders-Algra, M., Bouwstra, H., Decsi, T., Boehm, G., Martini, I. A.,..., Muskiet, F. A. J. (2005). Lower fetal status of docosahexaenoic acid, arachidonic acid and essential fatty acids is associated

with less favorable neonatal neurological condition. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 72(1), 21-28.
<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2004.08.002>

Djordjevic, D., Kim, H.-J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2004). Physical stability of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions at pH 3: Potential ω -3 fatty acid delivery systems (Part A). *Journal of Food Science*, 69(5), C351-C355.

Djordjevic, D., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2004). Oxidative stability of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions at pH 3: Potential ω -3 fatty acid delivery systems (Part B). *Journal of Food Science*, 69(5), C356-C362.

Elagizi, A., Lavie, C. J., Marshall, K., DiNicolantonio, J. J., O'Keefe, J. H., & Milani, R. V. (2018). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Health: A Comprehensive Review. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 61(1), 76-85.
<https://doi.org/10.1016/j.pcad.2018.03.006>

Erdmann, M. E., Lautenschlaeger, R., Zeeb, B., Gibis, M., & Weiss, J. (2017). Effect of differently sized O/W emulsions loaded with rosemary extract on lipid oxidation in cooked emulsion-type sausages rich in n-3 fatty acids. *LWT – Food Science and Technology*, 79, 496-502. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.022>

Filion, K. B., El Khoury, F., Bielinski, M., Schiller, I., Dendukuri, N., & Brophy, J. M. (2010). Omega-3 fatty acids in high-risk cardiovascular patients: A meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Cardiovascular Disorders*, 10, 24. <https://doi.org/10.1186/1471-2261-10-24>

- Flaiz, L., Freire, M., Cofrades, S., Mateos, R., Weiss, J., Jiménez-Colmenero, F., & Bou, R. (2016). Comparison of simple, double and gelled double emulsions as hydroxytyrosol and n-3 fatty acid delivery systems. *Food Chemistry*, 213(Supplement C), 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.005>
- Fomuso, L. B., Corredig, M., & Akoh, C. C. (2002). Effect of emulsifier on oxidation properties of fish oil-based structured lipid emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2957-2961. <https://doi.org/10.1021/jf011229g>
- Freire, M., Bou, R., Cofrades, S., & Jiménez-Colmenero, F. (2017). Technological characteristics of cold-set gelled double emulsion enriched with n-3 fatty acids: Effect of hydroxytyrosol addition and chilling storage. *Food Research International*, 100, 298-305. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.047>
- Fustier, P., Taherian, A. R., & Ramaswamy, H. S. (2010). Emulsion Delivery Systems for Functional Foods. En *Functional Food Product Development* (pp. 79-97). <https://doi.org/10.1002/9781444323351.ch4>
- Gadeyne, F., Van, R., Vlaeminck, B., Vossen, E., Van, D. M., & Fievez, V. (2015). Protection of polyunsaturated oils against ruminal biohydrogenation and oxidation during storage using a polyphenol oxidase containing extract from red clover. *Food Chemistry*, 171, 241-250. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.109>
- García-Moreno, P. J., Guadix, A., Guadix, E. M., & Jacobsen, C. (2016). Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized with fish protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 203, 124-135. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.073>

- Garti, N. (1997). Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. *LWT – Food Science and Technology*, 30(3), 222-235. <https://doi.org/10.1006/fstl.1996.0176>
- Gerber, M. (2009). Background review paper on total fat, fatty acid intake and cancers. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 55(1-3), 140-161. <https://doi.org/10.1159/000229000>
- Gerber, M. (2012). Omega-3 fatty acids and cancers: A systematic update review of epidemiological studies. *British Journal of Nutrition*, 107(SUPPL. 2), S228-S239. <https://doi.org/10.1017/S0007114512001614>
- Ghelichi, S., Sørensen, A.-D. M., García-Moreno, P. J., Hajfathalian, M., & Jacobsen, C. (2017). Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions fortified with enzymatic hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) roe. *Food Chemistry*, 237, 1048-1057. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.048>
- Ghorbanzade, T., Jafari, S. M., Akhavan, S., & Hadavi, R. (2017). Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*, 216, 146-152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.022>
- Goyal, A., Sharma, V., Sihag, M. K., Tomar, S. K., Arora, S., Sabikhi, L., & Singh, A. K. (2015). Development and physico-chemical characterization of microencapsulated flaxseed oil powder: A functional ingredient for omega-3 fortification. *Powder Technology*, 286, 527-537. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.08.050>

- Greene, E. R., Huang, S., Serhan, C. N., & Panigrahy, D. (2011). Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 96(1-4), 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2011.08.004>
- Gumus, C. E., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2017). Formation and Stability of ω -3 Oil Emulsion-Based Delivery Systems Using Plant Proteins as Emulsifiers: Lentil, Pea, and Faba Bean Proteins. *Food Biophysics*, 12(2), 186-197. <https://doi.org/10.1007/s11483-017-9475-6>
- Harris, W., & Baack, M. (2015). Beyond Building Better Brains: Bridging the Docosahexaenoic acid (DHA) Gap of Prematurity. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*, 35(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/jp.2014.195>
- He, Z., Zeng, W., Zhu, X., Zhao, H., Lu, Y., & Lu, Z. (2017). Influence of surfactin on physical and oxidative stability of microemulsions with docosahexaenoic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 151, 232-239. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.12.026>
- Horn, A. F., Nielsen, N. S., Jensen, L. S., Horsewell, A., & Jacobsen, C. (2012). The choice of homogenisation equipment affects lipid oxidation in emulsions. *Food Chemistry*, 134(2), 803-810. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.184>
- Huang, J., Wang, Q., Li, T., Xia, N., & Xia, Q. (2017). Nanostructured lipid carrier (NLC) as a strategy for encapsulation of quercetin and linseed oil: Preparation and in vitro characterization studies. *Journal of Food Engineering*, 215, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.07.002>

- Huerta-Yépez, S., Tirado-Rodríguez, A. B., & Hankinson, O. (2016). Role of diets rich in omega-3 and omega-6 in the development of cancer. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 73(6), 446-456. <https://doi.org/10.1016/j.bmhmx.2016.11.001>
- Jamshidi, A., Shabanpour, B., Pourashouri, P., & Raeisi, M. (2019). Optimization of encapsulation of fish protein hydrolysate and fish oil in W1/O/W2 double emulsion: Evaluation of sensory quality of fortified yogurt. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(9), e14063. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14063>
- Jeyakumari, A., Janarthanan, G., Chouksey, M. K., & Venkateshwarlu, G. (2016). Effect of fish oil encapsulates incorporation on the physico-chemical and sensory properties of cookies. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 856-863. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1981-2>
- Jiao, J., Rhodes, D. G., & Burgess, D. J. (2002). Multiple Emulsion Stability: Pressure Balance and Interfacial Film Strength. *Journal of Colloid and Interface Science*, 250(2), 444-450. <https://doi.org/10.1006/jcis.2002.8365>
- Jiménez-Colmenero, F. (2013a). Multiple emulsions; bioactive compounds and functional foods. *Nutrición Hospitalaria*, 28(5), 1413-1421. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.5.6673>
- Jiménez-Colmenero, F. (2013b). Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Research International*, 52(1), 64-74. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.040>
- Jiménez-Martín, E., Antequera, R., Gharsallaoui, A., Ruiz, C., & Pérez-Palacios, T. (2016). Fatty acid composition in double and multilayered microcapsules of ω -3

as affected by storage conditions and type of emulsions. *Food Chemistry*, 194, 476-486. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.046>

Jiménez-Martín, E., Gharsallaoui, A., Pérez-Palacios, T., Ruiz, C., & Antequera, R. (2015). Volatile compounds and physicochemical characteristics during storage of microcapsules from different fish oil emulsions. *Food and Bioprocess Processing*, 96, 52-64. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.07.005>

Julio, L. M., Copado, C. N., Diehl, B. W. K., Ixtaina, V. Y., & Tomás, M. C. (2018). Chia bilayer emulsions with modified sunflower lecithins and chitosan as delivery systems of omega-3 fatty acids. *LWT – Food Science and Technology*, 89, 581-590. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.044>

Karadağ, A., Hermund, D. B., Jensen, L. H. S., Andersen, U., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H. G.,..., Jacobsen, C. (2017). Oxidative stability and microstructure of 5% fish-oil-enriched granola bars added natural antioxidants derived from brown alga *Fucus vesiculosus*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(4). <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500578>

Kargar, M. (2014). *Emulsion design for protection of chemically sensitive bioactive ingredients* (Doctor of Philosophy). University of Birmingham, Birmingham.

Klinkesorn, U., & Geraldine, P.-L. (2012). Effect of temperature on lipid oxidation kinetics of tuna oil two-layers emulsion during storage. *Italian Journal of Food Science*, 24(SUPPL.), 22-25.

Komaiko, J., Sastrosubroto, A., & McClements, D. J. (2016). Encapsulation of ω -3 fatty acids in nanoemulsion-based delivery systems fabricated from natural

- emulsifiers: Sunflower phospholipids. *Food Chemistry*, 203, 331-339.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.080>
- Kristinova, V., Mozuraityte, R., Aaneby, J., Storrø, I., & Rustad, T. (2014). Iron-mediated peroxidation in marine emulsions and liposomes studied by dissolved oxygen consumption. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(2), 207-225. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300301>
- Kukizaki, M., & Goto, M. (2007). Preparation and evaluation of uniformly sized solid lipid microcapsules using membrane emulsification. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 293(1-3), 87-94.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.07.011>
- Lalia, A. Z., & Lanza, I. R. (2016). Insulin-Sensitizing Effects of Omega-3 Fatty Acids: Lost in Translation? *Nutrients*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/nu8060329>
- Lee, S., Hernandez, P., Djordjevic, D., Faraji, H., Hollender, R., Faustman, C., & Decker, E. A. (2006). Effect of Antioxidants and Cooking on Stability of n-3 Fatty Acids in Fortified Meat Products. *Journal of Food Science*, 71(3), C233-C238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb15623.x>
- Li, K., Huang, T., Zheng, J., Wu, K., & Li, D. (2014). Effect of Marine-Derived n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on C-Reactive Protein, Interleukin 6 and Tumor Necrosis Factor α : A Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 9(2), e88103.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088103>
- Liu, F., Zhu, Z., Ma, C., Luo, X., Bai, L., Decker, E. A.,..., McClements, D. J. (2016). Fabrication of Concentrated Fish Oil Emulsions Using Dual-Channel Microfluidization: Impact of Droplet Concentration on Physical Properties and

- Lipid Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(50), 9532-9541. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04413>
- Liu, S. X., Singh, M., Wayman, A. E., Hwang, H.-S., & Phaner, M. (2015). Reduction of omega-3 oil oxidation in stable emulsion of caseinate-omega-3 oil-oat beta-glucan. *LWT – Food Science and Technology*, 62(2), 1083-1090. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.012>
- Maghsoumi-Norouzabad, L., Mansoori, A., Abed, R., & Shishehbor, F. (2018). Effects of omega-3 fatty acids on the frequency, severity, and duration of migraine attacks: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutritional Neuroscience*, 21(9), 614-623. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1344371>
- Maki, K. C., Palacios, O. M., Bell, M., & Toth, P. P. (2017). Use of supplemental long-chain omega-3 fatty acids and risk for cardiac death: An updated meta-analysis and review of research gaps. *Journal of Clinical Lipidology*, 11(5), 1152-1160.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2017.07.010>
- Marik, P. E., & Varon, J. (2009). Omega-3 dietary supplements and the risk of cardiovascular events: A systematic review. *Clinical Cardiology*, 32(7), 365-372. <https://doi.org/10.1002/clc.20604>
- Mbatia, B., Kaki, S. S., Mattiasson, B., Mulaa, F., & Adlercreutz, P. (2011). Enzymatic synthesis of lipophilic rutin and vanillyl esters from fish byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7021-7027. <https://doi.org/10.1021/jf200867r>

McClements, D. J. (2015). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, Third Edition*. CRC Press.

McClements, D. J., Decker, E. A., & Park, Y. (2009). Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(1), 48-67.
<https://doi.org/10.1080/10408390701764245>

McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 65(8), 1270-1282.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10596.x>

McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72(8), R109-R124. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x>

Miles, E. A., & Calder, P. C. (2012). Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. *British Journal of Nutrition*, 107(S2), S171-S184. <https://doi.org/10.1017/S0007114512001560>

Mocellin, M. C., Camargo, C. de Q., Fabre, M. E. de S., & Trindade, E. B. S. de M. (2017). Fish oil effects on quality of life, body weight and free fat mass change in gastrointestinal cancer patients undergoing chemotherapy: A triple blind, randomized clinical trial. *Journal of Functional Foods*, 31, 113-122.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.01.041>

- Musa-Veloso, K., Binns, M. A., Kocenas, A., Chung, C., Rice, H., Oppedal-Olsen, H.,..., Lemke, S. (2011). Impact of low v. Moderate intakes of long-chain n-3 fatty acids on risk of coronary heart disease. *British Journal of Nutrition*, 106(8), 1129-1141. <https://doi.org/10.1017/S0007114511001644>
- Muschiolik, G. (2007). Multiple emulsions for food use. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 12(4-5), 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.07.006>
- Nejadmansouri, M., Hosseini, S. M. H., Niakosari, M., Yousefi, G. H., & Golmakani, M. T. (2016). Physicochemical properties and oxidative stability of fish oil nanoemulsions as affected by hydrophilic lipophilic balance, surfactant to oil ratio and storage temperature. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 506, 821-832. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.07.075>
- Nemets, H., Nemets, B., Apter, A., Bracha, Z., & Belmaker, R. H. (2006). Omega-3 treatment of childhood depression: A controlled, double-blind pilot study. *The American Journal of Psychiatry*, 163(6), 1098-1100. <https://doi.org/10.1176/ajp.2006.163.6.1098>
- O'Dwyer, S. P., O'Beirne, D., Eidhin, D. N., & O'Kennedy, B. T. (2013). Effects of sodium caseinate concentration and storage conditions on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1145-1152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.138>
- Owens, C., Griffin, K., Khouryieh, H., & Williams, K. (2018). Creaming and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized by whey protein-xanthan-locust

- bean complexes: Impact of pH. *Food Chemistry*, 239, 314-322.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.096>
- Pal, R. (2011). Rheology of simple and multiple emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 16(1), 41-60. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2010.10.001>
- Pande, G., & Akoh, C. C. (2016). Enzymatic Synthesis of Tyrosol-Based Phenolipids: Characterization and Effect of Alkyl Chain Unsaturation on the Antioxidant Activities in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(3), 329-337.
<https://doi.org/10.1007/s11746-015-2775-4>
- Pazos, M., Alonso, A., Sánchez, I., & Medina, I. (2008). Hydroxytyrosol Prevents Oxidative Deterioration in Foodstuffs Rich in Fish Lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3334-3340.
<https://doi.org/10.1021/jf073403s>
- Perica, M. M., & Delaš, I. (2011). Essential Fatty Acids and Psychiatric Disorders. *Nutrition in Clinical Practice*, 26(4), 409-425.
<https://doi.org/10.1177/0884533611411306>
- Pernin, A., Bosc, V., Soto, P., Roux, E. L., & Maillard, M.-N. (2019). Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions Rich in Omega-3: Effect of Aqueous Phase Viscosity, Emulsifiers, and Antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(9), 1800462. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800462>
- Rasti, B., Erfanian, A., & Selamat, J. (2017). Novel nanoliposomal encapsulated omega-3 fatty acids and their applications in food. *Food Chemistry*, 230, 690-696. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.089>

- Richardson, D. A. J. (2006). Omega-3 fatty acids in ADHD and related neurodevelopmental disorders. *International Review of Psychiatry*, 18(2), 155-172. <https://doi.org/10.1080/09540260600583031>
- Robinson, L. E., & Mazurak, V. C. (2013). N-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Relationship to Inflammation in Healthy Adults and Adults Exhibiting Features of Metabolic Syndrome. *Lipids*, 48(4), 319-332. <https://doi.org/10.1007/s11745-013-3774-6>
- Salminen, H., Helgason, T., Kristinsson, B., Kristbergsson, K., & Weiss, J. (2017). Tuning of shell thickness of solid lipid particles impacts the chemical stability of encapsulated ω -3 fish oil. *Journal of Colloid and Interface Science*, 490, 207-216. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.11.063>
- Santhanam, A. K., Lekshmi, M., Chouksey, M. K., Tripathi, G., & Gudipati, V. (2015). Delivery of Omega-3 Fatty Acids into Cake Through Emulsification of Fish Oil-in-Milk and Encapsulation by Spray Drying with Added Polymers. *Drying Technology*, 33(1), 83-91. <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.934832>
- Serhan, C. N., & Levy, B. D. (2018). Resolvins in inflammation: Emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *Journal of Clinical Investigation*, 128(7), 2657-2669. <https://doi.org/10.1172/JCI97943>
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2018). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9(1), 345-381. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317-095850>
- Shao, X., Bor, G., Al-Hosayni, S., Salentinig, S., & Yagmur, A. (2018). Structural characterization of self-assemblies of new omega-3 lipids: Docosahexaenoic

- acid and docosapentaenoic acid monoglycerides. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(37), 23928-23941. <https://doi.org/10.1039/C8CP04256J>
- Silva, W., Torres-Gatica, M. F., Oyarzun-Ampuero, F., Silva-Weiss, A., Robert, P., Cofrades, S., & Giménez, B. (2018). Double emulsions as potential fat replacers with gallic acid and quercetin nanoemulsions in the aqueous phases. *Food Chemistry*, 253, 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.128>
- Sivaprabha, S., & Sarkar, P. (2017). *Oxidative stability and effect of stress factors on flaxseed oil-in-water emulsions stabilized by sodium caseinate–sodium alginate–chitosan interfacial membrane*. Article in Press, <https://doi.org/10.1007/s11696-017-0252-2>
- Sugasini, D., & Lokesh, B. R. (2017). Curcumin and linseed oil co-delivered in phospholipid nanoemulsions enhances the levels of docosahexaenoic acid in serum and tissue lipids of rats. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 119, 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.03.007>
- Sulciner, M. L., Serhan, C. N., Gilligan, M. M., Mudge, D. K., Chang, J., Gartung, A.,..., Panigrahy, D. (2018). Resolvins suppress tumor growth and enhance cancer therapy. *Journal of Experimental Medicine*, 215(1), 115-140. <https://doi.org/10.1084/jem.20170681>
- Uluata, S., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2015). Physical Stability, Autoxidation, and Photosensitized Oxidation of ω -3 Oils in Nanoemulsions Prepared with Natural and Synthetic Surfactants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(42), 9333-9340. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03572>

- Walker, R. M., Gumus, C. E., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2017). Improvements in the formation and stability of fish oil-in-water nanoemulsions using carrier oils: MCT, thyme oil, & lemon oil. *Journal of Food Engineering*, 211, 60-68. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.05.004>
- Waraho, T., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2011). Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends in Food Science and Technology*, 22(1), 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.003>
- Werner, K., Küllenberg de Gaudry, D., Taylor, L. A., Keck, T., Unger, C., Hopt, U. T., & Massing, U. (2017). Dietary supplementation with n-3-fatty acids in patients with pancreatic cancer and cachexia: Marine phospholipids versus fish oil – a randomized controlled double-blind trial. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0495-5>
- Xu, X., Liu, W., Luo, L., Liu, C., & McClements, D. J. (2017). Influence of anionic polysaccharides on the physical and oxidative stability of hydrolyzed rice glutelin emulsions: Impact of polysaccharide type and pH. *Food Hydrocolloids*, 72, 185-194. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.018>
- Yagmur, A., Al-Hosayni, S., Amenitsch, H., & Salentinig, S. (2017). Structural Investigation of Bulk and Dispersed Inverse Lyotropic Hexagonal Liquid Crystalline Phases of Eicosapentaenoic Acid Monoglyceride. *Langmuir*, 33(49), 14045-14057. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b03078>
- Yang, J., & Ciftci, O. N. (2017). Encapsulation of fish oil into hollow solid lipid micro- and nanoparticles using carbon dioxide. *Food Chemistry*, 231, 105-113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.109>

- Yesiltas, B., García-Moreno, P. J., Sørensen, A.-D. M., Akoh, C. C., & Jacobsen, C. (2019). Physical and oxidative stability of high fat fish oil-in-water emulsions stabilized with sodium caseinate and phosphatidylcholine as emulsifiers. *Food Chemistry*, 276, 110-118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.172>
- Zheng, M.-Y., Liu, F., Wang, Z.-W., & Baoyindugurong, J.-H. (2011). Formation and characterization of self-assembling fish oil microemulsions. *Colloid Journal*, 73(3), 319-326. <https://doi.org/10.1134/S1061933X11030197>

CAPÍTULO II
OBJETIVOS

El trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral se encuadra dentro de una de las líneas de investigación del Grupo de “Tecnología de Procesos Químicos y Bioquímicos” (TEP-025) del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada. Desde hace años, este Grupo viene explorando y desarrollando nuevas estrategias para la micro- y nanoencapsulación, vehiculización y liberación de compuestos bioactivos con aplicación en la industria alimentaria y cosmética; y estudiando nuevas formas de estabilización y protección de estos biocompuestos mediante diferentes sistemas estructurados y/o (multi)compartimentalizados. En este contexto, la presente Tesis Doctoral constituye una contribución al conocimiento de los sistemas de liberación basados en oleogeles y en emulsiones como potenciales opciones tecnológicas para la encapsulación, protección, vehiculización y liberación de altas dosis de PUFAs ω -3 y curcumina por vía oral.

Los objetivos planificados para la presente Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Diseñar, desarrollar y optimizar la formulación de un sistema de liberación basado en oleogeles fisicoquímicamente estable para la protección, vehiculización y liberación de altas dosis de PUFAs ω -3 y curcumina por vía oral. Para la formulación óptima resultante:
 - Estudiar el comportamiento reológico y los principales parámetros fluidodinámicos, principalmente la viscosidad y las propiedades viscoelásticas.
 - Estudiar la estabilidad con el tiempo de los compuestos bioactivos incorporados frente a distintas condiciones ambientales (luz y temperatura).
 - Estudiar la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad de estos biocompuestos como otra de las variables de diseño.
2. Diseñar, desarrollar y optimizar la formulación de un sistema de liberación basado en emulsiones simples W/Og fisicoquímicamente estable para la encapsulación en la fase continua, protección, vehiculización y liberación de altas dosis de PUFAs ω -3 y curcumina por vía oral.

3. Diseñar, desarrollar y optimizar la formulación de un sistema de liberación basado en emulsiones simples Og/W fisicoquímicamente estable para la encapsulación en la fase dispersa, protección, vehiculización y liberación de altas dosis de PUFAs ω -3 y curcumina por vía oral. Para la formulación óptima resultante:
 - Estudiar el comportamiento reológico y los principales parámetros fluidodinámicos, principalmente la viscosidad y las propiedades viscoelásticas.
 - Estudiar su estabilidad con el tiempo frente a distintas condiciones ambientales (pH, fuerza iónica y temperatura).
 - Estudiar la estabilidad con el tiempo de los compuestos bioactivos incorporados frente a distintas condiciones ambientales (luz y temperatura).
 - Estudiar la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad de estos biocompuestos como otra de las variables de diseño.

4. Diseñar, desarrollar y optimizar la formulación de un sistema de liberación basado en emulsiones múltiples $W_1/Og/W_2$ fisicoquímicamente estable para la encapsulación en la fase oleosa intermedia, protección frente a procesos oxidativos, vehiculización y liberación de altas dosis de PUFAs ω -3 y curcumina por vía oral. Para la formulación óptima resultante:
 - Estudiar el comportamiento reológico y los principales parámetros fluidodinámicos, principalmente la viscosidad y las propiedades viscoelásticas.
 - Estudiar su estabilidad con el tiempo frente a distintas condiciones ambientales (pH, fuerza iónica y temperatura).
 - Estudiar la estabilidad con el tiempo de los compuestos bioactivos incorporados frente a distintas condiciones ambientales (luz y temperatura).
 - Estudiar la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad de estos biocompuestos como otra de las variables de diseño.

CAPÍTULO III
MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

En este apartado se relacionan los diferentes recursos relativos a equipamiento y materiales utilizados durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral. Además, mencionar que todos los ingredientes fueron de grado alimentario y todos los reactivos de grado analítico sin más purificación adicional o modificación de sus propiedades.

3.1.1. Equipamiento

A continuación, se relacionan los diferentes equipos utilizados:

- Agitador magnético (VELP Scientifica, modelo *AGE*). El rango de velocidades de agitación está comprendido entre 100 y 1200 rpm.
- Agitador magnético con placa calefactora (STUART Equipment, modelo *CBI62*). El rango de velocidades de agitación está comprendido entre 100 y 1500 rpm, y puede alcanzar una temperatura máxima de 450 °C.
- Agitador tipo vórtex (HEIDOLPH Instruments, modelo *Reax 2000*).
- Balanzas electrónicas (COBOS Precision, modelos *AX 120* y *AY 220*). Pueden pesar hasta 120 y 220 g respectivamente, con una precisión de ± 1 y ± 0.1 mg.
- Balanza de precisión (SARTORIUS, modelo *Quintix 5102*). Puede pesar hasta 5100 g, con una precisión de ± 10 mg.
- Centrífuga de laboratorio (Andreas HETTICH GmbH & Co. KG, modelo *MIKRO 120*). El rango de velocidades del equipo está comprendido entre 500 y 14000 rpm.
- Centrífuga de laboratorio (THERMO Fisher Scientific, modelo *Sorvall ST 40*). El rango de velocidades del equipo está comprendido entre 300 y 15200 rpm (dependiendo del rotor utilizado).

- Conductímetro de laboratorio (CRISON Instruments, modelo *GLP 31*) equipado con una célula de platino de uso general (52 92) y una sonda para la compensación automática de temperatura (55 31).
- Cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución (WATERS Corporation, modelo *Acquity UPLC H-Class*) equipado con un sistema de gestión de eluyentes cuaternario (QSM), un muestreador automático (SM-FTN) y un compartimento de columna termostaticado. El equipo se acopló a un espectrómetro de masas en tándem con analizador de triple cuadrupolo (triple-quad) (WATERS Corporation, modelo *Xevo TQ-S*).
- Densímetro digital (Anton Paar, modelo *DMA 38*). El rango de medida está comprendido entre 0 y 3 g/cm³, con una precisión de ± 0.001 g/cm³.
- Espectrofotómetro de fluorescencia (AGILENT Technologies, modelo *Cary Eclipse*) con lámpara de xenón. Los monocromadores de excitación y de emisión tienen un rango espectral que abarca entre 200 y 900 nm, con un ancho de banda de 1.5 nm.
- Espectrofotómetro de UV-Visible (THERMO Electron Corporation, modelo *Helios Gamma*) con lámpara de wolframio. El monocromador tiene un rango espectral que abarca entre 325 y 1100 nm, con un ancho de banda de 2 nm.
- Estufas de convección natural (J.P. Selecta, modelos *DIGITHEAT 52L* e *INCUBIG 288L*) con regulación y lectura digital de temperatura y tiempo.
- Homogenizador de alta presión (BEE International, modelo *Nano DeBEE*). El rango de presiones del equipo está comprendido entre 0 y 45000 psi.
- Homogenizador de rotor y estator (IKA, modelo *UltraTurrax T 25 digital*). El rango de velocidades está comprendido entre 3400 y 24000 rpm.
- Mastersizer (MALVERN Panalytical, modelo *2000*), equipado con un láser de helio-neón de 633 nm y 4 mW máximo y un LED de 466 nm y 10 mW máximo, que utiliza la difracción láser para medir el tamaño de partícula y la distribución de tamaño de partícula. Además, el equipo cuenta con la unidad de dispersión Hydro 2000 (MALVERN Panalytical, modelo *MU*)

que permite la dispersión de las muestras en fluidos mediante una turbina y/o una sonda de ultrasonidos.

- Microscopio invertido láser confocal (LEICA Camera, modelo *DMI 6000B*) equipado para fluorescencia con un láser de argón de 488 nm; objetivos 10x, 20x, 40x secos, 63x y 100x inmersión en aceite; sistema digital de adquisición de imágenes y módulo de superposición de imágenes.
- Microscopio óptico de luz transmitida (OLYMPUS Corporation, modelo *BX51*) con objetivos 2x (Apo), 4x, 10x, 20x, 40x secos (Plan Flúor), 60x y 100x inmersión en aceite (Plan Flúor); sistema fotográfico PM10SP1; cámara digital DP50, resolución efectiva 2776 x 2074 píxeles y prisma DIC en corredera para luz transmitida, analizador DIC y prismas DIC para PF 20x, 40x, 60x y 100x.
- pH-metro de laboratorio (CRISON Instruments, modelo *GLP 21*) equipado con un electrodo de pH (50 14 T) que incorpora un sensor de temperatura Pt 1000 para la compensación automática de temperatura.
- Rancimat[®] (Metrohm AG, modelo *743*). El rango de temperaturas de oxidación del equipo está comprendido entre 50 y 220 °C, con una desviación máxima de la temperatura ajustada de ± 0.3 °C.
- Refractómetro de Abbe (PZO Warszawa, modelo *RLI*).
- SimuGIT, un prototipo simulador *in vitro* del tracto gastrointestinal humano mediante la utilización de reactores químicos automatizados en serie que ya había sido previamente desarrollado por nuestro Grupo de Investigación (Rivas-Montoya, 2014).
- ThermoHaake (THERMO Fisher Scientific, modelo *RheoScope 1*). El rango de par de torsión del equipo es de 0.002 a 100 mN·m y el de velocidades de 0.025 a 1200 rpm. El rango de frecuencias es de 0.0001 a 100 Hz con una resolución angular de $1.2 \cdot 10^{-6}$ rad.
- Zetasizer Nano (MALVERN Panalytical, modelo *ZS*), equipado con un láser de helio-neón de 633 nm y 4 mW máximo, que utiliza la microelectroforesis de láser Doppler para medir el potencial zeta.

3.1.2. Fase acuosa

Como fase acuosa se utilizó agua destilada. Para intentar prevenir la contaminación microbiológica de las emulsiones se le añadió un 0.06 % p/p de benzoato de sodio (E-211) ($\text{NaC}_6\text{H}_5\text{CO}_2$, número CAS 532-32-1, Emerald Kalama Chemical) y un 0.06 % p/p de sorbato de potasio (E-202) ($\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$, número CAS 24634-61-5, Serproquim Food) como conservantes.

3.1.3. Emulgentes

El monolaurato de polioxietilen(20)sorbitano o polisorbato 20 (E-432) ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$, número CAS 9005-64-5, Merck, Ref.: 8221840500), conocido comercialmente como Tween 20, se usó como emulgente hidrofílico a lo largo de este trabajo (HLB = 16.7). El Tween 20 es un tensioactivo no iónico, de bajo peso molecular, con numerosas aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Es estable tanto en medios moderadamente ácidos y básicos (con un pH de 2 a 12) como en disoluciones de electrolitos. Las dosis habituales que suelen emplearse son del 1 % p/p al 15 % p/p.

El polirricinoleato de poliglicerol (PGPR, E-476) ($(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2)_n(\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2)_m$, número CAS 29894-35-7, Danisco), se utilizó como emulgente hidrofóbico a lo largo de este trabajo (HLB = 1.5). El PGPR es un tensioactivo no iónico, de bajo peso molecular y fuertemente lipofílico, ampliamente utilizado en la industria alimentaria. Se suele usar a niveles bajos, inferiores al 0.5 % p/p.

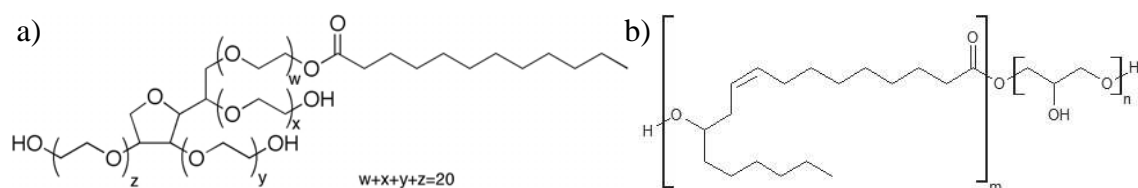


Figura 27. Estructuras químicas del a) Tween 20 y b) PGPR.

3.1.4. Estabilizante

Como estabilizante se utilizó la goma xantana o xantano (XG, E-415) ($C_{35}H_{49}O_{29}$, número CAS 11138-66-2, HELM Ibérica). La XG es un polisacárido aniónico natural de alto peso molecular que se produce a partir de un sustrato rico en hidratos de carbono por fermentación bacteriana de *Xanthomonas campestris*. Se disuelve tanto en agua caliente como fría, y se puede utilizar para cualquier tipo de aplicación que no implique cargas muy altas de electrolitos o cambios bruscos de pH y temperatura. En concentraciones relativamente pequeñas, la XG da lugar a productos con una alta viscosidad. Aunque su concentración puede variar de unas formulaciones a otras, normalmente oscila entre el 0.20 % p/p y el 0.50 % p/p; valores más altos, por encima del 1 % p/p, producen una gomosis excesiva que se percibe como negativa.

3.1.5. Fase oleosa

Como fase oleosa se utilizó un aceite de pescado enriquecido con PUFAs ω -3 (PronovaPure® 360:240 TG) suministrado por BASF (Alemania). En la Tabla 8 se muestra el perfil de ácidos grasos de este aceite de pescado:

Tabla 8. Perfil de ácidos grasos del aceite de pescado PronovaPure® 360:240 TG.

Perfil de ácidos grasos	Especificación	Resultado
EPA (como TG)	Min. 360 mg/g	384 mg/g
DHA (como TG)	Min. 240 mg/g	255 mg/g
EPA y DHA (como TGs)	600 – 700 mg/g	639 mg/g
PUFAs ω -3 totales (como TGs)	Min. 650 mg/g	773 mg/g
EPA (como FA)	Min. 345 mg/g	369 mg/g
DHA (como FA)	Min. 230 mg/g	245 mg/g

Por otra parte, para protegerlo de la oxidación lipídica se le añadió una mezcla de tocoferoles o tocoferoles mixtos en la cantidad de 1 mg/g.

3.1.6. Gelificante

Como agente estructurante se utilizó un aceite de colza totalmente hidrogenado (Palsgaard® 6111, polvo) suministrado por Palsgaard (Dinamarca). El aceite de colza totalmente hidrogenado se obtuvo a partir del extracto de la semilla de la colza (*Brassica napus*) mediante un proceso de refinado e hidrogenación; por consiguiente, está formado por triglicéridos cuya composición de ácidos grasos es una mezcla de SFAs. Su punto de fusión es de aproximadamente 61 °C.

3.1.7. Antioxidante

Como antioxidante se usó curcumina (E-100) (C₂₁H₂₀O₆, número CAS 458-37-7, 85 % de pureza), un compuesto del que ya se ha hablado extensamente en el apartado 1.2. Fue suministrada por Solutex (España).

3.1.8. Reactivos y productos químicos

A continuación se relacionan los diferentes reactivos y productos químicos, indicando el método en que fueron usados.

Para la medida de la conductividad eléctrica:

- Solución patrón de conductividad eléctrica 1413 µS/cm a 25 °C. CRISON Hach (Ref.: 97-10).
- Solución patrón de conductividad eléctrica 12.88 mS/cm a 25 °C. CRISON Hach (Ref.: 97-20).

Para la medida del pH:

- Solución patrón de pH 4.01 a 25 °C. CRISON Hach (Ref.: 94-63).
- Solución patrón de pH 7.00 a 25 °C. CRISON Hach (Ref.: 94-64).
- Solución patrón de pH 9.21 a 25 °C. CRISON Hach (Ref.: 94-65).

Para la medida del índice de peróxidos (PV):

- Ácido clorhídrico 1 N (HCl, número CAS 7647-01-0). PanReac AppliChem (Ref.: 181021.1211).
- 1-Butanol ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$, número CAS 71-36-3). Pureza: 99.9 %. PanReac AppliChem (Ref.: 361082.1611).
- Cloruro de bario dihidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, número CAS 10326-27-9). Pureza: 99 %. PanReac AppliChem (Ref.: 141182.1210).
- Hidroperóxido de cumeno ($\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OOH}$, número CAS 80-15-9). Pureza: 80 %. Alfa Aesar (Ref.: L06866).
- Isooctano o 2,2,4-trimetilpentano ($(\text{CH}_3)_3\text{CCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, número CAS 540-84-1). Pureza: 99.5 %. PanReac AppliChem (Ref.: 362064.1612).
- Metanol (CH_3OH , número CAS 67-56-1). Pureza: 99.9 %. PanReac AppliChem (Ref.: 361091.1611).
- 2-Propanol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, número CAS 67-63-0). Pureza: 99.7 %. PanReac AppliChem (Ref.: 161090.1211).
- Sulfato de hierro (II) heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, número CAS 7782-63-0). Pureza: 99.5 %. PanReac AppliChem (Ref.: 141362.1210).
- Tiocianato de amonio (NH_4SCN , número CAS 1762-95-4). Pureza: 99 %. PanReac AppliChem (Ref.: 141143.1210).

Para la medida del índice de *p*-Anisidina (*p*-AnV):

- Ácido acético glacial (CH_3COOH , número CAS 64-19-7). Pureza: 99.8 %. PanReac (Ref.: 361008.1612).
- *p*-Anisidina o 4-metoxianilina ($\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{NH}_2$, número CAS 104-94-9). Pureza: 99 %. Acros Organics (Ref.: 104832500).
- Isooctano o 2,2,4-trimetilpentano ($((\text{CH}_3)_3\text{CCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, número CAS 540-84-1). Pureza: 99.5 %. PanReac AppliChem (Ref.: 362064.1612).
- *trans,trans*-2,4-decadienal ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$, número CAS 25152-84-5). Pureza: 85 %. Sigma-Aldrich (Ref.: 180513-5G).

Para la medida de la concentración de curcumina:

- Acetonitrilo (CH_3CN , número CAS 75-05-8). Pureza: 99.9 %. PanReac AppliChem (Ref.: 361881.1611).
- Amoníaco (NH_3 , número CAS 7664-41-7). Pureza: 30 %. PanReac (Ref.: 141130.1611).
- Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, número CAS 64-17-5). Pureza: 96 %. PanReac AppliChem (Ref.: 121085.1211).
- Fluoruro de amonio (NH_4F , número CAS 12125-01-8). Pureza: 98.0 %. Sigma-Aldrich (Ref.: 216011-500G).

Para la simulación *in vitro* del tracto gastrointestinal humano (SimuGIT):

- Ácido clorhídrico (HCl , número CAS 7647-01-0). Pureza: 37 %. PanReac AppliChem (Ref.: 131020.1611).
- Carbonato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, número CAS 10361-29-2). Pureza: 30.0 %. Merck (Ref.: 1595040250).
- Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, número CAS 10035-04-8). Pureza: 99.0 %. PanReac (Ref.: 131232.1211).

- Cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, número CAS 7791-18-6). Pureza: 98 %. PanReac AppliChem (Ref.: 141396.1209).
- Cloruro de potasio (KCl, número CAS 7447-40-7). Pureza: 99.5 %. Merck (Ref.: 1049361000).
- Cloruro de sodio (NaCl, número CAS 7647-14-5). Pureza: 99.0 %. PanReac (Ref.: 121659.1211).
- Dodecilsulfato sódico ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OS}(=\text{O})_2\text{O}^-\text{Na}^+$, número CAS 151-21-3). Pureza: 85.0 %. PanReac (Ref.: 142363.1211).
- Hidrogenocarbonato de sodio (NaHCO_3 , número CAS 144-55-8). Pureza: 99.5 %. Sigma-Aldrich (Ref.: S5761-500G).
- Dihidrógenofosfato de potasio (KH_2PO_4 , número CAS 7778-77-0). Pureza: 99.5 %. PanReac AppliChem (Ref.: A1043.0500).
- Hidróxido de sodio (NaOH, número CAS 1310-73-2). Pureza: 98 %. PanReac (Ref.: 131687.1211).
- Lipoid P 45 (lecitina de soja sin aceite con 45 % de fosfatidilcolina). Lipoid GmbH (Ref.: 537000).
- Sales biliares. Sigma-Aldrich (Ref.: B8756-100G).
- α -amilasa de saliva humana (número CAS 9000-90-2). Lote: SLCD1111. Actividad enzimática: 300 – 1500 units/mg protein. Sigma-Aldrich (Ref.: A1031-1KU).
- Lipasa de páncreas porcino (número CAS 9001-62-1). Lote: SLBH6427V. Actividad enzimática: 100 – 500 units/mg protein. Sigma-Aldrich (Ref.: L3126-25G).
- Pancreatina de páncreas porcino (número CAS 8049-47-6). Lote: SLBT4919. Sigma-Aldrich (Ref.: P3292-25G).
- Pepsina de mucosa gástrica porcina (número CAS 9001-75-6). Lote: BCCC1803. Actividad enzimática: 250 units/mg protein. Sigma-Aldrich (Ref.: P7000-25G).

- Tripsina de páncreas bovino (número CAS 9002-07-7). Lote: SLCB2341. Actividad enzimática: ≥ 7500 BAEE units/mg solid. Sigma-Aldrich (Ref.: T9201-500MG).

Para la caracterización de la goma xantana y los estudios de estabilidad con el tiempo frente a distintas condiciones ambientales (pH y fuerza iónica):

- Ácido clorhídrico (HCl, número CAS 7647-01-0). Pureza: 37 %. PanReac AppliChem (Ref.: 131020.1611).
- Cloruro de sodio (NaCl, número CAS 7647-14-5). Pureza: 99.0 %. PanReac (Ref.: 121659.1211).
- Hidróxido de sodio (NaOH, número CAS 1310-73-2). Pureza: 98 %. PanReac (Ref.: 131687.1211).

3.2. Métodos

En este apartado se describe la metodología utilizada para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

3.2.1. Carga superficial de la goma xantana

La carga superficial de la XG en función del pH se determinó midiendo el potencial zeta de las soluciones de este polisacárido a diferentes pH, siguiendo el procedimiento descrito en el subapartado 3.2.4.3. de esta Memoria. Para ello, se prepararon soluciones de XG (0.35 % p/p) en fase acuosa y se mantuvieron en agitación a 25 °C durante 24 h para conseguir una completa hidratación del polisacárido. Posteriormente, se ajustó el pH de estas soluciones con HCl 1 M o NaOH 1 M, según correspondiera, en el intervalo de 1 a 13, y se midió el potencial zeta con un Zetasizer Nano ZS utilizando la tecnología de dispersión de luz electroforética.

3.2.2. Preparación de los diferentes sistemas de liberación estudiados

En este subapartado se detalla el procedimiento experimental que se ha seguido para la elaboración de los diferentes sistemas de liberación estudiados en este trabajo.

3.2.2.1. Oleogeles

En primer lugar, se pesaron cuidadosamente las cantidades correspondientes de agente gelificante, curcumina y aceite de pescado, en el orden indicado (estas cantidades se obtuvieron realizando un DOE, ver apartado 4.1.1.). Seguidamente, se mezclaron

vigorosamente todos los componentes durante 15 min para conseguir una mezcla homogénea, utilizando un agitador magnético a 1200 rpm. Esta mezcla se calentó al baño María hasta la temperatura correspondiente (siempre igual o superior a la temperatura de fusión del agente gelificante), manteniendo una agitación de 300 rpm. El calentamiento se realizó lo más rápidamente posible con objeto de minimizar la exposición de los diferentes componentes al calor, que origina procesos de oxidación lipídica y de degradación de la curcumina. A esas temperaturas se forma una suspensión homogénea que gelifica cuando se enfría a temperatura ambiente. Por tanto, la mezcla resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente (25 °C), manteniéndola en agitación con un agitador magnético a 1200 rpm durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, la curcumina se ha disuelto completamente en la fase oleosa y no se observan partículas en suspensión. El oleogel así preparado, inmediatamente después de su formación, se guardó en un recipiente de vidrio con tapón de rosca y anillo de sellado de silicona y se mantuvo en oscuridad durante 50 días a temperatura constante (25 °C y 40 °C) para estudiar su estabilidad química con el tiempo en condiciones ambientales y de envejecimiento aceleradas. El procedimiento aquí descrito garantiza la disolución total de la curcumina en la fase oleosa antes de la formación del sistema estructurado.

3.2.2.2. Emulsiones W/Og

A continuación, se describe el proceso de elaboración de las emulsiones W/Og, tanto de las preparadas mediante homogenización a alta velocidad como de las preparadas mediante homogenización a alta presión.

3.2.2.2.1. Mediante homogenización a alta velocidad

En primer lugar, se pesaron por un lado las cantidades correspondientes de oleogel y emulgente hidrofóbico, que constituyen la fase continua, y por otro la de fase acuosa, que forma la fase dispersa (estas cantidades se obtuvieron realizando un DOE, ver apartado 4.2.1.). A continuación, se mezclaron vigorosamente los componentes de

la fase continua mediante un agitador tipo vórtex hasta su completa disolución (30 s, aproximadamente). Posteriormente, se adicionó la fase dispersa sobre la fase continua y se llevó a cabo el proceso de emulsificación con un homogenizador de rotor y estator que operaba a temperatura ambiente (25 °C) y a la velocidad de homogenización correspondiente (entre 10000 y 20000 rpm) durante 5 min. La emulsión W/Og así preparada, inmediatamente después de su elaboración, se vertió en un recipiente de plástico con tapón de rosca y se guardó en oscuridad y a temperatura constante de 25 °C durante 10 días, con objeto de estudiar su estabilidad con el tiempo. Tras la preparación de cada emulsión, se limpió minuciosamente el homogenizador utilizado realizando dos enjuagues con agua caliente, otro más con un disolvente orgánico (etanol 96°) para solubilizar posibles restos de fase oleosa y curcumina y, finalmente, un último enjuague con agua destilada.

3.2.2.2. Mediante homogenización a alta presión

En primer lugar, se pesaron por un lado las cantidades correspondientes de oleogel y emulgente hidrofóbico, que constituyen la fase continua, y por otro la de fase acuosa, que forma la fase dispersa (estas cantidades se obtuvieron realizando un DOE, ver apartado 4.2.1.). A continuación, se mezclaron vigorosamente los componentes de la fase continua mediante un agitador tipo vórtex hasta su completa disolución (30 s, aproximadamente). Posteriormente, se adicionó la fase dispersa sobre la fase continua y se llevó a cabo una primera emulsificación con un homogenizador de rotor y estator, a 4000 rpm durante 2 min. Finalmente, se realizó la homogenización con un homogenizador de alta presión que operaba a temperatura ambiente (25 °C) y a la presión de homogenización correspondiente (entre 4500 y 11500 psi). La emulsión W/Og así preparada, inmediatamente después de su elaboración, se vertió en un recipiente de plástico con tapón de rosca y se guardó en oscuridad y a temperatura constante de 25 °C durante 10 días, con objeto de estudiar su estabilidad con el tiempo. Tras la preparación de cada emulsión, se limpió minuciosamente el homogenizador utilizado realizando dos enjuagues con agua caliente, otro más con un disolvente

orgánico (etanol 96°) para solubilizar posibles restos de fase oleosa y curcumina y, finalmente, un último enjuague con agua destilada.

3.2.2.3. Emulsiones Og/W

A continuación, se describe el proceso de elaboración de las emulsiones Og/W, tanto de las preparadas mediante homogenización a alta velocidad como de las preparadas mediante homogenización a alta presión.

3.2.2.3.1. Mediante homogenización a alta velocidad

En primer lugar, se pesaron por un lado las cantidades correspondientes de fase acuosa y emulgente hidrofílico, que constituyen la fase continua, y por otro la de oleogel, que forma la fase dispersa (estas cantidades se obtuvieron realizando un DOE, ver apartado 4.3.1.). A continuación, se mezclaron vigorosamente los componentes de la fase continua mediante un agitador tipo vórtex hasta su completa disolución (30 s, aproximadamente). Posteriormente, se adicionó la fase dispersa sobre la fase continua y se llevó a cabo el proceso de emulsificación con un homogenizador de rotor y estator que operaba a temperatura ambiente (25 °C) y a la velocidad de homogenización correspondiente (comprendida entre 6000 y 12000 rpm) durante 5 min. Finalmente se añadió el estabilizante, previamente pesado, que se dispersó mediante el homogenizador de rotor y estator a 3400 rpm durante 3 min. La emulsión Og/W así preparada, inmediatamente después de su elaboración, se vertió en un recipiente de plástico con tapón de rosca y se guardó en oscuridad y a temperatura constante de 25 °C durante 30 días, con objeto de estudiar su estabilidad con el tiempo. Tras la preparación de cada emulsión, se limpió el homogenizador realizando dos enjuagues con agua caliente, otro más con un disolvente orgánico (etanol 96°) para solubilizar posibles restos de fase oleosa y curcumina y, finalmente, un último enjuague con agua destilada.

3.2.2.3.2. Mediante homogenización a alta presión

En primer lugar, se pesaron por un lado las cantidades correspondientes de fase acuosa y emulgente hidrofílico, que constituyen la fase continua, y por otro la de oleogel, que forma la fase dispersa (estas cantidades se obtuvieron realizando un DOE, ver apartado 4.3.1.). A continuación, se mezclaron vigorosamente los componentes de la fase continua mediante un agitador tipo vórtex hasta su completa disolución (30 s, aproximadamente). Posteriormente, se adicionó la fase dispersa sobre la fase continua y se llevó a cabo una primera emulsificación con un homogenizador de rotor y estator, a 4000 rpm durante 2 min. Seguidamente, se realizó la homogenización con un homogenizador de alta presión que operaba a temperatura ambiente (25 °C) y a la presión de homogenización correspondiente (comprendida en el rango de 2000 a 6000 psi). Finalmente se añadió el estabilizante, previamente pesado, que se dispersó mediante el homogenizador de rotor y estator a 3400 rpm durante 3 min. La emulsión Og/W así preparada, inmediatamente después de su elaboración, se vertió en un recipiente de plástico con tapón de rosca y se guardó en oscuridad y a temperatura constante de 25 °C durante 30 días, con objeto de estudiar su estabilidad con el tiempo. Tras la preparación de cada emulsión, se limpió minuciosamente el homogenizador utilizado realizando dos enjuagues con agua caliente, otro más con un disolvente orgánico (etanol 96°) para solubilizar posibles restos de fase oleosa y curcumina y, finalmente, un último enjuague con agua destilada.

3.2.2.4. Emulsiones $W_1/Og/W_2$

A continuación, se describe el proceso de elaboración de las emulsiones múltiples $W_1/Og/W_2$. Estas emulsiones se elaborarán solamente mediante homogenización a alta velocidad.

3.2.2.4.1. Emulsión primaria W_1/Og

En primer lugar, se pesaron por un lado las cantidades correspondientes de oleogel y emulgente hidrofóbico, que constituyen la fase continua; y por otro las de fase acuosa, emulgente hidrofílico y estabilizante, que forman la fase dispersa (estas cantidades se obtuvieron realizando un DOE, ver apartado 4.4.1.). A continuación, se mezclaron vigorosamente y de forma independiente los componentes de la fase continua y los de la fase dispersa mediante un agitador tipo vórtex hasta su completa disolución (30 s, aproximadamente). Posteriormente, se adicionó la fase dispersa sobre la fase continua y se llevó a cabo el proceso de emulsificación con un homogenizador de rotor y estator que operaba a temperatura ambiente (25 °C) y a la velocidad de homogenización correspondiente (en el intervalo de 9000 a 21000 rpm) durante 5 min. Esta emulsión primaria W_1/Og fue la que se utilizó como fase dispersa de la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$. Tras la preparación de cada emulsión, se limpió minuciosamente el homogenizador utilizado realizando dos enjuagues con agua caliente, otro más con un disolvente orgánico (etanol 96°) para solubilizar posibles restos de fase oleosa y curcumina y, finalmente, un último enjuague con agua destilada.

3.2.2.4.2. Emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$

En primer lugar, se pesaron por un lado las cantidades correspondientes de fase acuosa y emulgente hidrofílico, que constituyen la fase continua, y por otro la de emulsión primaria W_1/Og , que forma la fase dispersa (estas cantidades se obtuvieron realizando un DOE, ver apartado 4.4.1.). A continuación, se mezclaron vigorosamente los componentes de la fase continua mediante un agitador tipo vórtex hasta su completa disolución (30 s, aproximadamente). Posteriormente, se adicionó la fase dispersa sobre la fase continua y se llevó a cabo el proceso de emulsificación con un homogenizador de rotor y estator que operaba a temperatura ambiente (25 °C) y a la velocidad de homogenización correspondiente (entre 3000 y 7000 rpm) durante 5 min. Es importante destacar que esta velocidad de homogenización siempre debe ser menor que la utilizada para la preparación de la emulsión primaria, para evitar la rotura de los glóbulos

internos (W_1/Og). Finalmente se añadió el estabilizante, previamente pesado, que se dispersó mediante el homogenizador de rotor y estator a 3400 rpm durante 3 min. La emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$ así preparada, inmediatamente después de su elaboración, se vertió en un recipiente de plástico con tapón de rosca y se guardó en oscuridad y a temperatura constante de 25 °C durante 30 días, con objeto de estudiar su estabilidad con el tiempo. Tras la preparación de cada emulsión, se limpió minuciosamente el homogenizador utilizado realizando dos enjuagues con agua caliente, otro más con un disolvente orgánico (etanol 96°) para solubilizar posibles restos de fase oleosa y curcumina y, finalmente, un último enjuague con agua destilada.

3.2.3. Estudios de estabilidad frente a diferentes condiciones ambientales

En este subapartado se detalla el procedimiento experimental utilizado para estudiar la estabilidad de los sistemas de liberación preparados frente a diferentes condiciones ambientales: pH, fuerza iónica, luz y temperatura.

3.2.3.1. pH

Una vez preparado el sistema de liberación correspondiente, inmediatamente después de su elaboración, se le midió el pH y se le ajustó a pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 con HCl 1 M o NaOH 1 M, según correspondiera. Las muestras resultantes se guardaron en estufa a temperatura constante (25 °C) durante 36 días y su estabilidad se determinó mediante la evolución del tamaño medio de partícula con el tiempo.

3.2.3.2. Fuerza iónica

Una vez preparado el sistema de liberación correspondiente, inmediatamente después de su elaboración, se le ajustó la fuerza iónica a 0, 10, 20, 50, 100, 200, 400 y

1000 mM, mediante la adición de diferentes cantidades de NaCl 4 M. Las muestras resultantes se guardaron en estufa a temperatura constante (25 °C) durante 36 días y su estabilidad se determinó mediante la evolución del tamaño medio de gota con el tiempo.

3.2.3.3. Luz

Una vez preparado el sistema de liberación correspondiente, inmediatamente después de su elaboración, se depositó durante 15 días en una cámara en oscuridad y en otra con iluminación controlada, ambas a 25 °C. La iluminación de la segunda cámara fue proporcionada por dos lámparas halógenas (PHILIPS TLD 18W/54) de 18 W cada una. Su estabilidad se determinó siguiendo la evolución de la concentración de curcumina en el sistema de liberación, en oscuridad e iluminado, con el tiempo.

3.2.3.4. Temperatura

Una vez preparado el sistema de liberación correspondiente, inmediatamente después de su elaboración, se depositó en un recipiente y éste en una estufa a temperatura controlada (a 25 °C y 80 °C) durante 8 días. Su estabilidad se determinó siguiendo la evolución del tamaño medio de partícula y de la concentración de curcumina en el sistema de liberación, a 25 °C y 80 °C, con el tiempo.

3.2.4. Caracterización de los diferentes sistemas de liberación estudiados

En este subapartado se describe la metodología utilizada para la caracterización de los diferentes sistemas de liberación estudiados.

3.2.4.1. Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica, σ , es un parámetro físico que mide la capacidad de una solución para transportar una corriente eléctrica. Esta capacidad depende de la presencia de iones, de la concentración total y relativa de los mismos, de su movilidad y valencia, así como de la temperatura a la que se realice la medida. Generalmente, los compuestos inorgánicos son buenos conductores de electricidad en disoluciones acuosas; sin embargo, los compuestos orgánicos, que no se disocian en disolución acuosa, no conducen la corriente eléctrica. Por otra parte, la conductividad eléctrica debe considerarse una medida acumulativa, es decir, que solamente indica el contenido total de iones, no los tipos de iones presentes en la muestra. Las unidades de conductividad eléctrica suelen darse en $\mu\text{S}/\text{cm}$ o mS/cm , dependiendo del contenido salino de la muestra.

En una emulsión, la conductividad eléctrica de las fases que la componen suele ser radicalmente diferente: por ejemplo, la fase acuosa, que normalmente contiene electrolitos, presenta una alta conductividad; en cambio, la fase oleosa no conduce la corriente eléctrica. Por otra parte, la conductividad eléctrica depende exclusivamente de la naturaleza de la fase continua, puesto que la fase dispersa no presenta continuidad entre los electrodos.

Mediante un puente de Wheatstone y una célula de conductividad apropiada (en nuestro caso, una célula 52 92 de platino), se determinó la conductividad eléctrica de la muestra por comparación, a la misma temperatura, de la resistencia eléctrica frente a soluciones patrón de conductividad eléctrica ($1413 \mu\text{S}/\text{cm}$ y $12.88 \text{mS}/\text{cm}$). A continuación se describe el procedimiento que se ha seguido tanto para la calibración del equipo como para la realización de las medidas.

3.2.4.1.1. Calibración del equipo

Si se es cuidadoso y se tiene la precaución de lavar bien el electrodo con agua destilada después de cada medida, solamente es necesario calibrar el equipo cada 15

días. Para ello se utilizan dos soluciones patrón de conductividad eléctrica: una de KCl 0.01 M (1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$) y otra de KCl 0.1 M (12.88 mS/cm). Para calibrar el conductímetro CRISON GLP 31, se siguieron los siguientes pasos:

1. Lavar muy bien el electrodo con agua destilada.
2. Secar bien el electrodo.
3. Sumergir el electrodo en la solución patrón de 1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y agitar suavemente dicha solución para homogenizarla y eliminar las posibles burbujas de aire. Esperar unos segundos hasta que se produzca la estabilización de la medida.
4. Lavar muy bien el electrodo con agua destilada.
5. Secar bien el electrodo.
6. Sumergir el electrodo en la solución patrón de 12.88 mS/cm y agitar suavemente dicha solución para homogenizarla y eliminar las posibles burbujas de aire. Esperar unos segundos hasta que se produzca la estabilización de la medida.
7. Lavar muy bien el electrodo con agua destilada.
8. Secar bien el electrodo.

3.2.4.1.2. Proceso de medida

Para medir la conductividad eléctrica se introduce el electrodo, perfectamente limpio y seco, en unos 100 mL de muestra. Este electrodo tiene unos agujeros de ventilación que deben quedar sumergidos durante la medida. La muestra debe agitarse suavemente para procurar su homogenización y eliminar las posibles burbujas de aire, tomando la lectura una vez se haya estabilizado. Después de cada medida, se lava el electrodo con agua destilada y se seca cuidadosamente para la siguiente medida. Una vez terminadas todas las mediciones, se introduce el electrodo en una disolución electrolítica de KCl 0.3 M saturada de AgCl (CRISON Hach, Ref.: 95-01) para su correcto mantenimiento y conservación.

3.2.4.2. pH

El pH es una medida de la acidez o alcalinidad de una solución e indica la concentración de iones de hidrógeno presentes en determinadas soluciones. El principio básico de la determinación electroquímica del pH es la medida de la actividad de los iones H^+ por mediciones potenciométricas, utilizando para ello un potenciómetro equipado con un electrodo de referencia (generalmente de Ag/AgCl) y un electrodo de vidrio que es sensible al ion de hidrógeno. Su medida se basa en la medida del potencial eléctrico que se crea en la membrana de un electrodo de vidrio, y que es función de la actividad de los iones hidrógeno a ambos lados de la membrana.

La f.e.m. producida en el sistema del electrodo de vidrio (en nuestro caso, un electrodo de pH 50 14 T doble unión con barrera a Ag^+) varía linealmente con el pH. Comparando esta f.e.m. con el pH de diferentes soluciones patrón de pH (4.01, 7.00 y 9.21), se determina el valor del pH de la muestra por interpolación. A continuación se describe el procedimiento que se ha seguido tanto para la calibración del equipo como para la realización de las medidas.

3.2.4.2.1. Calibración del equipo

En este caso, a diferencia de lo que ocurría en el conductímetro, a pesar de que se haya sido cuidadoso y se haya tenido la precaución de lavar bien el electrodo con agua destilada después de cada medida, es necesario calibrar el equipo diariamente. Para ello se utilizan tres soluciones patrón de pH: una de ftalato ácido de potasio (pH = 4.01), otra de fosfatos disódico y potásico (pH = 7.00) y otra de bórax (pH = 9.21). Para calibrar el pH-metro CRISON GLP 21, se siguieron los siguientes pasos:

1. Lavar muy bien el electrodo con agua destilada.
2. Secar bien el electrodo.
3. Sumergir el electrodo en la solución patrón de pH = 4.01 y agitar suavemente dicha solución para homogenizarla y eliminar las posibles

burbujas de aire. Esperar unos segundos hasta que se produzca la estabilización de la medida.

4. Lavar muy bien el electrodo con agua destilada.
5. Secar bien el electrodo.
6. Sumergir el electrodo en la solución patrón de pH = 7.00 y agitar suavemente dicha solución para homogenizarla y eliminar las posibles burbujas de aire. Esperar unos segundos hasta que se produzca la estabilización de la medida.
7. Lavar muy bien el electrodo con agua destilada.
8. Secar bien el electrodo.
9. Sumergir el electrodo en la solución patrón de pH = 9.21 y agitar suavemente dicha solución para homogenizarla y eliminar las posibles burbujas de aire. Esperar unos segundos hasta que se produzca la estabilización de la medida.
10. Lavar muy bien el electrodo con agua destilada.
11. Secar bien el electrodo.

3.2.4.2.2. Proceso de medida

Para medir el pH se introduce el electrodo, perfectamente limpio y seco, en unos 50 mL de muestra. Este electrodo cuenta con dos diafragmas cerámicos que deben quedar sumergidos durante la medida. La muestra debe agitarse suavemente para procurar su homogenización y eliminar las posibles burbujas de aire, tomando la lectura una vez se haya estabilizado. Después de cada medida, se lava el electrodo con agua destilada y se seca cuidadosamente para la siguiente medida. Una vez terminadas todas las mediciones, se introduce el electrodo en una disolución electrolítica de KCl 0.3 M saturada de AgCl (CRISON Hach, Ref.: 95-01) para su correcto mantenimiento y conservación.

3.2.4.3. Potencial zeta

Es habitual que las partículas coloidales dispersas en un medio acuoso porten carga eléctrica en su superficie. Así ocurre, por ejemplo, con los agregados de macromoléculas de naturaleza polielectrolítica o con las nanopartículas metálicas recubiertas de moléculas estabilizantes cargadas. En el medio acuoso, además de los iones procedentes de las partículas coloidales, pueden existir iones procedentes de la disolución de algún electrolito que se añada para regular la fuerza iónica. El potencial eléctrico generado por la carga de la partícula coloidal afecta a la distribución que presentan esos iones en la región de líquido que rodea a la partícula, apareciendo un perfil de concentración iónica desde la superficie de la partícula hasta el seno de la disolución. A su vez, la distribución de iones influirá en la variación del potencial eléctrico con la distancia a la superficie de la partícula. En términos generales, la concentración de *contra-iones* (iones de carga opuesta a la carga de la partícula) en torno a la superficie de la partícula es mayor que la concentración de *contra-iones* en el seno de la disolución. Como ya se ha comentado, el perfil de concentración generado está íntimamente relacionado con el modo en que varía el potencial eléctrico desde la superficie de la partícula hasta el seno de la disolución. El potencial zeta no es más que el valor del potencial eléctrico a una determinada distancia de la superficie de la partícula, tal y como se detallará a continuación.

Los perfiles de concentración iónica y de potencial eléctrico mencionados anteriormente permiten la distinción de varias zonas en la región de líquido que rodea a la partícula coloidal. Así, los iones adyacentes a la partícula están fuertemente unidos (adsorbidos) a su superficie y forman la denominada capa compacta o *capa de Stern*, mientras que los iones que no están en contacto directo con la superficie mantienen su capa de solvatación, no están firmemente unidos a la partícula (presentan movilidad) y forman la denominada *capa difusa* (Figura 28). Esta estructura es lo que se conoce tradicionalmente como '*doble capa eléctrica*'. En la capa de Stern, el potencial decrece linealmente con la distancia a la superficie de la partícula; mientras que en la capa difusa, el potencial presenta un decaimiento de tipo aproximadamente exponencial. La capa difusa se puede considerar, a su vez, constituida por dos zonas o subcapas: una

zona interna (más próxima a la superficie de la partícula) donde los iones forman una entidad estable con la partícula y se mueven con ella, y una zona externa (más alejada de la superficie de la partícula) donde la asociación entre los iones y la partícula es débil y ésta no los arrastra en su desplazamiento. El valor del potencial eléctrico en la frontera entre la capa de Stern y la capa difusa se denomina potencial de Stern, mientras que el valor del potencial en la frontera entre la zona interna y la zona externa de la capa difusa se denomina potencial zeta, ζ . Esta segunda frontera, separación entre los iones que acompañan el desplazamiento de la partícula y los iones libres, no es un lugar tan bien definido como la frontera entre los iones adsorbidos y la capa difusa y se la suele denominar plano de deslizamiento (*slipping plane*) o superficie de cizalla hidrodinámica, por ser la superficie de contacto efectiva entre la partícula coloidal y el disolvente, responsable de la hidrodinámica de la partícula. El potencial zeta es, por tanto, el valor del potencial eléctrico en esta superficie.

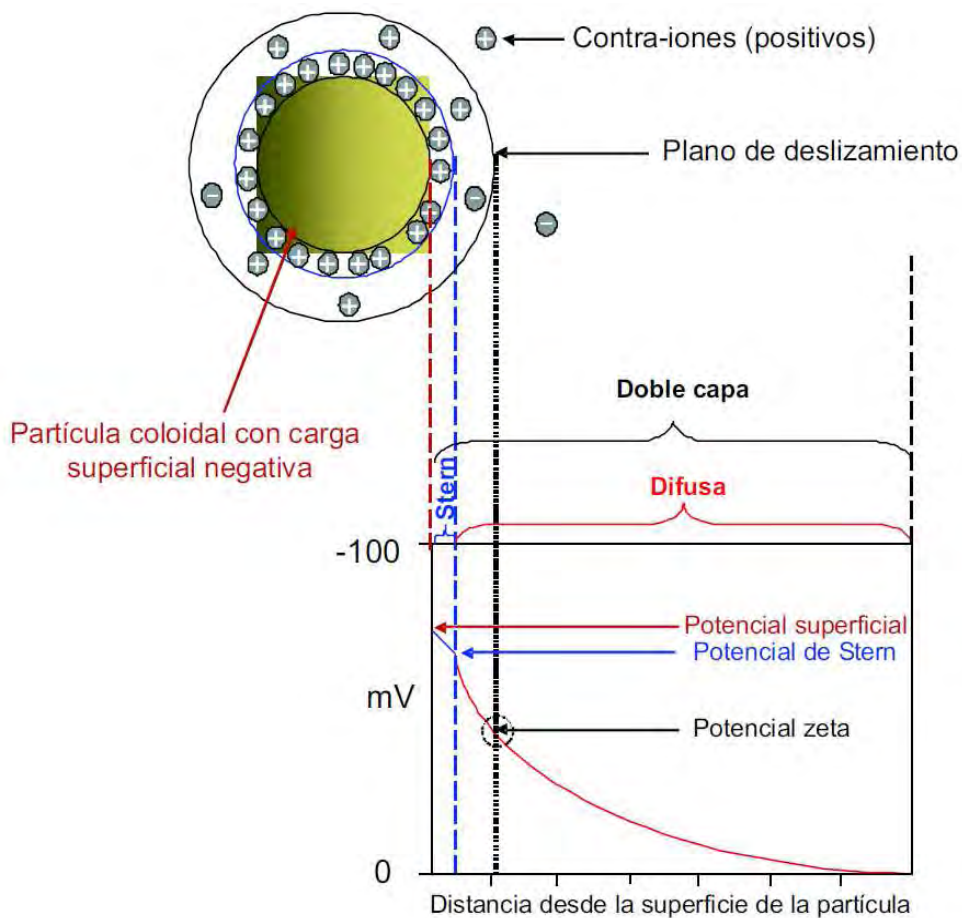


Figura 28. Representación de la doble capa eléctrica y el potencial zeta (Fernández Espín, 2018).

El valor del potencial zeta se utiliza como indicador de la estabilidad de una suspensión coloidal. Si todas las partículas en suspensión tienen un potencial zeta muy positivo o muy negativo, tenderán a repelerse entre sí por lo que no tendrán tendencia a agregar y la suspensión será estable. Se asume que partículas con un potencial zeta mayor que + 30 mV o menor que - 30 mV son estables, mientras que si el potencial zeta está comprendido entre ambos valores, la disolución es inestable y las partículas acabarán agregando y precipitando.

El potencial zeta se ve afectado por varios parámetros característicos de la disolución, siendo los principales el pH y la fuerza iónica. Así, por ejemplo, una partícula que adquiera carga negativa por la disociación de protones adquirirá más carga negativa cuanto más alcalina sea la disolución. En cambio, la adición de ácido hará disminuir dicha carga hasta que se alcance un determinado pH para el que la carga se vea neutralizada y el potencial zeta sea cero: es el denominado punto isoeléctrico, que suele coincidir con la situación en la cual la suspensión coloidal es menos estable. La adición de más ácido provocará que la carga y el potencial zeta se vuelvan positivos. Por otro lado, la concentración de iones, es decir, la fuerza iónica del medio, influye en el espesor de la doble capa (magnitud conocida como longitud de Debye-Hückel, κ^{-1}) y en el valor del potencial a lo largo de ella. Así, cuanto mayor es la fuerza iónica, más delgada es la doble capa y más pequeño se hace el potencial zeta. Esto es consecuencia del apantallamiento eléctrico producido por los *contra-iones* próximos a la superficie de la partícula que, obviamente, será mayor cuanto mayor sea la concentración. A su vez, la disminución del potencial zeta afecta a la estabilidad de la suspensión coloidal. Una adsorción suficientemente grande de *contra-iones* puede incluso llegar a revertir el signo del potencial zeta.

Las partículas con carga en su superficie pueden interactuar con campos eléctricos produciendo diferentes tipos de efectos electrocinéticos. La técnica que se ha utilizado en esta Tesis Doctoral para medir el potencial zeta ha sido la microelectroforesis de efecto Doppler, cuyo principio de funcionamiento se muestra en la Figura 29. Esta técnica consiste en medir la movilidad de las partículas coloidales en suspensión, que se encuentran sometidas a un campo eléctrico, utilizando la dispersión de luz. Para ello, dos haces coherentes procedentes de una fuente láser de helio-neón de baja potencia se cruzan en la celda de medida que contiene la muestra donde se está

aplicando el campo eléctrico. Las partículas cargadas suspendidas en el electrolito son atraídas hacia el electrodo de carga contraria. En ese proceso, aparecen fuerzas viscosas o de fricción que se oponen al movimiento de las partículas hasta que se alcanza un régimen estacionario en el que las dos fuerzas se contrarrestan y las partículas se mueven a velocidad constante. El movimiento de las partículas causa la fluctuación de la intensidad de luz dispersada con una variación de frecuencia que se correlaciona con la velocidad de las partículas en movimiento. La luz dispersada se recoge en un fotomultiplicador y se analiza para dar un espectro de frecuencias a partir del cual se calculan las velocidades, las movilidades electroforéticas y, finalmente, los potenciales zeta de las partículas. El número de partículas en el volumen de luz dispersada es grande, por lo que el análisis estadístico es bastante fiable.

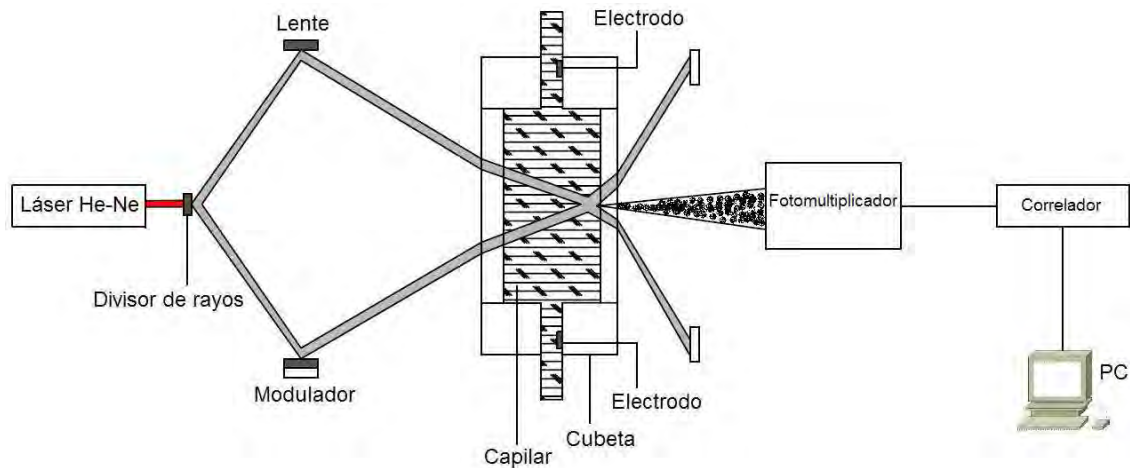


Figura 29. Esquema del principio de funcionamiento de la microelectroforesis de efecto Doppler para la medida del potencial zeta (Albarrán Castro, 2011).

La velocidad de las partículas cargadas en el medio acuoso es directamente proporcional al campo eléctrico aplicado. Se introduce así el concepto de movilidad electroforética, que se describe mediante la ecuación:

$$v_m = \mu_E \cdot E \quad \text{Ec. [1]}$$

donde v_m es la velocidad de las partículas; μ_E , la movilidad electroforética; y E , el campo eléctrico aplicado.

Por tanto, la movilidad electroforética es la velocidad de las partículas en el campo eléctrico y depende de la constante dieléctrica (ϵ), la viscosidad del medio (η) y

el potencial zeta de las partículas. Si la carga es baja ($\zeta < 30$ mV), se puede aplicar la ecuación de Henry para relacionar la movilidad electroforética y el potencial zeta:

$$\mu_E = \frac{2 \cdot \varepsilon \cdot \zeta}{3 \cdot \eta} \cdot f(\kappa_{RH}) \quad \text{Ec. [2]}$$

donde $f(\kappa_{RH})$ es la denominada función de Henry, una función que depende de la forma de la partícula. Para valores pequeños de κ_{RH} ($\kappa_{RH} < 1$) la ecuación de Henry toma el valor de la unidad, y corresponde al caso en el que la partícula es mucho más pequeña que el espesor de la doble capa. Este límite se conoce como la aproximación de Hückel y se aplica en soluciones de concentración iónica aproximadamente 0 (soluciones de conductividad muy baja). Cuando $\kappa_{RH} \gg 1$ la ecuación se aproxima a 1.5 y corresponde con partículas más grandes que el espesor de la doble capa; este límite se conoce como la aproximación de Smoluchowsky, que es la que se utilizó en nuestros ensayos.

Las medidas de potencial zeta se realizaron con un analizador de potencial zeta: el Zetasizer Nano ZS. El procedimiento de medida consistió en:

1. Introducir un pequeño volumen de la dispersión coloidal a analizar en una celda capilar plegada desechable (DTS1070, MALVERN Panalytical) que contiene dos electrodos.
2. Aplicar una diferencia de potencial eléctrico a los electrodos, cuya consecuencia es la migración de las partículas que tienen carga neta (o más estrictamente potencial zeta neto) hacia el electrodo de carga opuesta.
3. Iluminar una zona de la disolución con luz láser y medir la velocidad de migración aprovechando el efecto Doppler en la luz dispersada.
4. Transformar la velocidad en movilidad electroforética y, a partir de ella, calcular el potencial zeta.

El equipo utilizado efectúa dos medidas del potencial zeta (o de su distribución): una con inversión de campo lenta y otra con inversión de campo rápida, promediando y combinado adecuadamente los resultados de ambas medidas. Este procedimiento de “medida de modo mixto” (*Mixed Mode Measurement*), denominado M3-PALS, ha sido desarrollado por Malvern para minimizar el efecto colateral e indeseado de electroósmosis. El Zetasizer Nano ZS lleva a cabo la medida en la zona central de la

celda para evitar influencias perturbadoras de las paredes y facilitar el montaje instrumental y detecta el rayo dispersado a 12.8°. El resultado de todo ese procedimiento es una medida del potencial zeta rápida y robusta.

3.2.4.4. Tamaño de gota y distribución de tamaños de gota

El diámetro medio de gota, así como su distribución, puede determinarse experimentalmente de muchas formas: microscopía y análisis de imagen, dispersión de luz estática (SLS), dispersión de luz dinámica (DLS), difracción láser (LD), propiedades eléctricas y movimiento relativo gota-fase externa. En esta Tesis Doctoral se ha utilizado una u otra forma en función del sistema de liberación estudiado: la microscopía y el análisis de imágenes se empleó para las emulsiones W/Og y la difracción láser para las emulsiones Og/W y $W_1/Og/W_2$. La difracción láser es una técnica muy sencilla, rápida y repetible, ampliamente utilizada en muestras con tamaños que van desde los cientos de nanómetros hasta varios milímetros; sin embargo, requiere que el sistema a medir sea relativamente transparente o, en caso contrario, debe diluirse en un líquido transparente hasta alcanzar un rango de oscurecimiento adecuado. En las emulsiones Og/W y $W_1/Og/W_2$, de fase externa acuosa, se usa agua destilada como dispersante pero, en el caso de las emulsiones W/Og, de fase continua oleosa, habría que utilizar como dispersante el propio aceite de pescado enriquecido con PUFAs ω -3 o cualquier otro en el que fuese soluble, con el consiguiente coste económico que eso conlleva y la dificultad que implica para la limpieza del equipo entre una muestra y otra. Por tanto, en el caso de las emulsiones W/Og, se decidió utilizar la microscopía y el análisis de imágenes para determinar el tamaño de gota. A continuación, se detalla el procedimiento experimental seguido en ambos casos.

3.2.4.4.1. Microscopía y análisis de imágenes

Las imágenes de microscopía de fluorescencia y confocal se adquirieron con un microscopio invertido LEICA DMI 6000B equipado con un láser de argón de 488 nm.

Estas imágenes (Figura 30), de resolución 1024 x 1024 píxeles, se obtuvieron utilizando un objetivo de 63.0x1.40 OIL UV de inmersión en aceite, sin ningún tipo de magnificación adicional (ventana del PMT de 500 nm a 546 nm). La adquisición de datos se controló manualmente y el procesamiento de datos se llevó a cabo con la aplicación Leica LAS AF Lite 3.3.

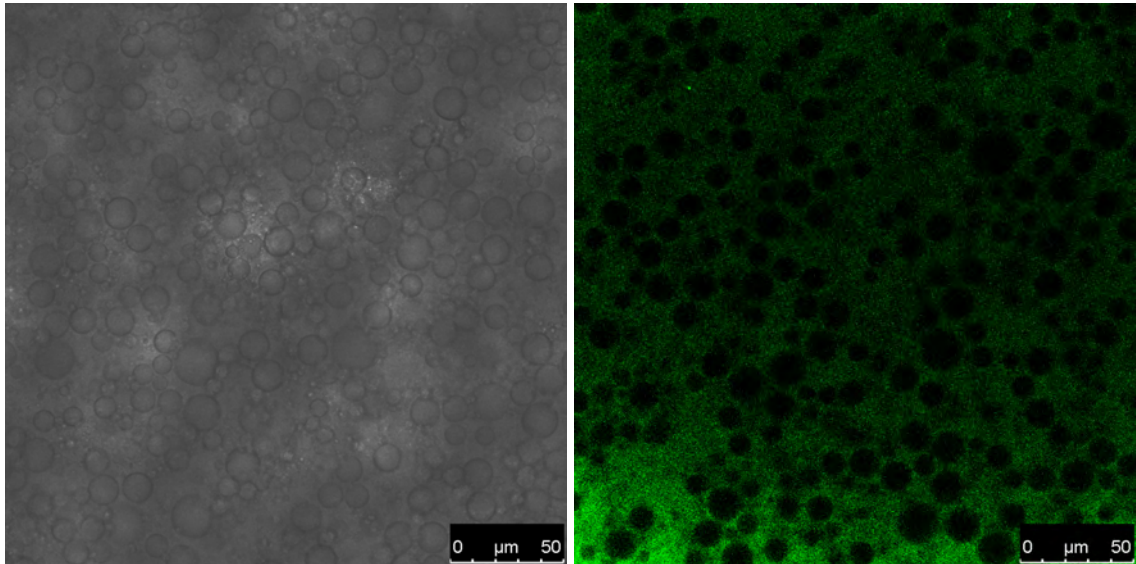


Figura 30. Imágenes de microscopía de fluorescencia y confocal de una emulsión W/Og conteniendo curcumina.

En cuanto al procedimiento operatorio, se colocó una gota de muestra sobre un portaobjetos, se protegió con un cubreobjetos (0.17 mm de grosor) intentando siempre que no hubiera espacio de aire o burbujas atrapadas entre la muestra y el cubreobjetos, y se puso sobre él una gota de aceite de inmersión. Seguidamente, se observaron al microscopio a temperatura ambiente (25 °C) y se tomaron entre 6 y 8 fotografías en diferentes zonas. Finalmente, con el programa ImageJ, se midió manualmente el diámetro de, al menos, 150 gotas por cada imagen. A partir de estos datos, se calculó el diámetro medio, $d_{[1,0]}$, mediante la ecuación:

$$d_{[1,0]} = \frac{\sum_{i=1}^N n_i \cdot d_i}{\sum_{i=1}^N n_i} \quad \text{Ec. [3]}$$

donde n_i es el número de gotas de un determinado tamaño de diámetro medio d_i .

3.2.4.4.2. Difracción láser

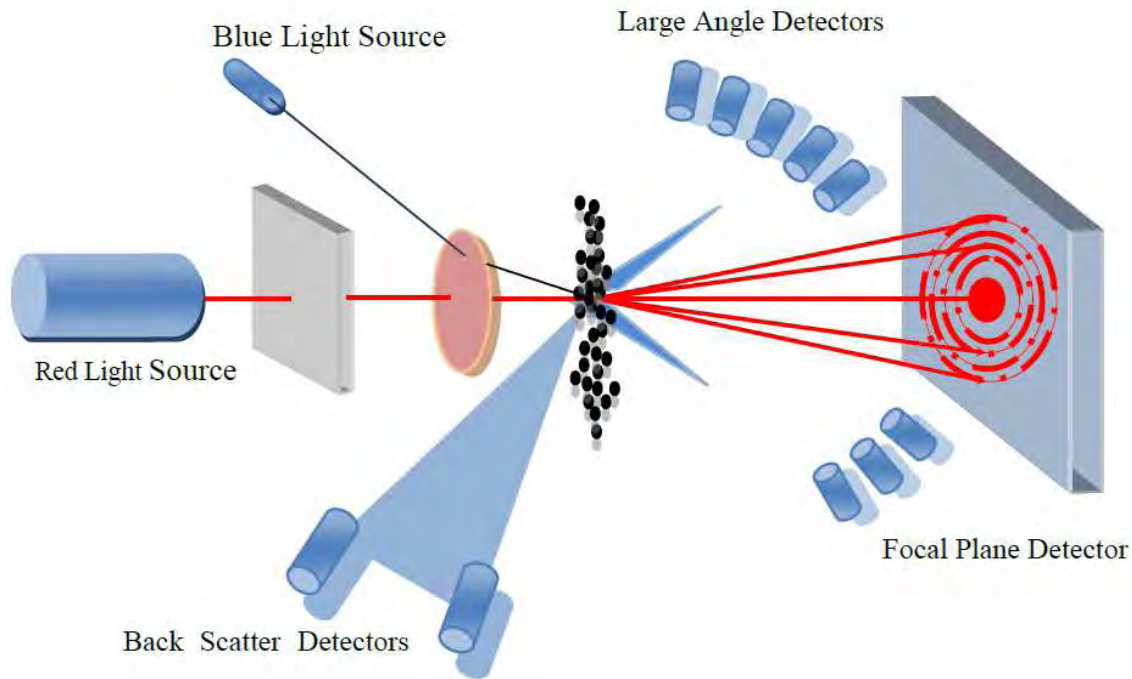


Figura 31. Esquema del principio de funcionamiento de la difracción láser para la medida del tamaño de gota y distribución de tamaños de gota (Kargar, 2014).

La difracción láser proporciona el tamaño de gota y la distribución de tamaños de gota midiendo la intensidad de la luz que se dispersa cuando el haz de luz láser pasa a través de una muestra de gotas en suspensión (Figura 31). Posteriormente, estos datos se analizan para calcular el tamaño de las gotas que crearon ese patrón de dispersión. Para esta técnica se utilizó el analizador de tamaño de partículas Mastersizer 2000 al que se le acopló la unidad de dispersión Hydro 2000 MU. Este equipo es adecuado para tamaños de gota comprendidos entre 0.02 y 2000 μm . Los parámetros ópticos utilizados fueron: índice de refracción de la fase dispersa, 1.500; índice de absorción de la fase dispersa, 0.01; densidad de la fase dispersa, 0.9536 g/cm^3 ; e índice de refracción de la fase continua, 1.33. Las muestras se dispersaron en agua Milli-Q[®] (velocidad del agitador/bomba = 1500 rpm). Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado, con un intervalo entre medidas de 6 s y un tiempo de medida de 12 s. El equipo proporciona, además de la distribución de tamaños de gota, una serie de parámetros característicos del tamaño de las gotas de la emulsión estudiada. Los que se utilizaron en esta Tesis

Doctoral fueron la moda de la distribución de tamaños, d_{mode} , y el diámetro volumétrico o diámetro medio de De Brouckere, $d_{[4,3]}$, que representa la media de una distribución de tamaños de gota ponderada por el volumen y que se calcula mediante la ecuación:

$$d_{[4,3]} = \frac{\sum_{i=1}^N n_i \cdot d_i^4}{\sum_{i=1}^N n_i \cdot d_i^3} \quad \text{Ec. [4]}$$

donde n_i es el número de gotas con un diámetro medio d_i .

Finalmente, como parámetro representativo de la polidispersidad de la muestra se ha elegido la uniformidad, U . La uniformidad indica la desviación de los tamaños de gota de la mediana de la distribución. Así, valores próximos o superiores a 1 corresponden a emulsiones muy polidispersas y un valor de 0 correspondería a una emulsión con un único tamaño de gota.

En cuanto al procedimiento operatorio, en primer lugar se encendió el Mastersizer 2000, la unidad de dispersión y el ordenador que controla todo el equipo; se abrió el software y se cargó el procedimiento operativo correspondiente (SOP). A continuación se cogió un vaso de precipitados de 500 mL, se llenó de agua destilada y se colocó en la unidad de dispersión donde se hizo circular por el circuito a través de todo el sistema hasta asegurar que éste se encontraba perfectamente limpio y sin ninguna burbuja de aire. Posteriormente, se retiró el vaso de agua destilada y se sustituyó por un nuevo vaso de 500 mL con agua Milli-Q[®], con la que se realizó la calibración del equipo. Esta calibración consistió en:

1. Medir el ruido eléctrico de los detectores; es decir, la señal que emiten los detectores cuando el láser está apagado. Este ruido, después, se le resta a la señal que emiten cuando el haz de luz láser incide sobre ellos.
2. Autoalinearse el haz de luz láser, para obtener una medida fina del ángulo de difracción.
3. Medir la señal producida por el dispersante utilizado (agua Milli-Q[®], en nuestro caso), así como por las posibles partículas de polvo y restos de suciedad depositados sobre la lente. Esta señal también se le resta posteriormente a la generada por la muestra.

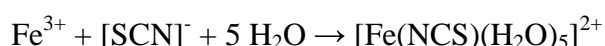
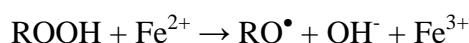
Una vez calibrado, se añadió muestra sobre el dispersante hasta alcanzar un rango de oscurecimiento del 10 al 20 %, que es el adecuado para realizar la medida y obtener unos resultados fiables (si se añadiese poca cantidad de muestra, la relación señal/ruido sería demasiado baja; y si se adicionase una cantidad de muestra mayor, la luz difractada por una gota podría ser nuevamente difractada por otra, enmascarando así los resultados reales). Finalmente, muestra y dispersante se hicieron pasar a través de la zona de medición del banco óptico donde un haz de luz láser ilumina la muestra y una serie de detectores mide con precisión la intensidad de la luz dispersada por las gotas en una amplia variedad de ángulos. Todas estas señales fueron procesadas por el software del equipo para proporcionar la serie de parámetros característicos del tamaño de las gotas de la emulsión que mencionábamos anteriormente. Después de cada medición, se lavó cuidadosamente el vaso de adición de muestra y el circuito con agua destilada y se dejó todo preparado para la siguiente medida.

3.2.4.5. Oxidación lipídica

Como ya se explicó detenidamente en el apartado 1.1.3., la oxidación lipídica es un proceso en cadena bastante complejo en el que se producen diferentes productos de oxidación a lo largo del tiempo: en la primera fase se forman hidroperóxidos lipídicos (productos primarios de la oxidación) y, a medida que transcurre el proceso de oxidación, los hidroperóxidos van desapareciendo y se van transformando en toda una serie de compuestos que se conocen con el nombre de productos secundarios de la oxidación (aldehídos, cetonas, etc.). Para la cuantificación de los primeros se utilizó el método del índice de peróxidos (PV) y para los segundos se usó el método del índice de *p*-anisidina (*p*-AnV). También se determinó el Índice de Estabilidad Oxidativa (OSI) de los diferentes sistemas de liberación estudiados mediante el método de oxidación acelerada Rancimat[®]. A continuación, se detalla el procedimiento experimental seguido en cada caso.

3.2.4.5.1. Método del índice de peróxidos

El PV es el método clásico para medir la oxidación de los aceites y las grasas. Para la determinación del PV se utilizó un método colorimétrico indirecto propuesto por Shantha & Decker (1994), con ligeras modificaciones. Este método, llamado del tiocianato férrico, se basa en la capacidad de los peróxidos e hidroperóxidos para oxidar los iones de hierro (II) a hierro (III) al interaccionar con una solución de tiocianato de amonio y cloruro de hierro (II). En él, los hidroperóxidos lipídicos oxidan los iones ferrosos, que pasan a iones férricos, y estos últimos se combinan con el ion tiocianato, en medio ácido clorhídrico, para dar lugar a un complejo de color rojo-violeta característico que muestra una absorbancia máxima a 500 – 510 nm.



Respecto al procedimiento operatorio, en primer lugar se tomó un determinado volumen de muestra dependiendo del sistema de liberación estudiado (10 μL para los oleogeles y 100 μL para las emulsiones) y se añadió a 1 mL de una solución de isooctano/2–propanol (3:1, v/v), se agitó en un vórtex durante 30 s (10 s, 3 veces) y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min para separar la fase orgánica de la mezcla. A continuación, se pipetearon 100 μL de esta fase orgánica (parte superior de la mezcla) y se añadieron a 2.9 mL de una solución de metanol/1–butanol (2:1, v/v) y 30 μL de una solución de tiocianato ferroso. La solución de tiocianato ferroso se preparó mezclando 15 μL de una solución de tiocianato de amonio 3.94 M y 15 μL de una solución de cloruro ferroso 0.072 M. La solución de cloruro ferroso se obtuvo del sobrenadante de una mezcla de 25 mL de solución de cloruro de bario (BaCl_2 0.132 M en HCl 0.4 M) y 25 mL de solución de sulfato ferroso 0.144 M. Después de cada adición, los tubos de ensayo se agitaron en el vórtex durante 30 s (10 s, 3 veces) y se dejaron reposar en oscuridad a 25 °C durante 20 min. Durante este tiempo, los hidroperóxidos lipídicos de la muestra reaccionarán con el ion ferroso, oxidándolo a ion férrico. Transcurrido el tiempo señalado, se midió la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 510 nm usando un espectrofotómetro de UV-Visible.

Para cuantificar los hidroperóxidos lipídicos se realizó una recta de calibrado con hidroperóxido de cumeno. Para ello, se prepararon soluciones de hidroperóxido de cumeno en isooctano/2-propanol (3:1, v/v) a diferentes concentraciones (entre 0 y 200 mg/L) y se les realizó el mismo procedimiento operatorio que el indicado para las muestras. Finalmente, la recta de calibración se utilizó para calcular la concentración de hidroperóxidos en cada muestra.

3.2.4.5.2. Método del índice de *p*-anisidina

Para la determinación de los productos secundarios de la oxidación se utilizó el método del *p*-AnV, descrito en el Cd 18-90 de la *American Oil Chemists' Society* (AOCS) (1998). Este método se basa en la reacción, en presencia de ácido acético, entre la *p*-anisidina y los compuestos aldehídicos (2-alquenes y 2,4-alcadienales, fundamentalmente) presentes en la muestra, produciendo compuestos de color amarillento característico que tienen un máximo de absorbancia a 350 nm.

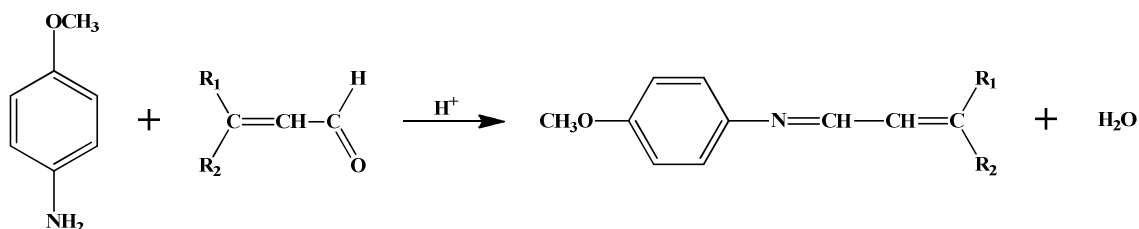


Figura 32. Reacción de los compuestos aldehídicos presentes en la muestra con la *p*-anisidina.

Esta reacción no necesita temperaturas elevadas ni ácidos fuertes y, por tanto, su influencia sobre la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos es mínima, siendo esta una de sus principales ventajas. La limitación más importante de este método es su baja sensibilidad. Otras limitaciones son la necesidad de utilizar reactivos libres de agua puesto que la reacción no se completa totalmente en presencia de agua, y que los reactivos deben estar libres de compuestos carbonílicos para evitar la interferencia con carbonilos existentes en la muestra (Norveel-Semb, 2012).

Respecto al procedimiento operatorio, en primer lugar se tomó un determinado volumen de muestra dependiendo del sistema de liberación estudiado (100 μL para los

oleogel y 1 mL para las emulsiones) y se añadió a 10 mL de isooctano, se agitó en un vórtex durante 30 s (10 s, 3 veces) y se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min para separar la fase orgánica de la mezcla. A continuación, se tomaron 5 mL de esta fase orgánica (parte superior de la mezcla) y se les añadió 1 mL de una solución de *p*-anisidina de 2.5 g/L (esta solución se preparó disolviendo 0.25 g de *p*-anisidina en 100 mL de ácido acético glacial). Los tubos de ensayo se agitaron en el vórtex durante 30 s (10 s, 3 veces) y se dejaron reposar en oscuridad a 25 °C durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 350 nm usando un espectrofotómetro de UV-Visible.

Para cuantificar los productos secundarios de la oxidación se realizó una recta de calibrado con *trans,trans*-2,4-decadienal. Para ello, se prepararon soluciones de *trans,trans*-2,4-decadienal en isooctano a diferentes concentraciones (entre 0 y 20 mg/L) y se les realizó el mismo procedimiento operatorio que el indicado para las muestras. Finalmente, la recta de calibración se utilizó para calcular la concentración de productos secundarios de la oxidación en cada muestra.

3.2.4.5.3. Método Rancimat[®]

Para la determinación del OSI se utilizó el método Rancimat[®], descrito en el Cd 12b-92 de la *American Oil Chemists' Society* (AOCS) (1997). Este método de oxidación acelerada se basa en la medida de la conductividad eléctrica del agua donde borbotan los productos de descomposición de la muestra, fundamentalmente ácidos orgánicos de bajo peso molecular. Para ello, el equipo consta de dos unidades interconectadas: una que contiene las células de conductividad y un bloque calefactor con capacidad para seis tubos en los que se coloca la muestra; y la segunda que controla los parámetros, procesa las señales e imprime el registro.

Para la medida de la estabilidad oxidativa se hace pasar una corriente controlada de aire filtrado, limpio y seco, a través de la muestra calentada a una temperatura que dé lugar a que se alcance la oxidación secundaria y, a la vez que oxida la muestra, arrastra los ácidos orgánicos volátiles formados que se recogen en un frasco de borboteo que contiene agua desionizada (60 mL) y la célula que mide continuamente la conductividad

eléctrica del agua. Cuando comienza la oxidación secundaria, se desprenden los primeros compuestos volátiles, mayoritariamente ácido fórmico, que son retenidos en el agua desionizada y dan lugar a un aumento brusco de la conductividad. El punto de inflexión de la curva de conductividad determina el final del periodo de inducción y su valor se calcula por la intersección de la línea base con la tangente a la curva trazada cuando aumenta bruscamente la conductividad. El tiempo transcurrido desde el inicio hasta el punto de inflexión es el tiempo de inducción u OSI y se mide en horas.

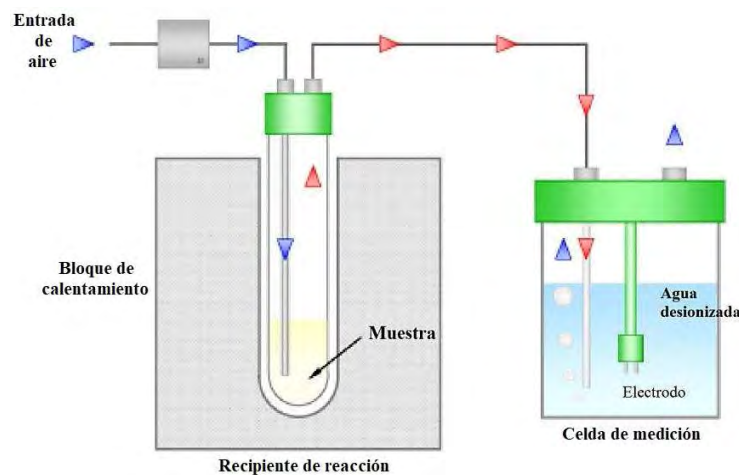


Figura 33. Representación esquemática del sistema Rancimat®.

Respecto al procedimiento operatorio, se siguió la norma UNE-EN ISO 6886:2016. Antes de cada ensayo, los tubos de muestra se limpiaron rigurosamente y se sumergieron durante toda la noche en una solución caliente de un detergente alcalino (3 % p/p), se aclararon con agua destilada y acetona y, finalmente, se secaron en un horno a 80 °C. Este procedimiento se realizó con el fin de evitar cualquier contaminación que pudiera catalizar el proceso de oxidación. Además, los electrodos, los tubos de conexión y los recipientes de medición se limpiaron cuidadosamente con alcohol y agua destilada y se soplaron con nitrógeno. Una vez preparado el equipo, en cada tubo de muestra se pesaron 3.0 g, los tubos se colocaron en el bloque de calentamiento eléctrico y se conectaron al surtidor de aire con un flujo de 4 L/h, calentándose así la muestra hasta la temperatura deseada (80 °C). Cuando se alcanzó dicha temperatura, se conectaron las salidas de los tubos a los frascos borboteadores que contenían el agua desionizada y los electrodos, se aumentó el flujo de aire a 20 L/h y se registró la conductividad eléctrica de forma continua a lo largo del tiempo. Se analizaron seis muestras en el equipo al mismo tiempo.

3.2.4.6. Cuantificación de curcumina

La cantidad de curcumina presente en cada sistema de liberación estudiado a lo largo del tiempo se determinó mediante diferentes métodos analíticos: espectroscopía UV-Visible (UV-Vis), espectroscopía de fluorescencia y cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS).

3.2.4.6.1. Espectroscopía UV-Visible

La espectroscopía UV-Vis es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV y visible y, a su vez, que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Esta absorción selectiva de radiación da lugar al espectro de absorción, que proporciona información fundamental para la determinación de la composición química, la estructura y las propiedades de la materia. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, fuerza iónica, temperatura, constante dieléctrica, etc.).

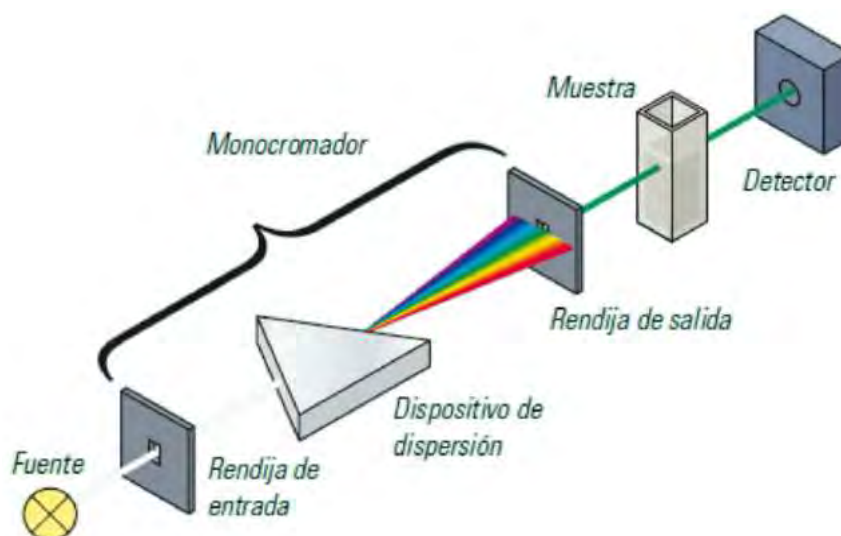


Figura 34. Esquema del principio de funcionamiento de un espectrofotómetro UV-Vis.

Las interacciones electromagnéticas con la materia provocan la absorción o emisión de energía a través de la transición de los electrones entre niveles cuánticos o discretos de energía, vibraciones de enlaces, rotaciones moleculares y transiciones de electrones entre orbitales atómicos y moleculares. Las energías implicadas en los tránsitos electrónicos corresponden a la absorción de fotones en la región visible (400 – 780 nm) y ultravioleta (195 – 400 nm) del espectro electromagnético.

Los espectrofotómetros son los equipos encargados de registrar estas interacciones y generar espectros que permiten el estudio de la longitud de onda y la intensidad de la radiación absorbida o emitida por la muestra analizada. El espectro de absorción es propio de cada especie, ya que la diferencia de energía entre los distintos niveles de energía para cada especie es característica de la misma.

La medida de la absorción de la luz mediante un espectrofotómetro se utiliza para medir su concentración en disolución. La luz incidente absorbida por una disolución a una longitud de onda determinada está relacionada con el espesor de la capa absorbente y con la concentración de la especie absorbente. Estas dos relaciones están combinadas en la ley de Lambert-Beer:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad \text{Ec. [5]}$$

donde A es la absorbancia; I_0 , la intensidad de la luz incidente; I , la intensidad de la luz transmitida; ε , el coeficiente de absorción molar; b , el ancho de la cubeta; y c , la concentración del compuesto de interés.

Para efectuar la determinación, en primer lugar se midió la absorbancia del disolvente utilizado (etanol) y se le asignó el valor de absorbancia cero. A continuación, se diluyó el sistema de liberación estudiado en etanol hasta una concentración apropiada para ser analizada por un espectrofotómetro UV-Vis a 420 nm, se puso la cubeta de cuarzo con la muestra en la celdilla y se leyó la absorbancia de ésta. Finalmente, la concentración de curcumina se calculó a partir de la absorbancia medida utilizando una curva de calibración y teniendo en cuenta el factor de dilución.

Para obtener la recta de calibrado se prepararon soluciones de diferentes concentraciones de curcumina en etanol (entre 0 y 10 mg/L), determinándose para cada

una de ellas el valor de absorbancia a 420 nm. Estos valores de absorbancia se representaron en el eje de ordenadas (eje Y) y los de concentración en el eje de abscisas (eje X). Finalmente, la recta de calibración se utilizó para calcular la concentración de curcumina en cada muestra.

3.2.4.6.2. Espectroscopía de fluorescencia

La fluorescencia es un tipo de luminiscencia que es posible observar en el rango del visible y que persiste en el tiempo sólo mientras el material es expuesto a la radiación UV (en esto radica su principal diferencia con la fosforescencia).

Este fenómeno físico consiste en el salto cuántico de aquellos electrones que absorbieron la radiación UV, reubicándose en niveles energéticos mayores (estado excitado). Cuando los electrones vuelven a su estado fundamental, liberan esta energía acumulada observándose como fluorescencia en el rango de los 400 a 700 nm (región visible del espectro), donde las cámaras fotográficas son capaces de capturarlas.

Las características de color e intensidad de las fluorescencias dependen de la naturaleza de los materiales, siendo frecuente en los de origen orgánico, y ocurre en los sistemas de enlaces dobles conjugados. La fluorescencia también depende de la longitud de onda con la que se estimule a los átomos de la estructura, donde los materiales pueden fluorescer en cierta longitud de onda y no fluorescer en otras longitudes de onda diferentes. Finalmente, también se ve afectada por una gran cantidad de factores ambientales como la temperatura y el pH, que hacen de la fluorescencia una técnica más sensible.

Los espectrofotómetros de fluorescencia son los equipos necesarios para llevar a cabo la captura de la fluorescencia en el visible. Consisten en una cámara fotográfica, dos lámparas de radiación UV de preferencia tubos que distribuyen la radiación de modo más parejo y difuso y un filtro barrera que bloquee el UV e IR proveniente de las lámparas, que produce principalmente falta de nitidez, bajo contraste, ruido y que puede teñir el color de la fluorescencia debido al IR presente con una coloración magenta.

Para efectuar la determinación, en primer lugar se midió la fluorescencia del disolvente utilizado (etanol) y se le asignó el valor de fluorescencia cero. A continuación, se diluyó la muestra en etanol hasta una concentración apropiada para ser analizada por un espectrofotómetro de fluorescencia a longitudes de onda de excitación y emisión de 488 nm y 525 nm, respectivamente, se colocó la cubeta en la celdilla y se leyó la fluorescencia de ésta. Finalmente, la concentración de curcumina se calculó a partir de la fluorescencia emitida utilizando una curva de calibración y teniendo en cuenta el factor de dilución.

Para obtener la recta de calibrado se prepararon soluciones de diferentes concentraciones de curcumina en etanol (entre 0 y 3 mg/L), determinándose para cada una de ellas la fluorescencia emitida (longitud de onda de excitación 488 nm, longitud de onda de emisión 525 nm). Estos valores se representaron en el eje de ordenadas (eje Y) y los de concentración en el eje de abscisas (eje X). Finalmente, la recta de calibración se utilizó para calcular la concentración de curcumina en cada muestra.

3.2.4.6.3. Cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem

La espectrometría de masas acoplada a la cromatografía líquida ha sido una de las técnicas analíticas que más se ha extendido en las últimas décadas. Su éxito es consecuencia de la combinación de una técnica de separación cromatográfica (UHPLC), que presenta una gran selectividad, versatilidad y resolución de pico mediante la disminución del tamaño de partícula a sub-2 μm , y las buenas y únicas capacidades de la espectrometría de masas (MS). La MS se ha presentado como la posibilidad analítica de alcanzar una elevadísima sensibilidad, incluso hasta niveles de pg/L, debido a su altísima especificidad. Además, presenta la habilidad única de medir los iones con masa exacta, proporcionando información de la composición elemental y permitiendo establecer las rutas de fragmentación. Incluso, ha sido posible aplicar todas esas cualidades en muestras de alta complejidad, alcanzando niveles de resolución inimaginables hace unos años con instrumentos considerados de media/alta resolución.

De forma muy básica, se puede definir el funcionamiento de la MS en los siguientes pasos:

1. La ionización, en la que las moléculas de los analitos pasan a estado gaseoso ionizándose, adicionándose o eliminándose un electrón o un protón. El exceso de energía proporcionado en este paso también puede transformarse en una fragmentación de la molécula, generando iones fragmento.
2. El siguiente paso es la separación y el análisis de la masa de los iones moleculares y sus fragmentos cargados basándose en su relación m/z.
3. Medida, amplificación y creación de espectros de masas.

Para que el segundo paso se desarrolle correctamente es necesario trabajar con alto vacío, permitiendo el movimiento libre de los iones en el espacio, sin la interferencia de otras especies con las que puedan colisionar. La colisión puede generar la fragmentación de los iones moleculares y/o producir nuevas especies por reacciones ión-molécula. Este último efecto produciría una reducción de la sensibilidad y resolución del análisis, generando resultados ambiguos o mala interpretación.

Finalmente, la posibilidad de poder acoplar dos analizadores de MS aumenta considerablemente el potencial y las posibilidades que ofrece esta técnica. La adquisición en tándem MS (MS/MS) ofrece una gran selectividad, ya que permite la posibilidad de aislar un ion en la celda de colisión, eliminando otros iones o fragmentos que puedan interferir; y aumenta considerablemente la sensibilidad, especialmente en matrices complejas, permitiendo la eliminación de interferentes de la matriz o de la propia fase móvil. Por todo ello, también se usó este método analítico para la cuantificación de curcumina.

Para ello, se utilizó el acoplamiento UHPLC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo (QqQ) y fuente de ionización por electronebulización (*Electrospray Ionization*, ESI). Para la separación cromatográfica se usó una columna Acquity UPLC BEH C18 130Å (50 mm × 2.1 mm, con un tamaño de partícula de 1.7 µm) de Waters Corporation.

La separación se realizó utilizando una fase móvil binaria con una solución de fluoruro de amonio 13 mM en amoníaco al 0.1 % p/p (A) y acetonitrilo (B) a una

velocidad de flujo de 0.300 mL/min. La elución en gradiente se llevó a cabo siguiendo el gradiente cromatográfico: 0 – 0.50 min, 95.0 % A; 0.50 – 1.50 min, 95.0 – 5.0 % A; 1.50 – 5.00 min, 5.0 % A; 5.00 – 5.10 min, 5.0 – 95.0 % A; y 5.10 – 7.00 min, 95.0 % A. El tiempo total de análisis fue de 7.00 min. El volumen de inyección de muestra fue de 5.00 μ L y la temperatura de la columna se mantuvo a 40.0 °C.

La curcumina se ionizó en modo de ionización positiva (ESI +) y se detectó en el modo de adquisición de la reacción seleccionada (*Selected Reaction Monitoring*, SRM), el cual permite la adquisición de múltiples transiciones al mismo tiempo. El resto de parámetros MS se fijaron con los siguientes valores: temperatura de la fuente, 150 °C; temperatura de desolvatación, 500 °C; flujo de gas de cono, 150 L/h; flujo de gas de desolvatación, 800 L/h (se usó nitrógeno como gas de secado); flujo de gas de colisión, 0.15 mL/min; presión de gas nebulizador, 7.00 bar; voltaje del capilar, 2.50 kV; y voltaje del cono, 30 V. Las transiciones iónicas del analito fueron: 369.29 \rightarrow 116.95 m/z, 369.29 \rightarrow 144.98 m/z, 369.29 \rightarrow 176.99 m/z y 369.29 \rightarrow 285.22 m/z.

3.2.4.7. Reología

El término '*reología*', acuñado por el químico norteamericano Eugene Bingham en 1929, hace alusión a la ciencia que estudia la deformación y el flujo de los materiales cuando son sometidos a esfuerzos externos (Barnes, 1989; Macosko, 1994). Así, uno de sus principales objetivos consiste en encontrar relaciones entre el esfuerzo aplicado (τ) y la velocidad de deformación o gradiente de velocidad conseguido ($\dot{\gamma}$). Estas relaciones matemáticas se denominan ecuaciones constitutivas o ecuaciones reológicas de estado e intentan capturar el comportamiento real del fluido. La ecuación constitutiva más sencilla de todas es la ley de Newton de la viscosidad (Ec. 6), que establece una relación lineal entre el esfuerzo de cizalla y el gradiente de velocidad o gradiente de cizalla y caracteriza un comportamiento ideal del fluido. La constante de proporcionalidad definida por dicha ecuación, η , es una propiedad reológica del material denominada viscosidad dinámica o newtoniana, que sólo depende de la naturaleza del material y de las condiciones de presión y temperatura. La viscosidad se puede definir como una medida de la intensidad de disipación de energía necesaria para mantener la

deformación continua de un fluido, y su unidad en el Sistema Internacional es Pascal por segundo (Pa·s).

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad \text{Ec. [6]}$$

El tipo de fluido que cumple con esta ecuación se denomina fluido newtoniano y el que no la cumple, fluido no newtoniano. La mayoría de los fluidos (emulsiones, suspensiones concentradas, cristales líquidos, etc.) son no newtonianos y se rigen por ecuaciones constitutivas no lineales (Sisko, 1958; Barnes, 1989). En realidad, es más correcto hablar de comportamiento newtoniano y no newtoniano, ya que un mismo fluido puede regirse por distintas leyes según las condiciones experimentales.

Hay muchos tipos de comportamiento no newtoniano en función de cómo dependa la viscosidad con el gradiente de velocidad (Barnes, 1989; Macosko, 1994). Esos diferentes tipos de comportamiento aparecen muy bien reflejados en las “curvas de fluidez” y “curvas de viscosidad”, siendo ambas representaciones equivalentes. En las primeras se representa el esfuerzo de cizalla frente al gradiente de velocidad (τ_{xy} vs. $\dot{\gamma}$) mientras que en las segundas se representa la viscosidad en función del gradiente de cizalla (η vs. $\dot{\gamma}$). A continuación vamos a comentar algunos de los tipos en los que tradicionalmente se ha clasificado el comportamiento no newtoniano y a mostrar sus curvas de fluidez y viscosidad características.

En primer lugar, se pueden distinguir dos grandes clases de comportamiento no newtoniano: dependiente del tiempo e independiente del tiempo, según que el cambio en la viscosidad del fluido se produzca o no como consecuencia de la duración del experimento. Así, en la primera clase, la viscosidad varía a lo largo del tiempo durante el cual está siendo deformado el fluido (aunque la velocidad de deformación se mantenga constante); en cambio, en la segunda clase, la viscosidad no varía con el tiempo de deformación, es decir, la viscosidad se mantiene constante mientras lo haga la velocidad de deformación, cambiando sólo cuando ésta también lo hace. A su vez, dentro de cada una de estas dos grandes clases de comportamiento, se pueden diferenciar varios tipos según sea la relación existente entre el esfuerzo y la velocidad de deformación, tal y como ilustran las curvas de fluidez representadas en la Figura 35. Cada una de ellas tiene su curva de viscosidad equivalente, cuya forma depende del tipo de comportamiento del fluido (Fernández Espín, 2018).

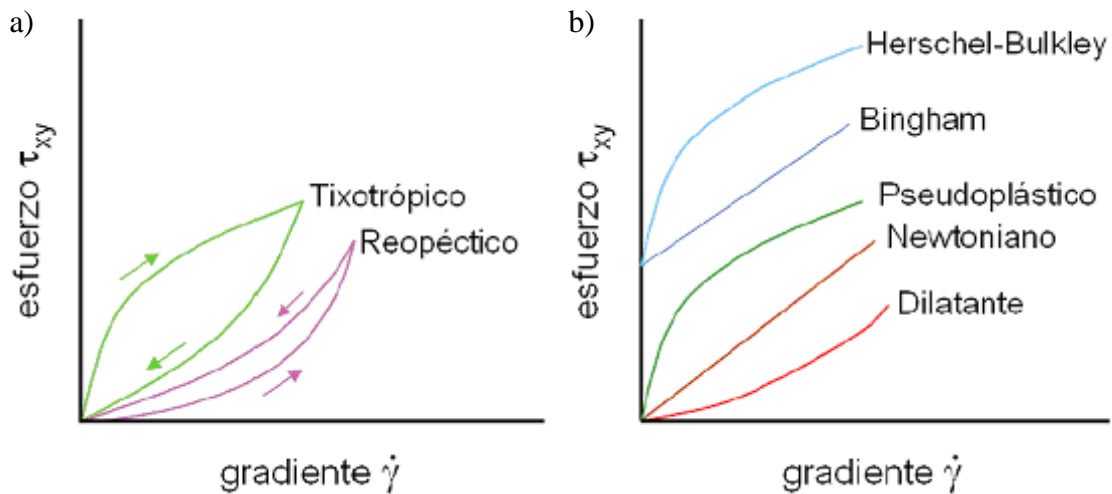


Figura 35. Curvas de fluidez típicas: (a) comportamiento dependiente del tiempo y (b) comportamiento independiente del tiempo.

Uno de los comportamientos no newtonianos más frecuentes es el pseudoplástico o fluidizante (*shear-thinning* en inglés), que se caracteriza porque la fluidez del líquido aumenta, o lo que es lo mismo, su viscosidad disminuye al aumentar el gradiente de velocidad al que es sometido. Aparece en disoluciones de macromoléculas, emulsiones y suspensiones, etc. El origen de este comportamiento se debe a cambios en la estructura compleja de estos materiales, como consecuencia de la variación en la velocidad de deformación. Estas estructuras están distribuidas al azar manteniendo un estado altamente desordenado que origina una gran resistencia interna al flujo. La aplicación de un gradiente de velocidad de cizalla creciente genera una deformación y orientación de las partículas que componen la estructura en la dirección del esfuerzo aplicado, lo cual se traduce en un descenso de la resistencia al flujo y, por tanto, de la viscosidad. Su curva de viscosidad típica se muestra en la Figura 36.

Es habitual que los fluidos con este comportamiento presenten, a gradiente de velocidad suficientemente bajo, un valor máximo de viscosidad que se mantiene constante al disminuir el gradiente (que denotaremos por η_0) y, a gradiente de velocidad muy elevado, un valor mínimo de viscosidad que se mantiene constante al aumentar el gradiente (que denotaremos por η_∞). A estas dos regiones con viscosidad constante se las denomina regiones o “mesetas” newtonianas inferior y superior respectivamente (inferior y superior, así como los subíndices empleados para η anteriormente, hacen referencia al valor del gradiente, no de la viscosidad). También se las denomina primera

y segunda región newtoniana. Al valor de la viscosidad en la meseta inferior se le llama, por razones obvias, viscosidad a cizalla cero (*zero-shear viscosity* en inglés). Muchos fluidos no newtonianos se comportan como newtonianos a valores bajos del gradiente de velocidad (Fernández Espín, 2018).

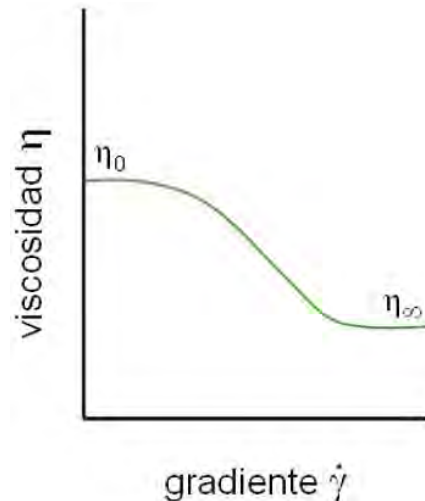


Figura 36. Curva de viscosidad típica de un comportamiento pseudoplástico.

El comportamiento dilatante (*shear-thickening* en inglés) se caracteriza porque la fluidez del líquido disminuye, o lo que es lo mismo, su viscosidad aumenta al aumentar el gradiente de cizalla al que es sometido. Es menos habitual que el comportamiento pseudoplástico y suele aparecer en algunas suspensiones concentradas de sólidos, proteínas y ciertas disoluciones de polímeros y detergentes.

La anterior clasificación sobre el comportamiento no newtoniano asume que los fluidos son puramente viscosos, sin atender a su posible componente elástica. Esto significa que:

- i) Cuando se aplica un esfuerzo constante, el fluido experimenta una deformación continua o flujo desde el instante inicial (aunque algunos casos requieran un valor mínimo de esfuerzo).
- ii) Cuando cesa el proceso de deformación, es decir, cuando deja de aplicarse el esfuerzo, el fluido permanece deformado, no recuperando ni total ni parcialmente su forma inicial.

Sin embargo, esto no suele ser así, pudiéndose definir lo que sería una nueva clase de comportamiento no newtoniano (al margen de la dependencia o no con el

tiempo) que denominamos viscoelástico para indicar la existencia simultánea de propiedades viscosas y elásticas en el material.

Para entender mejor este nuevo tipo de comportamiento, comenzaremos por definir lo que se entiende por comportamientos sólido y líquido ante una deformación. Un sólido ideal es aquel que cumple la ley de Hooke de la elasticidad: al aplicar un esfuerzo, el material adquiere una deformación “instantánea” proporcional al esfuerzo, la cual permanece mientras permanece el esfuerzo y desaparece cuando desaparece el esfuerzo, recuperando totalmente el sólido la forma original. Un líquido o fluido ideal es aquel que cumple la ley de Newton de la viscosidad: al aplicar un esfuerzo, el material adquiere una velocidad de deformación instantánea proporcional al esfuerzo, la cual permanece mientras permanece el esfuerzo, es decir, el material experimenta una deformación continua en el tiempo, y desaparece cuando desaparece el esfuerzo, no recuperando el fluido la forma original (ni ninguna forma intermedia). Sin embargo, existen materiales que, al aplicarles un esfuerzo, fluyen de forma inmediata y cuando cesa el esfuerzo recuperan parcialmente su forma, hay otros que sufren una deformación instantánea y comienzan a fluir para luego recuperar totalmente su forma tras el cese del esfuerzo, y así sucesivamente. A todos estos materiales cuyo comportamiento es híbrido entre el sólido elástico y el líquido viscoso se les denomina viscoelásticos (Fernández Espín, 2018).

El estudio de la viscoelasticidad implica establecer relaciones entre el esfuerzo, la deformación y el tiempo. En este tipo de comportamiento se deben distinguir dos situaciones diferentes. En el caso en que tanto el esfuerzo como la deformación sean relativamente pequeños, de manera que la estructura del material se conserva en estado prácticamente imperturbado, las relaciones entre ambas magnitudes y el tiempo se pueden describir mediante ecuaciones diferenciales lineales de coeficientes constantes y el comportamiento se denomina viscoelástico lineal. Esto implica que la relación entre la deformación y el esfuerzo es sólo función del tiempo y no de la magnitud del esfuerzo. En el caso contrario, en el que la cizalla aplicada sea suficientemente elevada como para producir destrucción estructural, a dicho comportamiento se le denominará viscoelástico no lineal. Para llevar a cabo la caracterización del comportamiento viscoelástico de un material se realizan, entre otros, ensayos de fluencia y recuperación, de relajación del esfuerzo y de cizalla oscilatoria (Díaz Ocampo, 2014).

Los dos parámetros más representativos de un material viscoelástico son el módulo elástico o de almacenamiento, G' , que caracteriza la componente o respuesta elástica, y el módulo viscoso o de pérdida, G'' , que caracteriza la componente o respuesta viscosa. El módulo G' es directamente proporcional a la energía media almacenada en un ciclo de deformación por unidad de volumen, y el módulo G'' lo es a la energía disipada en un ciclo de deformación por unidad de volumen. Ambos parámetros se pueden analizar como las componentes real e imaginaria de un número complejo, que se denomina módulo complejo, G^* , cuya forma trigonométrica es:

$$G^* = \left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right) \cdot \cos \delta + i \cdot \left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right) \cdot \sin \delta = G' + i \cdot G'' \quad \text{Ec. [7]}$$

Por tanto, el módulo del número complejo G^* sería:

$$|G^*| = \sqrt{G'^2 + G''^2} = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \quad \text{Ec. [8]}$$

Por otro lado, se deduce que:

$$\tan \delta = \left(\frac{G''}{G'} \right) \quad \text{Ec. [9]}$$

La tangente del ángulo de desfase, también denominada tangente de pérdidas, es una función viscoelástica dinámica, normalmente dependiente de la frecuencia, que expresa la relación entre las componentes viscosa y elástica. Así, el valor 1 de la tangente de pérdidas indica que en estas condiciones el material responde con componentes viscosa y elástica del mismo valor.

Otra función viscoelástica de interés en la caracterización de materiales es la viscosidad compleja, η^* , cuyo módulo es:

$$|\eta^*| = \sqrt{\left(\frac{G''}{\omega} \right)^2 + \left(\frac{G'}{\omega} \right)^2} = \frac{|G^*|}{\omega} \quad \text{Ec. [10]}$$

La viscosidad compleja es un parámetro equivalente al módulo complejo que se suele utilizar en materiales viscoelásticos de carácter predominantemente fluido.

En la Figura 37 se muestra un espectro mecánico completo característico de un material viscoelástico al aplicar el principio de superposición tiempo-temperatura.

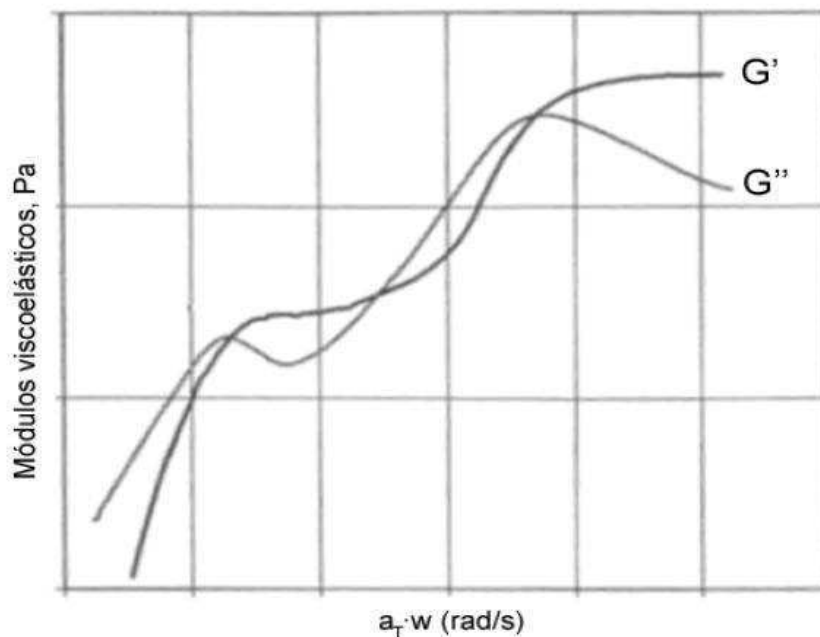


Figura 37. Espectro mecánico completo de un polímero de alto peso molecular no reticulado.

En la zona de bajas frecuencias o región de flujo terminal se observa que, por debajo del punto de corte entre las funciones viscoelásticas G' y G'' , el material presenta un comportamiento típico de líquido ($G'' > G'$) con variaciones potenciales de ambos módulos con la frecuencia, caracterizadas por pendientes 2 y 1, respectivamente, en escalas logarítmicas. En la zona de frecuencias intermedias, denominada zona o región “plateau”, la respuesta es predominantemente elástica, siendo el módulo de almacenamiento superior al de pérdidas ($G' > G''$). En la zona de altas frecuencias se encuentra la región de transición vítrea donde de nuevo $G'' > G'$ y, finalmente, la región vítrea, donde el material se comporta como un sólido, mostrando un valor de G' elevado e independiente de la frecuencia. La obtención del espectro mecánico completo sólo es posible si el intervalo de frecuencias estudiado es lo suficientemente amplio y el material permite la aplicación del principio de superposición tiempo-temperatura.

El conocimiento de las propiedades reológicas de una emulsión es importante en la producción y el uso de emulsiones por muchas razones. Por ejemplo, muchos de sus atributos sensoriales como son la cremosidad o la fluidez, están directamente relacionados con sus propiedades reológicas (Bengoechea-Ruiz, 2006). También son esenciales en el diseño de operaciones de procesado (bombeo, mezclado, intercambio de

calor, etc.). Además, las propiedades reológicas son frecuentemente utilizadas para analizar la organización estructural y las interacciones de los componentes de la emulsión y proporcionan información muy útil en relación con las características y calidad del producto final (estabilidad, textura, sabor, etc.) (Romero-García, 2009).

Las emulsiones alimentarias suelen ser sistemas de enorme complejidad que pueden exhibir una gran variedad de comportamientos reológicos que van desde fluidos newtonianos de baja viscosidad hasta sólidos vítreos, pasando por comportamientos viscosos no lineales con fenómenos de pseudoplasticidad, dilatación o tixotropía, y comportamientos viscoelásticos tipo gel. En definitiva, el comportamiento reológico de una emulsión depende tanto del tipo y concentración de ingredientes que contiene como de las condiciones de procesado y almacenamiento que ha experimentado.

En esta Tesis Doctoral se han realizado ensayos de flujo viscoso y de cizalla oscilatoria a las formulaciones óptimas de los diferentes sistemas de liberación estudiados. La caracterización reológica se llevó a cabo sobre muestras sin historia previa de cizalla y a temperatura constante de 25 °C, realizándose al menos tres réplicas por ensayo para asegurar la reproducibilidad. Después de colocar la muestra en el sistema sensor se esperó un tiempo de 300 s, asegurándose con ello una adecuada termostatación de toda la muestra y que todas presentaran un proceso de relajación estructural similar. Pasado ese tiempo, se procedió a realizar la medida correspondiente.

Los ensayos de flujo viscoso y los ensayos dinámicos para el estudio de las propiedades viscoelásticas en el rango lineal se realizaron en un reómetro de esfuerzo controlado RheoScope (ThermoHaake, Alemania), utilizando una geometría placa-placa de superficie rugosa de 35 mm de diámetro y 1 mm de separación entre placas. Las partes móviles del motor del equipo descansan sobre cojines de aire que le confieren estabilidad y permiten medir torques tan pequeños como 0.002 mN·m. Para el funcionamiento de este sistema el reómetro se encuentra conectado a un compresor de aire que debe ponerse en marcha antes de comenzar a operar. Además, incorpora un baño termostático Phoenix (ThermoHaake, Alemania) para la termostatación de las muestras y dispone de varios software que permiten programar el experimento y controlar la adquisición de datos: RheoWin v. 2.97, RheoWin Job Manager y RheoWin Data Manager.

En primer lugar, se realizaron las curvas de viscosidad en un rango de esfuerzos aplicados de 0.01 a 100 Pa. Posteriormente, se efectuaron barridos de esfuerzo o deformación en cizalla oscilatoria, a una frecuencia de 1 Hz (6.283 rad/s), para la determinación del intervalo de viscoelasticidad lineal. Y, finalmente, se realizaron barridos de frecuencia para obtener el espectro mecánico, aplicando un valor de esfuerzo o de deformación dentro del intervalo viscoelástico lineal, en un intervalo de frecuencias comprendido entre 0.03 y 62.83 rad/s.

3.2.5. Ensayos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad

Los ensayos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad de la curcumina se realizaron en un simulador dinámico *in vitro* del tracto gastrointestinal humano (SimuGIT) (Figura 38), previamente desarrollado en nuestro Grupo de Investigación (TEP-025) (Rivas-Montoya, 2014).

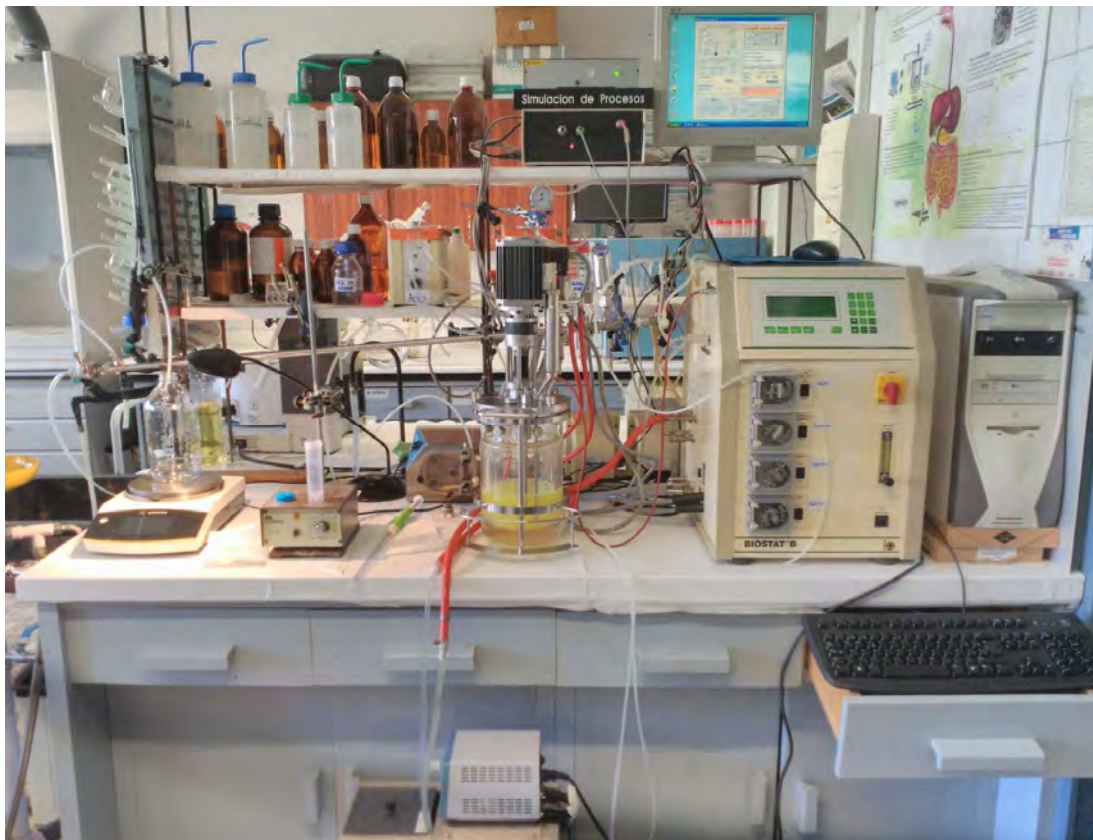


Figura 38. Simulador dinámico *in vitro* del tracto gastrointestinal humano (SimuGIT).

3.2.5.1. Descripción general del equipo

El SimuGIT, que aparece representado esquemáticamente en la Figura 39, consta de un reactor tipo tanque agitado continuo (CSTR) y un reactor tubular de flujo pistón continuo (PFR) equipado con una membrana cerámica tubular monocanal de tamaño de corte determinado, ambos conectados en serie (Rivas-Montoya et al., 2016). A continuación, se describe en detalle cada una de sus partes:

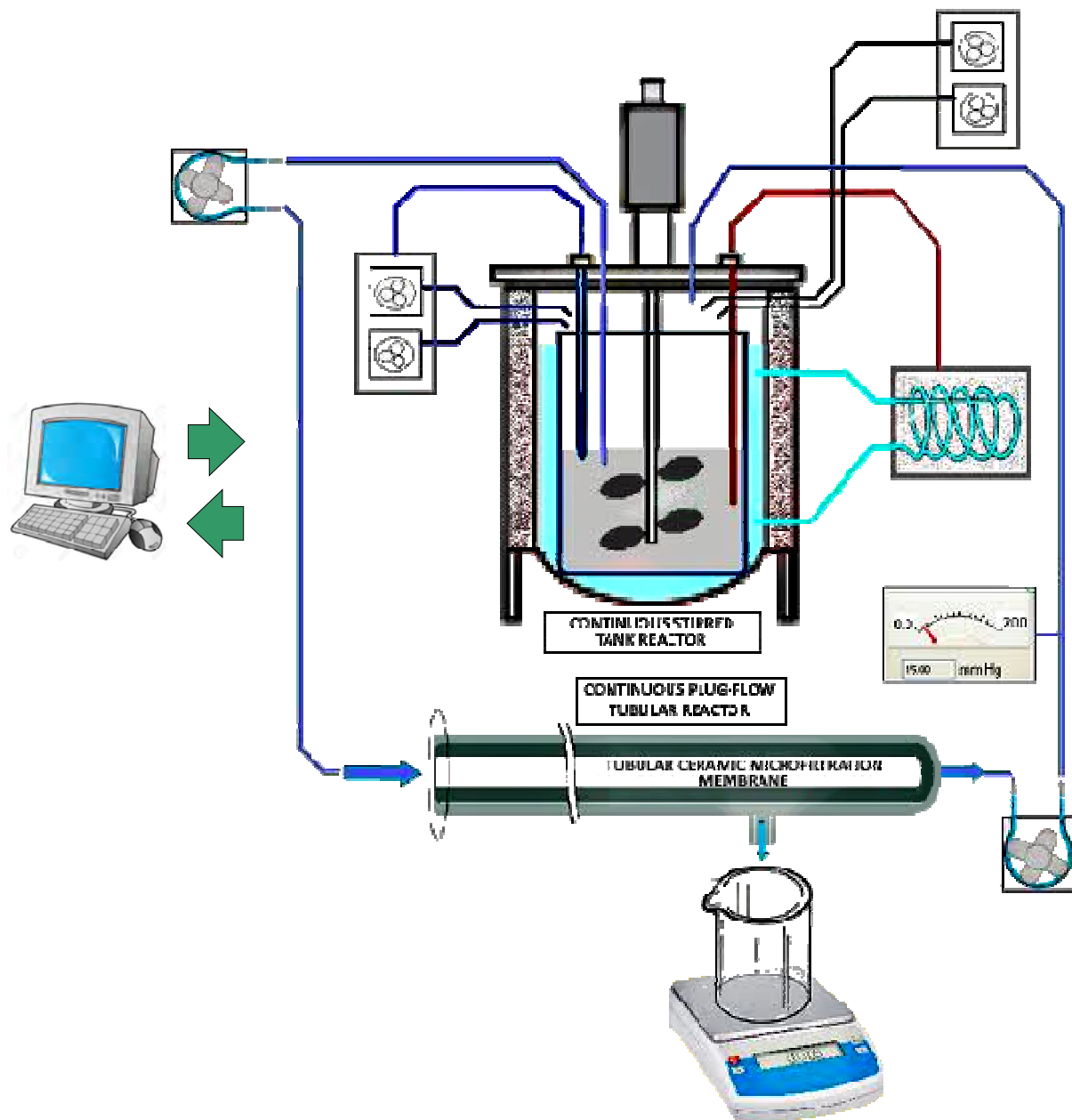


Figura 39. Esquema del SimuGIT (Rivas-Montoya, 2014).

El CSTR, donde tienen lugar las simulaciones gástrica y duodenal, consiste en un fermentador *Biostat B* de la compañía Braun Biotech International GmbH que consta de una unidad de control y un biorreactor de vidrio encamisado de 2 L de capacidad. La unidad de control dispone de una interfaz *RS-422* que permite la comunicación, el control y la supervisión del equipo desde un ordenador de sobremesa, así como el registro de parámetros y variables de forma automática para su posterior análisis. Por su parte, la vasija del reactor cuenta con un sistema de agitación mediante turbinas (dos turbinas de disco tipo *Rushton* con cuatro paletas cada una) accionado por un servomotor de 180 W que opera a velocidad constante y regulable (entre 50 y 1200 rpm) para mover el eje del agitador mediante un acople elástico. Asimismo, dispone de controles de temperatura, nivel, espuma, oxígeno disuelto y pH, todos ellos con sus sensores correspondientes; e incluye varias entradas para la adición de reactivos y la toma de muestras. Está dotado de un sistema de estabilización de temperatura, cuyo objetivo es mantener el interior del biorreactor en condiciones térmicas similares a las del cuerpo humano; para ello cuenta con un sistema cerrado de circulación con una bomba y una línea de conexión a la camisa de refrigeración/calefacción del reactor, una resistencia eléctrica y un circuito de agua fría. La medida de la temperatura se efectúa mediante un sensor digital tipo *Pt-100* inmerso en el interior de la vasija, en contacto directo con el contenido del reactor, y su control se realiza mediante un lazo de regulación PID que asegura un control de temperatura preciso ($T_{\text{set point}} \pm 0.1 \text{ } ^\circ\text{C}$) y constante. También dispone de un sistema de regulación de pH con un electrodo de cristal (Hamilton, modelo *Easyferm Plus K8*) inmerso en el interior del tanque y en contacto con el contenido del reactor como elemento sensor, y un sistema propio de control basado en un módulo de adquisición de datos *i-7011* que registra el pH del medio y actúa sobre un conjunto de bombas peristálticas (Eyela, modelo *MP-3*) que adicionan ácido (HCl) o base (NaHCO_3) en función del punto de consigna prefijado, simulando así las secreciones ácidas de las glándulas gástricas y la acción de los jugos pancreáticos.

Para simular el intestino delgado restante (el yeyuno y el íleon), donde predominan fundamentalmente los procesos de absorción, se hace pasar de forma continua y controlada el contenido del CSTR por el interior del PFR, un sistema modular de filtración que contiene una membrana tubular monocanal de un tamaño de

corte determinado en función de la barrera biológica a simular. La integración del dispositivo tubular y el CSTR en un único sistema de simulación global requiere la implementación de un conjunto de tubos y conexiones de polietileno químicamente resistentes que conforman los circuitos hidráulicos de impulsión y de retorno del simulador.

El PFR al que hacíamos referencia anteriormente consiste en una carcasa cilíndrica de acero inoxidable (Prozesstechnik GmbH, Basilea, Suiza) que contiene los dispositivos adecuados para recoger los flujos de permeado (fracción biodisponible) y retenido (fracción no biodisponible o residuo colónico). En su interior alberga la membrana cerámica tubular porosa monocanal que hace las veces de superficie filtrante y permite simular la difusión a través del epitelio intestinal. La membrana utilizada en esta Tesis Doctoral fue una membrana de ultrafiltración inorgánica monocanal de TiO_2 sobre soporte poroso de $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ proporcionada por Atech Innovations GmbH, modelo UF 50 N. Las dimensiones de la membrana fueron 1000 mm de longitud, 6 ± 0.5 mm de diámetro del conducto y 2 ± 0.5 mm de espesor, con un diámetro medio de poro igual a $0.05 \mu\text{m}$ y un tamaño de corte molecular de 50 kDa. Este tipo de membranas presentan toda una serie de ventajas:

- Alta resistencia mecánica y estabilidad térmica (soportan presiones de hasta 10 bar y pueden esterilizarse con vapor de agua a $121 \text{ }^\circ\text{C}$).
- Alta resistencia química frente a productos químicos altamente corrosivos.
- Estabilidad frente al pH (desde 0 hasta 14).
- Son fáciles de lavar y permiten efectuar retrolavados.
- Se pueden regenerar.
- Alto rendimiento y selectividad.
- Larga vida de servicio.

Para la regulación del caudal y la presión en los circuitos hidráulicos de impulsión y retorno se utiliza un sistema de control propio que actúa sobre un conjunto de bombas peristálticas, de tal forma que variando el ciclo de trabajo de estas bombas que funcionan con movimiento de rotación constante, es posible controlar la presión

dentro de los circuitos hidráulicos y la velocidad de filtración del permeado. La presión de funcionamiento también se puede ajustar de forma precisa ($P_{\text{set point}} \pm 10 \text{ mmHg}$) mediante una válvula reguladora de presión accionada por resorte (Swagelok, modelo *SS-R4512MM-SP*) y se puede medir mediante un manómetro digital (Endress+Hauser, modelo *Ceraphant PTC31*) situado en el extremo donde se recoge el retenido. Una balanza electrónica de precisión con conectividad USB (Sartorius, modelo *Quintix 5102*) registra de forma continua la masa de permeado con el tiempo. Una vez finalizado el ensayo, el producto concentrado o retenido que queda en el CSTR, que hace las funciones de reservorio, constituye el residuo colónico que pasaría al intestino grueso; sin embargo, esta última fase de la simulación que conllevaría incorporar cultivos de flora bacteriana no se ha realizado.

3.2.5.2. Descripción general del ensayo

Para poder comparar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de la curcumina en los diferentes sistemas de liberación estudiados (oleogel vs. emulsión simple Og/W vs. emulsión múltiple $W_1/\text{Og}/W_2$), todos los ensayos se realizaron suministrando una misma dosis inicial de oleogel: 6.018 g. Esta cantidad de oleogel es la necesaria para proporcionar 2.063 g de EPA y 1.375 g de DHA, que supone aproximadamente el doble de la cantidad de EPA y DHA diaria recomendada por la ISSFAL para la población general (ver apartado 1.1.1.). Por tanto, la cantidad de oleogel, emulsión simple Og/W o emulsión múltiple $W_1/\text{Og}/W_2$ suministrada en cada ensayo se ha calculado en base al porcentaje de oleogel que contenía ese sistema de liberación, de forma que siempre se proporcionase la misma cantidad inicial de oleogel.

Para realizar cada ensayo, primero hay que llevar el simulador a las condiciones fisiológicas del sistema gastrointestinal humano. Para ello, se estableció una temperatura interior del CSTR de $37.5 \pm 1.0 \text{ }^\circ\text{C}$ durante todo el proceso (Godoy et al., 2020) y una velocidad de agitación de 100 rpm para simular los movimientos peristálticos continuos de las paredes del estómago (Abad et al., 2018). A continuación, se prepararon 800 mL de fluido gástrico simulado (SGF) de acuerdo con la composición y concentraciones preestablecidas por Brodkorb et al. (2019), y se ajustó el pH a 1.6

para simular el estómago vacío (Abad et al., 2018). Este SGF así preparado se introdujo en el CSTR y se dejó calentar hasta la temperatura prefijada; mientras esto sucedía se procedió con la simulación de la fase oral.

3.2.5.2.1. Simulación de la fase oral

En primer lugar, se pesó la cantidad de alimento correspondiente, en nuestro caso el sistema de liberación a estudiar (6.018 g de oleogel, 12.251 g de emulsión simple Og/W o 25.000 g de emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$). Paralelamente se prepararon 26.25 mL de fluido salival simulado (SSF) de acuerdo con la composición y concentraciones preestablecidas por Brodkorb et al. (2019), y se ajustó el pH a 7.0. A continuación, se tomaron 17.5 mL de este SSF y se mezclaron con 1.25 mL de una solución de α -amilasa (75 U/mL), 125 μ L de una solución de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0.3 M) y 6.125 mL de agua destilada, haciendo un volumen total de 25 mL. Finalmente, se añadió el alimento ya pesado sobre la cantidad correspondiente de este SSF (1:1, p/p) y se puso en un agitador magnético a 1200 rpm durante 2 min para simular la masticación y la mezcla de los alimentos con la saliva (Figura 40). Concluida la fase oral se tomaron 10 mL de muestra para su posterior análisis y el resto pasó a la fase siguiente.

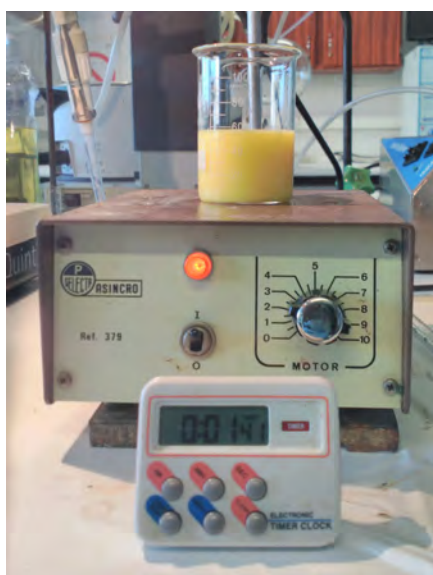


Figura 40. Simulación de la fase oral.

3.2.5.2.2. Simulación de la fase gástrica

Durante la simulación de la fase oral, el SGF que se había preparado al principio y se encontraba agitándose y calentándose en el CSTR ya debe haber alcanzado los 37.5 °C. La simulación de la fase gástrica comenzó añadiendo la mezcla resultante de la fase oral al CSTR, junto con 10 mL de una solución de pepsina (2000 U/mL) y 50 mg de lecitina de soja (Lipoid P 45) (Brodkorb et al., 2019). A continuación, se ajustó el pH del contenido del CSTR a 3.0 con la adición automática y controlada de una solución de NaHCO₃ 1 M (Godoy et al., 2020) y se mantuvo el sistema en estas condiciones durante 30 min (Figura 41). Concluida la fase gástrica se tomaron 10 mL de muestra para su posterior análisis y el resto pasó a la siguiente fase.



Figura 41. Simulación de la fase gástrica.

3.2.5.2.3. Simulación de la fase duodenal

La simulación de la fase duodenal se realiza en el propio CSTR, reproduciendo ahora las condiciones químicas del duodeno (los jugos pancreáticos y los jugos biliares). Para ello, se accionó el sistema de control de pH para dosificar una solución de NaHCO₃ 1 M (a 4.5 mL/min) (Sumeri et al., 2008) hasta alcanzar un pH en el reactor de

6.5 (Godoy et al., 2020), simulando así la acción de los jugos pancreáticos cuando neutralizan a los jugos gástricos. Seguidamente se añadieron 10 mL de solución de lipasa pancreática (2000 U/mL), 10 mL de solución de pancreatina (10 % p/v), 1.63 g de sales biliares (para conseguir una concentración final de sales biliares de 5 mM) y 1 mL de solución de tripsina (50 mg/ensayo) (Brodkorb et al., 2019), manteniendo el sistema en estas condiciones durante 10 min. Concluida la fase duodenal se tomaron 10 mL de muestra para su posterior análisis y el resto pasó a la fase siguiente.

3.2.5.2.4. Simulación de la fase de absorción intestinal

Para la simulación de la fase de absorción intestinal, se bombeó el contenido del CSTR a través del sistema de filtración modular anteriormente descrito. El tamaño de corte molecular de la membrana (50 kDa) se eligió en base a la experiencia previa y a la permeabilidad de la curcumina, que depende de su peso molecular (368.38 g/mol). El límite superior de sobrepresión del sistema se fijó en 150 ± 10 mmHg, de forma que la difusión de curcumina a través de la membrana únicamente se debiera al transporte pasivo. Una vez cebado el PFR y todos los circuitos (tanto de impulsión como de retorno), se consideró iniciada la fase de absorción intestinal que se prolongó durante 180 min (Figura 42). A los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 min, se tomaron muestras (10 mL) de permeado (fluido absorbido a través de la membrana) y retenido (fluido no absorbido que forma parte del residuo colónico) para su análisis posterior.



Figura 42. Simulación de la fase de absorción intestinal.

En resumen, cada ensayo tuvo una duración total aproximada de 240 min: fase oral (2 min), fase gástrica (30 min), fase duodenal (10 min) y, finalmente, fase de absorción intestinal (180 min). En cada experimento, el software del equipo (*BioDigestor*) (Figura 43) generaba un fichero de datos con el registro de todos los procesos y eventos que tuvieron lugar durante la simulación. Este fichero fue convenientemente procesado para obtener la información del ensayo.

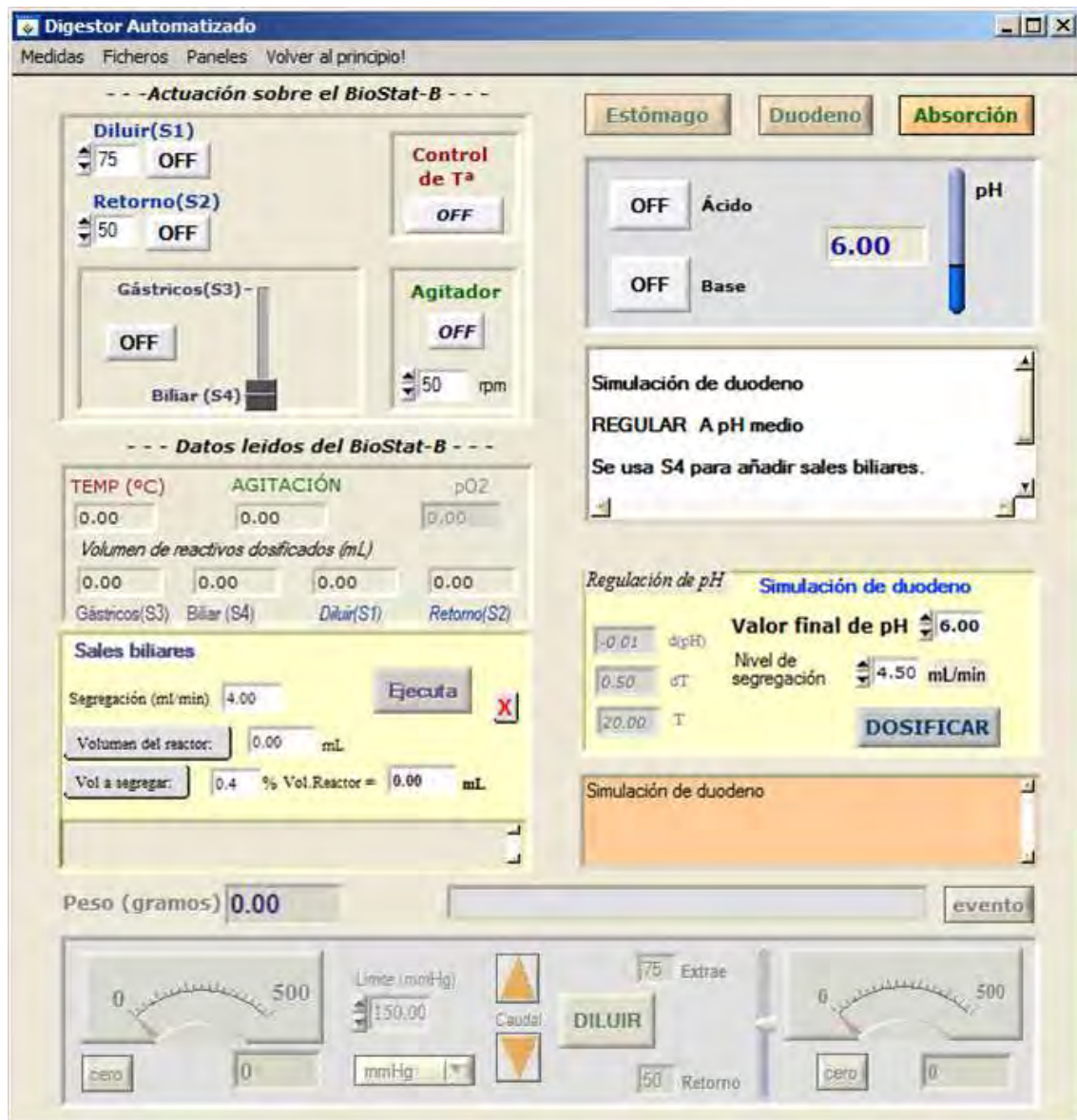


Figura 43. Interfaz de usuario del software del equipo (*BioDigestor*).

3.2.5.3. Descripción del protocolo de limpieza de la membrana

Terminado el ensayo, se procedió a realizar una limpieza minuciosa y exhaustiva de todos y cada uno de los componentes del simulador. Por su capital importancia de cara al cuidado y mantenimiento del equipo, la limpieza de la membrana merece una especial atención. Es por ello que se diseñó un protocolo de limpieza que incluía una serie de etapas: una limpieza física, otra química, y toda una serie de lavados o enjuagues; todo ello realizado en un equipo de membranas a escala de laboratorio (Prozesstechnik GmbH, Basilea, Suiza) (Figura 44). El protocolo utilizado es el que se detalla a continuación:

- **Limpieza física.**

Una vez terminado el ensayo, se realizó una primera limpieza física para eliminar sustancias débilmente adheridas a la membrana. Esta primera limpieza consistió en un lavado con agua caliente (50 °C) a la mínima presión de operación ofrecida por el equipo (2.5 bar), puesto que a presiones mayores se puede inducir la compactación del ensuciamiento sobre la membrana (aumento de la resistencia, taponamiento y bloqueo de poros), haciendo más difícil su eliminación. La duración de esta primera limpieza fue de 20 min.

- **Limpieza química.**

Después se realizó una segunda limpieza, en este caso química, para eliminar los restos de suciedad que hayan podido quedar tras la limpieza física anterior. Para ello se introducen agentes químicos que reaccionen con los depósitos, debilitando las fuerzas de cohesión entre los mismos y entre los depósitos y la superficie de la membrana. Esta segunda limpieza consistió en un lavado a 50 °C y 2.5 bar de presión, combinando dos agentes de limpieza: NaOH (20 g/L) y SDS (2 g/L). La duración de este segundo lavado fue de 30 min.



Figura 44. Equipo de membranas a escala de laboratorio para la limpieza de la membrana.

- **Lavados o enjuagues.**

Para terminar, después del tratamiento de limpieza realizado, se llevaron a cabo toda una serie de lavados que pretendían eliminar los posibles restos que hayan podido quedar en la membrana. Estos lavados o enjuagues consistieron en 3 lavados con agua

caliente (50 °C), seguidos de un cuarto con agua a temperatura ambiente (25 °C) y un quinto con agua destilada (25 °C), todos ellos de 15 min de duración.

3.2.6. Análisis de los resultados

Para llevar a cabo el análisis de los resultados (diseño de experimentos, análisis estadístico, ajuste del modelo, optimización, etc.) se utilizó el programa *Statgraphics Centurion XV*.

3.2.6.1. Diseño estadístico de experimentos

Un experimento es una prueba o ensayo. El experimento diseñado es una prueba o serie de pruebas en las cuales se hacen cambios deliberados en las variables de entrada de un proceso o sistema, de tal forma que sea posible observar e identificar las causas de los cambios en las variables de salida (Montgomery, 2001). Para realizar la elección de los experimentos y la evaluación de los resultados se debe utilizar una metodología matemática y estadística que indique cómo planificar, diseñar u organizar la secuencia de experimentos de una forma óptima, minimizando el coste y la influencia del error experimental sobre la información buscada. Dicha planificación y análisis es el principal objetivo del diseño de experimentos (DOE). Llamamos DOE al conjunto de herramientas estadísticas que permiten identificar los factores que pueden influir en el resultado de un experimento realizando un número mínimo de ensayos (Miller, 1993; Montgomery, 2001). En términos generales, se puede afirmar que el DOE propone, por un camino eficiente, obtener la optimización de un proceso o producto con un mínimo de experimentos.

Para explicar mejor la filosofía del DOE, consideremos un determinado proceso o sistema (Figura 45) como una caja negra donde entran y salen una serie de variables: X_1, X_2, \dots, X_k son las variables independientes o variables de entrada susceptibles de ser modificadas por el investigador (factores controlables); Z_1, Z_2, \dots, Z_m representan otras

variables que también intervienen en el proceso pero que o bien no son controlables o no interesa controlar (factores no controlables o ruido); e Y_i son las variables dependientes o variables de salida, que representan la respuesta del sistema frente a las modificaciones introducidas por las variables de entrada.

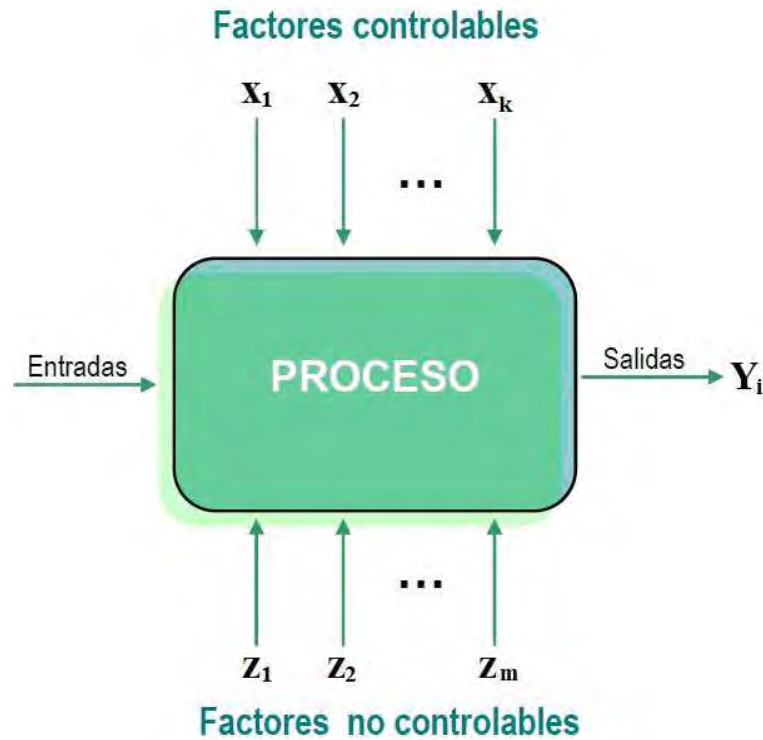


Figura 45. Esquema de un proceso o sistema.

Normalmente hay diferentes factores que intervienen en los experimentos, siendo un *factor* una variable que puede ser manejada de un modo controlado para estudiar su efecto y que tiene (o podría tener) influencia sobre la *variable respuesta* (parámetro estudiado). Se entiende por *niveles de un factor*, los diferentes valores que puede tomar dicho factor, y el *efecto de un factor* se define como el cambio en la respuesta producida por un cambio en el nivel del factor. Cuando se habla de *efecto principal*, nos referimos a los factores de interés primordial del experimento, y se conoce como *interacción* entre dos o más factores al fenómeno por el cual el efecto de un factor sobre la respuesta depende del nivel de otro u otros factores (estas interacciones pueden ser de orden dos, tres o superior).

El método de experimentación que surge de manera más intuitiva se basa en el estudio del problema a través de la modificación de las variables experimentales una a

una, mientras las demás se mantienen fijas (metodología univariante). De este modo, la variación de la respuesta se puede atribuir a la variación del factor y, por lo tanto, revela el efecto de ese factor. Esta estrategia experimental presenta grandes inconvenientes puesto que requiere de un gran esfuerzo experimental, además de no detectar la existencia de interacción o dependencia entre variables y de presentar un campo de validez restringido. Además, en el caso de la optimización experimental, puede no proporcionar la posición del óptimo. Para solucionar los inconvenientes de este método se utiliza la metodología del DOE, que permite investigar simultáneamente los efectos de todas las variables de interés mediante la realización de un número mínimo de ensayos, repercutiendo en una mayor eficiencia y en el ahorro de tiempo y costes. Algunas de las características más importantes de un buen diseño son:

- Que proporcione una distribución razonable de puntos de datos y, por tanto, de información.
- Que no requiera de un gran número de experimentos.
- Que permita estudiar la adecuación del modelo (falta de ajuste).
- Que proporcione estimadores precisos de los coeficientes del modelo.
- Que proporcione una estimación interna del error.
- Que permita realizar experimentos en bloques.
- Que no requiera de demasiados niveles de las variables independientes.

Además de las características mencionadas, es conveniente que el diseño escogido sea *ortogonal*; esto es, que el nivel i de uno de los factores se encuentre en la misma proporción que el nivel j del otro factor. La ortogonalidad garantiza que podamos estimar de forma independiente los efectos de los factores, ya que las estimaciones de los parámetros del modelo a ajustar, no presentarán correlación. En este caso, la varianza de la respuesta esperada es expresable como la suma ponderada de las varianzas de los parámetros estimados.

Que el diseño sea *invariante por rotación* resulta también interesante ya que asegura que la varianza de la respuesta esperada dependa solamente de la distancia de un punto al centro del diseño, y no de la dirección.

Otros principios básicos en el DOE son el de obtención de réplicas, aleatorización y análisis por bloques.

La réplica es una repetición del experimento básico, que permite tener una estimación del error experimental. Esta estimación permite determinar si las diferencias observadas en los datos son estadísticamente significativas. El uso de réplicas permite, además, una estimación más precisa del efecto de un factor en el experimento y la apreciación de las interacciones.

Los métodos estadísticos requieren que las observaciones o los errores sean variables aleatorias independientes. Por esta razón el experimento se debe aleatorizar adecuadamente, es decir, que la asignación del material experimental y el orden en que se realizan las pruebas individuales se deben determinar aleatoriamente.

El análisis por bloques permite incrementar la precisión del experimento, siendo un bloque una porción del material experimental más homogénea que el total del material. Al realizarse un análisis por bloques, se hacen comparaciones entre las condiciones de interés del experimento dentro de cada bloque.

Existen varios tipos de diseños experimentales: los *diseños factoriales*, que han sido desarrollados para determinar cuáles son los factores críticos dentro de un proceso o como parte del diseño de un producto; y los *diseños factoriales fraccionados*, que tienen por objetivo primordial el optimizar los recursos que suponen la ejecución de un experimento. Sin embargo, una de las aplicaciones más comunes para el DOE y que se ha difundido a gran escala, especialmente en procesos que involucran dos o más variables, es la optimización de factores: encontrar los parámetros de diseño ideales que optimicen la respuesta esperada. Este tipo de diseños se conocen como *diseños de optimización* o *diseños de superficie de respuesta* (DSR), y su objetivo final es el desarrollo, la mejora y la optimización de productos y procesos. A esta última categoría pertenecen los *diseños centrales compuestos*, los *diseños Draper-Lin* y los *diseños Box-Behnken*, todos ellos utilizados en esta Tesis Doctoral. A continuación, se comentarán algunos aspectos de cada uno de estos diseños.

3.2.6.1.1. Diseños centrales compuestos

Uno de los diseños más populares para ajustar modelos de segundo orden consiste en los diseños centrales compuestos (CCD) (Box & Wilson, 1951). Los CCD son relativamente eficientes cuando el número de factores es pequeño, entendiendo por eficiencia la obtención de los parámetros del modelo con el menor número de experimentos posibles. En cualquier caso, es conveniente realizar algún experimento adicional de los estrictamente necesarios para establecer los parámetros del modelo. De esta forma se dispone de grados de libertad suficientes para estimar la falta de ajuste del modelo propuesto.

Estos diseños constan de tres partes:

1. Un experimento factorial 2^k completo, si $k < 5$ (en el que todos los k factores se estudian a dos niveles que se corresponden con el máximo y el mínimo del rango de cada variable); o 2^{k-1} , si $k > 5$.
2. $2k$ puntos experimentales que se sitúan a una distancia α del centro del diseño.
3. c puntos centrales replicados. La bibliografía recomienda entre 3 y 5 réplicas.

Por tanto, el número de puntos experimentales a obtener con este tipo de diseños es:

$$N = 2^k + 2 \cdot k + c \quad \text{ó} \quad N = 2^{k-1} + 2 \cdot k + c \quad \text{Ec. [11]}$$

Así, en un estudio de 3 factores, 8 de los puntos de un diseño central compuesto forman un cubo que corresponde a un diseño factorial completo 2^3 . La parte correspondiente a la estrella consiste en un grupo adicional de puntos, situados a igual distancia del centro del cubo en radios que pasan a través del punto central de cada cara del cubo. La distancia desde el centro del cubo a uno de esos puntos se denomina *distancia axial* (α) de la estrella. Por tanto, el diseño cuenta con 5 niveles por factor ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$): punto axial mínimo, punto factorial mínimo, punto central, punto factorial máximo y punto axial máximo (Figura 46).

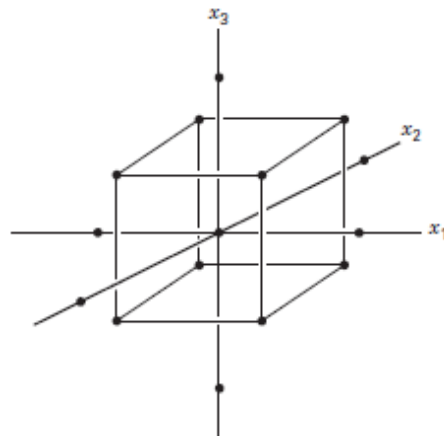


Figura 46. Diseño central compuesto para 3 factores.

La elección de un valor de α adecuado permite que el diseño cumpla con los criterios de ortogonalidad y/o rotabilidad. Cuando $\alpha = \pm 1$ se obtiene una variante del CCD ortogonal y/o rotatable denominada CCD centrado en las caras, donde todos los puntos axiales recaen sobre la superficie de las caras del diseño, como puede verse en la Figura 47. En este caso, el diseño sólo requiere 3 niveles para cada factor ($-1, 0, +1$), en lugar de los 5 que indicábamos anteriormente (lo cual puede ser difícil o costoso en algunas situaciones). Se evita, además, combinaciones con valores extremos de los factores, resultando de gran utilidad en la práctica donde a menudo es difícil modificar niveles para ajustarse a los criterios de ortogonalidad y/o rotabilidad. A cambio, este diseño no mantiene la propiedad de rotabilidad, aunque la ausencia de esta propiedad puede compensar el ahorro de recursos experimentales.

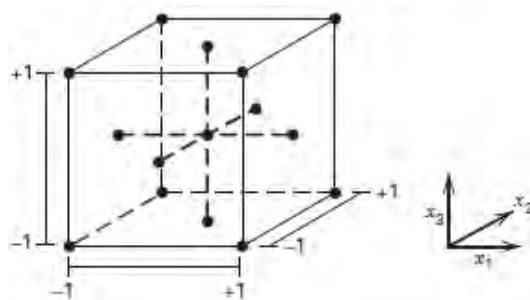


Figura 47. Diseño central compuesto centrado en las caras para 3 factores.

La yuxtaposición de un diseño factorial a dos niveles con un diseño de estrella permite estimar todos los parámetros en un modelo polinomial completo de segundo orden, mientras que los diseños factoriales completos a dos niveles sólo permiten la estimación de los parámetros de segundo orden.

3.2.6.1.2. Diseño compuesto reducido de Draper-Lin

Cuando el número de factores a estudiar es elevado, el número de ensayos a realizar en el diseño se incrementa considerablemente, especialmente si se desean realizar estudios a más de 2 niveles. En este sentido, se han desarrollado diferentes aproximaciones para conseguir la máxima información posible, con el menor número de experimentos, incrementándose así la eficacia del diseño. Los diseños compuestos se emplean con mucha frecuencia debido a su alta eficacia, aunque ésta decrece al aumentar el número de variables. Para solventar este problema, se han propuesto distintas estrategias para reducir el número de puntos del diseño factorial que constituye su “esqueleto factorial”, obteniéndose de este modo los llamados “diseños compuestos reducidos” (Draper, 1985). Así, Draper & Lin (1990) propusieron buscar los puntos necesarios del “esqueleto factorial” mediante la eliminación de columnas a partir de un diseño Plackett-Burman a 2 niveles (Plackett & Burman, 1946). Estos diseños muestran una eficacia muy alta, y se pueden ampliar fácilmente sin más que añadir puntos centrales, según los grados de libertad requeridos para la evaluación del modelo.

La aproximación de Draper y Lin se basa en los siguientes pasos:

1. Cálculo del mínimo número de puntos, m , requeridos para el “esqueleto factorial” ($m = p - 2k$).
2. Selección del diseño Plackett-Burman a 2 niveles, cuyo número de puntos es igual o mayor a m .
3. Selección de k columnas del diseño Plackett-Burman original y eliminación del resto.
4. En caso de que queden columnas duplicadas, eliminar una de cada duplicado.
5. Establecimiento del “esqueleto factorial” con el resto de las filas.
6. Adición de los correspondientes experimentos para los puntos estrella y centrales seleccionados, obteniéndose el diseño compuesto reducido de Draper-Lin definitivo.

3.2.6.1.3. Diseño de Box-Behnken

Este diseño con al menos 3 factores y 3 niveles por factor (-1, 0, +1), fue propuesto por Box & Behnken (1960) y proporciona información suficiente para obtener de manera confiable el óptimo de un proceso de manera equivalente a una superficie de respuesta, sólo que no se trata de superficies porque al tener más de 2 factores no puede representarse el relieve de la respuesta a todos los factores de manera simple; estrictamente se hablaría de volúmenes e hipervolúmenes.

El diseño de Box-Behnken se construye combinando diseños factoriales 2^k con diseños de bloques incompletos. El diseño resultante suele tener menos puntos experimentales que un CCD con el mismo número de factores (Figura 48). El número de experimentos requerido viene dado por:

$$N = 2 \cdot k \cdot (k - 1) + c \quad \text{Ec. [12]}$$

Este diseño es rotatable o casi rotatable, lo que permite que la codificación de los factores se conserve aunque estos cambien de cuadrante, con todos los puntos localizados en una esfera de radio $\sqrt{2}$. Además, tiene la característica de no tener ningún punto en los vértices de la región cúbica creada por los límites superior e inferior de cada variable. Esto supone una ventaja cuando los puntos de los vértices del cubo representan combinaciones de los niveles de los factores cuya prueba es económicamente costosa o materialmente inviable por las propias restricciones operacionales del proceso. En otras palabras, el diseño permite eliminar los experimentos con condiciones extremas (vértices del cubo).

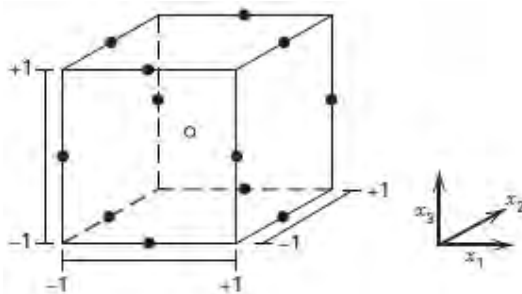


Figura 48. Diseño de Box-Behnken para 3 factores.

3.2.6.2. Análisis estadístico

El análisis estadístico del diseño de experimentos permite establecer cuáles son las variables independientes más significativas sobre las respuestas de interés y, posteriormente, construir modelos que se ajusten adecuadamente a los datos obtenidos. Así, los modelos permiten estimar el comportamiento de dichas variables en otras condiciones dentro del dominio experimental. En este sentido, el análisis de la varianza (ANOVA) permite establecer con cierto nivel de confianza si los factores analizados afectan significativamente o no la respuesta de interés. En esta Tesis Doctoral se ha utilizado un nivel de significación del 95 % para la evaluación de los estadísticos.

3.2.6.3. Optimización experimental

La optimización puede definirse como un recurso basado en instrucciones que permiten mejorar los resultados de un procedimiento. Científicamente, estas instrucciones se expresan a través de métodos matemáticos que permiten maximizar o minimizar alguna propiedad específica del sistema en estudio.

La propiedad que se desea optimizar se denomina *función objetivo* o *variable respuesta*, y se simboliza con la letra Y . Como ya se apuntó en el apartado anterior, la respuesta del proceso o sistema suele depender de una serie de *factores* experimentales que se simbolizan con la letra X , bajo el control del operador. La relación entre ambas variables vendrá dada por:

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_k) \quad \text{Ec. [13]}$$

El proceso de búsqueda de los niveles óptimos de estos factores se conoce como optimización. El procedimiento de optimización se lleva a cabo en las siguientes etapas:

1. Definición de la función objetivo o variable respuesta.
2. Determinación de los factores más importantes; es decir, de aquellos factores que presentan influencias significativas sobre la variable respuesta a optimizar.

3. Optimización propiamente dicha. Determinación de la combinación de los niveles de los factores seleccionados que resulte en la mejor respuesta (máxima o mínima). Para ello se utiliza el diseño estadístico de experimentos.

3.2.6.3.1. Metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta (RSM) (Box & Wilson, 1951) es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para desarrollar, mejorar y optimizar procesos. También es aplicable en el modelado y análisis de problemas, en el diseño, desarrollo y formulación de nuevos productos y en la mejora de diseños de productos ya implantados.

Puesto que la respuesta de interés (que puede ser una o más de una) viene influenciada por varios factores, el objetivo de la RSM consiste en optimizar dicha respuesta determinando los valores óptimos de los factores implicados. La relación entre el valor real esperado que tome la variable respuesta y los efectos de los factores puede ajustarse a modelos polinómicos de primer o segundo grado y puede representarse mediante una hipersuperficie denominada superficie de respuesta. El análisis de superficie de respuesta se llevará a cabo, por tanto, con la función o superficie ajustada obtenida.

La Figura 49 representa un ejemplo de una superficie de respuesta en tres dimensiones obtenida a partir de un modelo polinómico de segundo grado, donde puede verse la evolución de la variable respuesta Y en función de dos factores (X_1 y X_2). El correspondiente gráfico de contornos ayuda a visualizar mejor la forma de esta relación, donde cada línea de contorno representa una altura determinada de la superficie de respuesta, o lo que es lo mismo, distintas combinaciones de niveles de factores que provocan una misma variable respuesta.

Normalmente, la forma de la verdadera función respuesta f es desconocida, por lo que el primer paso en un RSM es determinar una aproximación a la relación real entre la variable respuesta y el conjunto de variables independientes. Generalmente la

variable respuesta suele ajustarse razonablemente bien a un polinomio de orden bajo (de primer o segundo grado). Naturalmente, es poco probable que un modelo polinómico sea una aproximación razonable de la relación funcional real a lo largo de todo el dominio de las variables independientes, pero para regiones relativamente pequeñas estos modelos pueden ser adecuados.

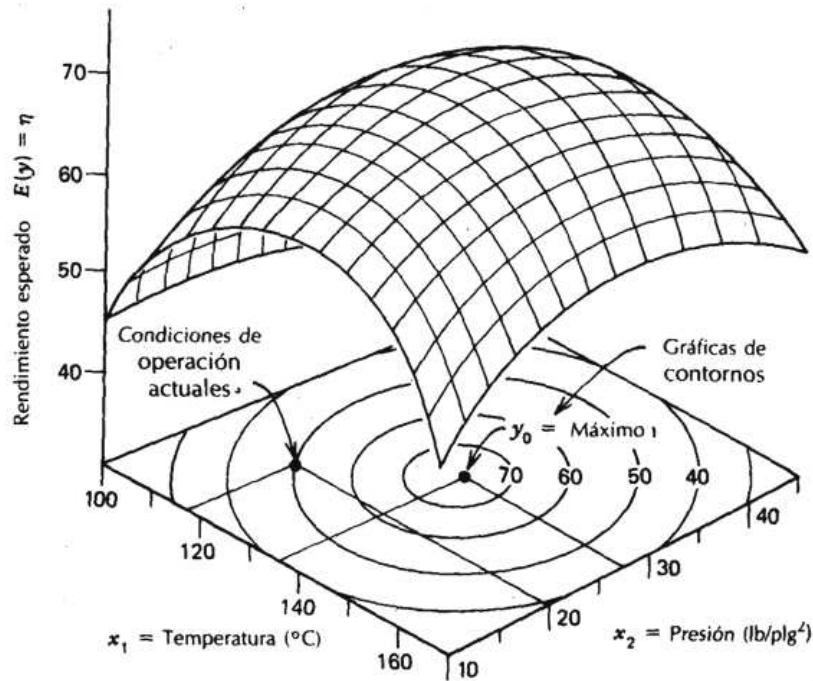


Figura 49. Superficie de respuesta tridimensional y gráfico de contornos correspondiente.

Si la variable respuesta puede expresarse por una función lineal de las variables independientes, la función de aproximación es el modelo polinomial de primer orden y vendrá dado por:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \dots + \beta_k \cdot X_k + \varepsilon \quad \text{Ec. [14]}$$

pudiendo incluir también términos de interacción ($\beta_{12} \cdot X_1 \cdot X_2$), los cuales introducen algo de curvatura en la función.

Cuando nos encontramos relativamente próximos al óptimo, es necesario incorporar mayor curvatura al modelo para aproximarlos a la respuesta a predecir; en estos casos debe utilizarse un modelo polinomial de mayor grado. En la mayoría de los casos bastará con ajustar a un polinomio de grado dos:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i \cdot X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} \cdot X_i^2 + \sum_{i < j} \sum_j \beta_{ij} \cdot X_i \cdot X_j + \varepsilon \quad \text{Ec. [15]}$$

Si $N \geq 3$ podremos obtener mediante mínimos cuadrados los estimadores de los coeficientes de regresión ($b_0, b_1, b_2, \dots, b_k$) del polinomio de aproximación, además de la variación del error experimental. La precisión de estos estimadores b_i para estimar los β_i va a depender de la idoneidad del diseño experimental utilizado. Cuando estos coeficientes de regresión se obtienen por regresión múltiple, se pueden emplear para predecir la variable respuesta Y como una función de los factores X y construir las superficies de respuesta y gráficos de contornos ajustados.

Los niveles o valores de los factores X_1, X_2, \dots, X_k que optimizan la variable respuesta serán un conjunto para los que las derivadas parciales serán igual a cero:

$$\frac{\partial \hat{Y}}{\partial X_1} = \frac{\partial \hat{Y}}{\partial X_2} = \dots = \frac{\partial \hat{Y}}{\partial X_k} = 0 \quad \text{Ec. [16]}$$

Este punto se denomina punto estacionario, y puede representar un punto de máxima respuesta, de mínima respuesta o punto silla en la que la respuesta aumenta o disminuye a partir del punto estacionario en función de la dirección en la que nos movamos (Figura 50).

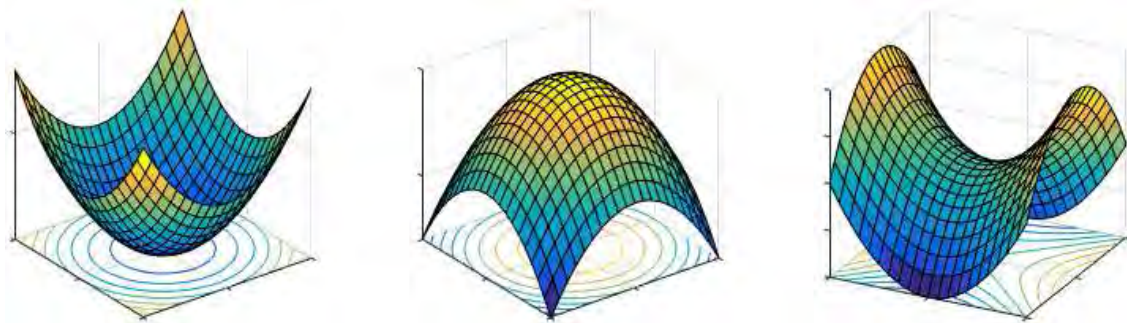


Figura 50. Punto estacionario mínimo (izquierda), máximo (centro) y punto silla (derecha).

Finalmente, podemos conocer el valor de la respuesta en dicho punto estacionario sustituyendo el valor del punto en la ecuación del modelo.

3.2.6.3.2. Metodología de superficie multi-respuesta

En muchas ocasiones puede ser importante evaluar más de una variable respuesta a la vez para cada unidad experimental. En estos casos suele ser habitual encontrar variables respuesta antagónicas, es decir, que una de ellas crece mientras las otras decrecen y viceversa. Cuando esto ocurre, el analista tiene dos opciones: decidir cuál de las respuestas es más importante para el fin perseguido o determinar el conjunto de condiciones operativas para la consecución de la mejor respuesta global. En el segundo caso, considerar el efecto que sobre más de una variable respuesta tienen k factores implica obtener un modelo de superficie de respuesta adecuado para cada una de ellas, para así tratar de encontrar el conjunto de condiciones que optimizan todas las respuestas o las mantiene en un determinado rango. Un método relativamente directo para encontrar las condiciones óptimas cuando contamos con un bajo número de factores es el de superponer los gráficos de contornos de cada respuesta. Sin embargo, cuando contamos con más de tres factores, este método se vuelve algo más complejo puesto que los gráficos de contornos son bidimensionales, por lo que tendríamos que mantener constante una o más variables para representar las $(k - 2)$ variables restantes.

Un método matemático más formal supone utilizar la técnica de optimización simultánea propuesta por Derringer & Suich (1980), la cual hace uso de funciones de deseabilidad para optimizar simultáneamente todas las respuestas. Esta metodología se basa en convertir cada una de las respuestas Y_i en una función de deseabilidad individual d_i que varíe entre 0 y 1 y que represente la cercanía de la respuesta a un valor ideal o deseado:

$$0 \leq d_i \leq 1 \quad \text{Ec. [17]}$$

Si Y_i alcanza el valor deseado (ya sea máximo, mínimo u objetivo), entonces $d_i = 1$. Si por el contrario la respuesta alcanzada se encuentra fuera de un intervalo de tolerancia, entonces $d_i = 0$. Así se pueden proponer tres formas diferentes de la función deseabilidad d en función del objetivo de optimización. Si el objetivo es maximizar una respuesta Y , entonces su deseabilidad individual será:

$$d = \begin{cases} 0 & y < L \\ \left(\frac{y-L}{U-L}\right)^r & L \leq y \leq U \\ 1 & y > U \end{cases} \quad \text{Ec. [18]}$$

donde L y U son los límites inferior y superior del intervalo donde se desea que se encuentre la respuesta, independientemente del objetivo de optimización, y r es un valor de peso asociado que establece la linealidad de la función deseabilidad con respecto al modelo. Si $r = 1$, la función de deseabilidad es lineal. Escoger $r > 1$ pone énfasis en acercarse lo máximo posible al valor objetivo, es decir, hace más difícil alcanzar una deseabilidad alta. Valores de $r < 1$ hace menos estricto satisfacer la condición (Figura 51).

Si el objetivo es minimizar una respuesta Y , su deseabilidad individual será:

$$d = \begin{cases} 1 & y < L \\ \left(\frac{U-y}{U-L}\right)^r & L \leq y \leq U \\ 0 & y > U \end{cases} \quad \text{Ec. [19]}$$

Finalmente, si el objetivo es mantener en un rango la respuesta Y , entonces su deseabilidad individual será:

$$d = \begin{cases} 0 & y < L \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^{r_1} & L \leq y \leq T \\ \left(\frac{U-y}{U-T}\right)^{r_2} & T \leq y \leq U \\ 0 & y > U \end{cases} \quad \text{Ec. [20]}$$

donde T es el valor objetivo que establezcamos oportuno o deseable.

A partir de las deseabilidades individuales se calcula una deseabilidad global D como único objetivo de optimización, que se define como la media geométrica de las deseabilidades individuales d_i . Cada d_i se escoge para maximizar D :

$$D = \left(\prod_{i=1}^p d_i \right)^{1/p} \quad \text{Ec. [21]}$$

donde p es el número total de variables respuesta involucradas. Según la ecuación anterior podemos ver que si alguna respuesta no alcanza su valor ideal, su deseabilidad es menor a 1, por lo tanto la global también lo es; y si alguna de las deseabilidades individuales es 0, lo será también la deseabilidad total.

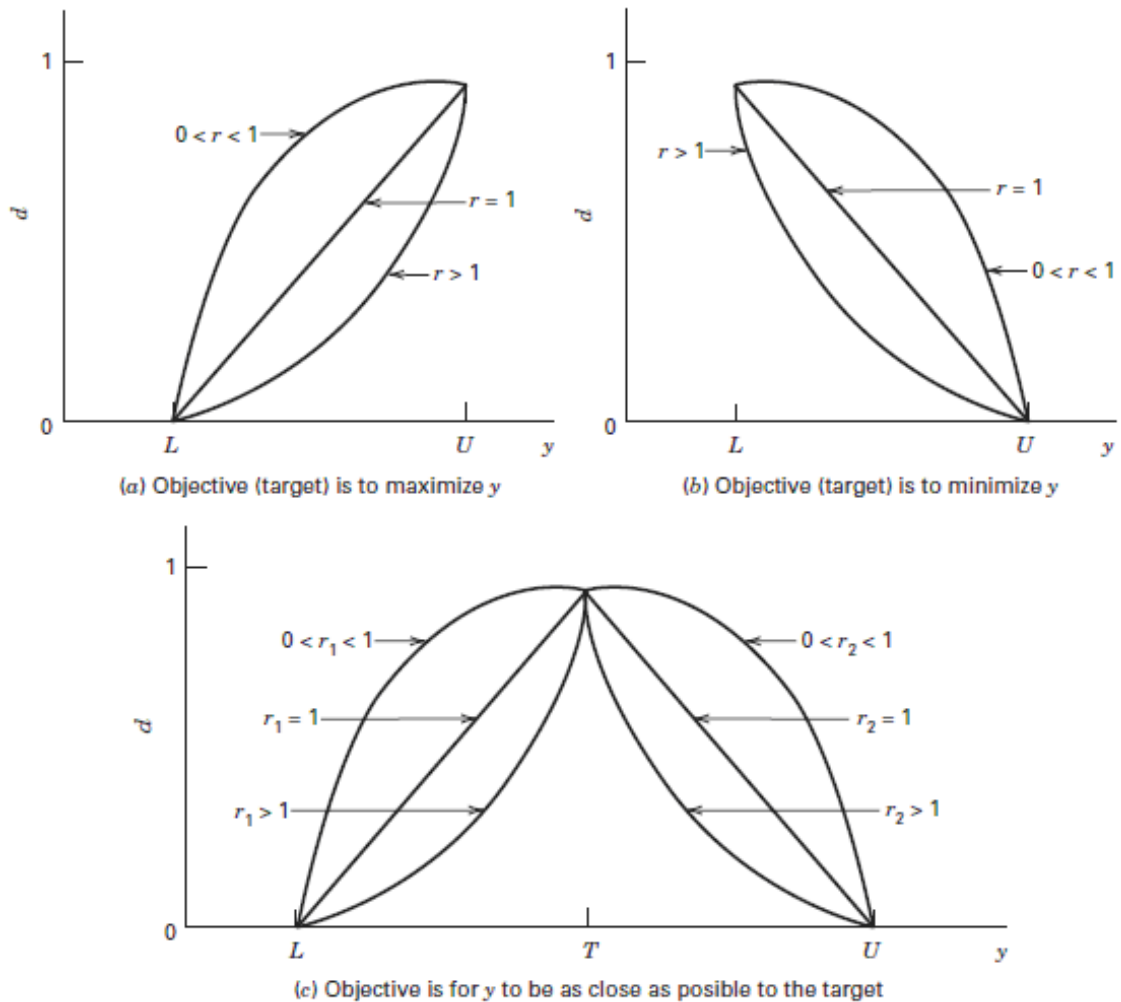


Figura 51. Tipos principales de deseabilidad individual para optimización de múltiples respuestas.

Eventualmente, se puede incorporar un factor en cada término de la productoria llamado coeficiente de impacto I_i que contemple la importancia de una respuesta sobre las demás. Dicho valor suele establecerse entre 1 y 5. De esta forma, la función deseabilidad global puede ser escrita como:

$$D = \left(\prod_{i=1}^p d_i^{I_i} \right)^{1/\sum I_i} \quad \text{Ec. [22]}$$

Así, el proceso de optimización global consistiría entonces en encontrar las condiciones de operación/formulación que conducen a un máximo valor de deseabilidad global.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Diseño, desarrollo y optimización de un sistema de liberación basado en oleogel rico en PUFAs ω -3 y curcumina

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para el primer objetivo de esta Tesis Doctoral: el diseño y desarrollo de un sistema de liberación basado en oleogel fisicoquímicamente estable para la protección, vehiculización y liberación de altas dosis de PUFAs ω -3 y curcumina por vía oral. Todo proceso de oleogelificación implica un aumento importante de la temperatura; por ejemplo, en nuestro caso calentamos a temperaturas superiores al punto de fusión del agente gelificante utilizado para que, al enfriarse, pueda gelificar y dar lugar a la estructura tridimensional típica de los oleogel. Sin embargo, ese tiempo que el aceite de pescado enriquecido con PUFAs ω -3 está expuesto a temperaturas relativamente elevadas y la presencia del aire atrapado en la estructura del oleogel, puede favorecer la oxidación lipídica del aceite (Crapiste et al., 1999; Rogers et al., 2014). Por tanto, para entender mejor el proceso y las variables que le afectan, primero se estudió la influencia de la composición y las condiciones de operación del sistema oleogelificado sobre su estabilidad oxidativa y su capacidad para proteger y estabilizar en el tiempo curcumina vehiculizada. Este estudio se realizó a temperatura ambiente (23 °C) y en condiciones aceleradas (40 °C). Posteriormente y en base a estos resultados, se aplicó la metodología de superficie de respuesta para obtener la formulación y condiciones de elaboración óptimas del oleogel. Para terminar, sobre esta fórmula óptima se llevaron a cabo estudios reológicos, de estabilidad de curcumina incorporada con el tiempo frente a distintas condiciones ambientales que podrían afectarle (como la luz o la temperatura), y de bioaccesibilidad y biodisponibilidad en condiciones fisiológicas humanas.

4.1.1. Diseño de experimentos

Tras una revisión bibliográfica exhaustiva y una serie de ensayos previos sobre las condiciones de operación del proceso, se seleccionaron las variables más

importantes a considerar en un DOE: la temperatura de preparación del oleogel y las concentraciones de agente gelificante y de curcumina. A partir de estas variables independientes se realizó un diseño de Box-Behnken que permitiese evaluar simultáneamente los efectos de todas ellas y de sus posibles interacciones sobre la oxidación primaria, la oxidación secundaria y la capacidad de retención de curcumina (variables respuesta). Se contemplaron un total de 3 niveles por factor (máximo, medio y mínimo) para facilitar la construcción de modelos polinómicos de segundo grado y se efectuaron 3 repeticiones del punto central para la estimación del error experimental, obteniendo un total de 15 experimentos que se detallan en la Tabla 9. El diseño fue ejecutado en un solo bloque y el orden de los experimentos fue completamente aleatorizado para garantizar una distribución azarosa de la variabilidad no planificada (ruido aleatorio) y evitar así la introducción de sesgos en el experimento.

Tabla 9. Matriz de experimentos del diseño de Box-Behnken para el oleogel.

N° de experimento	[Gelificante], % p/p	[Curcumina], % p/p	T, °C
1	5.0	0.15	80
2	3.0	0.10	60
3	5.0	0.10	70
4	7.0	0.15	70
5	3.0	0.10	80
6	7.0	0.05	70
7	7.0	0.10	60
8	3.0	0.05	70
9	5.0	0.05	80
10	7.0	0.10	80
11	5.0	0.10	70
12	3.0	0.15	70
13	5.0	0.10	70
14	5.0	0.05	60
15	5.0	0.15	60

A este diseño experimental se le añadió una muestra control preparada en las mismas condiciones del punto central, pero sin la adición del agente gelificante, es decir, disolviendo directamente un 0.10 % p/p de curcumina sobre el aceite de pescado enriquecido en PUFAs ω -3 y calentando la mezcla hasta los 70 °C según el procedimiento descrito en el apartado 3.2.2.1. de esta Tesis Doctoral. Así se pudo evaluar el impacto del proceso de oleogelificación del aceite sobre la oxidación lipídica y la capacidad de retención de curcumina.

Para la elección de los rangos de estudio de las variables independientes seleccionadas se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

- La cantidad de agente gelificante debe ser suficiente para estructurar la fase oleosa pero sin llegar a proporcionar la consistencia de un sólido que dificulte la preparación de las futuras emulsiones. Para fijarla, se disolvieron cantidades crecientes de agente gelificante y se observó la consistencia de los sistemas resultantes siguiendo el trabajo de Patel et al. (2013).
- La concentración de curcumina está impuesta por su solubilidad en el aceite utilizado. Así, la concentración máxima de curcumina se determinó mediante el procedimiento descrito en Ma et al. (2017).
- Finalmente, la temperatura de preparación del oleogel también está impuesta aunque, en este caso, por el punto de fusión del agente gelificante utilizado (ver apartado 3.1.6.); éste nos determina la temperatura mínima de oleogelificación.

De acuerdo con estas premisas, los rangos de estudio elegidos para las variables independientes fueron: 3.0–7.0 % p/p para la concentración de agente gelificante, 0.05–0.15 % p/p para la concentración de curcumina y 60–80 °C para la temperatura de preparación del oleogel.

4.1.2. Efecto de las variables de operación sobre la estabilidad oxidativa

Las Tablas 10 y 11 muestran la evolución de la concentración de hidroperóxidos lipídicos (productos primarios de la oxidación) con el tiempo a dos temperaturas de almacenamiento diferentes: 23 y 40 °C.

Tabla 10. Concentración de hidroperóxidos lipídicos con el tiempo a 23 °C.

N° de experimento	[Hidroperóxidos lipídicos], mg/L						
	Día 1	Día 7	Día 15	Día 24	Día 36	Día 50	Área ₃₆
Muestra control	5548.9	2108.9	5565.3	6217.2	7531.8	8287.7	187248
1	6441.8	4727.2	5264.1	6255.5	5631.1	7131.9	187533
2	6052.8	3878.2	5466.7	4743.7	7564.7	6847.1	171764
3	6534.9	3768.6	5455.8	8835.5	4278.1	5242.1	213510
4	6162.4	3681.0	7515.4	4195.9	3001.8	7225.1	162372
5	6239.1	4206.9	5685.8	4990.2	5959.7	6458.2	170824
6	6792.3	6803.3	5417.4	6036.4	3440.0	3566.0	183982
7	6326.7	4864.2	5401.0	7153.9	5099.7	8687.6	198241
8	2612.9	6682.8	3768.6	7833.1	4365.7	1928.1	203482
9	3478.3	6496.5	4217.8	8408.2	4497.2	1906.2	222319
10	3927.5	5176.4	5450.3	8687.6	5203.8	2289.7	232107
11	1807.6	2777.2	3220.9	4869.7	5132.6	1752.9	138186
12	1626.9	2788.1	4278.1	6945.7	3746.7	1632.4	167849
13	1446.1	3308.5	3971.3	6025.5	4590.3	1785.7	157562
14	1002.4	4371.2	3171.6	4119.2	4469.8	1479.0	132044
15	1725.5	2958.0	4026.1	5603.7	2996.3	1999.4	146851

Nota: Los valores en **negrita** indican el máximo y el mínimo para cada día; la columna *Área₃₆* muestra el área encerrada bajo la curva hasta el día 36.

Tabla 11. Concentración de hidroperóxidos lipídicos con el tiempo a 40 °C.

N° de experimento	[Hidroperóxidos lipídicos], mg/L						
	Día 1	Día 7	Día 15	Día 24	Día 36	Día 50	Área ₃₆
Muestra control	6534.9	7444.2	8139.8	6885.5	6337.7	6052.8	238662
1	6485.6	5154.5	7608.5	6020.0	4886.1	3576.9	206336
2	5877.6	5176.4	6644.4	5132.6	4672.5	3993.2	181357
3	5921.4	7646.9	6808.8	5373.6	5127.1	4119.2	198586
4	5735.1	8956.0	4546.5	3166.1	3631.7	1155.8	153864
5	6217.2	6272.0	7164.8	5718.7	5373.6	4486.2	200566
6	6085.7	6315.8	5088.8	3511.2	6496.5	2234.9	167738
7	6441.8	5559.9	6085.7	3089.4	5247.6	2678.6	161537
8	3692.0	4924.4	4059.0	5685.8	3401.6	608.0	175779
9	3335.9	5138.1	3368.8	8446.6	4431.4	832.6	211926
10	2875.8	4338.3	4272.6	7679.7	4787.5	1418.7	198609
11	1084.6	3100.4	4814.9	7049.8	3160.6	903.8	175150
12	1550.2	3040.1	4398.6	6819.7	2837.4	613.5	168274
13	1550.2	4086.4	5066.9	7646.9	3719.3	1133.9	195059
14	1254.4	2245.9	4272.6	5970.7	3149.7	1155.8	162210
15	2174.6	3549.5	3807.0	7131.9	3138.7	936.7	178859

Nota: Los valores en **negrita** indican el máximo y el mínimo para cada día; la columna *Área₃₆* muestra el área encerrada bajo la curva hasta el día 36.

En un primer momento se podría pensar que la concentración de hidroperóxidos lipídicos debe aumentar continuamente con el tiempo, puesto que el aceite de pescado enriquecido con PUFAs ω -3 es altamente reactivo y sus insaturaciones reaccionan con oxígeno dando lugar a procesos oxidativos; sin embargo, los resultados obtenidos muestran aumentos y disminuciones de la concentración de hidroperóxidos con el tiempo. Estos resultados encuentran su explicación en el hecho de que la oxidación lipídica es un proceso en cadena donde, en sus primeras etapas, se producen los hidroperóxidos lipídicos como productos primarios de la oxidación para, en etapas posteriores, descomponerse y dar lugar a toda una serie de productos secundarios de la oxidación (ver apartado 1.1.3.). De acuerdo con esto, los aumentos y disminuciones en la concentración de hidroperóxidos pueden interpretarse como periodos en los que

predominan las reacciones de producción y otros en los que predominan las reacciones de descomposición de productos primarios de la oxidación, respectivamente. En cualquier caso, estos incrementos y disminuciones en el tiempo que además difieren de unos oleogeles a otros, solamente hacen posible obtener conclusiones parciales respecto a la oxidación lipídica primaria: en función del día que se considere, podemos encontrar comportamientos diferentes y oleogeles más o menos oxidados.

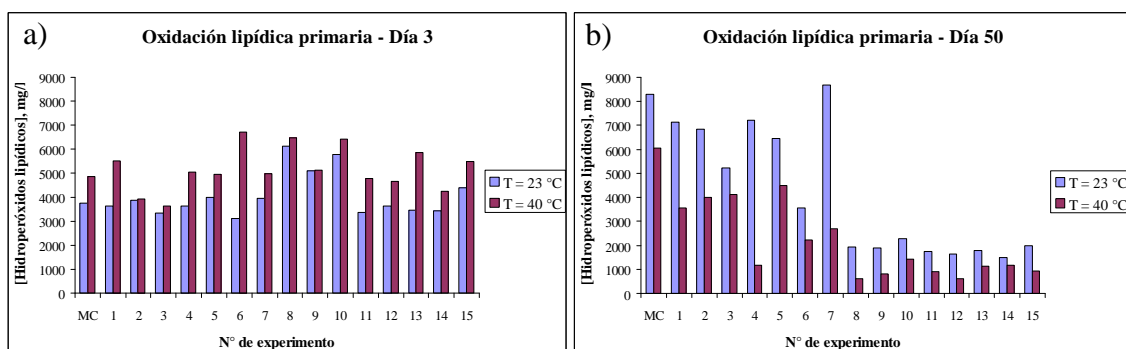
No obstante, a pesar de lo anterior, los valores recogidos en las Tablas 10 y 11 sí que permiten obtener una primera conclusión general comparando la muestra control y los oleogeles: la gelificación del aceite de pescado enriquecido con PUFAs ω -3 redujo la oxidación lipídica primaria a largo plazo en porcentajes comprendidos entre el 25.9 y el 90.0 %. Si bien es cierto que en las muestras almacenadas en condiciones ambientales (23 °C), la concentración de hidroperóxidos lipídicos del control siempre estuvo por debajo de la de alguno de los oleogeles estudiados, en las muestras sometidas a condiciones de envejecimiento aceleradas (40 °C), la concentración de hidroperóxidos del control superó a la de cualquier otro oleogel hasta en tres ocasiones (los días 1, 15 y 50 presentaron concentraciones de hidroperóxidos mayores a las del más inestable de los oleogeles en términos de oxidación en 49.3, 531.3 y 1566.6 mg/L) (Tabla 11). Estos datos sugieren que, a largo plazo, el aceite de pescado sin gelificar experimenta más oxidación lipídica primaria que gelificado y, por tanto, la oleogelificación es una estrategia adecuada para reducir la oxidación lipídica primaria hasta en un 90.0 % (Hwang et al., 2018). En este mismo sentido apuntan algunos otros trabajos recientes; por ejemplo, Pandolsook & Kupongsak (2019) demostraron que tanto los oleogeles de cera de salvado de arroz como las emulsiones agua-en-aceite gelificado preparadas a partir de estos oleogeles (ambos sistemas almacenados a 4 y 30 °C) presentaban una mayor estabilidad oxidativa que el aceite sin gelificar y la emulsión correspondiente. Sin embargo, también hay estudios que afirman justo lo contrario: que el proceso de oleogelificación aumenta el índice de peróxidos del sistema durante la fabricación y el almacenamiento (Gravelle et al., 2012; Yılmaz & Öğütçü, 2015; Park et al., 2018). Este comportamiento diferente que en algunos casos aparece puede atribuirse a varios factores: por un lado, al procedimiento y las condiciones de preparación del oleogel y, por otro, a la insuficiente concentración de agente gelificante utilizada; ambos factores han demostrado ser decisivos en la estabilidad oxidativa del sistema (Gravelle et al.,

2012; Oh et al., 2019). A pesar de ello, la comunidad científica sigue sin ponerse de acuerdo y es fácil encontrar trabajos relativamente recientes que arrojan opiniones contrapuestas (Park & Maleky, 2020).

Así pues, para intentar superar el inconveniente de la dependencia temporal de la oxidación lipídica primaria, poder comparar entre sí los distintos oleogeles y llegar a obtener conclusiones generales, fue necesario establecer un periodo de tiempo determinado sobre el que realizar el análisis. Este periodo de tiempo se estableció en un mínimo de 30 días contados a partir del día de la elaboración del sistema de liberación (por ejemplo, en los oleogeles se tomó el día 36). A partir de estos resultados se ajustaron los modelos apropiados.

En el caso de los oleogeles almacenados a 23 °C (Tabla 10), la concentración de hidroperóxidos lipídicos obtenida experimentalmente el día 36 estuvo comprendida entre los 2996.3 mg/L (oleogel 15) y los 7564.7 mg/L (oleogel 2), mientras que la concentración de productos primarios de la oxidación de los oleogeles almacenados a 40 °C para ese mismo día (Tabla 11), osciló entre los 2837.4 mg/L (oleogel 12) y los 6496.5 mg/L (oleogel 6). La Figura 52 representa comparativamente las concentraciones de productos primarios de la oxidación a 23 y 40 °C en los instantes iniciales (día 3) y final (día 50).

Figura 52. Concentración de hidroperóxidos lipídicos a 23 y 40 °C en: a) día 3 y b) día 50.



En los primeros días tras la oleogelificación del sistema de liberación, la concentración de hidroperóxidos lipídicos de los oleogeles almacenados a 40 °C fue entre 1.01 y 2.16 veces superior a la de los oleogeles almacenados a 23 °C (Figura 52a); en cambio, en periodos de tiempo más prolongados, ocurrió justo lo contrario y la

concentración de productos primarios de la oxidación de los oleogeles almacenados a 23 °C fue entre 1.27 y 6.25 veces superior a la de los oleogeles almacenados a 40 °C (Figura 52b). Queda claro, por tanto, que el comportamiento oxidativo primario de los oleogeles en condiciones ambientales y en condiciones aceleradas es totalmente diferente. Esto tiene su explicación en lo que ya se comentó anteriormente: la oxidación lipídica es un proceso en cadena donde, en sus etapas iniciales, predominan las reacciones de formación de hidroperóxidos lipídicos y, por eso, en los primeros días, la oxidación lipídica primaria a 40 °C se ve favorecida y la concentración de hidroperóxidos es superior a la de los oleogeles almacenados a 23 °C; sin embargo, en periodos de tiempo mayores, los hidroperóxidos lipídicos ya se han descompuesto y han dado lugar a toda una serie de productos secundarios de la oxidación resultando en una concentración inferior de hidroperóxidos a 40 °C.

A continuación, se presentan los modelos cuadráticos ajustados para la concentración de hidroperóxidos lipídicos a día 36 (a 23 y 40 °C) en función de las variables independientes consideradas y de sus interacciones.

$$\text{Modelo a } 23 \text{ }^{\circ}\text{C: } [\text{Hidroperóxidos lipídicos}] = 4666.99 - 611.447*[\text{Gelificante}] - 174.601*[\text{Curcumina}] + 145.159*T + 264.983*[\text{Gelificante}]^2 + 427.26*[\text{Gelificante}]*T - 1293.42*[\text{Curcumina}]^2 + 651.845*[\text{Curcumina}]*T + 1025.01*T^2 \quad \text{Ec. [23]}$$

En los oleogeles almacenados a 23 °C, el valor p del modelo ajustado (p_{MOD}) fue superior a 0.05 y la interacción $[\text{Gelificante}]*[\text{Curcumina}]$ resultó ser la variable menos estadísticamente significativa, decidiéndose su eliminación del ajuste. Así, el nuevo modelo obtenido (Ec. 23) presentó un coeficiente de determinación (R^2) del 85.38 % y un valor p de falta de ajuste (p_{LOF}) de 0.2402 (Tabla 12); al ser este número superior al nivel de significancia prefijado, se consideró que el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos experimentales obteniendo un p_{MOD} de 0.0443, inferior a 0.05, por lo que puede afirmarse que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables independientes y dependiente con un nivel de confianza del 95 %. Asimismo, la ausencia de un patrón definido en la gráfica de los residuos contra los valores ajustados o predichos (Figura 53) indica que el modelo seleccionado describe adecuadamente los datos experimentales.

Tabla 12. Análisis de la varianza (ANOVA) para la concentración de hidroperóxidos lipídicos a 23 °C.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón <i>F</i>	Valor <i>p</i> *
[Gelificante]	2.99094E6	1	2.99094E6	16.00	0.0572
[Curcumina]	243884	1	243884	1.30	0.3717
T	168569	1	168569	0.90	0.4426
[Gelificante] ²	259259	1	259259	1.39	0.3601
[Gelificante]*T	730203	1	730203	3.91	0.1868
[Curcumina] ²	6.17698E6	1	6.17698E6	33.04	0.0290
[Curcumina]*T	1.69961E6	1	1.69961E6	9.09	0.0946
T ²	3.87932E6	1	3.87932E6	20.75	0.0450
Falta de ajuste	2.53928E6	4	634821	3.40	<i>0.2402</i>
Error puro	373923	2	186961		
Total (corr.)	1.99216E7	14			

* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

Figura 53. Gráfica de residuos para la concentración de hidroperóxidos lipídicos a 23 °C.

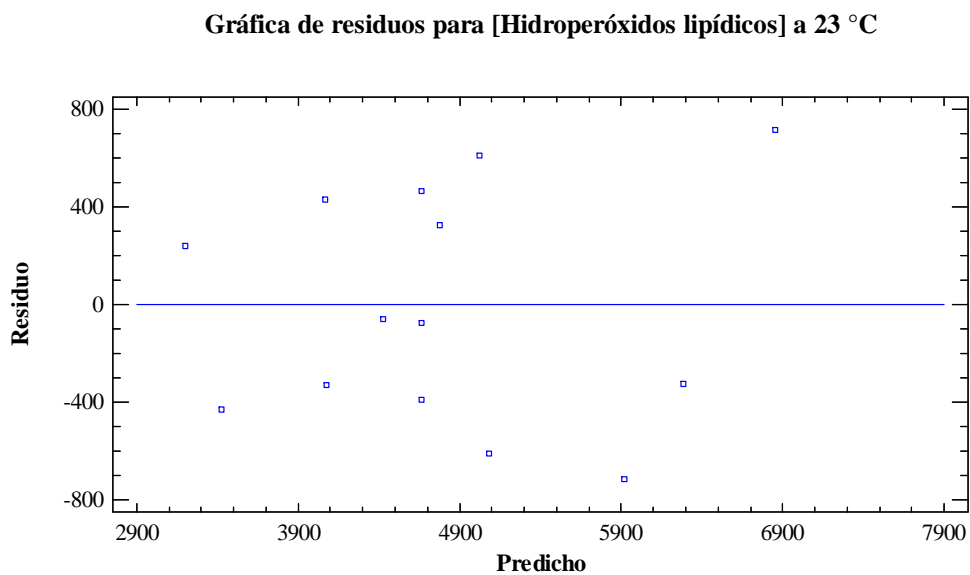
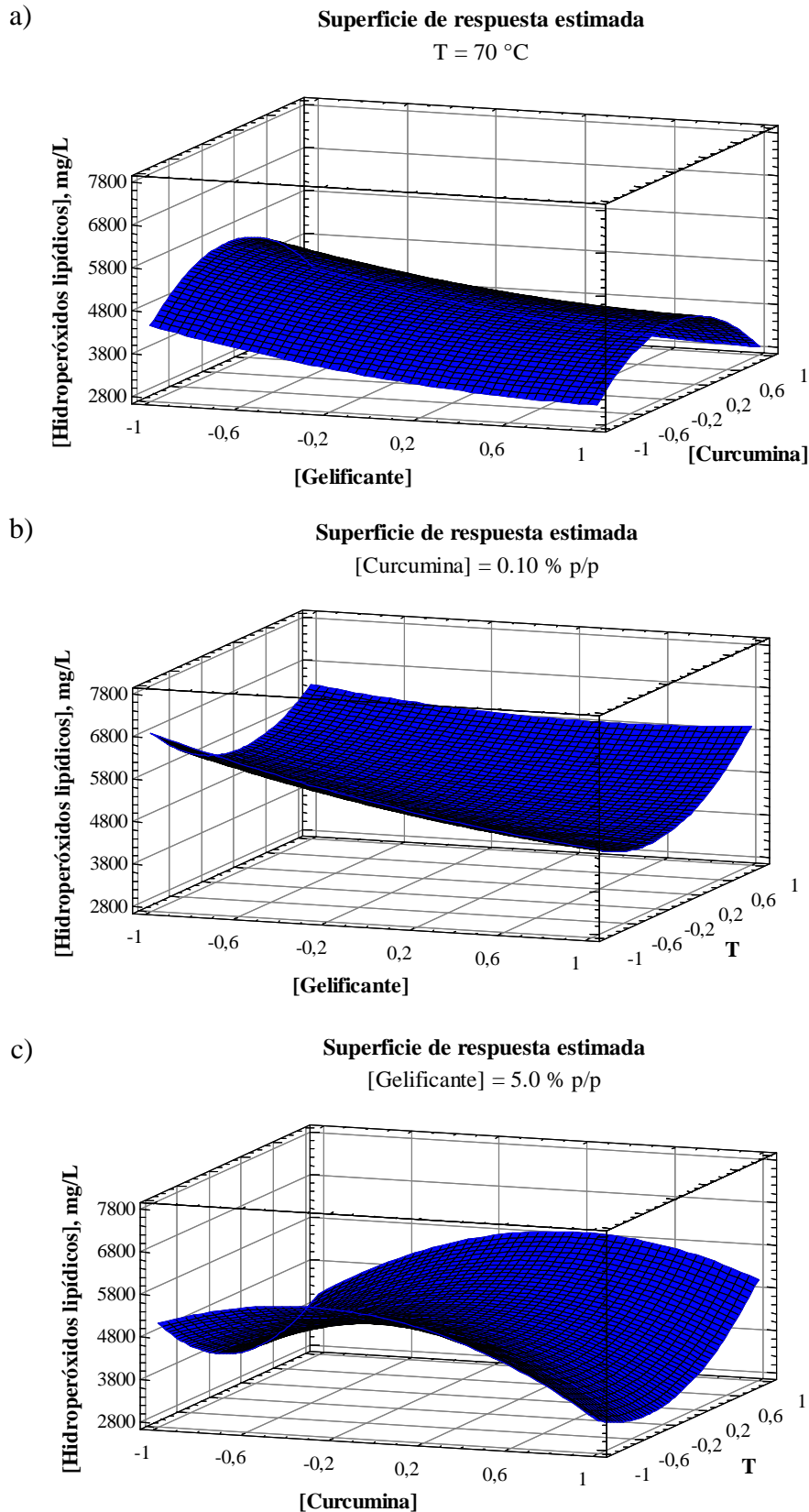


Figura 54. Superficie de respuesta estimada para la concentración de hidroperóxidos lipídicos a 23 °C.



Tras un análisis de la varianza (ANOVA) de los valores observados (Tabla 12), se encontró que tanto la concentración de curcumina como la temperatura de preparación del oleogel ejercen un efecto estadísticamente significativo en orden cuadrático sobre la oxidación primaria ($p < 0.05$), efecto que sin duda está relacionado con las propiedades antioxidantes de la curcumina y la dependencia de la velocidad de reacción con la temperatura. Esto puede verse reflejado en la Figura 54, donde se representa la superficie de respuesta estimada para las diferentes combinaciones de variables independientes. Ni la concentración de agente gelificante ni ninguna de sus interacciones con las otras variables afectaron significativamente a la variable respuesta, si bien la concentración de agente gelificante es la que estuvo más próxima de conseguirlo ($p = 0.0572$). Por tanto, aunque la oleogelificación del aceite de pescado parece una buena estrategia para reducir la oxidación lipídica primaria a largo plazo, la concentración de agente gelificante no parece ser tan decisiva como la concentración de antioxidante o las propias condiciones de preparación del oleogel.

Como ya se adelantó en la introducción, la curcumina es un antioxidante lipofílico muy potente con actividad como quelante de metales prooxidantes y como secuestrante de ROS, incluyendo radicales hidroxilo y radicales de dióxido de nitrógeno (Ak & Gülçin, 2008). Así pues, cabe esperar que a mayor concentración de curcumina en el oleogel, la oxidación lipídica primaria y la concentración de hidroperóxidos debería ser menor. Así se ha constatado, por ejemplo, en los oleogeles 8 y 12: en ambos sistemas, tanto la concentración de agente gelificante como la temperatura de operación durante la oleogelificación se mantuvieron constantes, variando únicamente la concentración de curcumina incorporada que pasó de ser un 0.05 % p/p en el primero a un 0.15 % p/p en el segundo. Cuando se triplicó la cantidad de curcumina, la concentración de hidroperóxidos del oleogel 12 fue un 14.2 % menor que en el oleogel 8 (Tabla 10). En este sentido apunta también el trabajo de Li et al. (2019) en el que estudian la estabilidad oxidativa de oleogeles de β -sitosterol y lecitina cargados con curcumina. En él, los autores concluyen que los oleogeles con curcumina presentaron una mayor estabilidad oxidativa que sin ella y, por tanto, le atribuyen una cierta capacidad protectora frente a la oxidación.

Por otra parte, también es ampliamente conocido que la velocidad de las reacciones químicas aumenta con la temperatura. En general, al aumentar la temperatura

unos 10 K, la velocidad de reacción varía en un factor comprendido entre 1.5 y 5. Por tanto, parece evidente pensar que cuanto mayor sea la temperatura de preparación del oleogel, más rápida será la oxidación primaria de éste. Además, el tiempo necesario para alcanzar esa temperatura y, por consiguiente, el tiempo que el oleogel está expuesto a temperaturas elevadas, también sería mayor. Este efecto queda patente en los oleogeles 1 y 15 donde, aumentando la temperatura de 60 a 80 °C, la concentración de hidroperóxidos lipídicos prácticamente se duplicó (pasó de 2996.3 a 5631.1 mg/L). Algo parecido se observa (aunque no de forma tan relevante) en los oleogeles 7 y 10 ó 9 y 14. Y es que, en efecto, las altas temperaturas y la agitación constante que se necesita para preparar los oleogeles proporcionan las condiciones necesarias para acelerar los procesos de autooxidación (Gravelle et al., 2012).

La temperatura de oleogelificación también puede afectar a la oxidación primaria al influir sobre el potencial antioxidante de la curcumina. Y es que, en efecto, son ya varios los estudios que han reportado que la capacidad antioxidante de la curcumina disminuye cuando aumenta la temperatura (Onyango, 2012; Eshghi et al., 2014). Así, aunque el valor p de la interacción [*Curcumina*]* T no ha resultado ser estadísticamente significativo ($p = 0.0946$), es el siguiente factor en importancia justo por detrás de los ya mencionados. Una posible explicación para ello reside en el hecho de que, a medida que aumenta la temperatura, también lo hace la velocidad de difusión de los PUFAs ω -3 hacia la superficie del sistema y, por consiguiente, se favorece su exposición al oxígeno atmosférico que es el que da lugar a los procesos oxidativos. Además, la molécula de curcumina también se degrada químicamente con la temperatura, disminuyendo así su capacidad antioxidante (Huang et al., 2017).

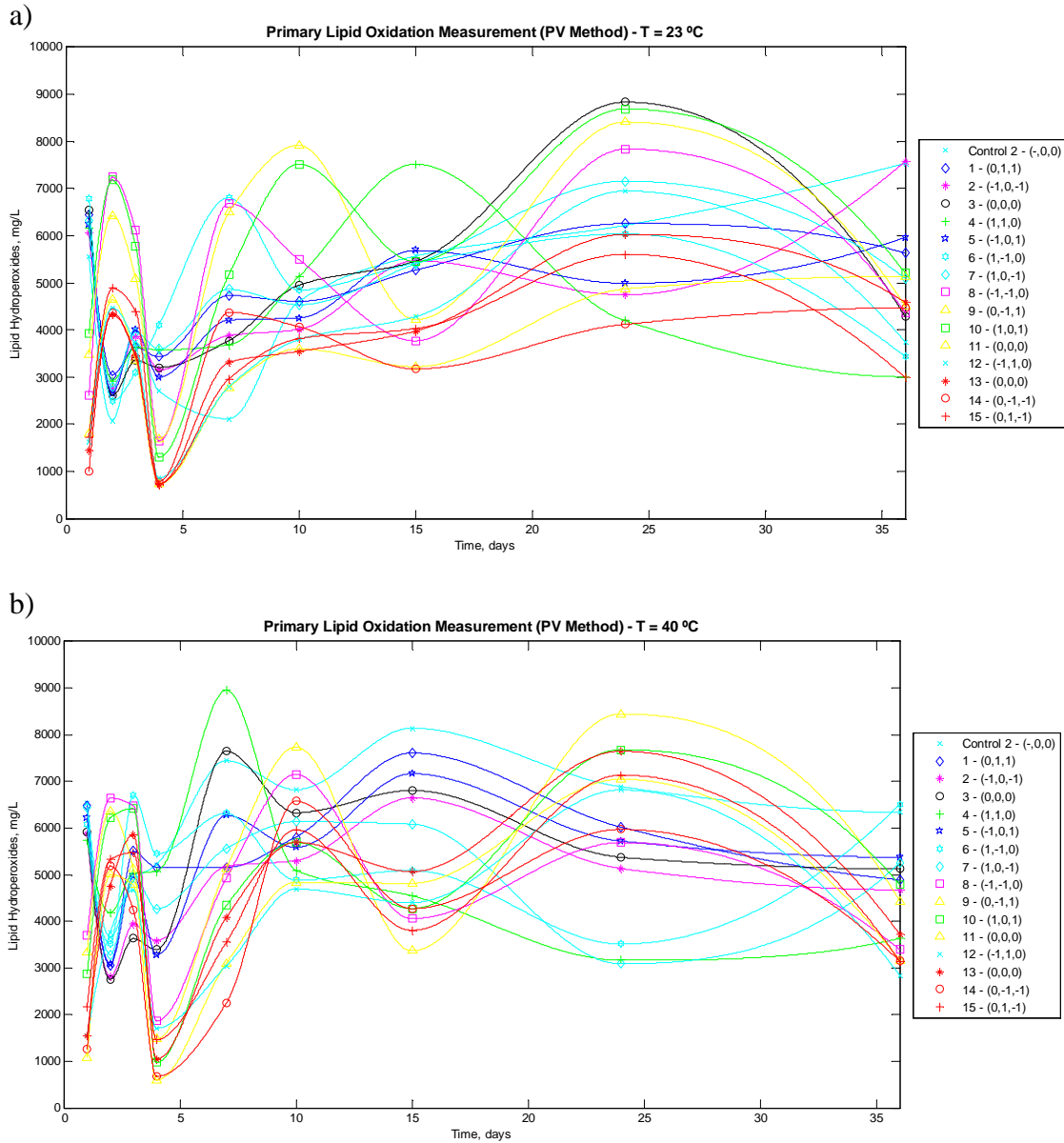
De acuerdo con las consideraciones anteriores y una vez establecida la ecuación que modela el comportamiento de la concentración de hidroperóxidos lipídicos a 23 °C con las variables independientes, se buscó y encontró el conjunto de condiciones óptimas para minimizar la oxidación primaria. En efecto, estableciendo una concentración de agente gelificante del 7.0 % p/p, una concentración de curcumina de 0.15 % p/p y una temperatura de 64 °C, se podría alcanzar una concentración de hidroperóxidos lipídicos mínima de 2487.0 mg/L.

En cuanto a la concentración de productos primarios de la oxidación de los oleogel almacenados a 40 °C, se ha alcanzado un modelo con R^2 del 57.45 % y p_{MOD} de 0.6672, por lo que no puede afirmarse que exista una correlación significativa entre las variables; sin embargo, la falta de ajuste sí que fue significativa ($p > 0.05$). El hecho de que en condiciones de envejecimiento aceleradas, los resultados experimentales no se ajusten a un modelo matemático adecuado, probablemente sea debido a que, en estos casos, la velocidad de formación y de descomposición de hidroperóxidos lipídicos con el tiempo es significativamente más elevada y, como decíamos anteriormente, estos datos no dejan de ser una “foto fija” que refleja el estado oxidativo primario del sistema en un instante de tiempo muy concreto, sin tener en cuenta el historial oxidativo previo de la muestra. Sin lugar a dudas, una alta velocidad de aparición y de desaparición de productos primarios de la oxidación puede llegar a suponer un inconveniente para la obtención de conclusiones generales respecto a la oxidación lipídica primaria puesto que puede presentarse que una muestra haya tenido concentraciones de hidroperóxidos superiores a otras en los días previos y, el día en cuestión que estamos estudiando, estos hidroperóxidos se hayan transformado en productos secundarios de la oxidación y su concentración sea menor, o viceversa; esto nos llevaría a conclusiones erróneas. Por tanto, es importante y necesario cuantificar y estimar de alguna forma la oxidación lipídica primaria total de la muestra durante todo el periodo de tiempo estudiado, y no solamente en un instante puntual y concreto.

Para ello se han utilizado las áreas encerradas bajo las curvas: a partir de los datos de concentración de hidroperóxidos lipídicos de que se disponían en los días previos, se han construido curvas suavizadas mediante polinomios cúbicos a trozos de interpolación de Hermite que más tarde fueron integrados numéricamente usando el método de los trapecios (Figura 55). Las áreas así calculadas que aparecen recogidas en las Tablas 10 y 11 con el nombre de ‘Área₃₆’ –por ser hasta ese día cuando se ha considerado para efectuar el cálculo–, representan de forma aproximada la concentración de hidroperóxidos lipídicos totales (acumulada) de la muestra recogiendo todo su historial de oxidación primaria anterior. De acuerdo con esto, se asociarán mayores valores de área con superiores tasas de oxidación primaria global del oleogel, y menores valores de área con oleogel que han sufrido una menor oxidación primaria

total. Todo este cálculo ha sido programado y ejecutado con el software *MatLab R2013b*, cuyo *script* correspondiente puede consultarse en el Anexo 1.

Figura 55. Curvas de concentración de hidroperóxidos lipídicos totales a) a 23 °C y b) a 40 °C.



Las áreas así obtenidas para los oleogeles almacenados a 23 y 40 °C confirman lo anteriormente indicado: que el proceso de oleogelificación reduce la oxidación lipídica primaria a largo plazo. Si bien es cierto que, en las muestras almacenadas a 23 °C, la concentración de hidroperóxidos lipídicos totales del control fue menor que la de muchos de los oleogeles estudiados, en las muestras sometidas a condiciones de

envejecimiento aceleradas (40 °C), la concentración de hidroperóxidos lipídicos totales del control superó a la de cualquier otro oleogel en un 12.6 % o más, llegando incluso hasta el 55.1 % (Tabla 11). Por tanto, puede afirmarse definitivamente que, de forma general, la estabilidad oxidativa primaria a largo plazo del aceite gelificado es mayor que la del correspondiente aceite sin gelificar en, al menos, un 12.6 %.

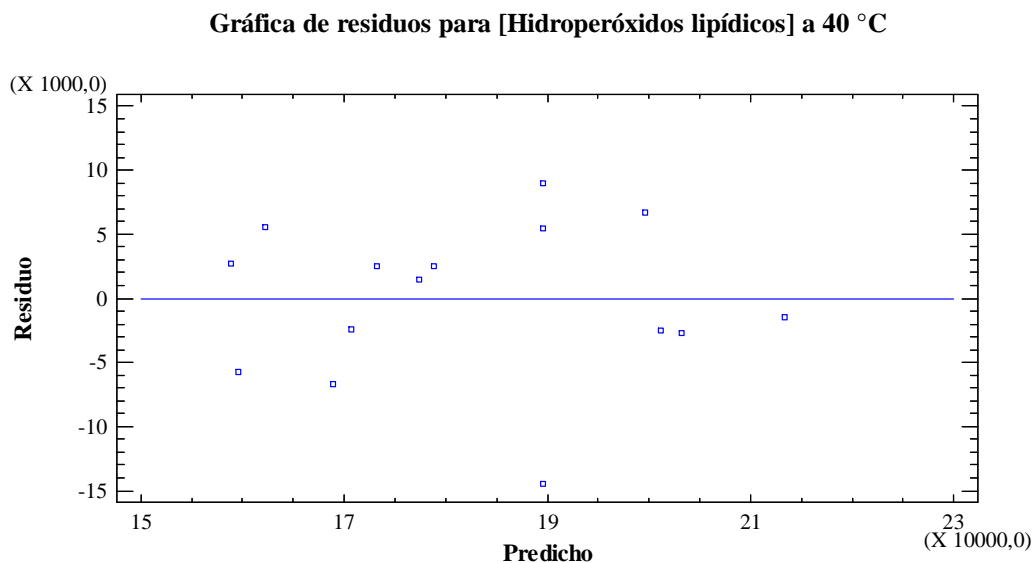
A continuación, se presentan los modelos cuadráticos ajustados para la concentración de hidroperóxidos lipídicos totales hasta el día 36 de su elaboración (a 40 °C), en función de las variables independientes consideradas y de las interacciones entre ellas.

Modelo a 40 °C: $[Hidroperóxidos\ lipídicos]_{TOTAL} = 189598 - 5528.5*[Gelificante] - 1290.0*[Curcumina] + 16684.3*T - 13750.0*[Gelificante]^2 + 4465.75*[Gelificante]*T - 9434.54*[Curcumina]^2 - 5559.75*[Curcumina]*T + 9668.96*T^2$ Ec. [24]

En este caso, al igual que sucedió a los oleogeles almacenados a 23 °C, el valor p del primer modelo obtenido considerando todas las variables independientes y sus correspondientes interacciones resultó ser superior a 0.05 y la interacción $[Gelificante]*[Curcumina]$ también aquí volvió a ser la variable menos estadísticamente significativa; por tanto, se decidió su eliminación de la ecuación. Así, el nuevo modelo matemático obtenido (Ec. 24) presentó un R^2 del 88.89 %, un poco mayor, incluso, al obtenido para los oleogeles almacenados a 23 °C (85.38 %). Por tanto, ambos modelos explican relativamente bien la variabilidad de los datos experimentales de oxidación primaria: el primero lo hace en muestras almacenadas en condiciones ambientales y de forma puntual (Ec. 23), y el segundo en muestras sometidas a condiciones de envejecimiento aceleradas –que equivalen a periodos de tiempo mucho más prolongados– y de forma global (Ec. 24). El valor p_{LOF} del modelo ajustado para la concentración de hidroperóxidos lipídicos totales a 40 °C fue de 0.8550 (Tabla 13), superior a 0.05, por lo que puede decirse que el modelo obtenido es apropiado para ajustar los datos observados con un nivel de confianza del 95 %. Además, el valor p_{MOD} fue de 0.0212, inferior a 0.05, por lo que puede afirmarse que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables independientes y dependientes con un nivel de confianza del 95 %. Estos tres parámetros, en su conjunto, permiten asegurar

que el modelo cuadrático propuesto puede ser utilizado para explicar la concentración de hidroperóxidos lipídicos totales a 40 °C en esta ventana operativa. Asimismo, la ausencia de un patrón definido en la gráfica de los residuos contra los valores ajustados o predichos (Figura 56) confirma la aseveración acerca de la idoneidad del modelo.

Figura 56. Gráfica de residuos para la concentración de hidroperóxidos lipídicos totales a 40 °C.



Realizando un análisis de la varianza (ANOVA) de los valores observados (Tabla 13), no se encontró que fuese estadísticamente significativa ninguna de las variables independientes consideradas ni sus interacciones; sin embargo, la temperatura de preparación del oleogel, con un valor p de 0.0648, fue el efecto con un mayor impacto sobre la concentración de hidroperóxidos lipídicos totales a 40 °C. Tanto es así que, si se simplificase el modelo matemático propuesto y se eliminase la concentración de curcumina, la temperatura de preparación del oleogel pasaría a ser una variable estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Y es que, como ya se ha explicado anteriormente, la variable temperatura es uno de los factores que presenta una mayor influencia sobre la velocidad de las reacciones de oxidación. En cambio, la variable [Curcumina], que en el caso de los oleogeles almacenados a 23 °C fue una de las variables estadísticamente significativas (en orden cuadrático) sobre la oxidación primaria, ahora a 40 °C es una de las variables menos influyentes. La explicación a esto probablemente resida en el hecho de que la molécula de curcumina, como ya se expuso en la introducción, es altamente sensible a multitud de factores ambientales, incluido la

temperatura. Por tanto, en los oleogeles almacenados a 40 °C, la curcumina está expuesta a temperaturas más elevadas que afectan significativamente a sus propiedades antioxidantes y, por eso, en este caso, su concentración no resulta demasiado importante. La Figura 57 representa la superficie de respuesta estimada para las diferentes combinaciones de variables independientes.

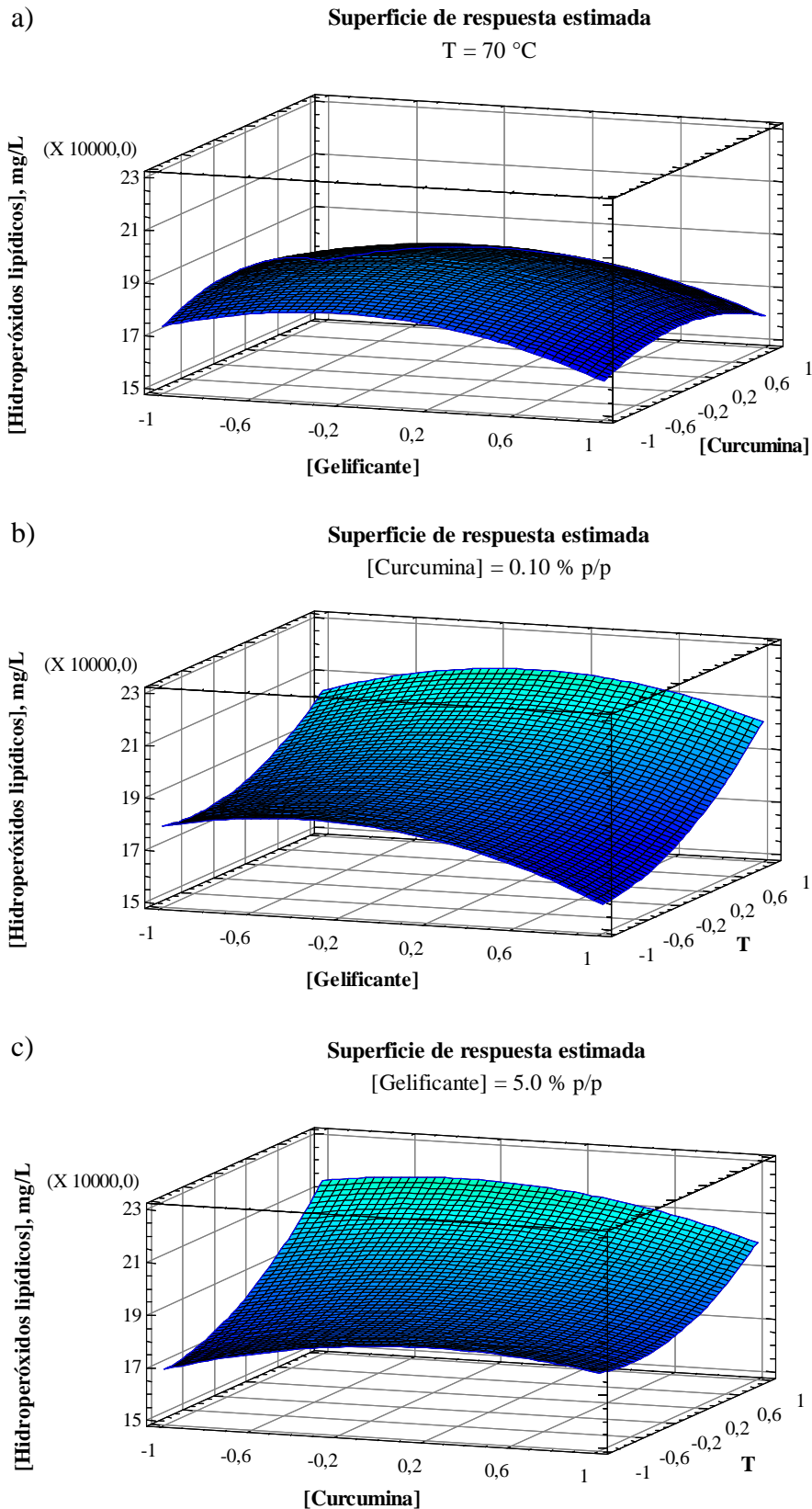
Una vez establecida la ecuación que modela el comportamiento de la concentración de hidroperóxidos lipídicos totales a 40 °C con las variables independientes, se halló el conjunto de condiciones óptimas para minimizar la oxidación lipídica primaria total. En efecto, estableciendo una concentración de agente gelificante del 7.0 % p/p, una concentración de curcumina de 0.05 % p/p y una temperatura de preparación del oleogel de 61 °C, se podría alcanzar una concentración de hidroperóxidos lipídicos totales mínima de 145924 mg/L.

Tabla 13. Análisis de la varianza (ANOVA) para la concentración de hidroperóxidos lipídicos totales a 40 °C.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor p*
[Gelificante]	2.44514E8	1	2.44514E8	1.53	0.3415
[Curcumina]	1.33128E7	1	1.33128E7	0.08	0.8000
T	2.22691E9	1	2.22691E9	13.95	0.0648
[Gelificante] ²	6.98081E8	1	6.98081E8	4.37	0.1717
[Gelificante]*T	7.97717E7	1	7.97717E7	0.50	0.5529
[Curcumina] ²	3.28654E8	1	3.28654E8	2.06	0.2878
[Curcumina]*T	1.23643E8	1	1.23643E8	0.77	0.4717
T ²	3.45189E8	1	3.45189E8	2.16	0.2793
Falta de ajuste	1.9639E8	4	4.90974E7	0.31	<i>0.8550</i>
Error puro	3.19351E8	2	1.59676E8		
Total (corr.)	4.64144E9	14			

* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

Figura 57. Superficie de respuesta estimada para la concentración de hidroperóxidos lipídicos totales a 40 °C.



Una vez analizada la oxidación primaria y los factores que más le afectan, las Tablas 14 y 15 muestran la evolución de la concentración de compuestos aldehídicos (productos secundarios de la oxidación) con el tiempo a dos temperaturas de almacenamiento diferentes: 23 y 40 °C.

Tabla 14. Concentración de compuestos aldehídicos con el tiempo a 23 °C.

N° de experimento	[Compuestos aldehídicos], mg/L						
	Día 1	Día 7	Día 15	Día 24	Día 36	Día 50	Área ₃₆
Muestra control	317.6	324.6	358.5	358.5	460.2	515.8	12547
1	357.7	363.1	416.3	355.4	528.1	587.4	13555
2	305.3	299.1	340.0	360.0	468.0	507.3	12295
3	316.1	327.6	359.3	362.3	457.9	500.3	12513
4	353.1	351.5	370.8	340.8	437.1	689.2	12509
5	350.8	353.1	375.4	407.8	491.1	546.6	13752
6	253.6	244.4	318.4	317.6	464.9	474.9	11013
7	288.3	302.2	313.0	368.5	408.6	555.8	12322
8	277.5	360.8	367.7	404.7	481.1	552.0	13556
9	279.1	394.7	368.5	511.9	589.8	804.1	15597
10	373.1	459.5	404.7	520.4	602.9	711.6	16993
11	345.4	398.6	374.7	437.9	502.6	538.9	14548
12	373.9	431.0	426.3	479.5	521.1	568.2	15841
13	346.9	461.8	393.9	499.6	496.5	584.4	15655
14	251.3	296.0	276.0	300.7	464.9	546.6	10834
15	329.2	386.2	373.1	424.0	527.3	636.8	14534

Nota: Los valores en **negrita** indican el máximo y el mínimo para cada día; la columna *Área₃₆* muestra el área encerrada bajo la curva hasta el día 36.

Tabla 15. Concentración de compuestos aldehídicos con el tiempo a 40 °C.

N° de experimento	[Compuestos aldehídicos], mg/L						
	Día 1	Día 7	Día 15	Día 24	Día 36	Día 50	Área ₃₆
Muestra control	330.0	399.3	488.0	588.2	683.0	799.5	18164
1	398.6	472.6	599.8	713.9	846.5	959.8	22070
2	315.3	355.4	468.0	597.5	723.9	819.5	17960
3	330.0	410.1	480.3	601.3	739.3	818.7	18635
4	389.3	387.0	340.0	366.2	488.0	541.2	13089
5	367.0	399.3	488.8	592.8	736.2	833.4	18502
6	253.6	267.5	279.8	316.9	418.6	529.6	10918
7	403.2	371.6	316.9	356.9	476.4	539.7	12523
8	302.2	410.9	488.0	599.8	661.5	740.9	18170
9	383.2	545.8	530.4	740.9	898.1	929.0	21932
10	386.2	481.1	505.7	717.7	1032.3	1026.9	22692
11	336.9	449.5	512.7	678.4	749.3	808.7	20143
12	412.4	493.4	539.7	660.7	750.9	832.6	20617
13	336.9	443.3	592.8	703.1	796.4	925.9	21460
14	249.8	363.9	470.3	589.0	686.9	795.6	17903
15	363.9	462.6	555.8	706.2	761.7	866.5	21350

Nota: Los valores en **negrita** indican el máximo y el mínimo para cada día; la columna *Área₃₆* muestra el área encerrada bajo la curva hasta el día 36.

A diferencia de lo que ocurría con las concentraciones de productos primarios de la oxidación –que aumentaban y disminuían continuamente con el tiempo–, la concentración de compuestos aldehídicos sí que presenta una tendencia creciente mucho más clara y estable: son pocas las ocasiones en las que la concentración de productos secundarios de la oxidación disminuye ligeramente para volver a aumentar inmediatamente después. Estas pequeñas disminuciones puntuales se producen como consecuencia de la transformación de los compuestos aldehídicos en compuestos orgánicos volátiles, cuando esta transformación transcurre más rápidamente que la velocidad con que los hidroperóxidos lipídicos se descomponen para formar los productos secundarios de la oxidación (ver apartado 1.1.3.). Por tanto, al igual que sucedía con la oxidación primaria, la dependencia temporal de la oxidación secundaria

hace que, dependiendo del tiempo considerado para efectuar el análisis, se puedan encontrar comportamientos distintos y sistemas más o menos oxidados. Así pues, de cara al análisis de la oxidación lipídica secundaria y de los factores que más le influyen, se ha mantenido el criterio temporal que se estableció para el estudio de la oxidación primaria en los oleogeles (día 36) y se han calculado las concentraciones de compuestos aldehídicos totales o acumulados en las muestras recogiendo todo su historial de oxidación secundaria anterior a ese día (para lo cual se siguió el procedimiento explicado anteriormente y se usó el *script* del Anexo 1).

Figura 58. Curvas de concentración de compuestos aldehídicos totales a) a 23 °C y b) a 40 °C.

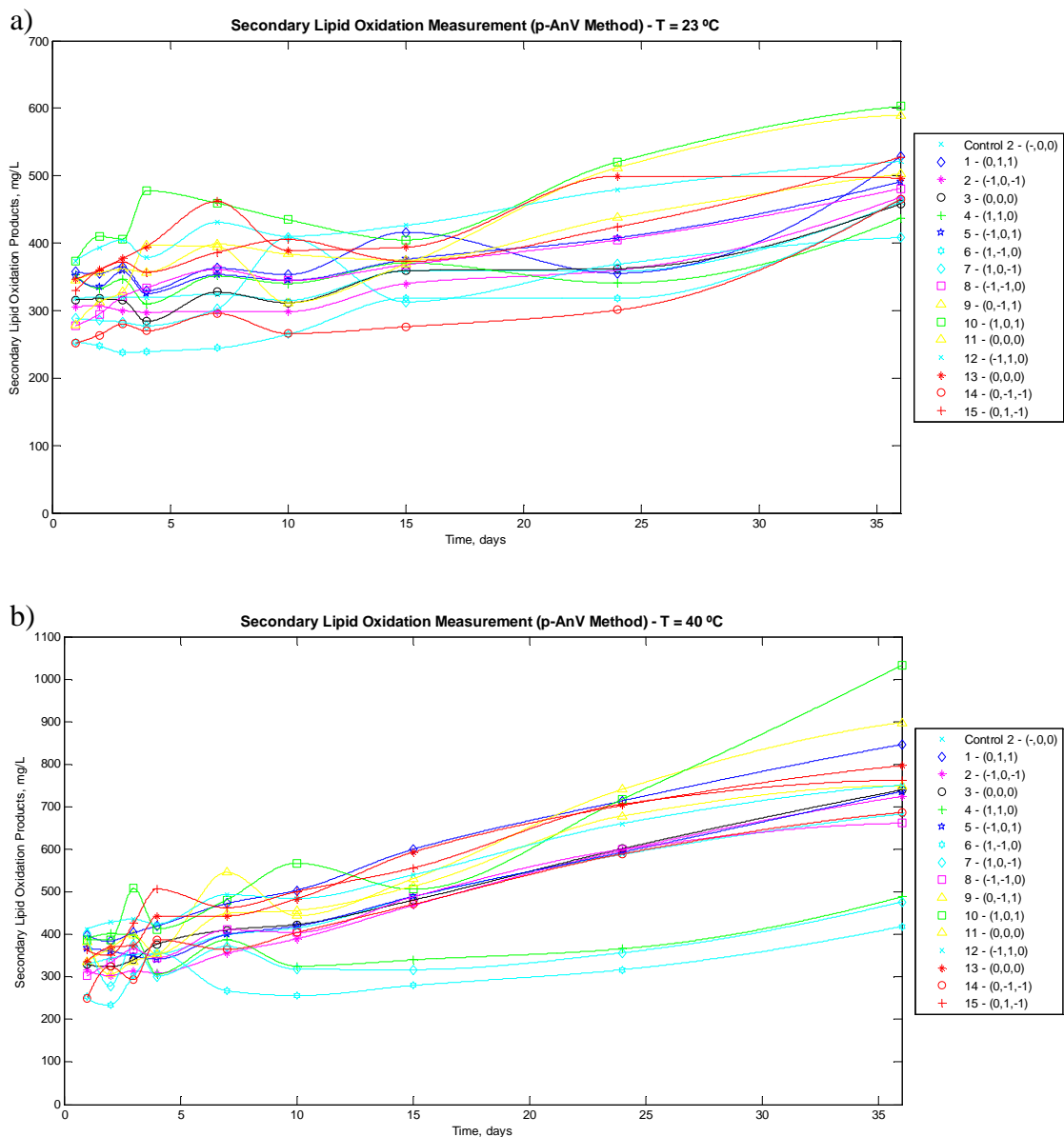
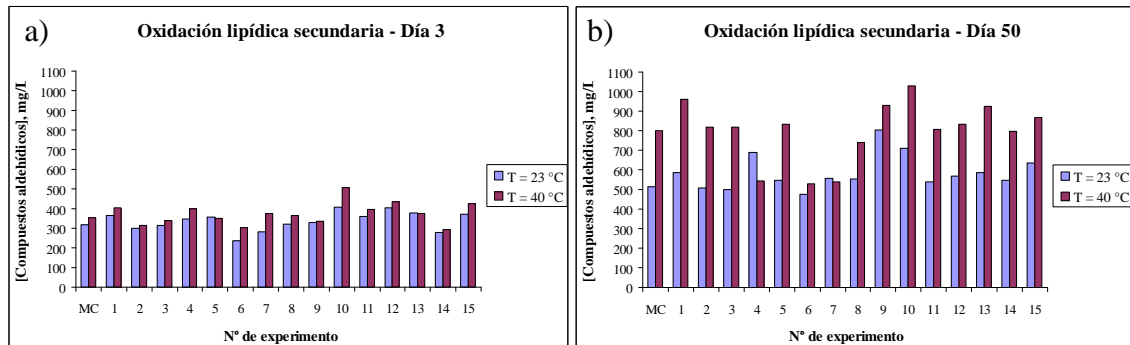


Figura 59. Concentración de compuestos aldehídicos a 23 y 40 °C en dos momentos diferentes del estudio: a) día 3 y b) día 50.



La Figura 59 muestra la concentración de compuestos aldehídicos de los oleogel almacenados a 23 y 40 °C en un instante de tiempo relativamente próximo a su elaboración (Figura 59a) y a largo plazo (Figura 59b). En vista de estos gráficos, cabe destacar una primera diferencia con respecto a la concentración de hidroperóxidos lipídicos en la oxidación primaria: si bien en aquel caso aparecían comportamientos diferentes a corto y a largo plazo entre los oleogel almacenados a 23 y 40 °C, en la oxidación lipídica secundaria se observa un mismo comportamiento en la concentración de compuestos aldehídicos de estos sistemas, independientemente del tiempo transcurrido desde su elaboración. Y es que, en efecto, la concentración de productos secundarios de la oxidación de las muestras a 40 °C fue siempre mayor que en las muestras a 23 °C, tanto a corto como a largo plazo, aunque a corto plazo estas diferencias fueron mucho menores que a largo plazo, donde se alcanzaron ratios de hasta 1.64 veces más (oleogel 3). Este hecho sugiere que el grado de oxidación secundaria de las muestras almacenadas en condiciones de envejecimiento aceleradas (40 °C) es mayor que el de las muestras almacenadas en condiciones ambientales (23 °C) y, en consecuencia, hay un mayor número de hidroperóxidos lipídicos que se han descompuesto y se han transformado en productos secundarios de la oxidación.

Otra de las diferencias que pueden extraerse de la comparación de las Tablas 10 y 11 con las Tablas 14 y 15 está relacionada con la estabilidad oxidativa del aceite gelificado frente al aceite sin gelificar. Si bien en la oxidación lipídica primaria los oleogel habían demostrado un mejor comportamiento oxidativo primario a largo plazo que el aceite de pescado sin gelificar, ahora en la oxidación lipídica secundaria no sucede lo mismo y hay oleogel con un mejor comportamiento oxidativo y oleogel

con concentraciones de compuestos aldehídicos totales por encima del correspondiente aceite sin gelificar. Y es que la oxidación lipídica primaria está más relacionada con la presencia o ausencia de oxígeno, y la oxidación lipídica secundaria con la temperatura. En efecto, durante la oxidación lipídica primaria, los PUFAs ω -3 reaccionan con el oxígeno del aire y dan lugar a los hidroperóxidos lipídicos; por eso, el proceso de oleogelificación que limita la movilidad y difusión de los PUFAs ω -3 y el oxígeno, aumentó la estabilidad oxidativa del sistema. En cambio, durante la oxidación lipídica secundaria, los hidroperóxidos lipídicos que se han formado previamente y que son tan inestables, se descomponen y dan lugar a los productos secundarios de la oxidación; así pues, la oxidación secundaria, a diferencia de la primaria, no implica la reacción con otra especie química sino que se trata de una reacción de descomposición por acción del calor, la luz, etc. y, por consiguiente, la limitación de la movilidad y de los fenómenos de difusión no ejercen ningún tipo de efecto sobre la oxidación secundaria mientras que sí lo hace el tiempo de exposición a temperaturas elevadas. La oleogelificación implica intrínsecamente tiempos de exposición al calor más prolongados que los necesarios para el calentamiento del aceite correspondiente hasta la misma temperatura, puesto que parte del calor suministrado debe invertirse en fundir el agente gelificante utilizado. Este tiempo 'extra' que el sistema está expuesto a altas temperaturas es el que favorece la oxidación lipídica secundaria y el que explica el mal comportamiento oxidativo secundario a largo plazo de los oleogeles frente al aceite de pescado sin gelificar. Así, por ejemplo, Martins et al. (2017) informaron de la formación de cantidades de compuestos aldehídicos significativamente mayores en oleogeles de cera de abejas almacenados durante 20 días. Las salchichas tipo Frankfurt elaboradas con oleogeles de cera de salvado de arroz al 10 % también produjeron cantidades de compuestos aldehídicos significativamente mayores en comparación con las elaboradas a partir de grasa de cerdo (Wolfer et al., 2018). Por tanto, todos estos resultados sugieren que, respecto a la oxidación lipídica secundaria, el proceso de oleogelificación no siempre supone una buena estrategia para reducir la concentración de productos secundarios de la oxidación a largo plazo.

Una vez hecho todo este análisis a nivel general, se prestó atención ahora en la obtención de conclusiones a partir de los valores de oxidación lipídica secundaria obtenidos el día 36 del estudio. En los oleogeles almacenados a temperatura ambiente

(Tabla 14), la concentración de compuestos aldehídicos obtenida experimentalmente estuvo comprendida entre los 408.6 mg/L del oleogel 7 y los 602.9 mg/L del oleogel 10, mientras que la concentración de productos secundarios de la oxidación de los oleogeles en condiciones de almacenamiento aceleradas (Tabla 15) osciló entre los 418.6 mg/L del oleogel 6 y los 1032.3 mg/L del oleogel 10. A diferencia de la oxidación primaria, en la oxidación lipídica secundaria sí que se observa una correspondencia mucho más clara y manifiesta entre las concentraciones de productos secundarios de la oxidación de los oleogeles almacenados a 23 y 40 °C: en general, aquellos oleogeles que a 23 °C presentaron concentraciones de compuestos aldehídicos más bajas, también lo hicieron a 40 °C, y viceversa.

Continuando con el análisis de la oxidación lipídica secundaria el día 36 de su elaboración, llama la atención el caso de los oleogeles 7 y 10. Ambos sistemas de liberación tienen exactamente la misma composición: un 7.0 % p/p de agente gelificante y un 0.10 % p/p de curcumina; la única diferencia entre ellos radica en su temperatura de preparación (el oleogel 7 se preparó a 60 °C y el oleogel 10 a 80 °C). Como consecuencia del aumento de la temperatura de preparación del oleogel en 20 °C, el oleogel 7 fue el que presentó una mayor estabilidad oxidativa secundaria a 23 °C y el oleogel 10 el que la presentó menor (Tabla 14). En los oleogeles almacenados a 40 °C, la diferencia fue todavía más abultada: la concentración de compuestos aldehídicos del oleogel 10 fue de más del doble (2.2 veces) la del oleogel 7 (Tabla 15). En los oleogeles 2 y 5 se puede observar esta misma tendencia: al mantener constantes el resto de variables, un aumento de 20 °C en la temperatura de preparación produjo un incremento en la concentración de compuestos aldehídicos aunque, en este caso, de forma bastante menos acentuada (un 4.9 % a 23 °C y un 1.7 % a 40 °C). Por tanto, se vuelve a poner de manifiesto la enorme importancia de la temperatura de preparación del oleogel sobre la oxidación lipídica, en este caso, secundaria; sin embargo, esa influencia no se visualiza de forma tan clara en el resto de variables independientes, como se ve a continuación.

La comparación de los experimentos 5 y 10 permite discutir el impacto de la concentración de agente gelificante sobre la oxidación lipídica secundaria. Y es que, en efecto, ambos sistemas oleogelificados se prepararon utilizando la misma concentración de curcumina (0.10 % p/p) y temperatura de preparación del oleogel (80 °C), diferenciándose únicamente en la cantidad de agente gelificante empleada (un 3.0 % p/p

en el oleogel 5 y un 7.0 % p/p en el oleogel 10). Según los resultados obtenidos, un aumento del 4.0 % p/p en la concentración de agente gelificante condujo a un incremento en la concentración de compuestos aldehídicos del 22.8 % en el caso de los oleogeles almacenados en condiciones ambientales, y del 40.2 % en los oleogeles almacenados en condiciones de envejecimiento aceleradas. Sin embargo, comparando ahora los oleogeles 2 y 7 en los que, al igual que antes, sólo se modifica la concentración de agente gelificante y se mantienen constantes el resto de variables (0.10 % p/p de curcumina y 60 °C), se observa una disminución en la concentración de productos secundarios de la oxidación del 12.7 y 34.2 %, a 23 y 40 °C respectivamente. Ambos comportamientos diametralmente opuestos manifiestan la dificultad para la obtención de conclusiones generales sobre cómo afectan las diferentes variables independientes y sus interacciones sobre la variable respuesta, haciendo prácticamente imprescindible un tratamiento estadístico que permita determinar con claridad qué factores y en qué medida fueron estadísticamente significativos.

A continuación, se presentan los modelos cuadráticos ajustados y los resultados obtenidos para la concentración de compuestos aldehídicos el día 36 desde su elaboración (a 23 y 40 °C) en función de las variables independientes consideradas y de sus interacciones.

En el caso de los oleogeles que se almacenaron a 23 °C, el p_{MOD} obtenido fue de 0.0867 que, al ser superior a 0.05, no permite afirmar que exista una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95 %. De entre las variables independientes y sus interacciones, la concentración de curcumina es la que presentó un valor p más elevado ($p = 0.8660$), superior a 0.05, por lo que puede decirse que la variable concentración de curcumina no es una variable estadísticamente significativa sobre la concentración de compuestos aldehídicos de las muestras almacenadas a 23 °C y, por consiguiente, puede ser eliminada del modelo. He aquí, por tanto, una de las diferencias más importantes entre la oxidación lipídica primaria y secundaria de los oleogeles almacenados a 23 °C: si bien en el caso de la oxidación primaria, la concentración de curcumina fue una de las variables que ejerció un efecto estadísticamente más significativo (en orden cuadrático) sobre la concentración de

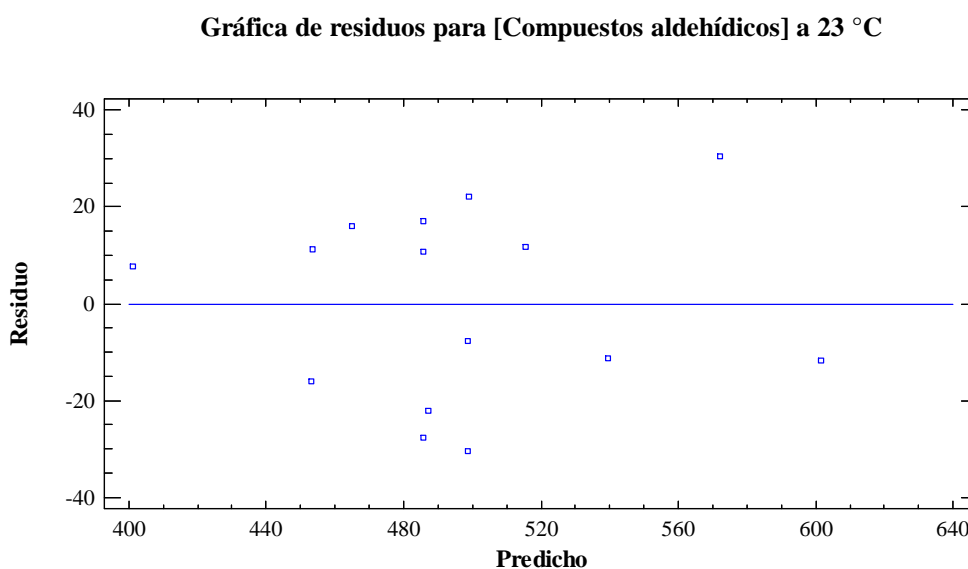
hidroperóxidos lipídicos el día 36, ahora en la oxidación secundaria no ha resultado ser una variable estadísticamente influyente. En efecto, son bastantes los trabajos que han estudiado las propiedades antioxidantes de la curcumina y, en particular, su capacidad para inhibir los procesos de peroxidación lipídica (oxidación primaria) en sistemas *in vitro* y en modelos animales (Reddy & Lokesh, 1994; Bhullar et al., 2013; Fang et al., 2013; Alisi et al., 2018); sin embargo, no se han encontrado estudios que evalúen, de forma específica, su capacidad antioxidante sobre la oxidación lipídica secundaria. De acuerdo con Ak & Gülçin (2008), las propiedades antioxidantes de la curcumina provienen de su capacidad como quelante de metales prooxidantes y como secuestrante de radicales libres y ROS, llegando incluso a proponer los mecanismos moleculares que explicarían estas propiedades. Sin embargo, ya se ha dicho anteriormente que la oxidación secundaria, a diferencia de la primaria, es un proceso que no implica la reacción con otras especies químicas, sino que consiste en la descomposición por acción del calor, la luz, etc. de los productos primarios de la oxidación y, por consiguiente, la actividad antioxidante de la curcumina no ejercería ningún tipo de efecto sobre la oxidación lipídica secundaria. Por esta razón, la concentración de curcumina es una variable estadísticamente significativa sobre la oxidación lipídica primaria pero, sobre la oxidación secundaria, no lo es.

$$\begin{aligned} \text{Modelo a } 23 \text{ }^\circ\text{C: } [\text{Compuestos aldehídicos}] = & 485.686 - 5.97475*[\text{Gelificante}] + \\ & 42.8831*T - 22.2607*[\text{Gelificante}]^2 - 16.9603*[\text{Gelificante}]*[\text{Curcumina}] + \\ & 42.7868*[\text{Gelificante}]*T + 12.6241*[\text{Curcumina}]^2 - 31.03*[\text{Curcumina}]*T + \\ & 29.1991*T^2 \end{aligned} \quad \text{Ec. [25]}$$

La ecuación que se presenta como Ec. 25 es el modelo matemático ajustado que resulta de la eliminación de la variable *[Curcumina]* al no ser ésta una variable estadísticamente significativa. Dicho modelo es capaz de explicar de manera aceptable el 86.53 % de la variabilidad en la concentración de compuestos aldehídicos de los oleogel almacenados a 23 °C sin presentar falta de ajuste ($p_{LOF} > 0.05$) (Tabla 16). Por tanto, puede afirmarse que el modelo aquí propuesto describe adecuadamente los datos experimentales. Además, el p_{MOD} fue ahora de 0.0356, inferior a 0.05, por lo que puede asegurarse que existe una relación significativa entre las variables independientes y

dependiente. Asimismo, la ausencia de un patrón definido en la gráfica de los residuos contra los valores ajustados o predichos (Figura 60) también indica una buena adecuación del modelo a los datos experimentales.

Figura 60. Gráfica de residuos para la concentración de compuestos aldehídicos a 23 °C.



El análisis de la varianza de los valores observados (Tabla 16) reveló que la única variable que ejercía un efecto estadísticamente significativo sobre la concentración de compuestos aldehídicos de los oleogel almacenados a 23 °C era la temperatura de preparación del oleogel: un aumento en esta temperatura produciría un incremento de la oxidación lipídica secundaria. A lo largo de este apartado, ya se ha discutido ampliamente el efecto de la temperatura sobre la velocidad de las reacciones de oxidación, por lo que este efecto ha quedado ya explicado con anterioridad. Simplemente destacar aquí que también se ha observado el mismo efecto de la temperatura sobre la oxidación secundaria (Eshghi et al., 2014), lo cual queda patente en el trabajo de Asnaashari et al., (2017) en el que estudian los cambios de color y la influencia de la luz y la temperatura sobre la oxidación lipídica de un aceite de maíz enriquecido con curcumina. En efecto, los autores encontraron concentraciones de compuestos aldehídicos mayores cuanto mayor era la temperatura. Por otra parte, ni la concentración de agente gelificante ni la concentración de curcumina ejercieron efectos significativos en sus términos lineales ni de interacción sobre la concentración de productos secundarios de la oxidación.

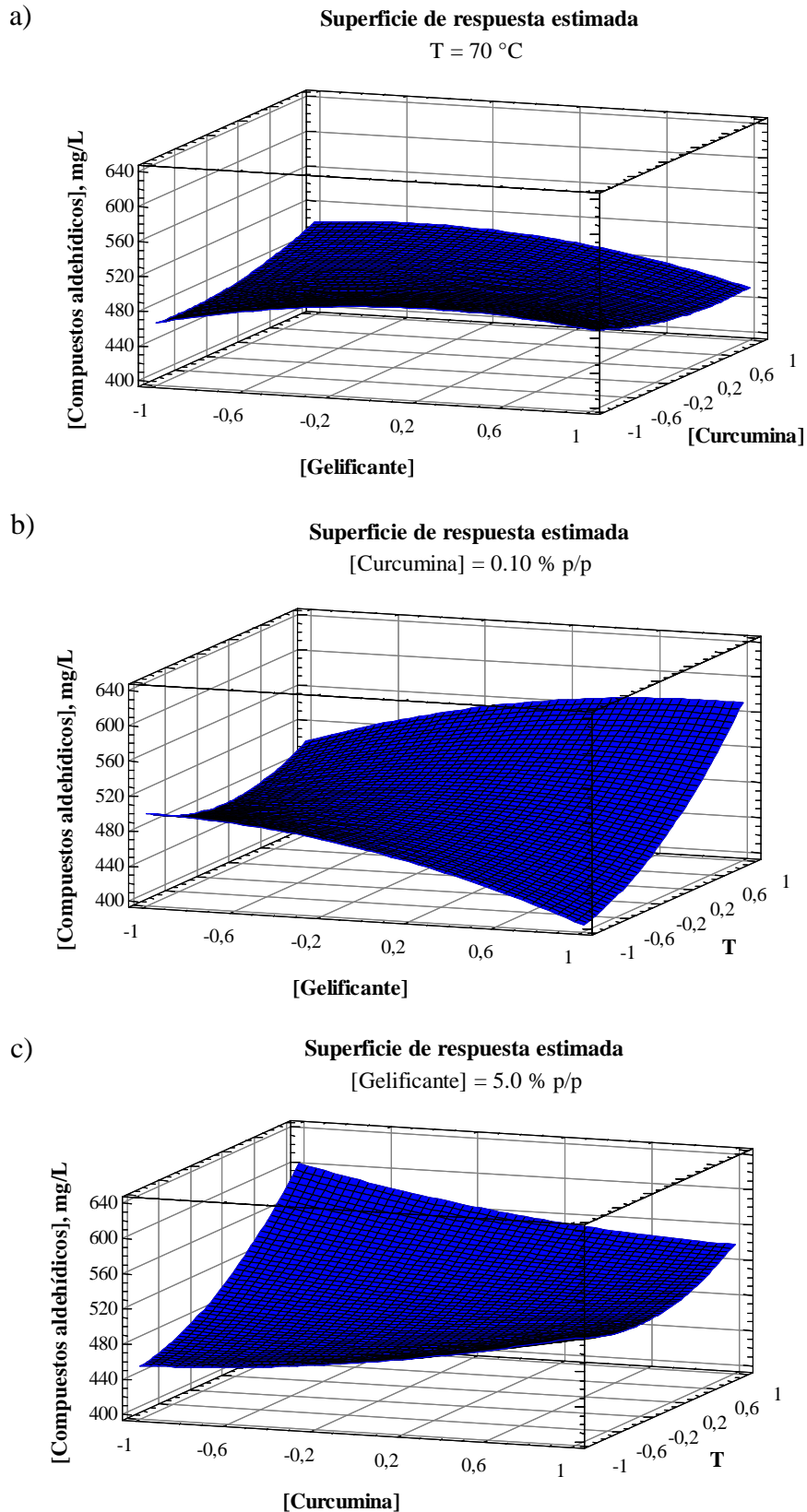
Tabla 16. Análisis de la varianza (ANOVA) para la concentración de compuestos aldehídicos a 23 °C.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor p*
[Gelificante]	285.581	1	285.581	0.49	0.5577
T	14711.7	1	14711.7	25.05	0.0377
[Gelificante] ²	1829.68	1	1829.68	3.12	0.2196
[Gelificante]*[Curcumina]	1150.6	1	1150.6	1.96	0.2965
[Gelificante]*T	7322.82	1	7322.82	12.47	0.0717
[Curcumina] ²	588.434	1	588.434	1.00	0.4222
[Curcumina]*T	3851.44	1	3851.44	6.56	0.1246
T ²	3148.01	1	3148.01	5.36	0.1466
Falta de ajuste	4002.76	4	1000.69	1.70	<i>0.4022</i>
Error puro	1174.39	2	587.197		
Total (corr.)	38427.2	14			

* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

La Figura 61 representa la superficie de respuesta estimada para las diferentes combinaciones de variables independientes, incluyendo la concentración de curcumina. En vista de las figuras, se aprecia claramente que la temperatura de preparación del oleogel es la variable que ocasiona un cambio más pronunciado sobre la superficie de respuesta. Finalmente, el procedimiento de optimización arroja una estimación para la concentración de compuestos aldehídicos mínima de 397.1 mg/L, con un nivel de confianza del 95 %, siempre y cuando la concentración de agente gelificante se mantenga en su nivel más alto (7.0 % p/p), la temperatura de preparación del oleogel asuma su nivel más bajo (60 °C) y la concentración de curcumina tome un valor de 0.07 % p/p. Si se compara este óptimo con aquel obtenido para minimizar la concentración de hidroperóxidos lipídicos, en ambos casos interesa una alta concentración de agente gelificante; sin embargo, la temperatura de preparación del oleogel y, sobre todo, la concentración de curcumina, deben seleccionarse cuidadosamente en función de la variable respuesta que más interese minimizar en cada caso o, en su defecto, realizar una optimización simultánea de ambas variables respuesta.

Figura 61. Superficie de respuesta estimada para la concentración de compuestos aldehídicos a 23 °C.



Con respecto a los oleogeles que se almacenaron a 40 °C, el valor p del modelo ajustado también fue superior a 0.05 ($p_{MOD} = 0.0985$), por lo que no se puede afirmar que exista una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95 %. De entre las variables independientes y sus correspondientes interacciones, al igual que lo que sucedió en el caso de la oxidación lipídica primaria de los oleogeles a 23 y 40 °C, la variable interacción [*Gelificante*]*[*Curcumina*] es la que presentó un valor p más elevado ($p = 0.7734$), superior a 0.05, por lo que puede decirse que no es una variable estadísticamente significativa sobre la concentración de compuestos aldehídicos de las muestras almacenadas a 40 °C y, por consiguiente, se puede eliminar del ajuste. Tras ello, el modelo ajustado resultante es el que se muestra a continuación como Ec. 26.

$$\begin{aligned} \text{Modelo a } 40 \text{ }^\circ\text{C: } [\text{Compuestos aldehídicos}] = & 761.68 - 57.1455*[\text{Gelificante}] + \\ & 22.7426*[\text{Curcumina}] + 108.027*T - 119.012*[\text{Gelificante}]^2 + \\ & 135.877*[\text{Gelificante}]*T - 62.9272*[\text{Curcumina}]^2 - 31.6083*[\text{Curcumina}]*T + \\ & 99.5463*T^2 \end{aligned} \quad \text{Ec. [26]}$$

El nuevo modelo matemático obtenido presenta un coeficiente de determinación del 85.72 %, es decir, permite explicar de manera aceptable el 85.72 % de la variabilidad en la concentración de compuestos aldehídicos de los oleogeles almacenados a 40 °C. Este R^2 es un 3.17 % más pequeño que el obtenido en el modelo para explicar la concentración de hidroperóxidos lipídicos de los oleogeles almacenados a la misma temperatura. Aun así, se considera que el ajuste explica razonablemente bien la variabilidad de los datos experimentales de productos secundarios de la oxidación. El p_{LOF} fue de 0.0702 (Tabla 17): al ser su valor superior al nivel de significancia prefijado, se considera que el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos experimentales observados. Además, el p_{MOD} del nuevo modelo fue de 0.0415, inferior a 0.05, por lo que puede afirmarse que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables independientes y dependiente con un nivel de confianza del 95 %. Asimismo, la ausencia de un patrón definido en la gráfica de los residuos contra los valores ajustados o predichos (Figura 62) indica que el modelo seleccionado describe adecuadamente los datos experimentales.

Figura 62. Gráfica de residuos para la concentración de compuestos aldehídicos a 40 °C.

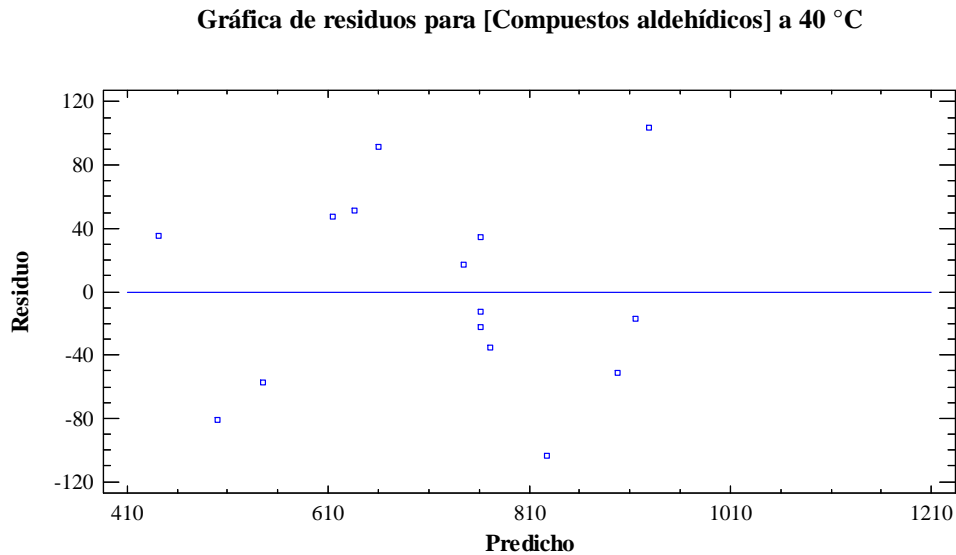
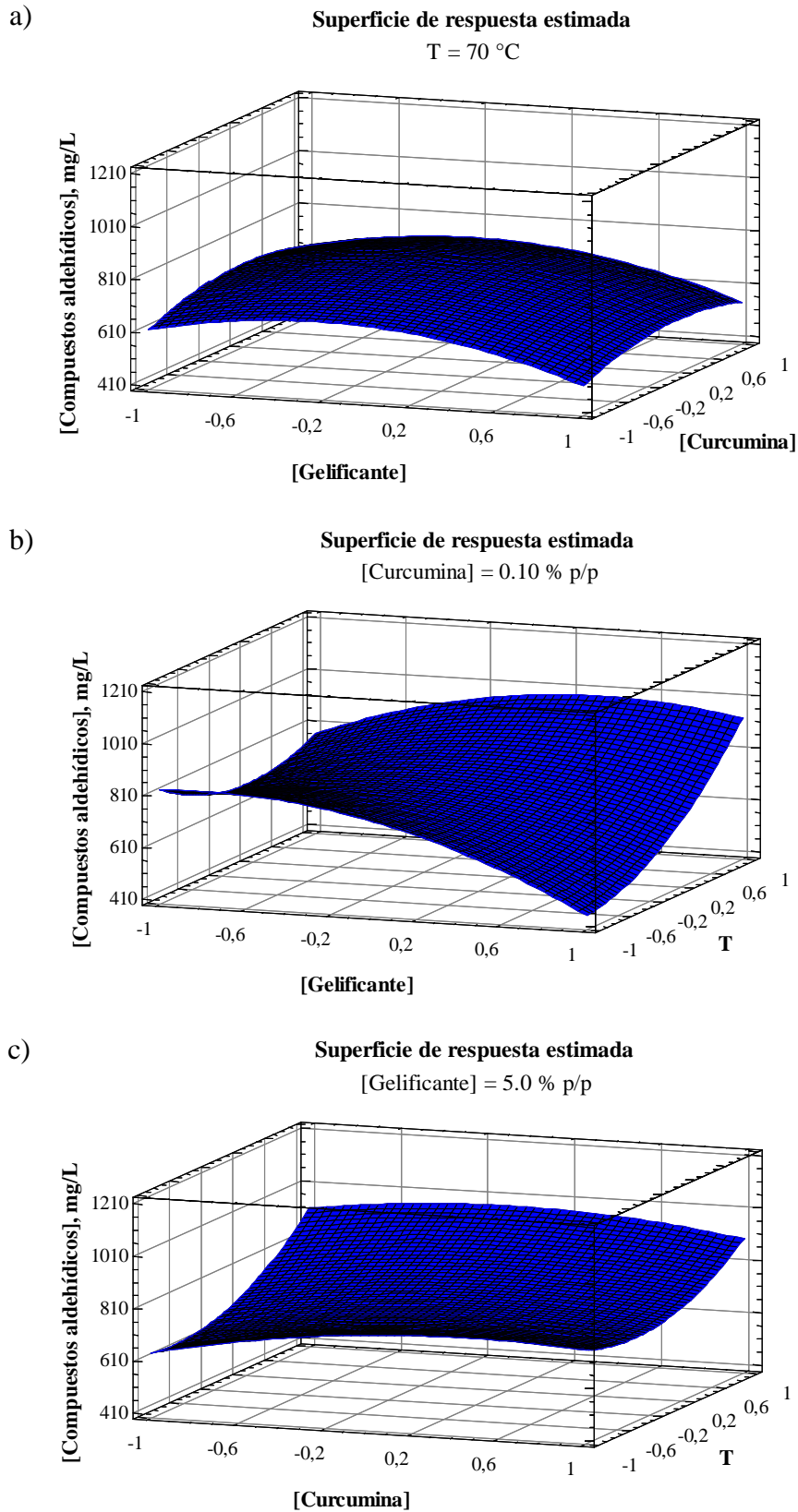


Tabla 17. Análisis de la varianza (ANOVA) para la concentración de compuestos aldehídicos a 40 °C.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón <i>F</i>	Valor <i>p</i> *
[Gelificante]	26124.9	1	26124.9	28.16	0.0337
[Curcumina]	4137.82	1	4137.82	4.46	0.1691
T	93358.0	1	93358.0	100.63	0.0098
[Gelificante] ²	52297.7	1	52297.7	56.37	0.0173
[Gelificante]*T	73849.7	1	73849.7	79.60	0.0123
[Curcumina] ²	14620.9	1	14620.9	15.76	0.0580
[Curcumina]*T	3996.33	1	3996.33	4.31	0.1736
T ²	36588.8	1	36588.8	39.44	0.0244
Falta de ajuste	50065.2	4	12516.3	13.49	<i>0.0702</i>
Error puro	1855.45	2	927.727		
Total (corr.)	363710	14			

* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

Figura 63. Superficie de respuesta estimada para la concentración de compuestos aldehídicos a 40 °C.



Llevando a cabo un análisis de la varianza de los valores observados (Tabla 17), se encontró que tanto la concentración de agente gelificante como la temperatura de preparación del oleogel ejercieron efectos estadísticamente significativos en orden lineal y cuadrático sobre la concentración de compuestos aldehídicos el día 36 ($p < 0.05$). Además, la interacción entre estos dos factores también resultó significativa. El efecto de la temperatura, que como vimos también se hizo presente en los oleogeles que se almacenaron a 23 °C, ya se ha explicado sobradamente. Por tanto, aquí nos vamos a centrar en comentar la influencia de la concentración de agente gelificante sobre la oxidación lipídica secundaria a largo plazo.

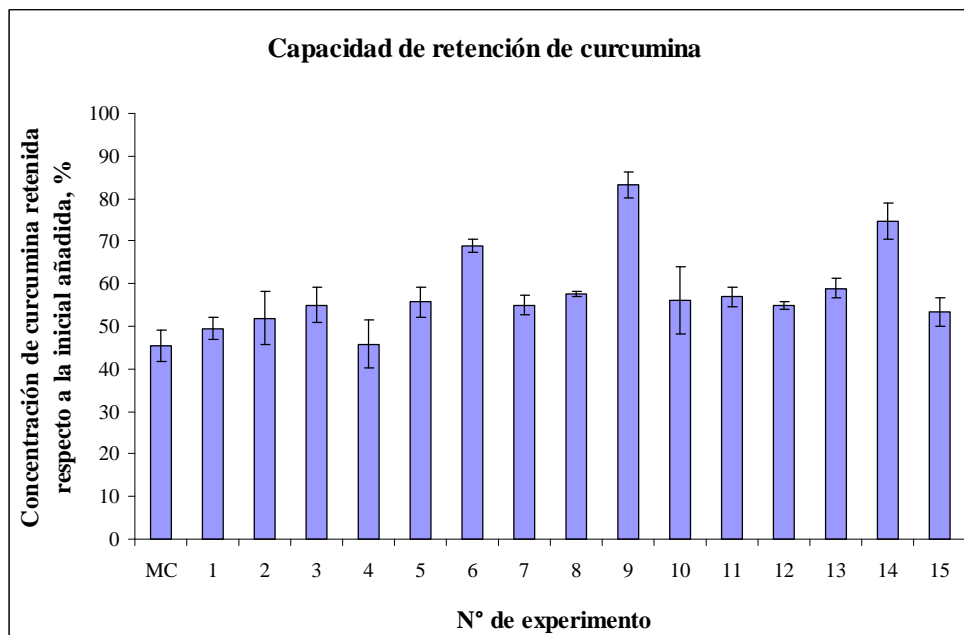
Altas concentraciones de agente gelificante dan lugar a oleogeles de mayor firmeza, con redes tridimensionales cristalinas más densas y mayores puntos de fusión, creando así una barrera física que reduce los procesos de difusión en el aceite (Hwang et al., 2012, 2015). Sin embargo, muchas de las ceras utilizadas como agente gelificante presentan una cierta actividad prooxidante. Por tanto, en base a lo anterior, algunos estudios sugieren la existencia de concentraciones de agente gelificante óptimas (que no necesariamente tienen que ser las más altas) para minimizar la oxidación lipídica: estas concentraciones óptimas serían las correspondientes para que la reducción de los procesos de difusión en el aceite fuese significativamente mayor que la actividad prooxidante que origina esa cantidad de agente gelificante (Hwang et al., 2018). Así, por ejemplo, según la Figura 63b, a bajas temperaturas predominan los procesos de difusión y por tanto interesan concentraciones de agente gelificante mayores para minimizar la concentración de compuestos aldehídicos mientras que, a altas temperaturas, predomina la actividad prooxidante del agente gelificante y por tanto interesan concentraciones más bajas para minimizar la oxidación lipídica secundaria.

De acuerdo con todo lo anterior, los valores de las variables independientes que permiten optimizar la oxidación lipídica secundaria a largo plazo son: 7.0 % p/p de agente gelificante, 0.05 % p/p de curcumina y 61 °C de temperatura de preparación del oleogel, alcanzando una concentración de compuestos aldehídicos a largo plazo mínima de 333.5 mg/L.

4.1.3. Efecto de las variables de operación sobre la capacidad de retención de curcumina

Con objeto de estudiar la influencia de las variables independientes consideradas sobre la capacidad de retención de curcumina, se analizaron sus concentraciones en el aceite de pescado sin gelificar y en los sistemas oleogelificados mediante espectroscopía UV-Vis los días 1, 15, 36 y 50 desde su elaboración. La Figura 64 muestra, en forma de gráfico barras, la curcumina presente en los diferentes sistemas de liberación, inmediatamente después de su fabricación, con respecto a las cantidades inicialmente añadidas. El porcentaje restante hasta el 100 % representa la cantidad de curcumina perdida –degradada– como consecuencia del propio proceso de fabricación.

Figura 64. Capacidad de retención de curcumina de los diferentes sistemas de liberación durante el proceso de fabricación.



Con un porcentaje de retención de curcumina de tan sólo el 45.4 %, el aceite de pescado sin gelificar fue el sistema que presentó una capacidad de retención de curcumina más baja; en cambio, la de los oleogeles estuvo comprendida entre el 45.8 % del oleogel 4 y el 83.2 % del oleogel 9. Por tanto, la gelificación del aceite de pescado enriquecido con PUFAs ω -3 puede ser una posible estrategia para aumentar la

capacidad de retención de curcumina e, incluso, llegar casi a duplicarla. Como ya se mencionó en la introducción, la curcumina es un compuesto poco soluble tanto en agua como en aceite y muy sensible a multitud de condiciones ambientales (luz, calor, oxígeno, etc.) que dificultan su aplicación a nivel práctico, de donde surge la necesidad de encontrar sistemas con una capacidad de retención de curcumina elevada (Kaminaga et al., 2003). Cuando la curcumina se disuelve directamente sobre un aceite de pescado convencional (líquido) por calentamiento y agitación, cristaliza y acaba precipitando en un periodo de tiempo más o menos corto. En cambio, el proceso de oleogelificación lo que produce es un atrapamiento físico o fijación del aceite y la curcumina en la estructura tridimensional y semisólida del oleogel, inhibiendo la movilidad y agregación de todos sus componentes (Liu et al., 2020). Por consiguiente, la adición de un agente gelificante disminuye la precipitación de curcumina y aumenta su grado de protección frente a agentes ambientales externos, lo que se traduce en un aumento de su capacidad de retención. Por otra parte, midiendo las concentraciones de curcumina con el tiempo, se ha comprobado que la mayor parte se degrada durante el proceso de fabricación del oleogel y que, una vez formado, su concentración se mantiene prácticamente inalterada durante el tiempo de estudio, independientemente de la temperatura de almacenamiento del sistema de liberación. Por tanto, el proceso de fabricación es un paso crítico para maximizar la capacidad de retención de curcumina. A continuación, se presenta el modelo cuadrático ajustado para la capacidad de retención de curcumina justo después de su elaboración, en función de las variables estudiadas y sus interacciones.

$$\begin{aligned} \% \text{ de curcumina retenida} = & 56.955 + 0.707125*[\text{Gelificante}] - 10.097*[\text{Curcumina}] + \\ & 1.17163*T - 5.3275*[\text{Gelificante}]^2 - 5.09175*[\text{Gelificante}]*[\text{Curcumina}] - \\ & 0.6745*[\text{Gelificante}]*T + 5.19725*[\text{Curcumina}]^2 - 3.11875*[\text{Curcumina}]*T + \\ & 3.0575*T^2 \end{aligned} \quad \text{Ec. [27]}$$

El modelo matemático obtenido (Ec. 27), con un R^2 del 91.53 %, un p_{MOD} de 0.0313 y un p_{LOF} de 0.0993, puede considerarse adecuado para describir los datos observados. Además, la ausencia de un patrón definido en la gráfica de los residuos contra los valores ajustados o predichos (Figura 65) confirma que el modelo describe adecuadamente los datos experimentales.

Figura 65. Gráfica de residuos para el % de curcumina retenida durante el proceso de fabricación.

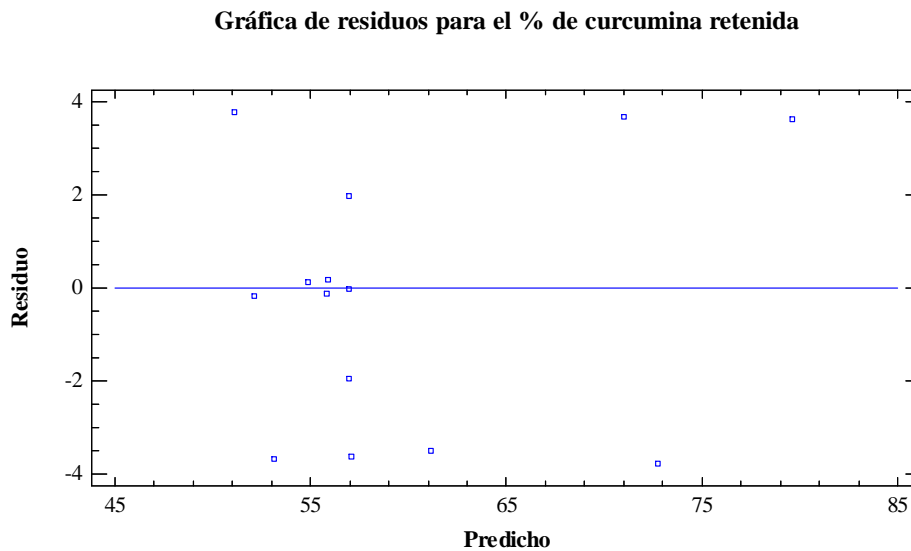
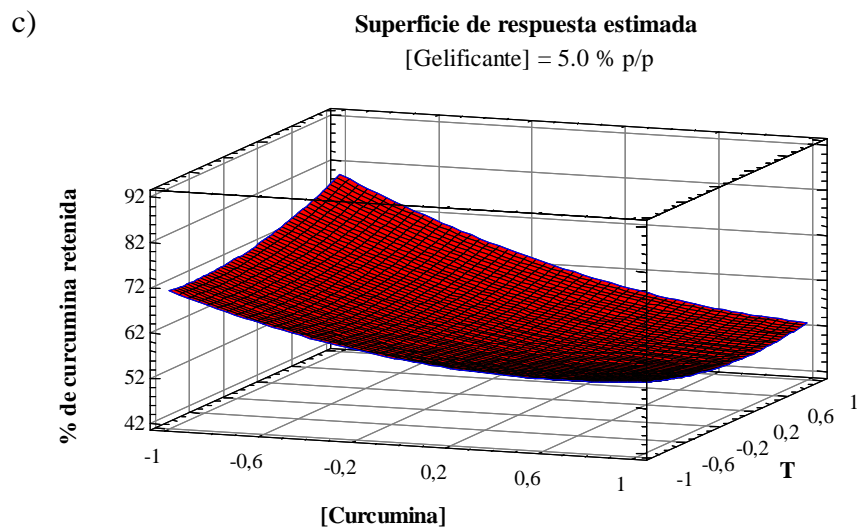
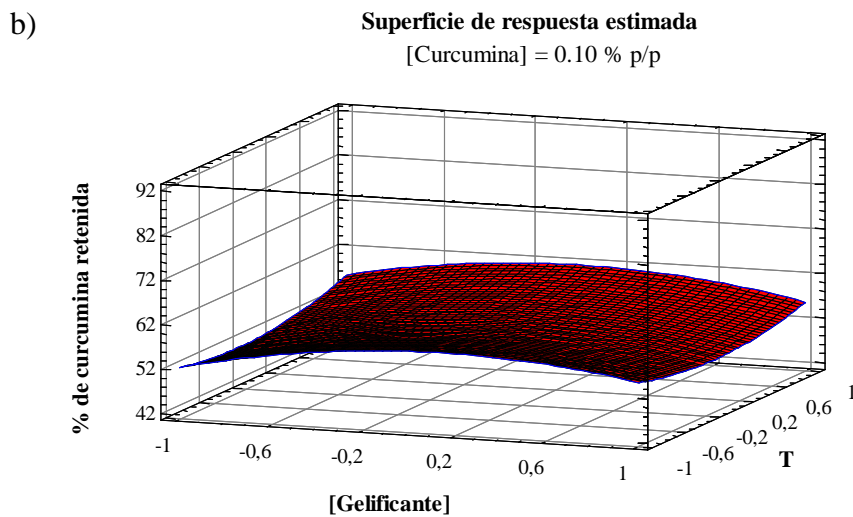
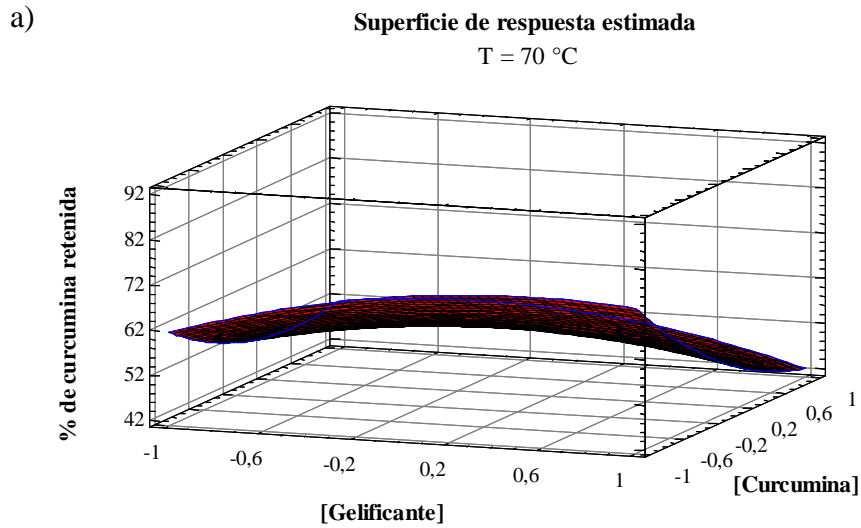


Tabla 18. Análisis de la varianza (ANOVA) para el % de curcumina retenida durante el proceso de elaboración.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón <i>F</i>	Valor <i>p</i> *
[Gelificante]	4.00021	1	4.00021	1.04	0.4146
[Curcumina]	815.595	1	815.595	212.60	0.0047
T	10.9816	1	10.9816	2.86	0.2327
[Gelificante] ²	104.796	1	104.796	27.32	0.0347
[Gelificante]*[Curcumina]	103.704	1	103.704	27.03	0.0351
[Gelificante]*T	1.8198	1	1.8198	0.47	0.5622
[Curcumina] ²	99.7344	1	99.7344	26.00	0.0364
[Curcumina]*T	38.9064	1	38.9064	10.14	0.0861
T ²	34.5168	1	34.5168	9.00	0.0955
Falta de ajuste	106.235	3	35.4116	9.23	<i>0.0993</i>
Error puro	7.67271	2	3.83635		
Total (corr.)	1345.6	14			

* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

Figura 66. Superficie de respuesta estimada para el % de curcumina retenida durante el proceso de fabricación.



Realizando un análisis de la varianza de los valores observados (Tabla 18), se encontró que la concentración de curcumina ejerció un efecto estadísticamente significativo en orden lineal y cuadrático sobre el porcentaje de curcumina retenida durante el proceso de fabricación, mientras que la concentración de agente gelificante solamente lo hizo en orden cuadrático ($p < 0.05$). Además, la interacción entre estas dos variables también resultó significativa. La Figura 66 representa la superficie de respuesta estimada para las diferentes combinaciones de variables independientes.

La variable concentración de curcumina, con un valor p de 0.0047, es el efecto principal más influyente sobre el porcentaje de retención de este compuesto de forma que, cuanto mayor es su contenido inicial en la formulación, el porcentaje de retención es menor. Este hecho, que en un primer momento puede incluso resultar contradictorio, tiene todo su sentido al tratarse de porcentajes, no de cantidades netas, de curcumina retenida en los oleogeles. Si bien es cierto que al incorporar en las formulaciones mayores concentraciones de curcumina, las cantidades netas presentes en los sistemas de liberación también deberían serlo, en el caso de los porcentajes de retención de curcumina, no necesariamente tiene que ocurrir lo mismo. La capacidad de los sistemas oleogelificados para incorporar, vehiculizar y proteger compuestos bioactivos es limitada y, por consiguiente, añadir concentraciones de curcumina más altas no implica que toda esa curcumina pueda incorporarse, quedar protegida y mantenerse suspendida en el sistema sin llegar a precipitar. Así pues, altas cantidades de curcumina también suponen pérdidas de compuesto bioactivo más elevadas, disminuyendo por tanto la capacidad de retención del sistema.

Por otra parte, el agente gelificante es el responsable de la formación de la estructura tridimensional y de la consistencia semisólida que caracteriza a este tipo de sistemas. Esta estructura tipo gel que se forma reduce la movilidad de sus componentes (entre ellos, la curcumina) así como de las especies reactivas que pueden degradarlos, llevando al aumento de su capacidad de retención. Además, la estructuración que produce el agente gelificante en el sistema de liberación dificulta los procesos de difusión, nucleación y crecimiento de cristales de curcumina que, al mantenerse pequeños y dispersos unos de otros, permanecen en suspensión sin precipitar. Estos dos fenómenos contribuyen al aumento de la capacidad de retención de curcumina con la concentración de agente gelificante.

Una vez obtenido el modelo que ajusta adecuadamente los datos experimentales y se han identificado las variables estadísticamente más significativas, se encontraron las condiciones óptimas que conducen a la máxima capacidad de retención de curcumina. En efecto, estableciendo una concentración de agente gelificante del 6.0 % p/p, una concentración de curcumina de 0.05 % p/p y una temperatura de preparación del oleogel de 60 °C, se podría alcanzar una capacidad de retención de curcumina máxima durante el proceso de fabricación del sistema del 80.8 %.

4.1.4. Optimización multivariable de la composición y las condiciones de operación del sistema oleogelificado

En los apartados precedentes, se obtuvieron los conjuntos de condiciones óptimas para cada variable respuesta: para minimizar la oxidación lipídica primaria y secundaria a corto y largo plazo y para maximizar la capacidad de retención de curcumina. Como cabía esperar, estos conjuntos de condiciones óptimas fueron diferentes entre sí. Por tanto, no es posible alcanzar un único conjunto de condiciones para el que todas las respuestas se encuentren en su valor óptimo. En los casos donde se requiere optimizar varias variables respuesta a la vez, es necesario recurrir a la metodología de superficie multi-respuesta. Esta metodología es una herramienta útil y eficaz que permite encontrar el conjunto de condiciones que asegura un óptimo global del sistema dentro de la ventana operativa del diseño.

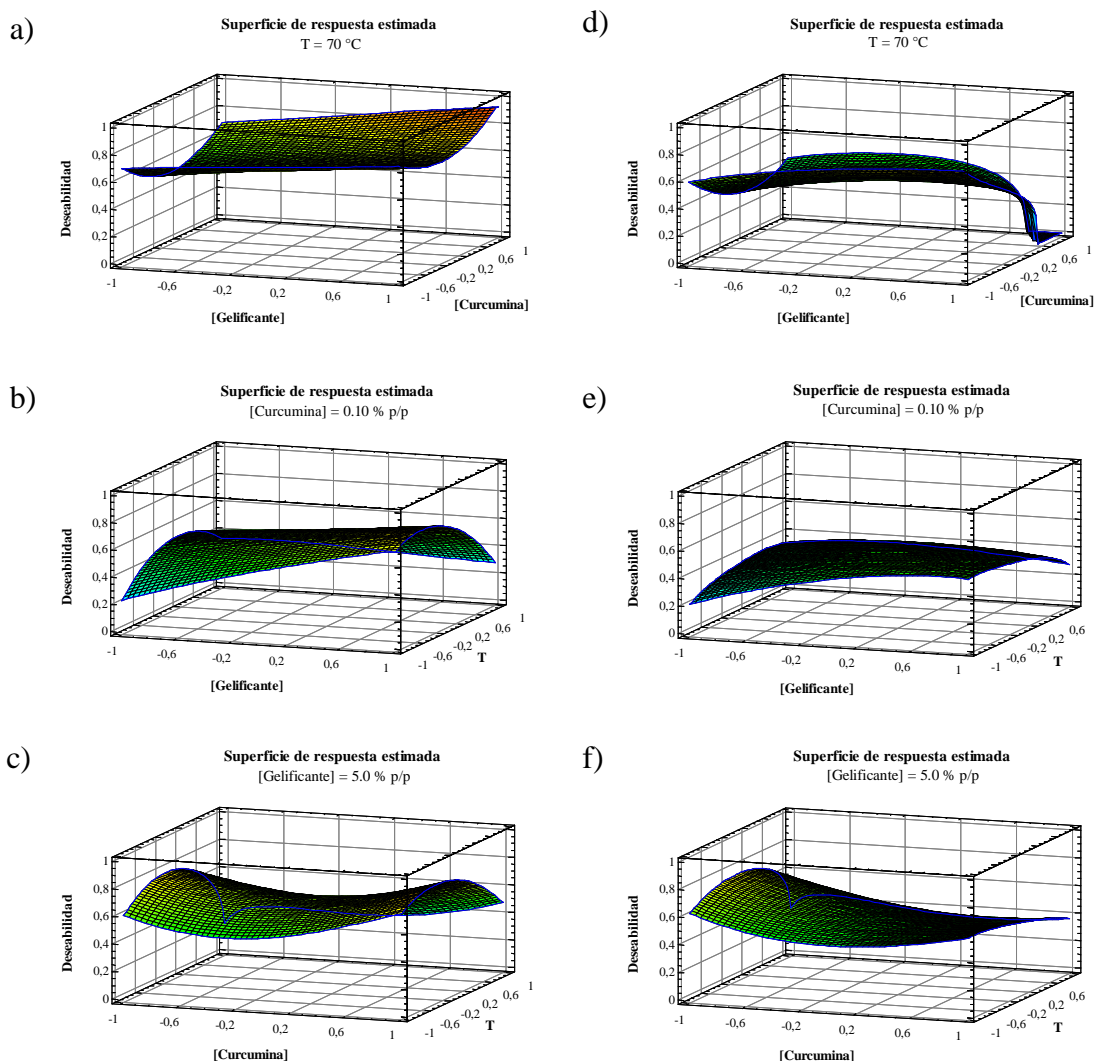
En primer lugar, se buscaron las condiciones óptimas para minimizar conjuntamente la oxidación lipídica primaria y secundaria a corto plazo (de los oleogeles almacenados a 23 °C). Como ya se ha explicado anteriormente, la oxidación lipídica es un proceso en cadena donde, en sus primeras etapas, se producen los hidroperóxidos lipídicos como productos primarios de la oxidación para, en etapas posteriores, descomponerse y dar lugar a toda una serie de productos secundarios de la oxidación. Por tanto, la oxidación lipídica secundaria tiene lugar si y solo si previamente ocurrió la oxidación lipídica primaria de forma que, minimizando esta última, también se reduce en cierto modo la primera. Así pues, para realizar la

optimización conjunta de la oxidación lipídica primaria y secundaria, la primaria se ponderó con un mayor peso (5.0) que la secundaria (2.0). La composición y condiciones de operación óptimas del sistema oleogelificado obtenidas son: 7.0 % p/p de agente gelificante, 0.14 % p/p de curcumina y 61.5 °C de temperatura de preparación del oleogel, alcanzando una concentración de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos mínima a corto plazo de 2996.3 y 423.2 mg/L respectivamente, y un valor de deseabilidad global de 0.978. Según estas condiciones, la minimización de la oxidación lipídica de forma global, en su conjunto, se consigue empleando altas concentraciones de agente gelificante, que es el responsable de la formación de la estructura típica de los oleogeles y de reducir la movilidad de las ROS, concentraciones elevadas de curcumina, que posee capacidad antioxidante, y temperaturas de preparación relativamente bajas, para ralentizar todo lo posible la velocidad de los procesos oxidativos. La Figura 67 (a, b y c) representa la deseabilidad global ajustada de esta función objetivo respecto a las diferentes combinaciones de variables independientes.

Modificando ahora el objetivo de optimización para minimizar conjuntamente la oxidación lipídica primaria y secundaria a corto plazo (a 23 °C) y, a su vez, maximizar la capacidad de retención de curcumina del sistema oleogelificado, se alcanzan condiciones óptimas diferentes: 7.0 % p/p de agente gelificante, 0.05 % p/p de curcumina y 66.0 °C de temperatura de preparación del oleogel, alcanzando una concentración de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos mínima a corto plazo de 3389.6 y 445.9 mg/L respectivamente, una capacidad de retención de curcumina máxima durante el proceso de fabricación del 71.8 % y un valor de deseabilidad global de 0.821. Para este nuevo objetivo de optimización, los pesos asignados a cada una de las variables respuesta fueron: 5.0 para la oxidación lipídica primaria, 2.0 para la secundaria y 3.0 para la capacidad de retención de curcumina. Comparando estas condiciones óptimas con respecto a las obtenidas con anterioridad, se observa un cambio radical en la concentración de curcumina (de 0.14 a 0.05 % p/p) y un ligero aumento de la temperatura de preparación del oleogel (de 61.5 a 66.0 °C). Con estas nuevas condiciones, la concentración de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos mínima que podría alcanzarse sería un 36.3 y 12.3 % superior a la concentración más baja que se puede obtener (2487.0 y 397.1 mg/L), consiguiendo

porcentajes de retención de curcumina de hasta el 71.8 %. La Figura 67 (d, e y f) representa la deseabilidad global ajustada para este nuevo objetivo de optimización en función de las diferentes combinaciones de variables independientes.

Figura 67. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada en los oleogeles almacenados a 23 °C.



Utilizando la metodología de superficie multi-respuesta para los oleogeles almacenados a 40 °C y llevando a cabo un tratamiento estadístico similar al anterior, se obtuvieron los conjuntos de condiciones óptimas (Tabla 19) para, por un lado, minimizar la oxidación lipídica primaria total y secundaria (objetivo de optimización 1) y, por otro, minimizar la oxidación primaria total y secundaria y maximizar la capacidad de retención de curcumina (objetivo de optimización 2). La Figura 68 muestra la

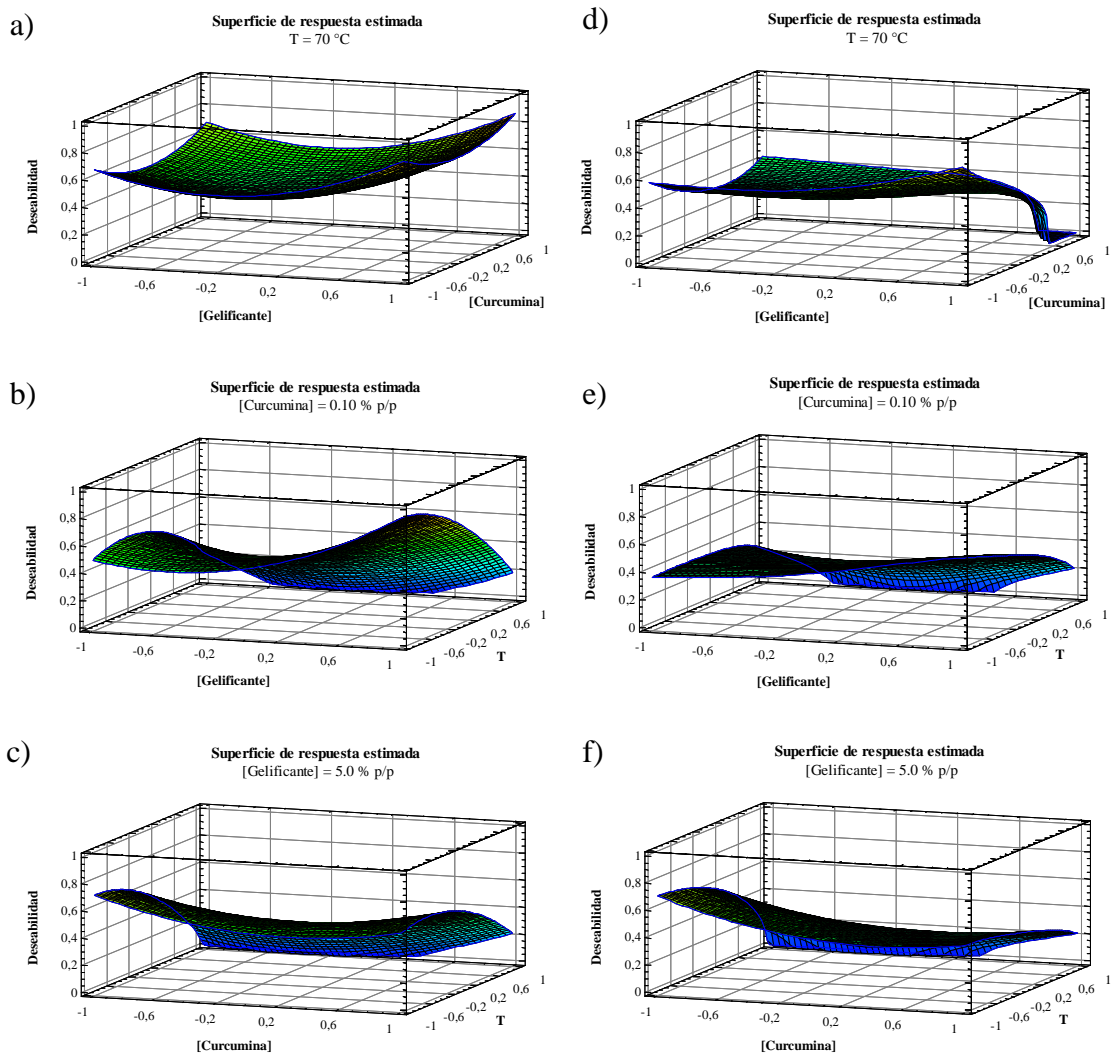
deseabilidad global ajustada de ambas funciones objetivo respecto a las diferentes combinaciones de variables independientes.

Tabla 19. Conjunto de condiciones óptimas para los dos objetivos de optimización de los oleogeles almacenados a 40 °C.

Variable independiente	Objetivo de optimización 1	Objetivo de optimización 2
[Gelificante], % p/p	7.0	6.6
[Curcumina], % p/p	0.07	0.05
T, °C	60.5	60.0
Variable respuesta	Objetivo de optimización 1	Objetivo de optimización 2
[Hidroperóxidos lipídicos] _{TOTAL} , mg/L	153835	152754
[Compuestos aldehídicos], mg/L	395.2	413.4
Curcumina retenida, %	---	72.8
Deseabilidad global	1.000	0.907

Para ambos objetivos de optimización a largo plazo, la deseabilidad global ajustada fue ligeramente superior a la que se obtuvo a corto plazo.

Figura 68. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada en los oleogel almacenados a 40 °C.

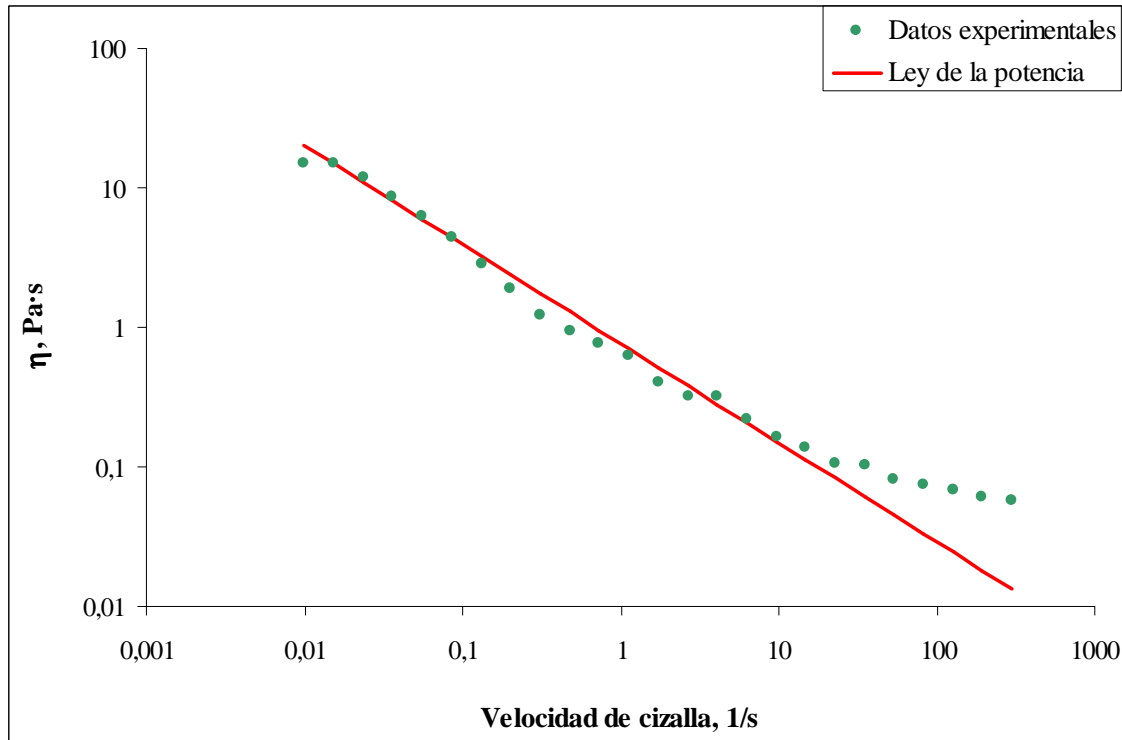


4.1.5. Estudio reológico del oleogel óptimo

Una vez obtenida la formulación y condiciones de operación óptimas del sistema de liberación basado en oleogel rico en PUFAs ω -3 y curcumina (4.6 % p/p de agente gelificante, 0.15 % p/p de curcumina y 66.5 °C de temperatura de preparación), se estudió su comportamiento reológico a temperatura constante (25 °C), y más concretamente, la curva de viscosidad y los módulos viscoelásticos en función de la frecuencia –para determinar la zona viscoelástica lineal, previamente se realizó un

barrido de esfuerzos. La Figura 69 muestra, en escala doblemente logarítmica, la viscosidad del oleogel óptimo para distintas velocidades de cizalla.

Figura 69. Curva de viscosidad del oleogel óptimo a 25 °C.



La curva de viscosidad obtenida para el oleogel óptimo, de aspecto relativamente líquido, pone de manifiesto un comportamiento pseudoplástico, esto es, su viscosidad disminuye (de 15.1 Pa·s a 0.0568 Pa·s) al aumentar la velocidad de cizalla (de 0.01 s⁻¹ a 300 s⁻¹), siendo éste el comportamiento típico de los materiales estructurados y altamente estructurados. El origen de este fenómeno se debe a cambios en la estructura compleja del oleogel como consecuencia de la variación en la velocidad de deformación. En efecto, esta estructura tridimensional está inicialmente distribuida al azar, manteniendo un estado altamente desordenado que ocasiona una gran resistencia interna al flujo, es decir, una alta viscosidad. Sin embargo, la aplicación de un gradiente de velocidad de cizalla creciente produce el desenredo, estiramiento y orientación de las cadenas de gelificante que componen el oleogel en la dirección del esfuerzo aplicado, lo cual se traduce en un descenso de la resistencia al flujo y, por tanto, de la viscosidad. En el caso extremo de velocidades de cizalla muy elevadas, la estructura del material podría llegar a destruirse y/o reorientarse totalmente con respecto a su estado inicial, tal que no

existieran interacciones entre las cadenas de gelificante, lo que daría lugar a un valor constante de viscosidad. Sin embargo, esto último no llega a ocurrir en la curva de viscosidad de la Figura 69, pudiendo afirmarse que el oleogel óptimo aquí desarrollado no llega a destruirse y/o reorientarse completamente con respecto a su estado inicial. Además, puesto que tampoco se detecta claramente la meseta newtoniana, se decide ajustarla a la *ley de la potencia*, también conocida como *ley de Ostwald*:

$$\eta = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad \text{Ec. [28]}$$

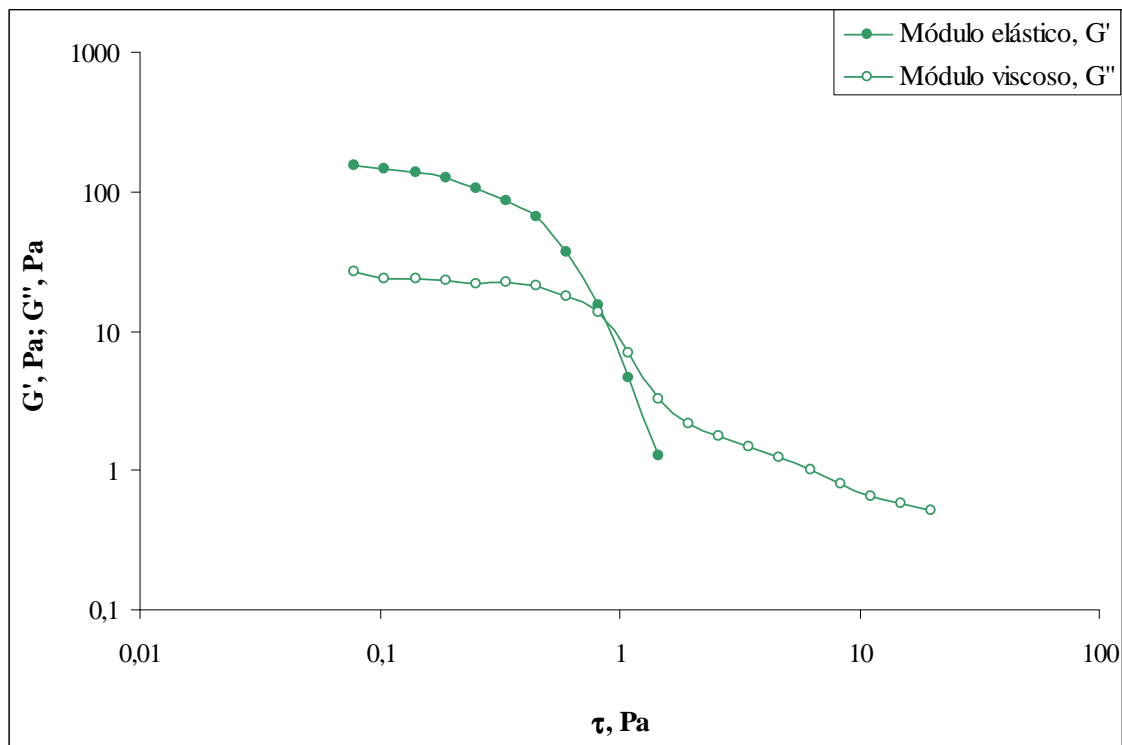
donde K y n son dos parámetros empíricos: K es el índice de consistencia de flujo (con unidades $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ en el SI) y n es el índice de comportamiento de flujo o índice de Ostwald, cuyo valor (adimensional) depende del comportamiento reológico del fluido. Así, valores de $n = 1$ corresponden a un comportamiento newtoniano, valores de $n < 1$ describen un comportamiento pseudoplástico o fluidizante, y valores de $n > 1$ describen un comportamiento dilatante. Cuanto más alejado está el valor de n de la unidad, mayor es la diferencia respecto al comportamiento newtoniano. Una limitación importante de la *ley de la potencia* es que, generalmente, sólo es aplicable en un rango limitado (intermedio) de gradientes de cizalla: para velocidades de cizalla muy bajas o muy altas no suele proporcionar buenos ajustes.

Aplicando la *ley de la potencia* o *ley de Ostwald* a la curva de viscosidad del oleogel óptimo, se obtuvieron los siguientes parámetros: $\lambda = 0.765 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ y $n = 0.289$. El valor de n obtenido, muy por debajo de la unidad, vuelve a poner de manifiesto un marcado comportamiento pseudoplástico que está relacionado con la estructuración interna del sistema. A partir de esos valores, se ha representado el modelo de la *ley de la potencia* en la Figura 69. De acuerdo con la mencionada figura, a velocidades de cizalla por debajo de 10 s^{-1} , el grado de ajuste entre los datos experimentales y el modelo matemático es bastante razonable; sin embargo, a velocidades de cizalla por encima de 10 s^{-1} , se aprecia una desviación importante en el gráfico, desviación que en realidad no es muy significativa debido a la escala logarítmica del eje de la viscosidad.

Para analizar la viscoelasticidad del oleogel óptimo, comportamiento que está relacionado con su respuesta temporal y con la estructura interna del sistema, se realizaron medidas oscilatorias de pequeña amplitud y se calcularon las funciones viscoelásticas G' y G'' al ir variando la frecuencia de oscilación (espectro dinámico).

Estos ensayos han de llevarse a cabo en la zona de comportamiento lineal, donde el esfuerzo y la deformación son proporcionales (región elástica del espectro mecánico) y, por tanto, los módulos viscoelásticos no dependen del esfuerzo aplicado (Lim & Ahn, 2013). Así pues, como fase previa fue necesario determinar esta zona viscoelástica lineal. Con esta finalidad se hicieron medidas oscilatorias a una frecuencia constante de 1 Hz (6.283 rad/s) y se variaron las amplitudes de esfuerzo entre 0.07851 Pa y 20 Pa (también llamado barrido de esfuerzos). En esta zona lineal es donde se cumplen las ecuaciones del apartado 3.2.4.7. y se pueden definir adecuadamente ambos módulos viscoelásticos. La Figura 70 representa, en escala doblemente logarítmica, la gráfica de barrido de esfuerzos obtenida con el oleogel óptimo para detectar la zona lineal.

Figura 70. Barrido de esfuerzos del oleogel óptimo a 25 °C.

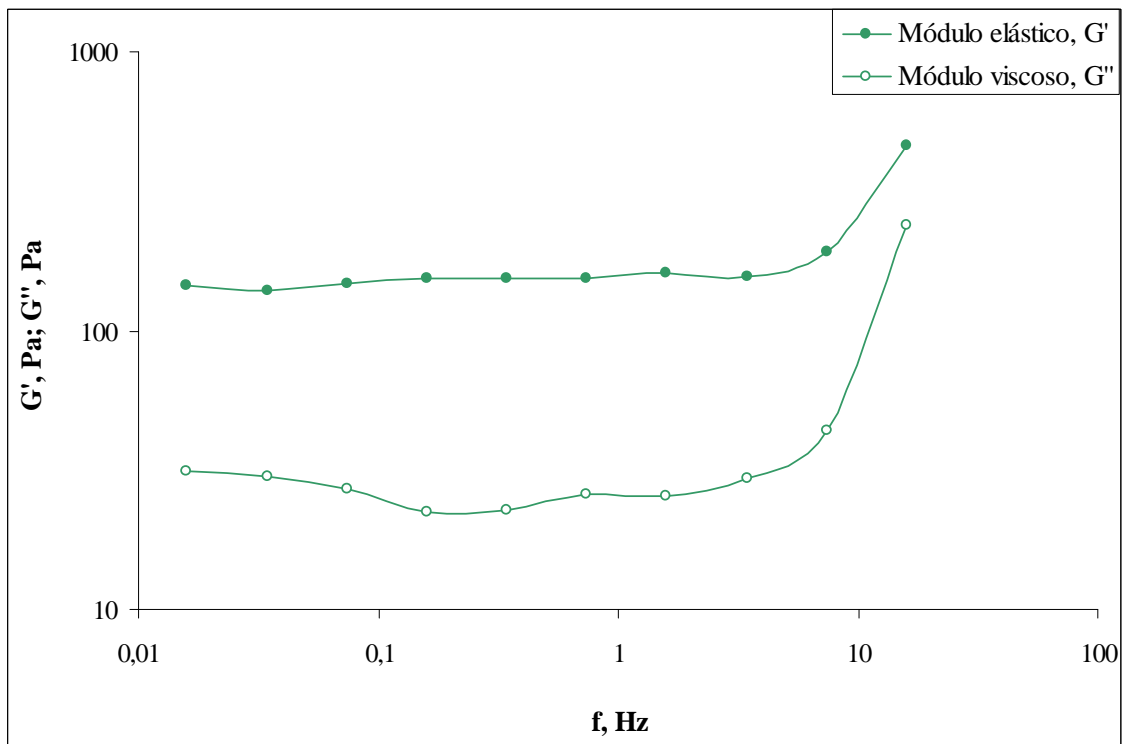


De la Figura 70 se desprende que, a esfuerzos próximos a 0.1 Pa, ambos módulos son más o menos constantes, lo que significa que el esfuerzo y la deformación son proporcionales (ya que estos módulos corresponden al cociente de ambos multiplicado por una función del desfase). También es interesante destacar que los valores de sus respectivos módulos, tanto el elástico como el viscoso, ambos medidos en la zona lineal, son muy diferentes entre sí, y que la extensión de la región

viscoelástica lineal no tiene por qué estar necesariamente relacionada con los valores de dichos módulos (de hecho, los valores de ambas funciones son relativamente altos y, sin embargo, la zona lineal es bastante estrecha).

Una vez seleccionada una determinada amplitud del esfuerzo dentro de la región lineal (en este caso, 0.1 Pa), se realizó un barrido de frecuencias de 0.01592 Hz a 15.92 Hz –manteniendo el esfuerzo constante– y se obtuvo el llamado espectro dinámico, esto es, la representación gráfica de las funciones viscoelásticas G' y G'' en función de la frecuencia de oscilación (Figura 71).

Figura 71. Espectro dinámico del oleogel óptimo a 25 °C.



De acuerdo con la Figura 71, las funciones viscoelásticas G' y G'' son más o menos dependientes de la frecuencia de oscilación, lo cual indica que el oleogel óptimo aquí desarrollado presenta un aspecto más parecido a un líquido que a un sólido (Lee et al., 2019). Asimismo, también se observa en la figura que presenta valores del módulo elástico o de almacenamiento, G' , mayores que el módulo viscoso o de pérdida, G'' , siendo este comportamiento típico de estructuras de tipo gel débil (Lapasin & Prici, 1995).

4.1.6. Estudios de estabilidad de la curcumina incorporada al oleogel óptimo con la luz y la temperatura

Tras obtener la composición y condiciones de operación óptimas del sistema de liberación basado en oleogeles rico en PUFAs ω -3 y curcumina, se estudió el efecto de diferentes condiciones ambientales –como son la luz y la temperatura– sobre la estabilidad de la curcumina incorporada al oleogel óptimo con el tiempo.

Como ya se indicó en la introducción, la molécula de curcumina es fotosensible. La degradación fotoquímica de la curcumina se produce independientemente del estado físico o del entorno químico en que se encuentre (Núñez Solano et al., 2020). Sin embargo, la cinética de degradación sí que depende del estado físico del compuesto, de las condiciones de la degradación y del sistema de liberación utilizado para su vehiculización (Moustafine et al., 2013). Así por ejemplo, Liu et al. (2020) estudiaron la velocidad de degradación de la curcumina expuesta a la luz UV en varios sistemas de liberación: un aceite de maíz sin gelificar y otro gelificado con etilcelulosa. Los autores observaron que la velocidad de degradación de la curcumina en el aceite sin gelificar fue notablemente mayor que en el sistema oleogelificado: tras 8 h de exposición a la luz UV, la curcumina que permanecía en el aceite sin gelificar fue inferior al 10 % de la curcumina inicial; en cambio, en el aceite gelificado, el porcentaje de curcumina presente fue algo mayor (del 14.77 %). Estos resultados sugieren que los sistemas oleogelificados son capaces de proporcionar una cierta protección frente a la degradación fotoquímica de la curcumina y, además, están en consonancia con los obtenidos en algunos otros trabajos para diferentes compuestos bioactivos o tipo de oleogeles (Cui et al., 2019; Lee et al., 2019).

Con objeto de evaluar la susceptibilidad a la degradación fotoquímica de la curcumina incorporada en los oleogeles aquí desarrollados y, más tarde, determinar el tipo de sistema de liberación que le otorga una mayor protección frente a la luz, se compararon los resultados de una muestra de uno de los oleogeles óptimos (4.6 % p/p de agente gelificante, 0.15 % p/p de curcumina y 66.5 °C) almacenado en oscuridad, en condiciones de temperatura controladas y sin filtraciones de luz ambiental, con los

obtenidos en otra muestra del mismo oleogel, irradiada con dos lámparas halógenas de 18 W cada una, en las mismas condiciones anteriores (apartado 3.2.3.3.). Los resultados se recogen en la Tabla 20.

Tabla 20. Concentración de curcumina en el oleogel con el tiempo en presencia y en ausencia de luz.

Tiempo, días	Oscuridad		Luz	
	[Curcumina], mg/L	Curcumina sin degradar, %	[Curcumina], mg/L	Curcumina sin degradar, %
0	1581.7	100.0	1557.0	100.0
1	1458.4	92.2	1415.2	90.9
2	1484.6	93.9	1236.4	79.4
3	1595.6	100.9	1113.0	71.5
4	1504.6	95.1	1068.3	68.6
7	1631.0	103.1	871.0	55.9
8	1521.6	96.2	793.9	51.0
9	1595.6	100.9	778.5	50.0
10	1637.2	103.5	758.5	48.7
11	1706.6	107.9	693.7	44.6
14	1701.9	107.6	652.1	41.9

Nota: Los porcentajes superiores al 100.0 % se deben a pequeños errores experimentales en el pipeteo del oleogel como consecuencia de su alta viscosidad.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observa que la cantidad de curcumina presente en el oleogel almacenado en oscuridad permanece prácticamente constante durante los 14 días de estudio –las pequeñas variaciones que aparecen en la concentración de curcumina con respecto a la concentración inicial deben atribuirse al propio error experimental, puesto que las cantidades aumentan y disminuyen con respecto al valor inicial sin ningún patrón apreciable. En cambio, en el caso de los oleogeles sometidos a estímulo fotolítico, la concentración de curcumina sí que disminuye significativamente con el tiempo de forma que, dos semanas después, la cantidad presente en el oleogel es de tan solo un 41.9 % de la curcumina inicial; por tanto, el 58.1 % se ha degradado por acción de la luz. Así pues, se observa claramente cómo la presencia de luz visible degrada la curcumina incorporada en este sistema de

liberación. Además, también se observa que durante los primeros días es cuando se produce la mayor pérdida de curcumina, siendo la degradación cada vez más lenta a medida que va pasando el tiempo: así, durante los 3 primeros días se perdió aproximadamente el 30 % de la curcumina incorporada mientras que, para volver a alcanzar porcentajes de pérdida similares al anterior, se necesitaron otros 11 días más. Según algunos autores, la degradación fotoquímica de la curcumina a través de luz visible ocurre mediante ROS producidas por la curcumina a través del estado triplete de ésta. Este procedimiento se da a través de la llamada transferencia fotogenerada al oxígeno molecular y transferencia energética a ROS (Albadalejo et al., 2015).

Zaibunnisa et al. (2009) estudiaron la degradación fotoquímica de la curcumina con el tiempo en el complejo de inclusión molecular de oleorresina de cúrcuma (*Curcuma domestica*) con β -ciclodextrina, encontrando una reacción irreversible de primer orden de ecuación cinética:

$$-\frac{d[Curc.]}{dt} = k \cdot [Curc.] \quad \text{Ec. [29]}$$

Separando variables e integrando, se obtiene la ecuación:

$$\ln\left(\frac{[Curc.]}{[Curc.]_0}\right) = -k \cdot t \quad \text{Ec. [30]}$$

Por tanto, aceptando también en este caso una reacción irreversible de primer orden, representando gráficamente la recta que define la Ec. 29 y efectuando el ajuste, se obtiene una constante cinética de degradación fotoquímica de la curcumina en el sistema oleogelificado de 0.0734 día^{-1} y un R^2 del 92.55 %. Comparando esta constante cinética con las obtenidas por Zaibunnisa et al. (2009), la velocidad de degradación de la curcumina incorporada en el oleogel resultó ser mucho menor que en el complejo de inclusión que utilizaron. Además, estos autores encontraron que las constantes cinéticas de degradación de la curcumina dependían de la temperatura de almacenamiento y que la curcumina de las muestras almacenadas en ausencia de luz se degradaba entre 3 y 5 veces más lento que en presencia de luz.

Para estudiar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la curcumina incorporada en los oleogeles aquí desarrollados y, más tarde, determinar el tipo de sistema de liberación que le otorga una mayor protección frente a esta variable, se

siguió un procedimiento experimental similar al ya descrito para el estudio de la estabilidad frente a la luz: se mantuvo una muestra del mismo oleogel con curcumina de entonces (4.6 % p/p de agente gelificante, 0.15 % p/p de curcumina y 66.5 °C) en condiciones de temperatura controladas a 80 °C y los resultados obtenidos se compararon con los proporcionados por una muestra del mismo oleogel que había sido mantenida a temperatura ambiente (25 °C) (apartado 3.2.3.4.). Los resultados se recogen en la Tabla 21.

Tabla 21. Concentración de curcumina en el oleogel con el tiempo a dos temperaturas de almacenamiento diferentes: 25 y 80 °C.

Tiempo, h	T = 25 °C		T = 80 °C	
	[Curcumina], mg/L	Curcumina sin degradar, %	[Curcumina], mg/L	Curcumina sin degradar, %
0	1862.27	100.0	1862.27	100.0
1			1282.62	68.9
2			1288.79	69.2
3			1222.50	65.6
4			1236.37	66.4
5			1234.83	66.3
6			1168.54	62.7
24	1416.74	76.1	1305.75	70.1
48	1133.09	60.8	1239.46	66.6
72	1180.88	63.4	1194.75	64.2
144	1120.75	60.2	1083.75	58.2
168	1301.12	69.9	989.72	53.2

Según varios estudios, la curcumina es un compuesto bioactivo bastante sensible a la luz y moderadamente estable con la temperatura (Sowbhagya et al., 2005). Tanto es así que ya se mencionó en la introducción que, por debajo de 70 °C, la curcumina permanecía estable y sólo se descompone por completo a temperaturas por encima de los 100 °C (Wang et al., 2009). Por tanto, a la temperatura más alta del estudio (80 °C), la curcumina debe degradarse parcialmente y observar una disminución progresiva con el tiempo. En efecto, en la Tabla 21 se aprecia una pérdida de curcumina con el tiempo tanto en el oleogel almacenado a 25 °C como en el oleogel almacenado a 80 °C. Si bien

es cierto que en el caso del oleogel almacenado a 25 °C se produce una pérdida de curcumina muy importante durante los dos primeros días del estudio que alcanza porcentajes de pérdida del 39.2 %, en el caso del oleogel almacenado a 80 °C se produce una pérdida algo más paulatina pero mucho más prolongada en el tiempo, es decir, en el oleogel a 25 °C, a partir de las 48 horas desde su elaboración parece estabilizarse y la cantidad de curcumina que permanece en él permanece más o menos constante mientras que en el oleogel a 80 °C, la pérdida de curcumina se prolonga en el tiempo y el día 7 solamente contiene el 53.2 % de la curcumina inicialmente añadida. Además, estos porcentajes de pérdida de curcumina son comparables a los obtenidos en el mismo periodo de tiempo para las muestras expuesta a la luz visible.

4.1.7. Conclusiones

En este primer capítulo se ha analizado la influencia de la composición –concentraciones de agente gelificante y curcumina– y las condiciones de operación –temperatura de preparación del oleogel– de un sistema oleogelificado rico en PUFAs ω -3 y curcumina sobre su estabilidad oxidativa (tanto primaria como secundaria) con el tiempo y su capacidad para proteger y estabilizar curcumina vehiculizada. Este estudio se realizó tanto a temperatura ambiente (23 °C) como en condiciones aceleradas (40 °C).

Como primera conclusión, los datos de concentración de hidroperóxidos lipídicos obtenidos para el aceite de pescado sin gelificar y los oleogeles confirman que, independientemente de la temperatura de almacenamiento, el aceite de pescado sin gelificar experimenta más oxidación lipídica primaria a largo plazo que gelificado y, por tanto, la oleogelificación es una estrategia adecuada para reducir la oxidación lipídica primaria en porcentajes comprendidos entre un 25.9 y un 90.0 %. En cambio, con respecto a la oxidación lipídica secundaria, el proceso de oleogelificación no siempre supone una buena estrategia para reducir la concentración de productos secundarios de la oxidación a largo plazo. Y es que la oxidación lipídica primaria está más relacionada con la presencia o ausencia de oxígeno, mientras que la oxidación lipídica secundaria está más relacionada con la temperatura.

Como segunda conclusión, el comportamiento oxidativo primario a corto y a largo plazo de los oleogeles en condiciones ambientales y en condiciones aceleradas es totalmente diferente: en los primeros días, la oxidación lipídica primaria a 40 °C se ve favorecida y la concentración de hidroperóxidos es superior a la de los oleogeles almacenados a 23 °C; en cambio, a tiempos más prolongados, los hidroperóxidos lipídicos se descomponen y dan lugar a toda una serie de productos secundarios de la oxidación, resultando en una concentración inferior de hidroperóxidos a 40 °C. Sin embargo, en la oxidación lipídica secundaria se observa un mismo comportamiento en la concentración de compuestos aldehídicos de estos sistemas, independientemente del tiempo transcurrido desde su elaboración. Y es que, en efecto, la concentración de productos secundarios de la oxidación de las muestras a 40 °C fue siempre mayor que en las muestras a 23 °C, tanto a corto como a largo plazo, aunque a corto plazo estas diferencias fueron mucho menores que a largo plazo.

En relación a los oleogeles almacenados a 23 °C, la oxidación lipídica primaria está afectada tanto por la concentración de curcumina como por la temperatura de preparación del oleogel, ambas en orden cuadrático, efecto que sin duda está relacionado con las propiedades antioxidantes de la curcumina y la dependencia de la velocidad de reacción con la temperatura; mientras que la oxidación lipídica secundaria únicamente se afecta por la temperatura de preparación del oleogel en su término lineal. Sin embargo, con respecto a los oleogeles almacenados a 40 °C, ninguna de las variables independientes consideradas ni sus interacciones influye significativamente sobre la oxidación lipídica primaria, si bien es cierto que la temperatura de preparación del oleogel es la variable que ejerce un mayor impacto sobre la concentración de hidroperóxidos lipídicos totales; por su parte, tanto la concentración de agente gelificante como la temperatura de preparación del oleogel ejercen efectos estadísticamente significativos en orden lineal y cuadrático sobre la oxidación lipídica secundaria y, además, la interacción entre estos dos factores también resulta significativa.

Con respecto a la capacidad de retención de curcumina, el aceite de pescado sin gelificar es el sistema que presenta una capacidad de retención de curcumina más baja y, por tanto, la gelificación del aceite de pescado enriquecido con PUFAs ω -3 puede ser una posible estrategia para aumentar la capacidad de retención de curcumina e, incluso,

llegar casi a duplicarla. Asimismo, se encuentra que la concentración de curcumina ejerce un efecto estadísticamente significativo en orden lineal y cuadrático sobre el porcentaje de curcumina retenida durante el proceso de elaboración, mientras que la concentración de agente gelificante solamente lo hace en orden cuadrático y la interacción entre estas dos variables también resulta significativa.

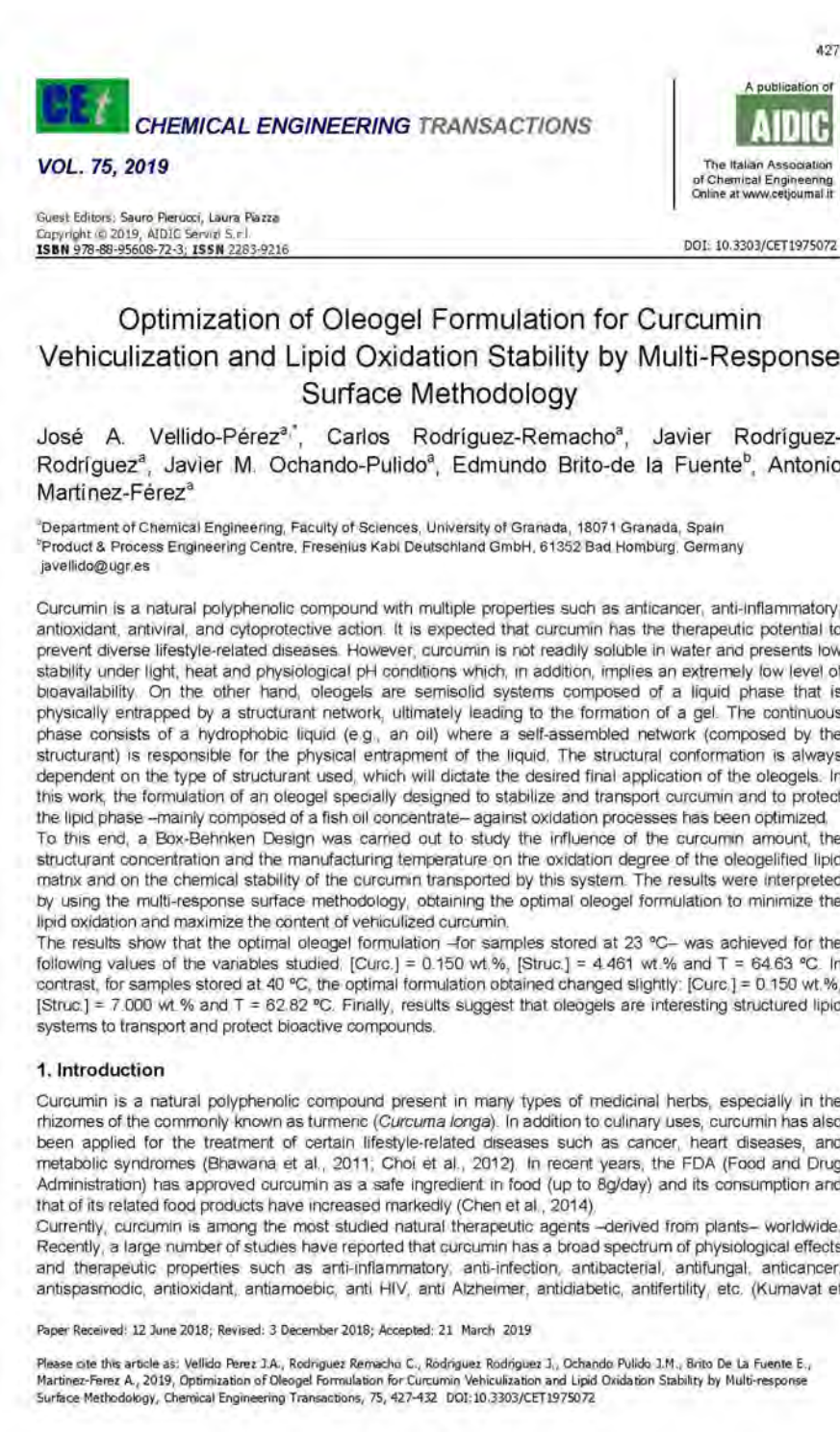
Las condiciones óptimas para minimizar conjuntamente la oxidación lipídica primaria y secundaria a corto plazo (de los oleogeles almacenados a 23 °C) y, a su vez, maximizar la capacidad de retención de curcumina del sistema oleogelificado son: 7.0 % p/p de agente gelificante, 0.05 % p/p de curcumina y 66.0 °C de temperatura de preparación del oleogel, alcanzando una concentración de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos mínima a corto plazo de 3389.6 y 445.9 mg/L, respectivamente, y una capacidad de retención de curcumina máxima durante el proceso de fabricación del 71.8 %. Para los oleogeles almacenados a 40 °C, el conjunto de condiciones óptimas son: 6.6 % p/p de agente gelificante, 0.05 % p/p de curcumina y 60.0 °C de temperatura de preparación del oleogel, alcanzando una concentración de hidroperóxidos lipídicos totales y compuestos aldehídicos mínima a corto plazo de 152754 y 413.4 mg/L, respectivamente, y una capacidad de retención de curcumina máxima durante el proceso de fabricación del 72.8 %.

La curva de viscosidad obtenida para el oleogel óptimo pone de manifiesto un comportamiento pseudoplástico, siendo éste el comportamiento típico de los materiales estructurados. Las funciones G' y G'' son más o menos dependientes de la frecuencia de oscilación, lo cual indica que el oleogel presenta una consistencia más parecida a un líquido que a un sólido. Finalmente, su módulo G' es mayor que su módulo G'' , siendo este comportamiento típico de estructuras de tipo gel débil.

Para terminar, en el caso del oleogel sometido a estímulo fotolítico, la concentración de curcumina disminuye significativamente con el tiempo de forma que, dos semanas después de su preparación, la cantidad presente en el oleogel es de tan solo un 41.9 % de la curcumina inicial. Por su parte, en el caso del oleogel almacenado a alta temperatura (80 °C), una semana después solamente contiene el 53.2 % de la curcumina inicialmente añadida.

4.1.8. Publicaciones derivadas de la investigación

A continuación, se adjunta la publicación derivada de este trabajo de investigación:



Optimization of Oleogel Formulation for Curcumin Vehiculization and Lipid Oxidation Stability by Multi-Response Surface Methodology

José A. Vellido-Pérez^{a,*}, Carlos Rodríguez-Remacho^a, Javier Rodríguez-Rodríguez^a, Javier M. Ochando-Pulido^a, Edmundo Brito-de la Fuente^b, Antonio Martínez-Férez^a

^aDepartment of Chemical Engineering, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain

^bProduct & Process Engineering Centre, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, 61352 Bad Homburg, Germany
javellido@ugr.es

Curcumin is a natural polyphenolic compound with multiple properties such as anticancer, anti-inflammatory, antioxidant, antiviral, and cytoprotective action. It is expected that curcumin has the therapeutic potential to prevent diverse lifestyle-related diseases. However, curcumin is not readily soluble in water and presents low stability under light, heat and physiological pH conditions which, in addition, implies an extremely low level of bioavailability. On the other hand, oleogels are semisolid systems composed of a liquid phase that is physically entrapped by a structurant network, ultimately leading to the formation of a gel. The continuous phase consists of a hydrophobic liquid (e.g., an oil) where a self-assembled network (composed by the structurant) is responsible for the physical entrapment of the liquid. The structural conformation is always dependent on the type of structurant used, which will dictate the desired final application of the oleogels. In this work, the formulation of an oleogel specially designed to stabilize and transport curcumin and to protect the lipid phase –mainly composed of a fish oil concentrate– against oxidation processes has been optimized.

To this end, a Box-Behnken Design was carried out to study the influence of the curcumin amount, the structurant concentration and the manufacturing temperature on the oxidation degree of the oleogelified lipid matrix and on the chemical stability of the curcumin transported by this system. The results were interpreted by using the multi-response surface methodology, obtaining the optimal oleogel formulation to minimize the lipid oxidation and maximize the content of vehiculized curcumin.

The results show that the optimal oleogel formulation –for samples stored at 23 ° C– was achieved for the following values of the variables studied: [Curc.] = 0.150 wt.%, [Struc.] = 4.461 wt.% and T = 64.63 ° C. In contrast, for samples stored at 40 ° C, the optimal formulation obtained changed slightly: [Curc.] = 0.150 wt.%, [Struc.] = 7.000 wt.% and T = 62.82 ° C. Finally, results suggest that oleogels are interesting structured lipid systems to transport and protect bioactive compounds.

1. Introduction

Curcumin is a natural polyphenolic compound present in many types of medicinal herbs, especially in the rhizomes of the commonly known as turmeric (*Curcuma longa*). In addition to culinary uses, curcumin has also been applied for the treatment of certain lifestyle-related diseases such as cancer, heart diseases, and metabolic syndromes (Bhawana et al., 2011; Choi et al., 2012). In recent years, the FDA (Food and Drug Administration) has approved curcumin as a safe ingredient in food (up to 8g/day) and its consumption and that of its related food products have increased markedly (Chen et al., 2014).

Currently, curcumin is among the most studied natural therapeutic agents –derived from plants– worldwide. Recently, a large number of studies have reported that curcumin has a broad spectrum of physiological effects and therapeutic properties such as anti-inflammatory, anti-infection, antibacterial, antifungal, anticancer, antispasmodic, antioxidant, antiamebic, anti HIV, anti Alzheimer, antidiabetic, antifertility, etc. (Kumavat et al., 2013; Ma et al., 2017; Naksuriya et al., 2016; Rai et al., 2015). However, due to its poor solubility in water and low stability under heat, light and physiological pH conditions or in the presence of metal ions, the application of curcumin is limited in food manufacturing. In addition to its physicochemical instability, curcumin presents a very low bioavailability after oral administration. The extremely low level of bioavailability, together with its rapid degradation speed under physiological and/or environmental conditions are the major limitations for the clinical or nutritional application of curcumin. This represents an important challenge, both for the scientific community and for the industry, which must design, develop and optimize systems for the encapsulation, protection, vehiculization, and release of curcumin (and other similar bioactive compounds), which will facilitate its application in the food and pharmaceutical industries, among others.

Different authors have tested many methods or systems to encapsulate curcumin. Bisht et al. (2007) synthesized nanocurcumin –polymeric nanoparticle encapsulated formulation of curcumin– using micellar aggregates of cross-linked and random copolymers of N-isopropylacrylamide, with N-vinyl-2-pyrrolidone and poly(ethyleneglycol)monoacrylate. Unlike free curcumin, they observed that nanocurcumin is readily soluble in aqueous solutions and they demonstrated that nanocurcumin formulation had comparable therapeutic efficacy to free curcumin against pancreatic cancer cell lines *in vitro*, by inhibiting cell viability and colony formation in soft agar. Maiti et al. (2007) developed a new curcumin formulation in combination with phospholipids to explore the protective effect of the curcumin-phospholipid complex on carbon tetrachloride induced acute liver damage in rats. The results obtained showed that the curcumin-phospholipid complex presented better hepatoprotective activity, due to its better antioxidant property, than free curcumin at the same dose level. Thangapazham et al. (2008) incorporated curcumin into liposomes (nanodelivery vehicles primarily composed of phospholipids) coated with prostate membrane specific antigen. The results suggest that liposome formulations are effective nanodelivery vehicles that increase the bioavailability of curcumin and show high therapeutic effects compared with free curcumin. Yu and Huang (2010) proved that hydrophobically modified starch, a food-grade amphiphilic biopolymer, is able to self-assemble to form micelles and to encapsulate curcumin into its hydrophobic core. Encapsulated curcumin revealed increased water solubility by about 1670 folds and the anticancer activity was also enhanced compared to free curcumin. Esmaili et al. (2011) used camel beta-casein, an amphiphilic self-assembling protein, to form micellar nanostructures to encapsulate curcumin. They observed that curcumin encapsulated in beta-casein micelles increased the curcumin solubility up to 2500 folds, its antioxidant activity and bioavailability. Recently, Ma et al. (2017) used oil-in-water nanoemulsions varying the triacylglycerol compositions to incorporate curcumin. These authors concluded that the curcumin nanoemulsion could reach the highest amount of curcumin by choosing medium chain triglycerides as the oil phase, providing an interesting reference to enhance the application of curcumin in the food industry, improving its solubility and bioavailability.

On the other hand, oleogels are examples of alternatively (non-TAG)-structured lipid systems that are recently being a subject of huge research interest due to their applications as fat replacements in a variety of food products and due to their enormous potential in different fields such as lubrication, separation science, pharmaceuticals and foods (Martins et al., 2018; Patel et al., 2013). Oleogels are semisolid systems –soft matter systems– composed of a liquid phase that is physically entrapped by a structurant network, ultimately leading to the formation of a gel. The continuous phase is made of a hydrophobic liquid (like oil or an organic solvent) where a self-assembled network (composed by the structurant or gelling agent) is responsible for the physical entrapment of the liquid (Patel et al., 2013). The structural conformation is always dependent on the type of structurant used, which will dictate the desired final application of the oleogels. Some of the most significant physical properties of oleogels are a consequence of the type of structurant used to induce gelation (fatty acid derivatives, cellulose polymers, shellac, natural waxes –plant and animal– and resins, phytosterols and oryzanol, lecithin, etc.) and the type of the method used (direct or indirect) (Martins et al., 2018). One of the main advantages of this type of systems is that they can modify different physicochemical properties, the rheological behaviour, and texture properties; to control phases separation and decrease the mobility and migration of lipophilic bioactive compounds (such as curcumin, etc.) from the oil phase, providing solid-like properties without using high levels of saturated fatty acids as well as to be a carrier of interesting bioactive compounds for the cosmetic, food and pharmaceutical industries (Osullivan et al., 2017). In addition, by creating a gel-like structure, diffusion of oxygen and pro-oxidant metals inside the oil phase is hindered, thus protecting the polyunsaturated fatty acids contained in the oil.

This study aimed to develop and optimize a physicochemically stable oleogel formulation containing a high content of curcumin and, in turn, minimizing the lipid oxidation of the oleogelified matrix –mainly composed of fish oil enriched in omega-3 polyunsaturated fatty acids.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Fish oil enriched in omega-3 polyunsaturated fatty acids (PronovaPure oil containing 36.0 % EPA and 24.0 % DHA TG Deodorized) and Palsgaard® 6111 powder (fully hydrogenated rapeseed oil, kindly supplied by Palsgaard, Denmark) were used as the oil phase and gelling agent for the preparation of all oleogels in this study. Curcumin (E-100, 85 % purity) was received from Solutex, Spain.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of oleogels

All the oleogels were prepared to disperse accurately weighed quantities of Palsgaard® 6111 and curcumin into fish oil to achieve the concentration ranges desired. The samples were premixed for 2 minutes using a magnetic stirrer at maximum agitation speed (1600 rpm). Later, the mixtures were heated using bain-marie at different temperatures (always above the melting point of the Palsgaard® 6111, > 60 ° C) under mild agitation (400 rpm). Heating was performed as quickly as possible to minimize curcumin and fish oil exposure to heat. Dispersions of curcumin were then immediately cooled to room temperature (23 ° C) while being stirred using the magnetic stirrer at maximum agitation speed (1600 rpm), until curcumin was fully dispersed in the oil phase and no specks were visible (~ 3 minutes), resulting in the formation of oleogels. The latter, immediately after formation, were placed in a sealed screw cap glass tube and kept in an oven for 50 days at 23 and 40 ° C to promote potential oxidation processes. The described method ensured that the curcumin was fully dissolved in the oil phase before oleogelified structure formation.

2.2.2. Lipid oxidation measurements

Oleogel chemical stability was determined by measuring the lipid oxidation after its preparation and during storage. To this end, both primary and secondary lipid oxidation products were measured. The first ones were quantified by the peroxide value method (PV) using the colorimetric ferric-thiocyanate method, adapted from Shantha and Decker (1994), and the second ones using the p-anisidine value technique (p-AnV), described in the American Oil Chemical Society (AOCS) CD 18-90 (1998).

2.2.3. Curcumin stability studies

The content of curcumin was determined by UV spectrophotometry. Measurements (wavelength equal to 425 nm) were carried out at 23 ° C after diluting 500 times in 95 % ethanol. A standard curve was used to quantify the content of curcumin in the oleogels.

2.2.4. Statistical analysis

Table 1: BBD matrix for the optimization of the oleogel formulation.

Experiment	[Curc.], wt.%	[Struc.], wt.%	T, ° C
Control	0.10	0.0	70
Exp 1	0.15	5.0	80
Exp 2	0.10	3.0	60
Exp 3	0.10	5.0	70
Exp 4	0.15	7.0	70
Exp 5	0.10	3.0	80
Exp 6	0.05	7.0	70
Exp 7	0.10	7.0	60
Exp 8	0.05	3.0	70
Exp 9	0.05	5.0	80
Exp 10	0.10	7.0	80
Exp 11	0.10	5.0	70
Exp 12	0.15	3.0	70
Exp 13	0.10	5.0	70
Exp 14	0.05	5.0	60
Exp 15	0.15	5.0	60

Both the oleogel formulation and the manufacturing conditions were optimized by a statistical experimental design in combination with an analysis of the multi-response surface. In this study, the curcumin content, the amount of structuring agent and the manufacturing temperature were selected as independent variables, and the oxidation degree of the oleogelified lipid matrix and the amount of vehiculized curcumin as response surface (RF). The ranges tested for the selected variables were equal to 0.05-0.15 wt.% for the curcumin content, 3.0-7.0 wt.% for the amount of structurant and 60-80 ° C for the manufacturing temperature. A Box-Behnken Design (BBD) was applied to simultaneously calculate the effect of the change in each of these variables and also their possible interactions. Three levels were considered for each variable, including three repetitions of the central point to verify the reproducibility of the model, which results in a total of 15 experiments (Table 1). In addition to the oleogels obtained by means of the experimental design, a control sample was prepared by dissolving curcumin (0.10 wt.%) directly in fish oil enriched in omega-3 PUFAs at a medium manufacturing temperature (70 ° C), following the procedure described in the section 2.2.1. The reason for preparing this control sample was to be able to compare the

beneficial effect provided by the use of oleogels versus ungelled fish oil. The experimental conditions were established randomly combining the minimum, medium and maximum values of each variable studied. The optimization of the model was carried out with the software *Statgraphics Centurion XV* and the results were interpreted by using the multi-response surface methodology (M-RSM).

3. Results and discussion

3.1. Lipid oxidation stability of the oleogels

Fig. 1 shows the evolution in time of the lipid oxidation measured at two different storage temperatures (23 and 40 ° C) –Fig. 1A corresponds to the concentration of lipid hydroperoxides and Fig. 1B to the concentration of secondary lipid oxidation products.

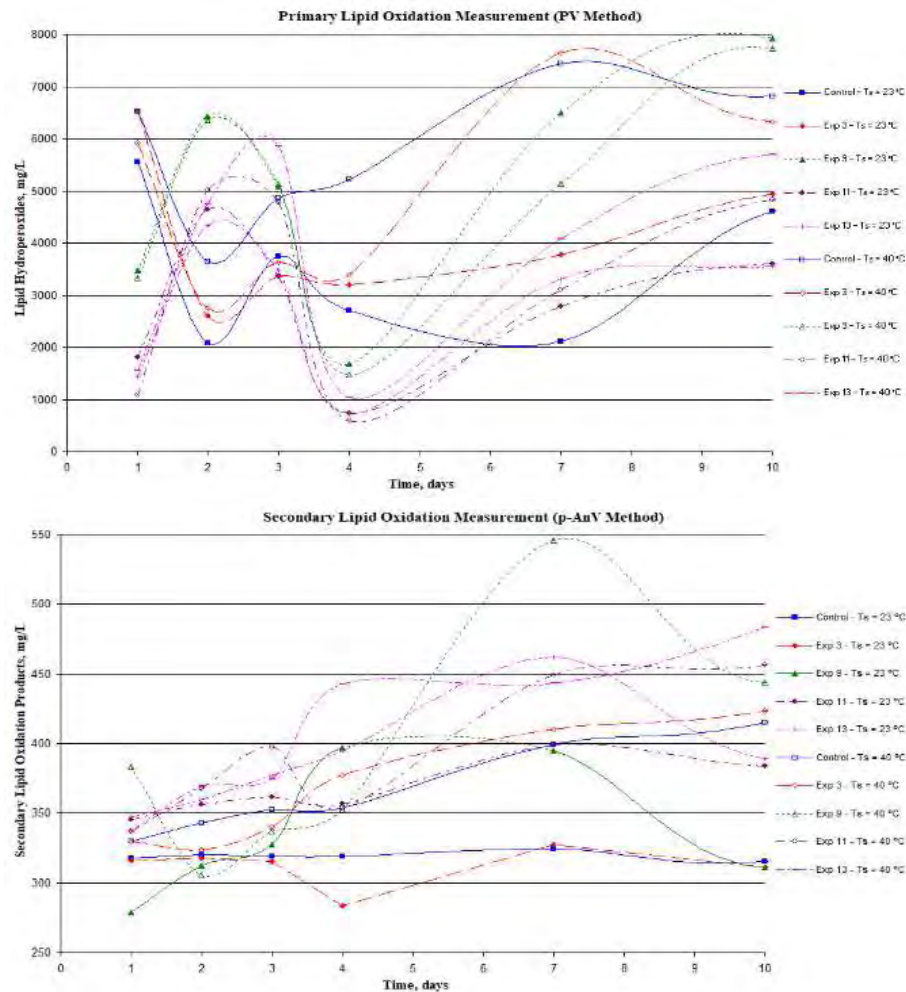


Figure 1: Lipid oxidation measured as a function of time at two different storage temperatures (23 ° C and 40 ° C). (A) Concentration of lipid hydroperoxides and (B) concentration of secondary lipid oxidation products.

As it can be seen, different evolution patterns occurred depending on the studied variables. In Fig. 1A, the appearance of areas in which the concentration of lipid hydroperoxides increases and areas in which decreases is frequent. The former would represent the oxidative processes experienced by the PUFAs when they react with oxygen and produce these primary lipid oxidation products, while the latter would represent the oxidation of these primary oxidation products to give rise to the secondary lipid oxidation products. Therefore, depending on the rates of the primary and secondary oxidation reactions, there will be an increase or a decrease in the concentration of lipid hydroperoxides. In addition, from a careful analysis of the concentration of lipid hydroperoxides of the different samples tested, interesting conclusions can be drawn. It was observed that oleogels 11 and 13 showed the lowest final lipid

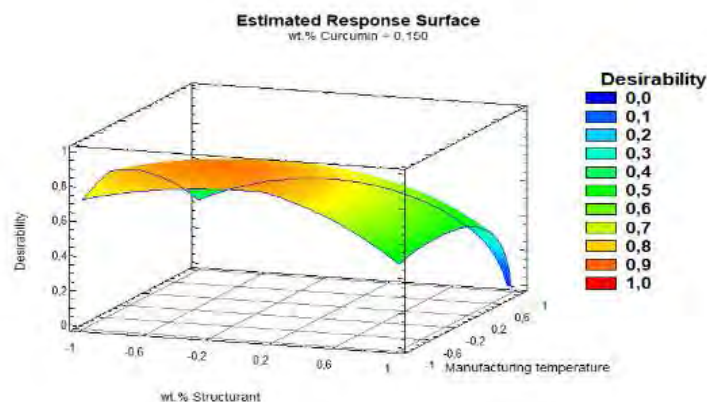
hydroperoxide concentrations, even lower than that exhibited by the control sample for the same period of time (note that the only difference between samples 11 and 13 and the control is that the former contained a certain amount of structurant and, therefore, formed oleogelified structures, while the control did not carry structurant and, therefore, did not form an oleogel). These results suggest that oleogelified systems offer greater protection against the oxidation processes of PUFAs, probably due to the modification of the rheological properties of the system, especially the increase of its viscosity, which would reduce the oxygen diffusion process through the lipid matrix and, therefore, lead to an increase of their oxidative stability. According to this, oleogel 9, containing the lowest concentration of curcumin and manufactured at the highest temperature, is the one that showed the worst performance against primary oxidation.

On the other hand, unlike what occurred in the study of primary lipid oxidation, in the samples stored at 23 ° C of Fig. 1B it can be noted that the concentration of secondary lipid oxidation products remains relatively constant throughout the time studied; however, in the samples stored at 40 ° C, areas in which the concentration of secondary lipid oxidation products increases and areas in which decreases are again observed. The increase in the concentration of secondary lipid oxidation products is due to the oxidative processes experienced by the primary lipid oxidation products when they react with oxygen, while the decrease in concentration is due to the oxidation of these secondary products that leads to the formation of volatile and low-molecular-weight compounds. Therefore, these results suggest that these secondary lipid oxidation processes require higher storage temperatures or, on another hand, occur at longer storage times. Furthermore, it was observed that oleogels 11 and 13 showed relatively high final secondary lipid oxidation products concentrations compared to the concentration exhibited by the control sample during the same period of time. In view of these results, the lower lipid hydroperoxides concentration of these oleogels could be attributed to the fact that part of their lipid hydroperoxides had already been oxidized and become secondary lipid oxidation products. In contrast, oleogel 9 showed secondary lipid oxidation products concentration values similar to those measured in the control sample and, in any case, lower than those of oleogels 11 and 13. This may be due to the fact that this oleogel formulation retards the oxidation of the primary to secondary lipid oxidation products for a longer time and, consequently, the secondary lipid oxidation products concentration is lower at the expense of the secondary lipid oxidation products concentration, which is higher.

Therefore, as has been reported by Kargar (2014), a lower primary lipid oxidation products concentration usually leads to a higher secondary lipid oxidation products concentration and vice versa. Consequently, a compromise solution must be reached, seeking the optimal oleogel formulation so that the primary and secondary lipid oxidation products concentrations, together, are minimal.

3.2. Optimization study of the oleogel formulation

The M-RSM was applied to achieve the optimal oleogel formulation which, in this case, involved minimizing the lipid oxidation of the oleogel and maximizing the amount of vehiculized curcumin. The results are shown in fig. 2, that represents the estimated response surface for the effect of the amount of structuring agent and the manufacturing temperature on the overall desirability for a constant curcumin content (equal to the optimum reached in each case) at two different storage temperatures (figs. 2A and 2B, respectively).



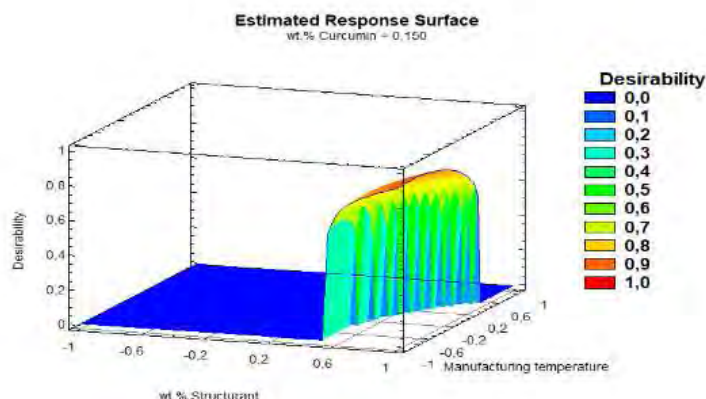


Figure 2: Estimated multi-response surface for the effect of the amount of structurant and the manufacturing temperature on the overall desirability, for a constant curcumin content at two different storage temperatures. (A) 23 ° C and (B) 40 ° C.

As explained before, secondary lipid oxidation takes place from the products generated in primary lipid oxidation; therefore, minimizing the latter will intrinsically reduce the former. On the other hand, curcumin has beneficial therapeutic properties; however, its presence in the oleogel does not deteriorate the quality of the final product, unlike what happens with the oxidative processes of fish oil. According to this, different importance for each of the RFs were considered, assigning different weights. The weighting applied to each of the RFs for the optimization study is 50 % for primary lipid oxidation, 10 % for secondary lipid oxidation and 40 % for the content of curcumin in the oleogel, obtaining the optimal result shown in Table 2.

Table 2: Optimized input parameters for the oleogel formulation.

T _{storage} , ° C	[Curc.], wt. %	[Struc.], wt. %	T, ° C	Desirability
23	0.150	4.461	64.63	0.881
40	0.150	7.000	62.82	0.911

Table 2 shows that the optimum amount of curcumin is the maximum of those tested. Thanks to its antioxidant capacity, the oxidative processes of fish oil concentrate are minimized, in addition, to maximize its presence in the oleogel. On the other hand, the highest optimal structurant concentration obtained for samples stored at 40 ° C compared to those stored at 23 ° C confirms what was mentioned in the previous section: oleogelified systems offer greater protection against the oxidation processes of PUFAs, favored at higher storage temperatures. Finally, it is known that temperature increases the speed of any reaction so that the optimum manufacturing temperatures are relatively low in both cases and close to the minimum necessary to form the oleogel.

4. Conclusions

By using the M-RSM, the optimal oleogel formulation was determined in order to minimize the lipid oxidation of the oleogel and maximize the content of vehiculized curcumin. The optimum conditions for samples stored at 23 ° C were achieved for the following values of the variables studied: [Curc.] = 0.150 wt.%, [Struc.] = 4.461 wt.% and T = 64.63 ° C; while for samples stored at 40 ° C, the optimal formulation obtained changed slightly: [Curc.] = 0.150 wt.%, [Struc.] = 7.000 wt.% and T = 62.82 ° C. These results suggest that oleogels are very interesting structured lipid systems to transport and protect bioactive compounds.

Acknowledgments

This work was supported by the Research Group TEP025 “Technologies for Chemical and Biochemical Processes” from the Chemical Engineering Department of the University of Granada. The Ministry of

Education, Culture and Sport (MECD) is deeply grateful for supporting the grant FPU17/03005 of Mr. Vellido-Perez.

References

- AOCS, 1998. p-Anisidine value. In: Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists. Method CD 18-90.
- Bisht, S., Feldmann, G., Soni, S., Ravi, R., Karikar, C., Maitra, A., Maitra, A., 2007. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): A novel strategy for human cancer therapy. *J. Nanobiotechnology* 5.
- Bhawana, Basniwal, R.K., Buttar, H.S., Jain, V.K., Jain, N., 2011. Curcumin nanoparticles: Preparation, characterization, and antimicrobial study. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2056-2061.
- Chen, Z., Xia, Y., Liao, S., Huang, Y., Li, Y., He, Y., Tong, Z., Li, B., 2014. Thermal degradation kinetics study of curcumin with nonlinear methods. *Food Chem.* 155, 81-86.
- Choi, H.A., Kim, M.-R., Park, K.A., Hong, J., 2012. Interaction of over-the-counter drugs with curcumin: Influence on stability and bioactivities in intestinal cells. *J. Agric. Food Chem.* 60, 10578-10584.
- Esmaili, M., Ghaffari, S.M., Moosavi-Movahedi, Z., Atri, M.S., Sharifzadeh, A., Farhadi, M., Yousefi, R., Chobert, J.-M., Haertlé, T., Moosavi-Movahedi, A.A., 2011. Beta casein-micelle as a nano vehicle for solubility enhancement of curcumin; food industry application. *LWT – Food Sci. Technol.* 44, 2166-2172.
- Kargar, M., 2014. Emulsion design for protection of chemically sensitive bioactive. University of Birmingham.
- Kumavat, S.D., Chaudhari, Y.S., Borole, P., Mishra, P., Shenghani, K., Duvvuri, P., 2013. Degradation studies of curcumin. *Int. J. Pharm. Rev. Res.* 3, 50-55.
- Ma, P., Zeng, Q., Tai, K., He, X., Yao, Y., Hong, X., Yuan, F., 2017. Preparation of curcumin-loaded emulsion using high pressure homogenization: Impact of oil phase and concentration on physicochemical stability. *LWT – Food Sci. Technol.* 84, 34-46.
- Maiti, K., Mukherjee, K., Gantait, A., Saha, B.P., Mukherjee, P.K., 2007. Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *Int. J. Pharm.* 330, 155-163.
- Martins, A.J., Vicente, A.A., Cunha, R.L., Cerqueira, M.A., 2018. Edible oleogels: An opportunity for fat replacement in foods. *Food Funct.* 9, 758-773.
- Naksuriya, O., Vansteenberghe, M.J., Torano, J.S., Okonogi, S., Hennink, W.E., 2016. A kinetic degradation study of curcumin in its free form and loaded in polymeric micelles. *AAPS J.* 18, 777-787.
- Osullivan, C.M., Davidovich-Pinhas, M., Wright, A.J., Barbut, S., Marangoni, A.G., 2017. Ethylcellulose oleogels for lipophilic bioactive delivery-effect of oleogelation on: In vitro bioaccessibility and stability of beta-carotene. *Food Funct.* 8, 1438-1451.
- Patel, A.R., Schatteman, D., De, V., Lesaffer, A., Dewettinck, K., 2013. Preparation and rheological characterization of shellac oleogels and oleogel-based emulsions. *J. Colloid Interface Sci.* 411, 114-121.
- Rai, M., Pandit, R., Gaikwad, S., Yadav, A., Gade, A., 2015. Potential applications of curcumin and curcumin nanoparticles: From traditional therapeutics to modern nanomedicine. *Nanotechnol. Rev.* 4, 161-172.
- Shantha, N.C., Decker, E.A., 1994. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *J. AOAC Int.* 77, 421-424.
- Thangapazham, R.L., Puri, A., Tele, S., Blumenthal, R., Maheshwari, R.K., 2008. Evaluation of a nanotechnology-based carrier for delivery of curcumin in prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* 32, 1119-1123.
- Yu, H., Huang, Q., 2010. Enhanced in vitro anti-cancer activity of curcumin encapsulated in hydrophobically modified starch. *Food Chem.* 119, 669-674.

4.2. Diseño, desarrollo y optimización de un sistema de liberación basado en emulsiones W/Og rico en PUFAs ω -3 y curcumina

En este capítulo se exponen los resultados obtenidos para el segundo objetivo de esta Tesis Doctoral, el diseño y desarrollo de un sistema de liberación basado en emulsiones W/Og fisicoquímicamente estable para la encapsulación en la fase continua, protección, vehiculización y liberación de altas dosis de PUFAs ω -3 y curcumina por vía oral. Para ello, primero se estudió la influencia de la composición y las condiciones de operación del sistema emulsificado sobre su estabilidad física y oxidativa, así como sobre su capacidad para proteger y estabilizar en el tiempo curcumina vehiculizada. Este estudio se realizó mediante dos metodologías de homogenización diferentes: homogenización a alta velocidad de cizalla y a alta presión. Finalmente, y en base a estos resultados, se aplicó la metodología de superficie de respuesta para obtener la formulación y condiciones de operación óptimas de la emulsión W/Og con las que diseñar y desarrollar otros sistemas de liberación más complejos.

4.2.1. Diseño de experimentos

Tras una revisión bibliográfica minuciosa y de acuerdo con nuestra experiencia previa en el diseño y desarrollo de otras emulsiones W/O, se seleccionaron las variables independientes más importantes a considerar en un DOE y sus rangos correspondientes: por un lado, las concentraciones de fase dispersa (25–35 % p/p) y emulgente hidrofóbico (PGPR, 2.0–6.0 % p/p) y, por otro, la velocidad (12000–18000 rpm) o la presión (6000–10000 psi) de homogenización, según corresponda, en función del método utilizado para la emulsificación. A partir de estas variables independientes, se aplicó un diseño central compuesto en 3 bloques completamente aleatorizado para evaluar simultáneamente los efectos de todas ellas y de sus posibles interacciones sobre el tamaño de partícula, la oxidación primaria y secundaria y la capacidad de retención

de curcumina (variables respuesta). Se contemplaron 5 niveles por factor (punto axial máximo, punto factorial máximo, punto central, punto factorial mínimo y punto axial mínimo) para facilitar la construcción de modelos polinómicos de segundo grado y se eligió una distancia axial adecuada para cumplir la propiedad de rotabilidad del diseño. Además, se efectuaron 3 repeticiones del punto central para la estimación del error experimental, haciendo un total de 17 ensayos que se recogen en las Tablas 22 y 23.

A este diseño experimental se le añadió una muestra adicional (control) que consistió en el mismo oleogel que el utilizado para la elaboración de las emulsiones W/Og. Con ella se pretendía evaluar el impacto del proceso de emulsificación del oleogel sobre la oxidación lipídica y la capacidad de retención de curcumina.

Tabla 22. Matriz de experimentos del diseño central compuesto para la emulsión W/Og homogenizada a alta velocidad.

N° de experimento	[Fase dispersa], % p/p	[Emulgente], % p/p	Velocidad de homogenización, rpm
1	35	2.0	18000
2	25	2.0	12000
3	25	6.0	18000
4	30	4.0	15000
5	35	6.0	12000
6	30	4.0	15000
7	25	2.0	18000
8	35	6.0	18000
9	25	6.0	12000
10	35	2.0	12000
11	30	7.35	15000
12	30	0.65	15000
13	30	4.0	20000
14	21.63	4.0	15000
15	30	4.0	10000
16	38.37	4.0	15000
17	30	4.0	15000

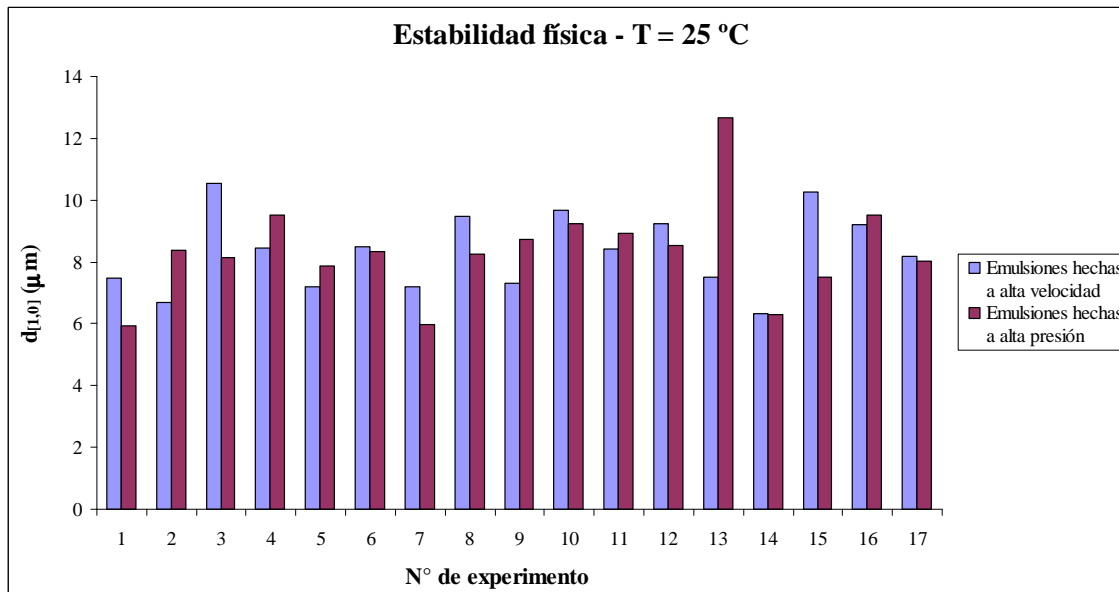
Tabla 23. Matriz de experimentos del diseño central compuesto para la emulsión W/Og homogenizada a alta presión.

N° de experimento	[Fase dispersa], % p/p	[Emulgente], % p/p	Presión de homogenización, psi
1	35	2.0	10000
2	25	2.0	6000
3	25	6.0	10000
4	30	4.0	8000
5	35	6.0	6000
6	30	4.0	8000
7	25	2.0	10000
8	35	6.0	10000
9	25	6.0	6000
10	35	2.0	6000
11	30	7.35	8000
12	30	0.65	8000
13	30	4.0	11500
14	21.63	4.0	8000
15	30	4.0	4500
16	38.37	4.0	8000
17	30	4.0	8000

4.2.2. Efecto de las variables de operación sobre la estabilidad física

La Figura 72 representa comparativamente el tamaño medio de gota ($d_{[1,0]}$) de las emulsiones W/Og preparadas tanto a alta velocidad como a alta presión, medido inmediatamente después de su elaboración (a tiempo 0). Los tamaños medios de las emulsiones W/Og preparadas a alta velocidad estuvieron comprendidos entre 6.319 μm (emulsión 14) y 10.538 μm (emulsión 3), mientras que los diámetros medios de gota de las emulsiones W/Og preparadas a alta presión se encontraron en el rango 5.919 μm (emulsión 1) y 12.658 μm (emulsión 13).

Figura 72. Tamaño medio de gota de las diferentes emulsiones W/Og inmediatamente después de su elaboración.



Según algunos trabajos, en condiciones de homogenización adecuadas, el tamaño de gota depende en gran medida de las características del aceite y del emulsionante utilizado (Yuan et al., 2008; Bai et al., 2016; Niknam et al., 2020). Todas las emulsiones W/Og de la Figura 72 tienen idénticas concentraciones de fase dispersa y emulgente hidrofóbico, diferenciándose únicamente en el método de homogenización utilizado (alta velocidad o alta presión). Por tanto, las diferencias observadas en los tamaños medios de gota de cada experimento se deben exclusivamente al método de homogenización empleado, y no a la composición del sistema emulsificado. En principio, la homogenización a alta presión aporta mayores cantidades de energía que la homogenización a alta velocidad y, por consiguiente, debería dar lugar a emulsiones con diámetros medios de gota más pequeños. Sin embargo, en las emulsiones 2, 4, 5, 9, 11, 13 y 16, la homogenización a alta velocidad produjo tamaños medios de gota menores mientras que, para el resto de muestras, sucedió justo lo contrario y dio lugar a diámetros medios más grandes. La razón para este efecto observado sobre el tamaño de gota probablemente se encuentre en el hecho de que presiones altas pueden romper el oleogel de la fase continua y así distorsionar los tamaños de gota obtenidos. A priori, no se ha observado en esas emulsiones ningún tipo de patrón respecto a las concentraciones de fase dispersa o emulgente hidrofóbico que permita justificar esas diferencias.

A continuación, se presenta el modelo cuadrático ajustado para el diámetro medio de gota inicial ($d_{[1,0]}$) de los sistemas W/Og emulsificados a alta velocidad, en función de las variables independientes consideradas y de sus interacciones; en el caso de las emulsiones W/Og elaboradas a alta presión, el tipo de modelo propuesto no resultó ser adecuado ($R^2 = 34.07\%$) y, por tanto, se debería evaluar si un modelo más complejo permitiría ajustar esos datos experimentales. Sin embargo, dado que todos los tamaños medios obtenidos fueron del mismo orden de magnitud que los de las emulsiones W/Og a alta velocidad (la diferencia de tamaños promedio fue igual a 1.260 μm), cabe esperar que todas ellas presenten una estabilidad física similar y, por consiguiente, no es indispensable el ajuste de un modelo matemático para optimizar esta variable respuesta en las emulsiones W/Og elaboradas a alta presión.

Modelo a alta velocidad de cizalla: $d_{[1,0]} = 8.60143 + 0.511346*[Fase\ dispersa] - 0.333031*[Fase\ dispersa]^2 - 0.55925*[Fase\ dispersa]*[Emulgente] - 0.456*[Fase\ dispersa]*[Velocidad] + 0.90075*[Emulgente]*[Velocidad]$ Ec. [31]

En las emulsiones W/Og elaboradas a alta velocidad de cizalla, el valor p del primer modelo obtenido al considerar todas las variables independientes y sus correspondientes interacciones resultó ser superior a 0.05, indicando que no existe una relación significativa entre las variables dependiente e independientes. Eliminando secuencialmente aquellas variables estadísticamente menos significativas ($Velocidad$, $[Emulgente]^2$, $Velocidad^2$ y $[Emulgente]$), se pudo simplificar el modelo y se llegó a obtener uno adecuado (Ec. 31). El nuevo modelo matemático ($p_{MOD} = 0.0354$) presentó un R^2 del 62.13 % y un valor p_{LOF} de 0.3633 (Tabla 24) que, al ser mayor de 0.05, puede decirse que sí que es apropiado para ajustar los datos observados con un nivel de confianza del 95 %. Asimismo, la ausencia de un patrón definido en la gráfica de los residuos contra los valores ajustados o predichos (Figura 73) confirma la idoneidad del modelo propuesto.

El análisis de la varianza (ANOVA) de los valores observados (Tabla 24) permitió determinar el valor p para cada una de las variables independientes y de sus interacciones. De todas ellas, la interacción $[Emulgente]*[Velocidad]$ es el único factor

que arrojó un valor p inferior a 0.05, por lo que puede afirmarse que es la única variable que ejerce un efecto estadísticamente significativo sobre el tamaño medio de gota.

Tabla 24. Análisis de la varianza (ANOVA) para el tamaño medio de gota inicial de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor p^*
[Fase dispersa]	3.55605	1	3.55605	4.73	0.0726
[Fase dispersa] ²	1.41965	1	1.41965	1.89	0.2185
[Fase dispersa]*[Emulgente]	2.50208	1	2.50208	3.33	0.1179
[Fase dispersa]*Velocidad	1.66349	1	1.66349	2.21	0.1874
[Emulgente]*Velocidad	6.4908	1	6.4908	8.63	0.0260
Falta de ajuste	5.01771	5	1.00354	1.33	<i>0.3633</i>
Error puro	4.51071	6	0.751785		
Total (corr.)	25.1605	16			

* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

Figura 73. Gráfica de residuos para el tamaño medio de gota inicial de las emulsiones W/Og preparadas a alta velocidad.

Gráfica de residuos para d[1,0] a alta velocidad

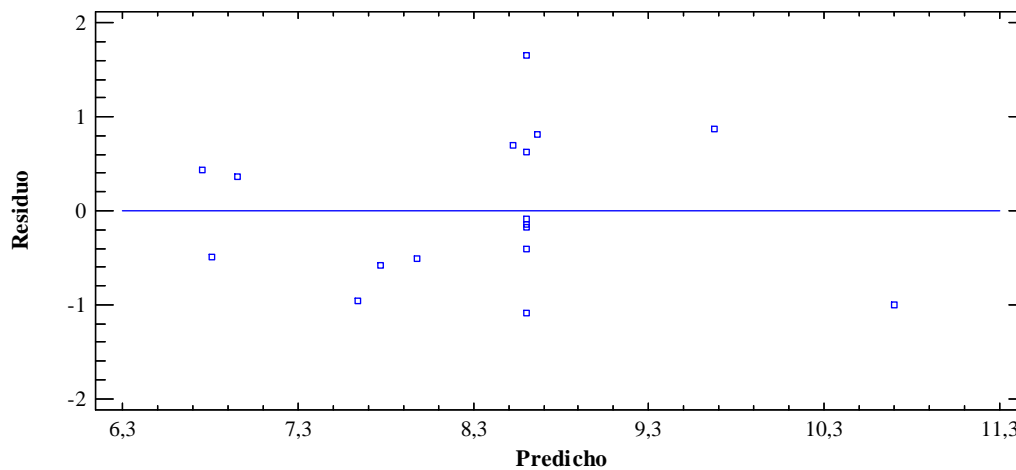
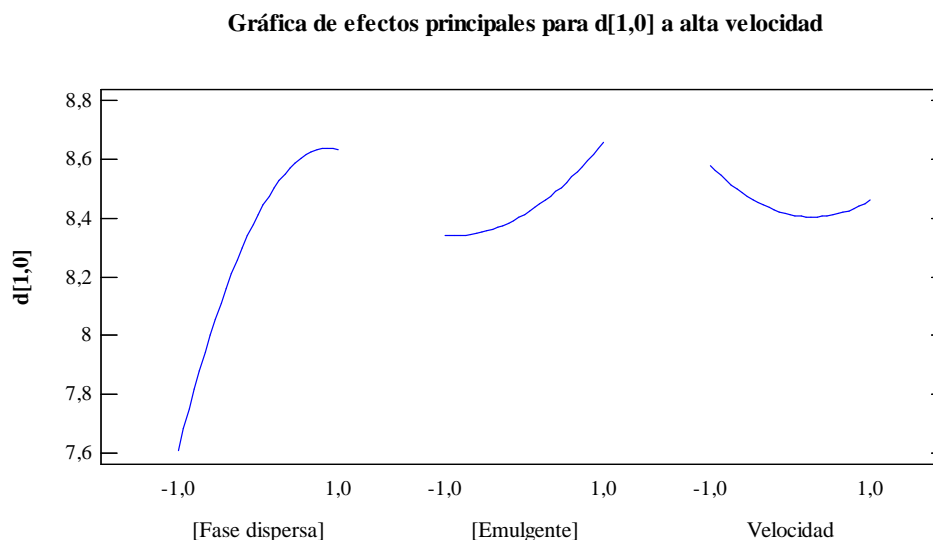


Figura 74. Gráfica de efectos principales para el tamaño medio de gota inicial de las emulsiones W/Og preparadas a alta velocidad.



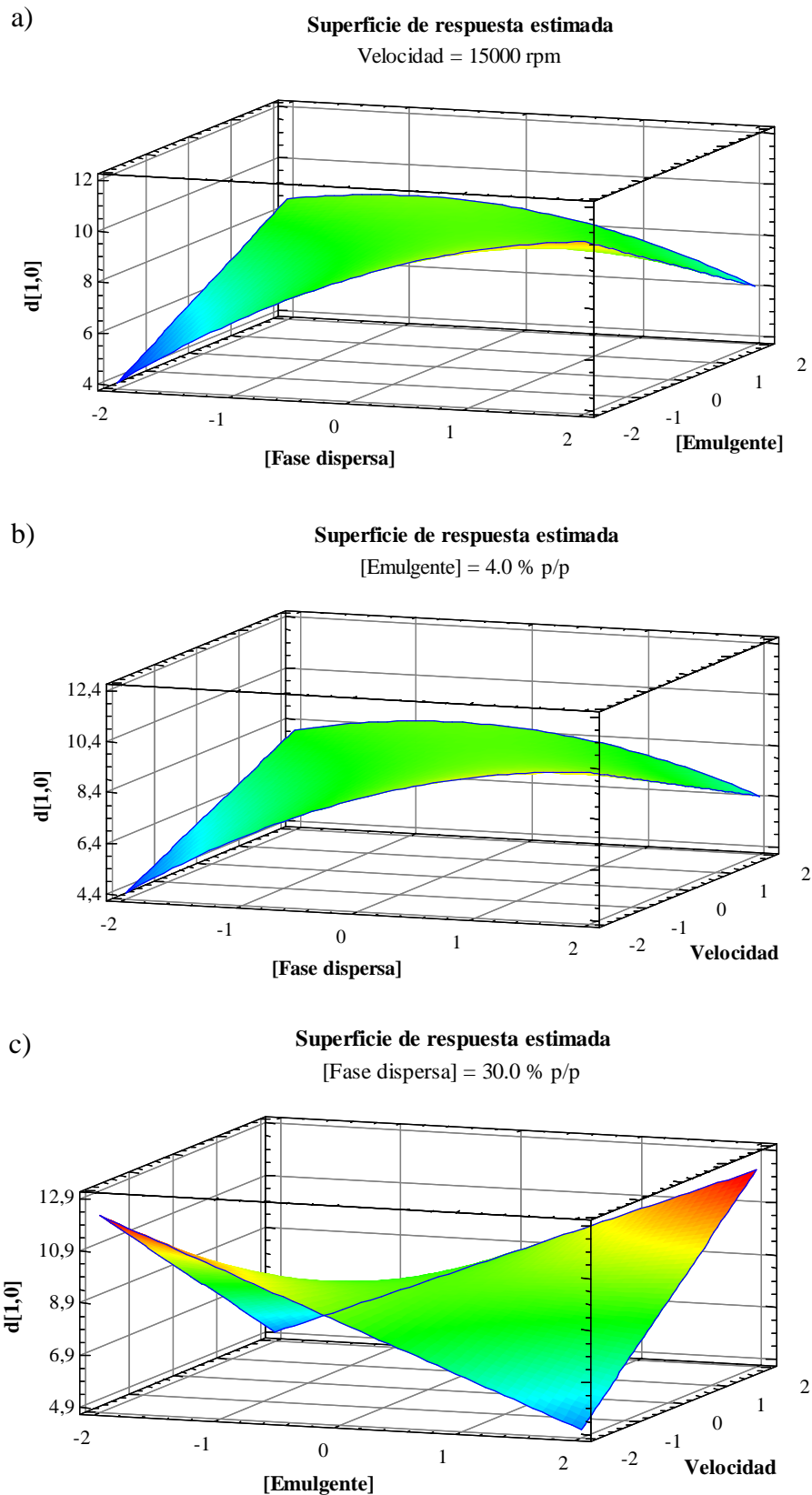
De acuerdo con la gráfica de efectos principales (Figura 74) se deduce que, a bajas concentraciones de emulgente, el diámetro medio de gota obtenido es menor y, a medida que la cantidad de emulgente utilizada en la emulsión W/Og aumentó, el tamaño medio de las gotas resultantes fue cada vez mayor. Respecto a la velocidad de homogenización, bajas velocidades de homogenización dieron lugar a emulsiones W/Og con tamaños de gota inicial más grandes y, a medida que la velocidad de homogenización aumentó, el tamaño de gota inicial se redujo hasta alcanzar un diámetro mínimo a partir del cual, aunque se siguiese aumentando la velocidad, el tamaño de gota no disminuyó más. No obstante, no son estas variables por separado sino su interacción, la que resultó estadísticamente significativa sobre el tamaño medio de gota inicial, $d_{[1,0]}$.

La estabilidad física de diferentes sistemas emulsionados con PGPR ya ha sido previamente estudiada en varios trabajos (Cheng et al., 2006; Fechner et al., 2007; Bonnet et al., 2009). Todos ellos coinciden en afirmar que aumentando la concentración de PGPR se obtienen tamaños de gota iniciales más pequeños que, finalmente, conducen a estabilidades físicas más prolongadas en el tiempo (Márquez et al., 2010). Este hecho parece contradecir los resultados aquí obtenidos, en los que mayores concentraciones de emulgente dieron lugar a tamaños de gota iniciales más grandes; sin embargo, la explicación se halla en la principal diferencia entre aquellos sistemas y

estos: el tipo de fase continua empleada. En efecto, el PGPR produce un aumento de la viscosidad de la fase continua (Su et al., 2006) que, en el caso de las emulsiones W/O, favorece la dispersión y estabilización de la fase acuosa y conduce a tamaños de gota iniciales más pequeños; en cambio, en las emulsiones W/Og, la fase continua ya está gelificada y, por tanto, su viscosidad es mayor que la del aceite de partida. En este último caso, concentraciones de PGPR más elevadas pueden dar lugar a una viscosidad excesiva de la fase continua (oleogel) que llegue a entorpecer y dificultar el propio proceso de dispersión y emulsificación de la fase acuosa y, por tanto, crear gotas más grandes. Precisamente por ello, es la interacción [*Emulgente*]**Velocidad* una variable estadísticamente significativa sobre el tamaño medio de gota inicial y, para reducirlo, se requieren cantidades de emulgente pequeñas –el PGPR posee un alto poder emulsionante (Márquez et al., 2007)– y velocidades de homogenización elevadas. No obstante, conviene destacar que los tamaños de gota iniciales mayores se compensan con la mayor viscosidad de la fase continua y, por tanto, en el caso particular de las emulsiones W/Og, gotas más grandes no necesariamente implican una menor estabilidad física del sistema.

Una vez establecida la ecuación matemática que permite modelar el tamaño medio de gota inicial, $d_{[1,0]}$, de las emulsiones W/Og preparadas a alta velocidad con las variables independientes, se obtuvieron las condiciones óptimas para minimizar esos tamaños. En efecto, estableciendo una concentración de fase dispersa del 22.05 % p/p, una concentración de emulgente hidrofóbico de 0.65 % p/p y una velocidad de homogenización de 20000 rpm, se podría llegar a alcanzar un tamaño de gota inicial medio de 4.151 μm . La Figura 75 representa la superficie de respuesta estimada para las diferentes combinaciones de variables independientes.

Figura 75. Superficie de respuesta estimada para el tamaño medio de gota inicial de las emulsiones W/Og preparadas a alta velocidad.



4.2.3. Efecto de las variables de operación sobre la estabilidad oxidativa

Las Tablas 25 y 26 muestran la concentración de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos (productos primarios y secundarios de la oxidación) de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad y a alta presión, todas almacenadas a 25 °C. Como ya se hizo en el caso de los oleogel, con objeto de solventar el inconveniente de la dependencia temporal de la oxidación lipídica primaria y secundaria y poder comparar entre sí las distintas emulsiones W/Og, se estableció un periodo de tiempo determinado sobre el que realizar el análisis. Puesto que el óptimo de la emulsión W/Og se utilizará como punto de partida para el diseño y desarrollo de sistemas de liberación basados en emulsiones múltiples $W_1/Og/W_2$, no como un producto final en sí mismo, se analizaron periodos de tiempo más cortos. Así pues, en este caso se fijó un tiempo de tan solo 10 días contados a partir del día de la elaboración del sistema de liberación y, a partir de estos resultados, se ajustaron los modelos apropiados.

En el caso de las emulsiones W/Og a alta velocidad, la concentración de hidroperóxidos lipídicos obtenida experimentalmente estuvo comprendida entre los 4465.4 mg/L (emulsión 16) y los 6573.4 mg/L (emulsión 14), mientras que la concentración de productos primarios de la oxidación de las emulsiones W/Og a alta presión osciló entre los 5213.1 mg/L (emulsión 11) y los 6777.6 mg/L (emulsión 10). En ambos tipos de emulsiones W/Og (a alta velocidad y a alta presión), la concentración de hidroperóxidos lipídicos fue mucho menor que la del oleogel correspondiente a partir del cual fueron preparadas (en el mismo periodo de tiempo e idénticas condiciones de almacenamiento, la concentración de hidroperóxidos del oleogel fue de 14409.4 mg/L y 18481.9 mg/L, respectivamente). Esto pone de manifiesto cómo la emulsificación de sistemas oleogelificados para la obtención de emulsiones W/Og, independientemente del método de homogenización empleado, puede reducir significativamente la oxidación lipídica primaria (en porcentajes superiores al 119.2 %) debido, probablemente, a la sustitución parcial de la fase oleosa –rica en PUFAs ω -3 y, por tanto, susceptible a la oxidación lipídica– por fase acuosa y emulgente. Además, como

ya se indicó en el capítulo anterior, este tipo de emulsiones W/Og también reduce la oxidación lipídica primaria respecto a las emulsiones W/O correspondientes (de fase oleosa sin gelificar) (Park & Maleky, 2020). Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Pandolsook & Kupongsak (2019), quienes compararon la estabilidad oxidativa de oleogeles de cera de salvado de arroz y emulsiones W/Og preparadas a partir de estos oleogeles (ambos sistemas almacenados a 4 y 30 °C) con la del aceite sin gelificar y la emulsión W/O correspondiente. En efecto, estos autores observaron las concentraciones de hidroperóxidos lipídicos más bajas en las emulsiones W/Og, independientemente de la temperatura de almacenamiento y del tiempo transcurrido.

Tabla 25. Concentración de hidroperóxidos lipídicos a los 10 días de su elaboración.

N° de experimento	[Hidroperóxidos lipídicos], mg/L	
	<i>Emulsión W/Og a alta velocidad</i>	<i>Emulsión W/Og a alta presión</i>
Muestra control	14409.4	18481.9
1	6220.2	5977.4
2	6189.9	6385.8
3	5613.2	6316.8
4	6413.4	6374.7
5	5160.7	6394.0
6	5798.1	6777.6
7	6076.7	5897.4
8	4495.7	5941.5
9	5574.6	5994.0
10	5682.2	6777.6
11	5047.6	5213.1
12	6200.9	6606.5
13	4804.8	5853.2
14	6573.4	6452.0
15	5273.8	6322.3
16	4465.4	5905.7
17	6223.0	5530.4

Nota: Los valores en **negrita** indican el máximo y el mínimo.

Tabla 26. Concentración de compuestos aldehídicos a los 10 días de su elaboración.

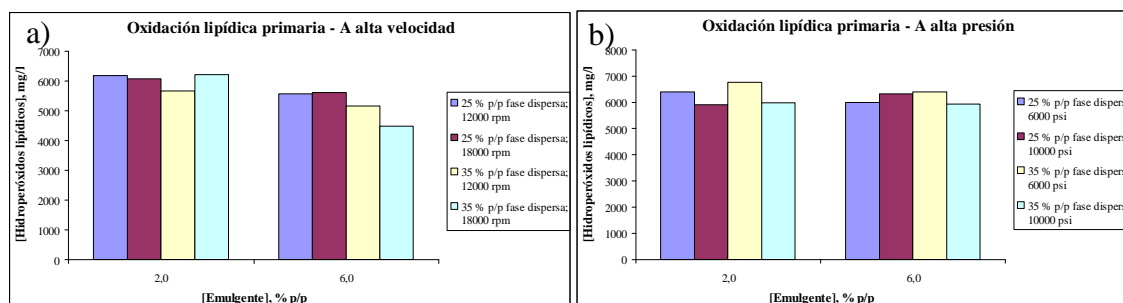
N° de experimento	[Compuestos aldehídicos], mg/L	
	Emulsión W/Og a alta velocidad	Emulsión W/Og a alta presión
Muestra control	739.8	943.5
1	405.9	513.1
2	447.6	559.7
3	485.3	537.6
4	456.6	544.2
5	380.5	485.3
6	418.2	552.4
7	504.1	506.5
8	405.9	431.3
9	438.6	495.1
10	339.6	486.1
11	387.9	460.7
12	429.6	464.0
13	455.8	531.9
14	510.6	585.9
15	419.8	544.2
16	357.6	482.0
17	423.9	495.1

Nota: Los valores en **negrita** indican el máximo y el mínimo.

De forma análoga, en el caso de la oxidación lipídica secundaria, la concentración de compuestos aldehídicos del oleogel de partida también fue superior (entre 1.45 y 2.19 veces) a la de las emulsiones W/Og preparadas a partir de él. La justificación es la misma que ya se indicó para la oxidación lipídica primaria: la sustitución parcial de la fase oleosa por fase acuosa y emulgente. Estos resultados también están en consonancia con los obtenidos por Pandolsook & Kupongsak (2019), quienes refirieron concentraciones similares de productos secundarios de la oxidación en los oleogeles y las emulsiones W/Og (menores que 0.4 mg MDA/kg muestra) y, en todo caso, muy por debajo de las concentraciones próximas a 1 mg MDA/kg muestra del aceite sin gelificar y la emulsión W/O correspondiente.

Por otra parte, los datos de la Tabla 26 reflejan concentraciones de compuestos aldehídicos en las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad más pequeñas que en las homogenizadas a alta presión. En un principio, la menor oxidación lipídica secundaria podría atribuirse al método de homogenización empleado; sin embargo, también se observa que la muestra control (oleogel de partida) presenta esa misma tendencia y no ha sido emulsificada (739.8 mg/L y 943.5 mg/L, respectivamente). Por tanto, en lugar de asociar la mayor o menor concentración de compuestos aldehídicos al método de homogenización empleado, debería atribuirse al grado de oxidación lipídica del oleogel.

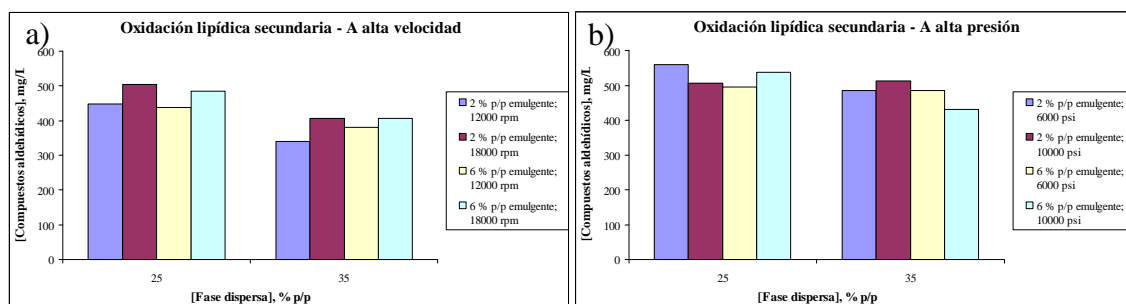
Figura 76. Concentración de hidroperóxidos lipídicos en función de la concentración de emulgente.



De entre las variables independientes consideradas, la concentración de emulgente es la que parece afectar de forma más clara a la oxidación lipídica primaria: un aumento en la concentración de emulgente hidrofóbico utilizada condujo a una concentración de productos primarios de la oxidación más baja (Figura 76). Así, por ejemplo, se interpreta de las emulsiones W/Og 2 y 9 (fracción de fase dispersa = 25 % p/p, velocidad de homogenización = 12000 rpm) donde únicamente aumentó la concentración de PGPR del 2.0 al 6.0 % p/p y, al hacerlo, la concentración de hidroperóxidos lipídicos el día 10 de su elaboración se redujo en un 9.94 % (en las emulsiones W/Og a alta presión, el porcentaje de reducción fue del 6.14 %). Si el aumento en la concentración de emulgente es más importante, como sucede en las emulsiones 11 y 12 (con un incremento del 0.65 al 7.35 % p/p), también lo serán los porcentajes de reducción de productos primarios de la oxidación (18.60 y 21.09 %, respectivamente). No obstante, en las emulsiones W/Og 1 y 8 homogenizadas a alta velocidad, con una fracción de fase dispersa del 35 % p/p y una velocidad de homogenización de 18000 rpm, es donde mejor queda reflejada la disminución de la

oxidación lipídica primaria con el aumento de la concentración de emulgente, alcanzando porcentajes de reducción de hasta el 27.72 % (Figura 76a). Y es que, en efecto, la molécula de PGPR posee restos polares de gran tamaño que, cuando se sitúa en la interfase, dan como resultado la formación de capas interfaciales gruesas que cubren completamente las gotas de agua y actúan como una barrera física que separa el sustrato lipídico de las especies prooxidantes de la fase acuosa (Dridi et al., 2016). Por tanto, aumentar la fracción de PGPR implica modificar el tamaño y las propiedades de la interfase agua-aceite, ralentizando así los procesos oxidativos. Este mismo efecto también fue señalado por Dridi et al. (2016) al estudiar el impacto de los diferentes parámetros composicionales de una emulsión W/O sobre su estabilidad oxidativa. Respecto al resto de factores considerados, la observación directa de los valores de la Tabla 25 no conduce a resultados concluyentes y, por tanto, su estudio precisa de un análisis estadístico adecuado.

Figura 77. Concentración de compuestos aldehídicos en función de la fracción de fase dispersa.



Asimismo, de las variables independientes consideradas, la fracción de fase dispersa es la que parece afectar más claramente a la oxidación lipídica secundaria: un aumento en la fracción de fase dispersa condujo a una concentración de productos secundarios de la oxidación más baja (Figura 77). Así, por ejemplo, se extrae de las concentraciones de compuestos aldehídicos de las emulsiones W/Og 2 y 10 el décimo día de su elaboración: en estas dos emulsiones se mantuvo constante la concentración de emulgente (2.0 % p/p) y la velocidad de homogenización (12000 rpm), y se incrementó la concentración de fase dispersa desde un 25 % p/p hasta un 35 % p/p. Como consecuencia del citado aumento, la concentración de productos secundarios de la oxidación se redujo en un 24.13 % (para las mismas emulsiones W/Og pero homogenizadas a alta presión –6000 psi–, el porcentaje de reducción fue del 13.15 %).

Cuando el incremento en la fracción de fase dispersa es más significativo, como sucede en las emulsiones 14 y 16 (con un incremento del 21.63 al 38.37 % p/p), también lo son los porcentajes de reducción de productos secundarios de la oxidación (29.96 y 17.73 %, respectivamente). Como ya se explicó en la Introducción, los PUFAs ω -3 poseen múltiples insaturaciones que los convierten en compuestos altamente reactivos y susceptibles a la oxidación lipídica; el agua o la fase acuosa no experimentan este tipo de degradación química (Shahidi & Zhong, 2010; Dridi et al., 2016). En las emulsiones W/Og, el aumento de la fracción de fase dispersa conlleva la sustitución parcial de la fase continua –rica en PUFAs ω -3– por fase acuosa. Esta disminución en la cantidad de PUFAs ω -3 se traduce en una notable reducción de la oxidación lipídica secundaria. Respecto al resto de factores considerados, la observación directa de los valores de la Tabla 26 no conduce a resultados concluyentes y, por tanto, su estudio precisa de un procesamiento estadístico adecuado.

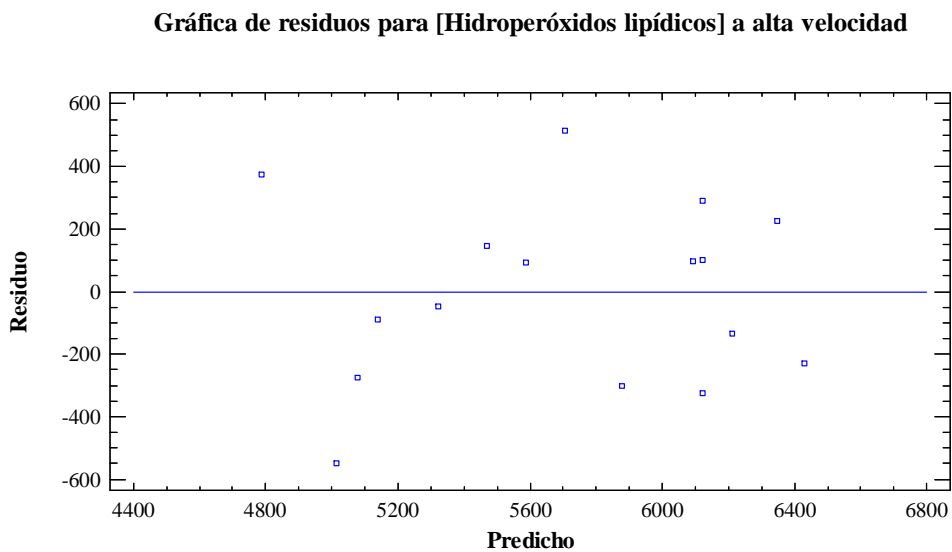
Tras este primer análisis de los resultados, a continuación se presentan los modelos cuadráticos ajustados para la concentración de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos 10 días después de su elaboración, a alta velocidad, en función de las variables independientes consideradas y de sus correspondientes interacciones.

Modelo a alta velocidad de cizalla: $[Hidroperóxidos\ lipídicos] = 6123.39 - 398.743*[Fase\ dispersa] - 386.374*[Emulgente] - 72.5223*Velocidad - 158.372*[Fase\ dispersa]^2 - 145.891*[Fase\ dispersa]*[Emulgente] - 120.926*[Emulgente]^2 - 131.405*[Emulgente]*Velocidad - 329.834*Velocidad^2$ Ec. [32]

En el caso de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad, el p_{MOD} del modelo obtenido al considerar todas las variables independientes y sus correspondientes interacciones resultó ser ligeramente superior al nivel de significancia prefijado. La variable interacción $[Fase\ dispersa]*Velocidad$ fue la menos estadísticamente significativa, procediéndose a su eliminación del modelo y simplificación del ajuste. Así, el nuevo modelo obtenido (Ec. 32) presentó un coeficiente de determinación del 82.30 % y un p_{LOF} de 0.4036 (Tabla 27); al ser este valor superior a 0.05, se concluye que el nuevo modelo seleccionado es adecuado para describir los datos experimentales. Con un p_{MOD} de 0.0218, menor que 0.05, también puede afirmarse que existe una

relación estadísticamente significativa entre las variables independientes y dependiente con un nivel de confianza del 95 %. Asimismo, la ausencia de un patrón en la gráfica de los residuos contra los valores ajustados o predichos (Figura 78) revela que el modelo seleccionado describe adecuadamente los datos experimentales.

Figura 78. Gráfica de residuos para la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.



El análisis de la varianza (ANOVA) de la concentración de hidroperóxidos lipídicos (Tabla 27) reveló que, tanto la fracción de fase dispersa como la concentración de emulgente hidrofóbico, ejercen un efecto estadísticamente significativo en orden lineal ($p < 0.05$) sobre la oxidación lipídica primaria de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad. En efecto, ya se apuntó anteriormente que un aumento en la concentración de PGPR, debido a sus características moleculares, contribuye a la separación física de la fase oleosa y las especies prooxidantes presentes en la acuosa. Adicionalmente, el aumento de la fracción de fase dispersa supone reducir la cantidad de sustrato disponible para ser oxidado. Por tanto, el aumento de cualesquiera de estas variables, o incluso de ambas, resulta adecuado para reducir la oxidación lipídica primaria. Su influencia queda puesta de manifiesto en la gráfica de efectos principales (Figura 79). La velocidad de homogenización –en orden cuadrático– no llegó a ser una variable estadísticamente significativa sobre la oxidación lipídica primaria ($p = 0.0731$), aunque sí que fue el siguiente factor en importancia.

Tabla 27. Análisis de la varianza (ANOVA) para la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor p*
[Fase dispersa]	2.16235E6	1	2.16235E6	21.79	0.0430
[Emulgente]	2.03027E6	1	2.03027E6	20.46	0.0456
Velocidad	71529.0	1	71529.0	0.72	0.4853
[Fase dispersa] ²	279103	1	279103	2.81	0.2355
[Fase dispersa]*[Emulgente]	170273	1	170273	1.72	0.3205
[Emulgente] ²	162722	1	162722	1.64	0.3288
[Emulgente]*Velocidad	138138	1	138138	1.39	0.3594
Velocidad ²	1.2106E6	1	1.2106E6	12.20	0.0731
Falta de ajuste	1.05564E6	6	175940	1.77	<i>0.4036</i>
Error puro	198460	2	99230.0		
Total (corr.)	7.08647E6	16			

* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

Figura 79. Gráfica de efectos principales para la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.

Gráfica de efectos principales para [Hidroperóxidos lipídicos] a alta velocidad

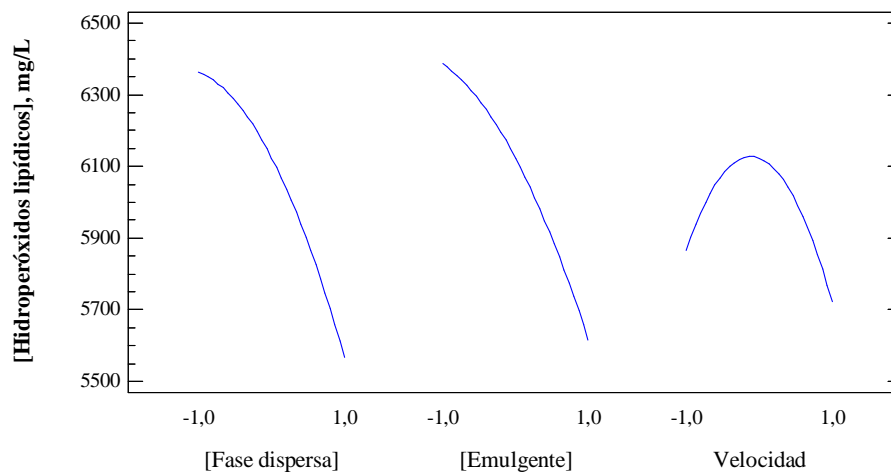
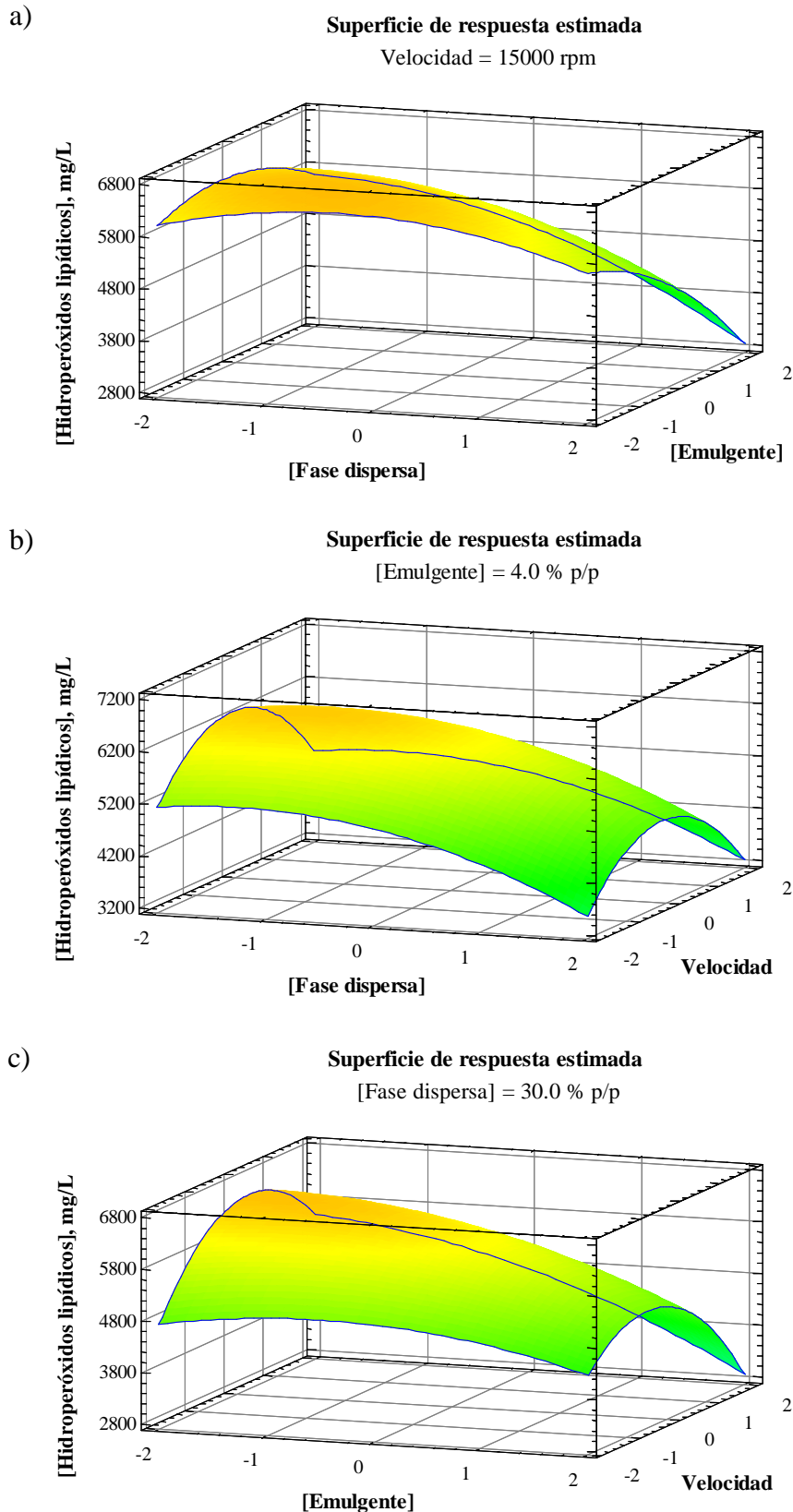


Figura 80. Superficie de respuesta estimada para la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.



Tras obtener el modelo matemático que ajusta adecuadamente la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad e identificar las variables estadísticamente más significativas, se hallaron las condiciones óptimas que permiten minimizar la oxidación lipídica primaria. En efecto, estableciendo una fracción de fase dispersa del 34.37 % p/p, una concentración de emulgente hidrofóbico del 7.34 % p/p y una velocidad de homogenización de 20000 rpm, se podría llegar a alcanzar una concentración de hidroperóxidos mínima de 2211.2 mg/L. La Figura 80 representa la superficie de respuesta estimada para las diferentes combinaciones de variables independientes.

Modelo a alta velocidad de cizalla: $[Compuestos\ aldehídicos] = 432.939 - 44.0969*[Fase\ dispersa] - 4.16746*[Emulgente] + 18.7603*Velocidad + 0.311283*[Fase\ dispersa]^2 + 8.5875*[Fase\ dispersa]*[Emulgente] - 1.4375*[Fase\ dispersa]*Velocidad - 8.74229*[Emulgente]^2 - 6.3375*[Emulgente]*Velocidad + 1.63271*Velocidad^2$ Ec. [33]

Respecto a la oxidación lipídica secundaria, el modelo matemático obtenido considerando todas las variables (Ec. 33) presentó un R^2 del 93.65 %, significativamente mayor, incluso, al obtenido para la oxidación lipídica primaria (82.30 %). Por tanto, se puede afirmar que ambos modelos explican relativamente bien la variabilidad de los datos experimentales de oxidación de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad. El valor p_{LOF} del modelo ajustado para la concentración de compuestos aldehídicos fue de 0.6953 (Tabla 28), superior a 0.05, por lo que puede decirse que el modelo obtenido es apropiado para ajustar los datos observados con un nivel de confianza del 95 %. Además, el valor p_{MOD} fue de 0.0020, inferior a 0.05, por lo que puede afirmarse que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables independientes y dependiente con un nivel de confianza del 95 %. Estos tres parámetros, en su conjunto, permiten asegurar que el modelo cuadrático propuesto puede ser utilizado para explicar la concentración de compuestos aldehídicos en este tipo de emulsiones en esta ventana operativa. Asimismo, la ausencia de un patrón definido en la gráfica de los residuos contra los valores ajustados o predichos (Figura 81) confirma la aseveración acerca de la idoneidad del modelo propuesto.

Figura 81. Gráfica de residuos para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.

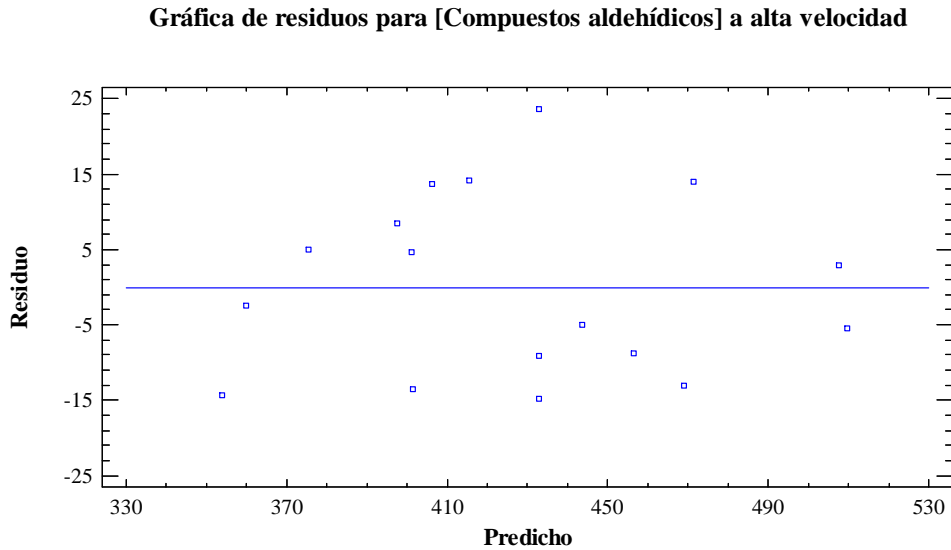
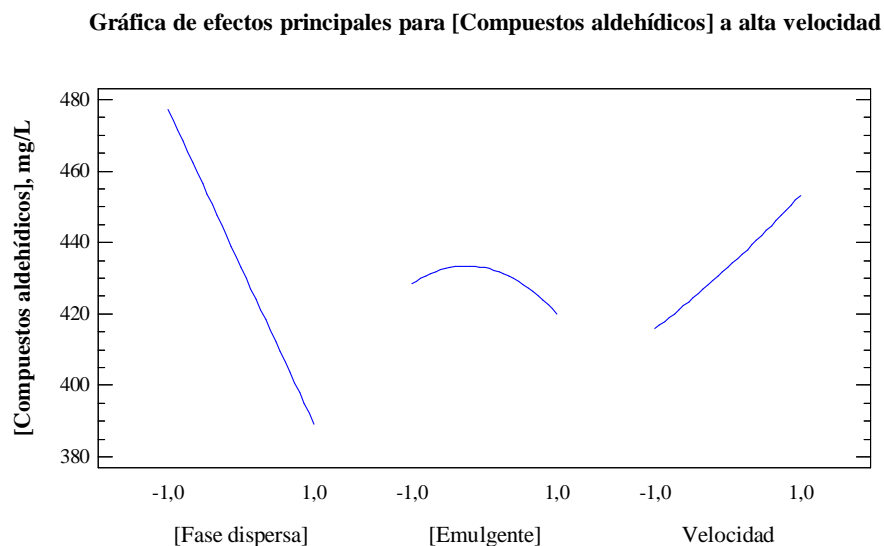


Tabla 28. Análisis de la varianza (ANOVA) para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón <i>F</i>	Valor <i>p</i> *
[Fase dispersa]	26445.7	1	26445.7	61.59	0.0159
[Emulgente]	236.201	1	236.201	0.55	0.5356
Velocidad	4786.48	1	4786.48	11.15	0.0792
[Fase dispersa] ²	1.07824	1	1.07824	0.00	0.9646
[Fase dispersa]*[Emulgente]	589.961	1	589.961	1.37	0.3619
[Fase dispersa]*Velocidad	16.5313	1	16.5313	0.04	0.8626
[Emulgente] ²	850.467	1	850.467	1.98	0.2946
[Emulgente]*Velocidad	321.311	1	321.311	0.75	0.4782
Velocidad ²	29.6637	1	29.6637	0.07	0.8173
Falta de ajuste	1411.2	5	282.241	0.66	0.6953
Error puro	858.78	2	429.39		
Total (corr.)	35774.8	16			

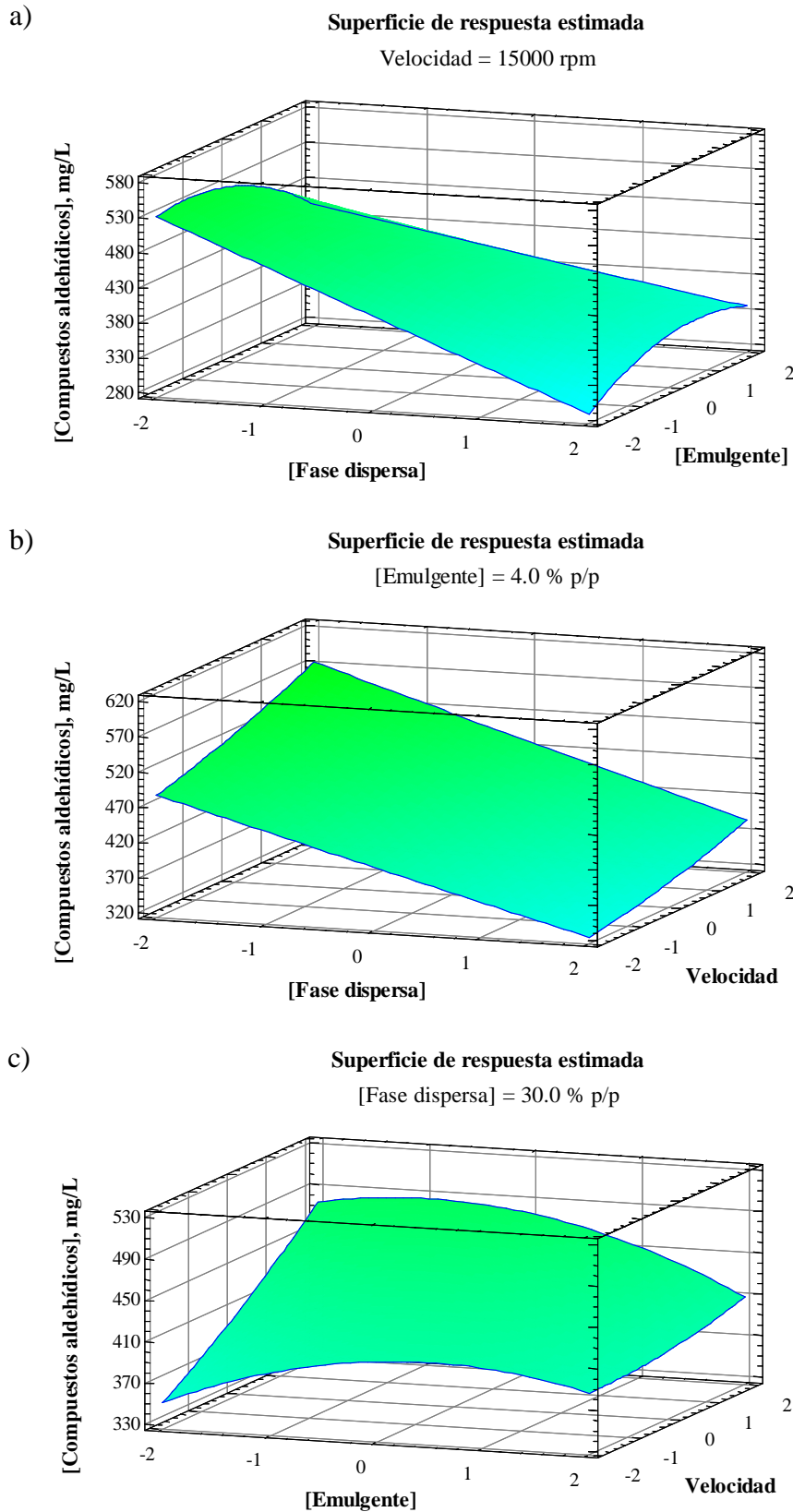
* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

Figura 82. Gráfica de efectos principales para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.



En el caso de la oxidación secundaria, a diferencia de la primaria, el análisis de la varianza (ANOVA) de los valores observados (Tabla 28) demostró que la fracción de fase dispersa fue la única variable que ejerció un efecto estadísticamente significativo en orden lineal ($p < 0.05$) sobre la oxidación lipídica secundaria de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad; sin embargo, la concentración de emulgente no resultó ser estadísticamente significativa en este caso. También se debe destacar que, si bien es cierto que la velocidad de homogenización mostró un valor p ligeramente mayor que 0.05 ($p = 0.0792$), fue la siguiente variable que quedó más próxima a él y, por tanto, es una variable también importante sobre la oxidación lipídica secundaria. Según la gráfica de efectos principales (Figura 82), el aumento de la velocidad de homogenización implica también un aumento en la concentración de compuestos aldehídicos en las emulsiones W/Og. Y es que, durante el proceso de emulsificación en un sistema rotor y estator, el propio movimiento y agitación de las fases continua y dispersa introduce pequeñas burbujas de aire en el seno de la emulsión, tanto más cuanto mayor es la velocidad y el tiempo de homogenización. Con el paso de los días, este oxígeno que ha quedado incorporado a la emulsión y está en contacto con la fase oleosa rica en PUFAs ω -3, acaba promoviendo la ocurrencia de procesos oxidativos (Ambrosone et al., 2006; Dridi et al., 2016). La Figura 83 representa la superficie de respuesta estimada para las diferentes combinaciones de variables independientes.

Figura 83. Superficie de respuesta estimada para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.



Una vez establecido el modelo que ajusta el comportamiento de la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad con las variables independientes, se halló el conjunto de condiciones óptimas para minimizar la oxidación lipídica secundaria. En efecto, estableciendo una fracción de fase dispersa del 38.37 % p/p, una concentración de emulgente de 0.65 % p/p y una velocidad de homogenización de 10600 rpm, se podría alcanzar una concentración de compuestos aldehídicos mínima de 282.8 mg/L.

Seguidamente, se presentan los modelos cuadráticos ajustados para la concentración de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos el día después de su elaboración, a alta presión, en función de las variables independientes consideradas y de sus interacciones.

Modelo a alta presión: $[Hidroperóxidos\ lipídicos] = 4003.53 - 390.79*[Fase\ dispersa] - 239.013*[Fase\ dispersa]*Presión + 145.201*[Emulgente]*Presión - 155.074*Presión^2$ Ec. [34]

En las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión, el valor p del modelo obtenido al considerar todas las variables independientes y sus correspondientes interacciones resultó ser superior a 0.05, indicando que no existe una relación significativa entre las variables dependiente e independientes. Eliminando secuencialmente aquellas variables estadísticamente menos significativas ($Presión$, $[Fase\ dispersa]*[Emulgente]$, $[Emulgente]^2$, $[Fase\ dispersa]^2$ y $[Emulgente]$), se pudo simplificar el modelo y se llegó a alcanzar uno adecuado (Ec. 34). El nuevo modelo matemático obtenido, con un valor p de 0.0360, es capaz de explicar de manera aceptable el 54.94 % de la variabilidad en la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión sin presentar falta de ajuste ($p_{LOF} = 0.9227$), lo que revela que el orden del modelo propuesto es adecuado para ajustar los datos experimentales. Asimismo, la ausencia de un patrón definido en la distribución de los residuos representada en la gráfica de los residuos frente a los valores ajustados o predichos (Figura 84) fortalece la hipótesis de idoneidad del modelo; es decir, permite considerar que el modelo de regresión propuesto es adecuado para ajustar los datos.

Figura 84. Gráfica de residuos para la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión.

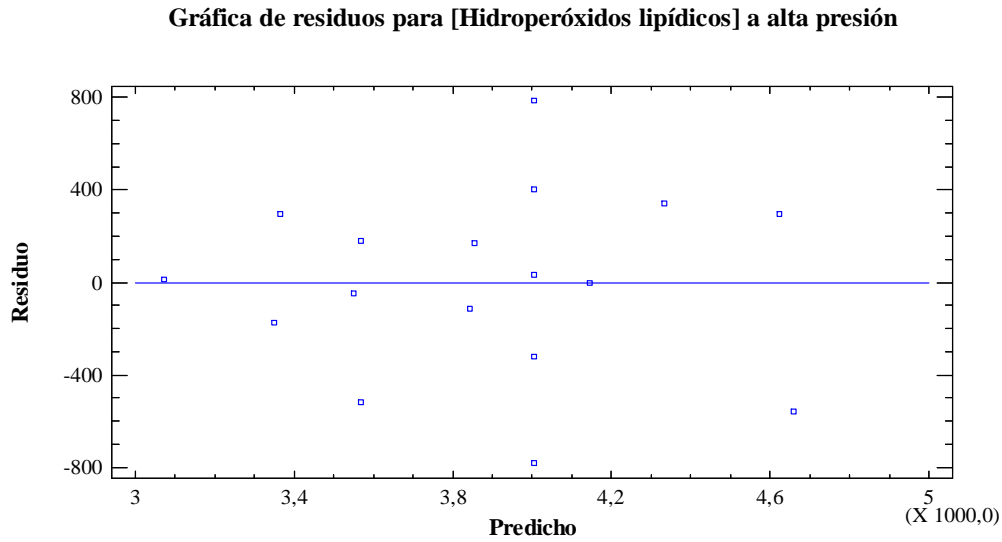
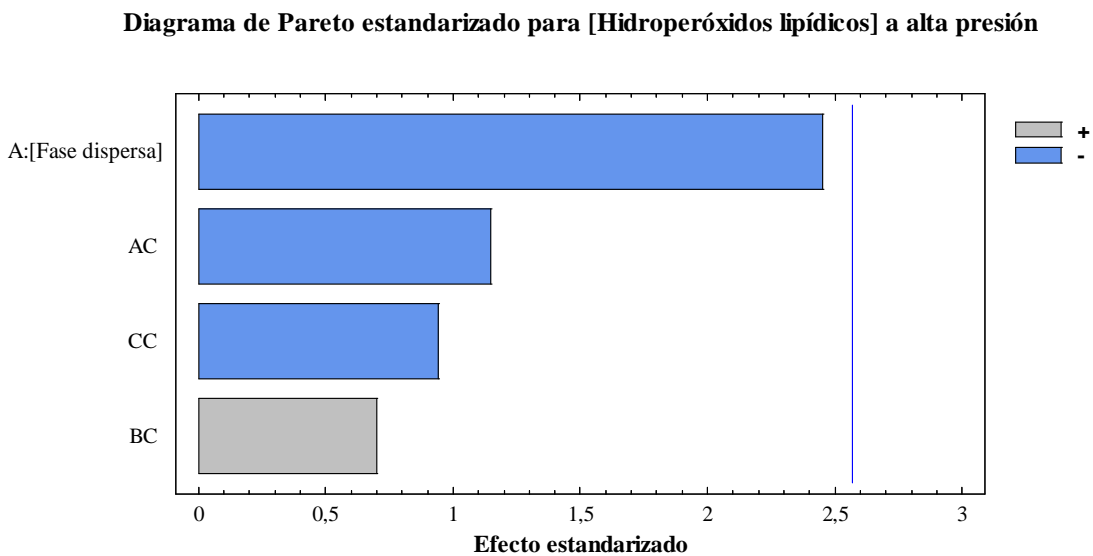


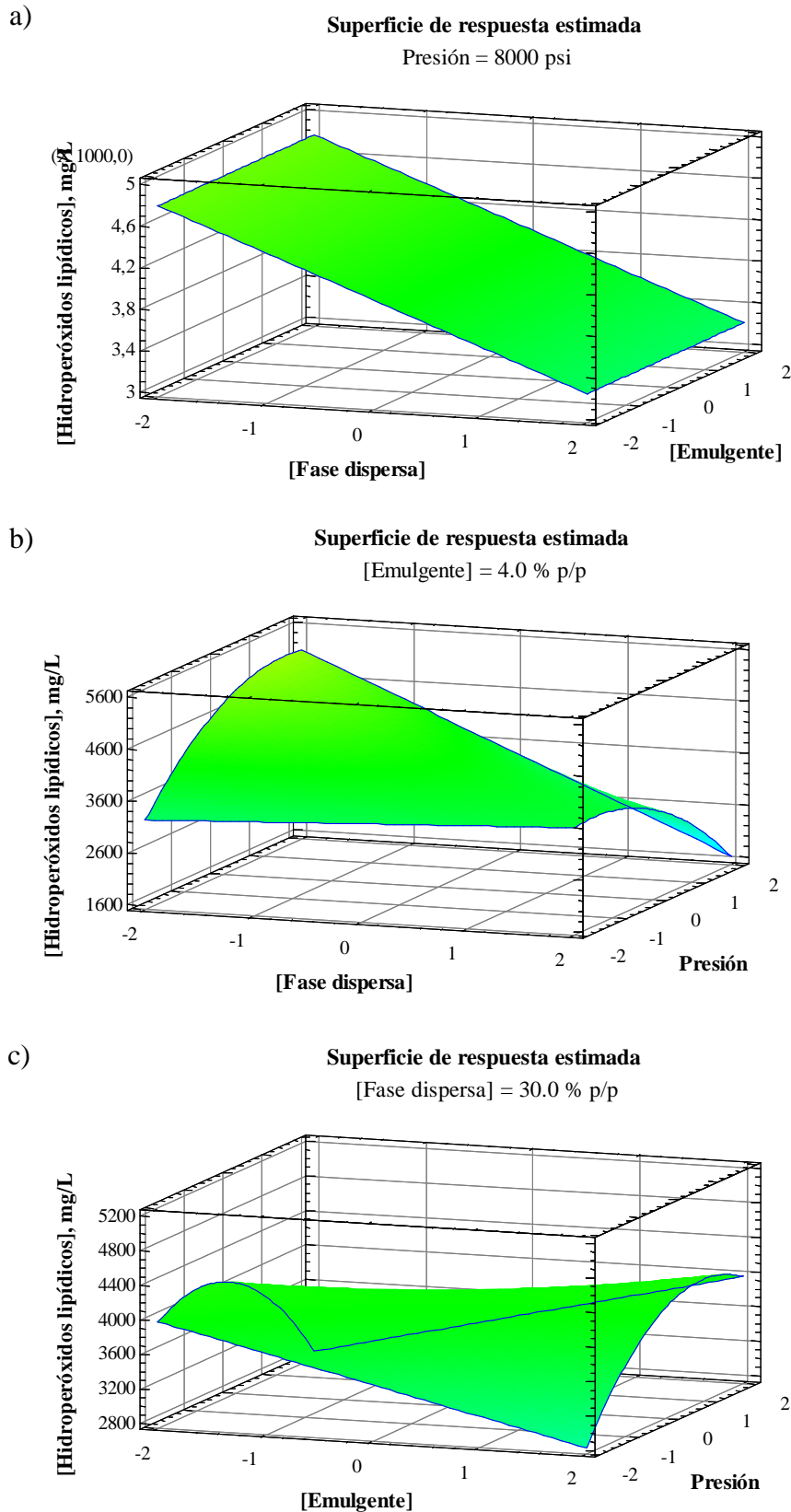
Figura 85. Diagrama de Pareto estandarizado para la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión.



Por otra parte, el diagrama de Pareto estandarizado para la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión (Figura 85) muestra que, para este tipo de emulsiones, ninguna de las variables consideradas fue lo suficientemente significativa como para ser representativa en la oxidación primaria, si bien la concentración de fase dispersa estuvo bastante próxima de serlo (la justificación del efecto de la fracción de fase dispersa sobre la oxidación lipídica ya quedó explicada con anterioridad).

La Figura 86 representa la superficie de respuesta estimada para las diferentes combinaciones de variables independientes. Los valores de las variables que permiten optimizar la oxidación lipídica primaria de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión el día después de su elaboración son: 38.37 % p/p de fase dispersa, 0.70 % p/p de emulgente y 11500 psi de presión de homogenización, alcanzando una concentración de hidroperóxidos lipídicos mínima de 1844.9 mg/L.

Figura 86. Superficie de respuesta estimada para la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión.



Modelo a alta presión: $[Compuestos\ aldehídicos] = 431.123 - 39.0617*[Fase\ dispersa] - 14.9034*[Emulgente] - 0.0307185*Presión + 5.08456*[Fase\ dispersa]^2 + 9.10388*[Fase\ dispersa]*[Emulgente] - 4.80763*[Fase\ dispersa]*Presión - 9.82062*[Emulgente]^2 + 3.98938*[Emulgente]*Presión + 5.08456*Presión^2$ Ec. [35]

En cuanto a la oxidación lipídica secundaria de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión, la ecuación obtenida al considerar todas las variables y sus correspondientes interacciones (Ec. 35) presentó un R^2 del 93.39 %, prácticamente igual al obtenido para las emulsiones a alta velocidad a 10 días. El p_{LOF} del modelo ajustado fue de 0.4834 (Tabla 29), superior a 0.05, por lo que puede afirmarse que el modelo obtenido es apropiado para ajustar los datos observados con un nivel de confianza del 95 %. Además, el p_{MOD} fue de 0.0023, inferior a 0.05, por lo que puede decirse que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables independientes y dependiente con un nivel de confianza del 95 %. Estos tres parámetros, en su conjunto, permiten asegurar que el modelo cuadrático propuesto puede ser utilizado para explicar la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión en esta ventana operativa. Asimismo, la ausencia de un patrón definido en la gráfica de los residuos contra los valores ajustados o predichos (Figura 87) confirma la idoneidad del modelo propuesto.

Figura 87. Gráfica de residuos para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión.

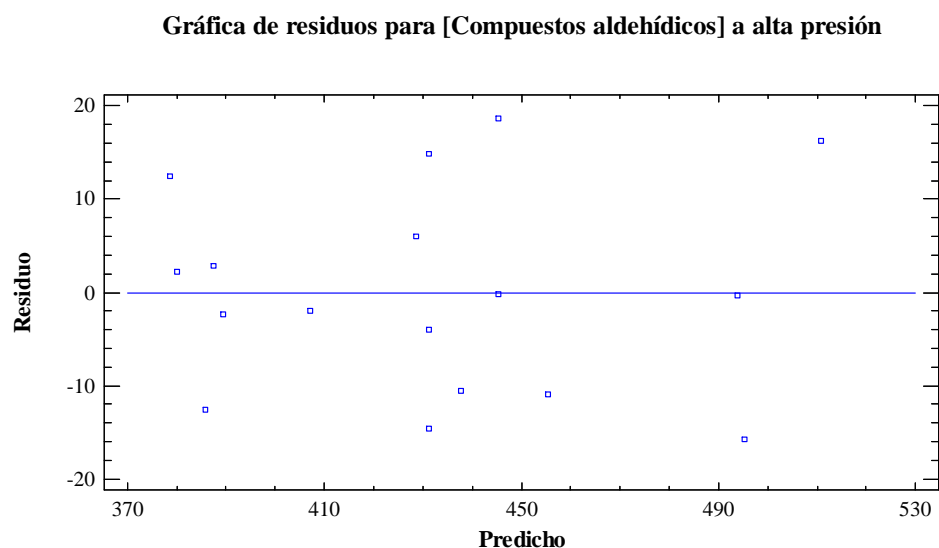


Tabla 29. Análisis de la varianza (ANOVA) para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión.

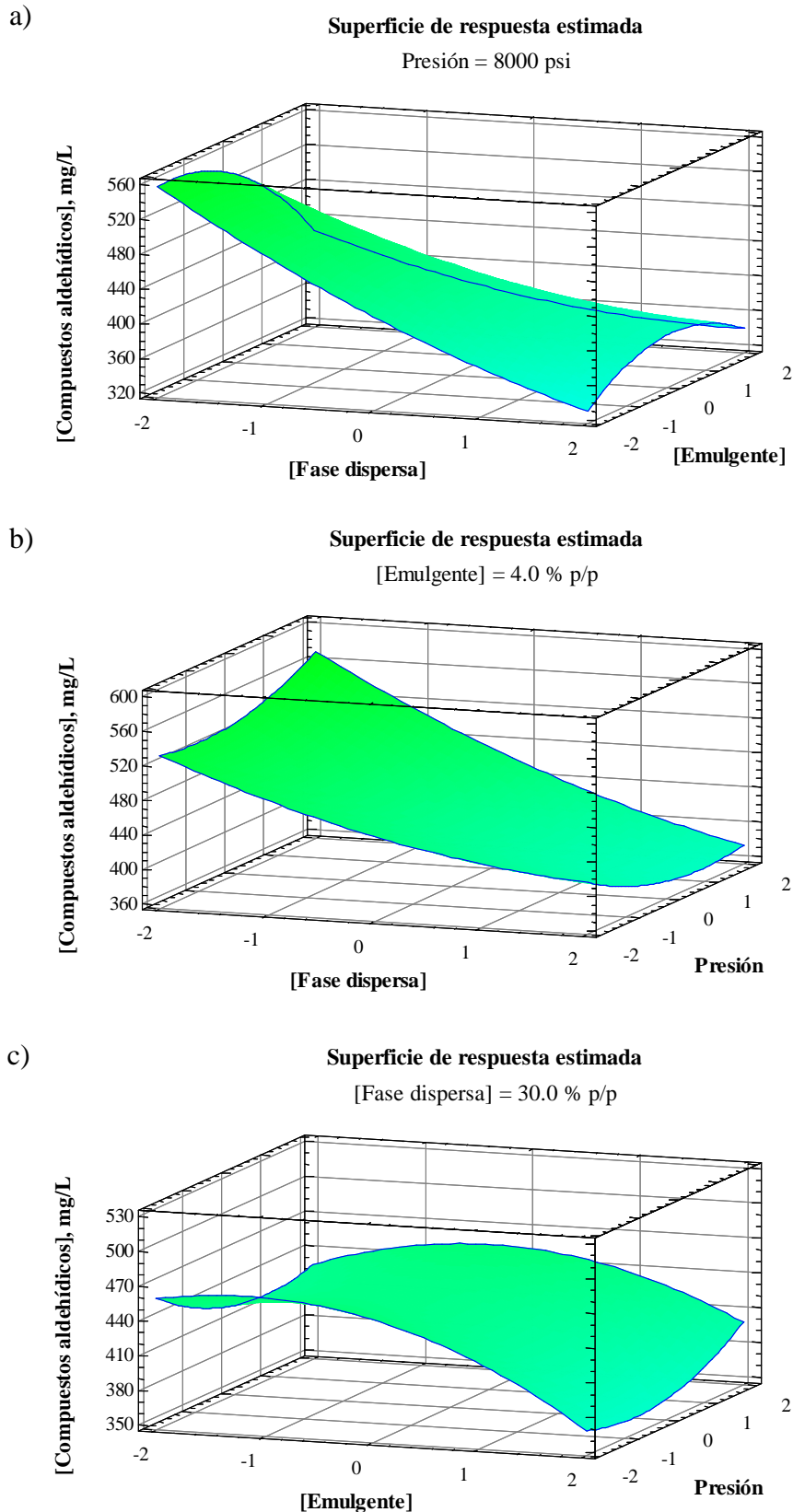
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor p*
[Fase dispersa]	20751.1	1	20751.1	93.24	0.0106
[Emulgente]	3020.72	1	3020.72	13.57	0.0664
Presión	0.0128333	1	0.0128333	0.00	0.9946
[Fase dispersa] ²	287.682	1	287.682	1.29	0.3734
[Fase dispersa]*[Emulgente]	663.044	1	663.044	2.98	0.2265
[Fase dispersa]*Presión	184.906	1	184.906	0.83	0.4582
[Emulgente] ²	1073.21	1	1073.21	4.82	0.1593
[Emulgente]*Presión	127.321	1	127.321	0.57	0.5284
Presión ²	287.682	1	287.682	1.29	0.3734
Falta de ajuste	1472.22	5	294.444	1.32	<i>0.4834</i>
Error puro	445.109	2	222.554		
Total (corr.)	28987.1	16			

* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

El análisis de la varianza (ANOVA) de la concentración de compuestos aldehídicos (Tabla 29) puso de manifiesto que la variable '*fracción de fase dispersa*' es la única que ejerce un efecto estadísticamente significativo en orden lineal ($p < 0.05$) sobre la oxidación lipídica secundaria de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión. La concentración de emulgente no alcanzó a ser una variable estadísticamente significativa ($p = 0.0664$), aunque sí que fue el siguiente factor en importancia. La explicación del modo en que afectan ambas variables sobre la oxidación lipídica ya se expuso en las emulsiones W/Og a alta velocidad.

La Figura 88 representa la superficie de respuesta estimada para las diferentes combinaciones de variables independientes. Finalmente, el procedimiento de optimización arroja una estimación para la concentración de compuestos aldehídicos mínima de 354.6 mg/L, con un nivel de confianza del 95 %, siempre y cuando las concentraciones de fase dispersa y emulgente hidrofóbico se mantengan en su nivel más alto (38.37 y 7.35 % p/p) y la presión de homogenización sea de 5000 psi.

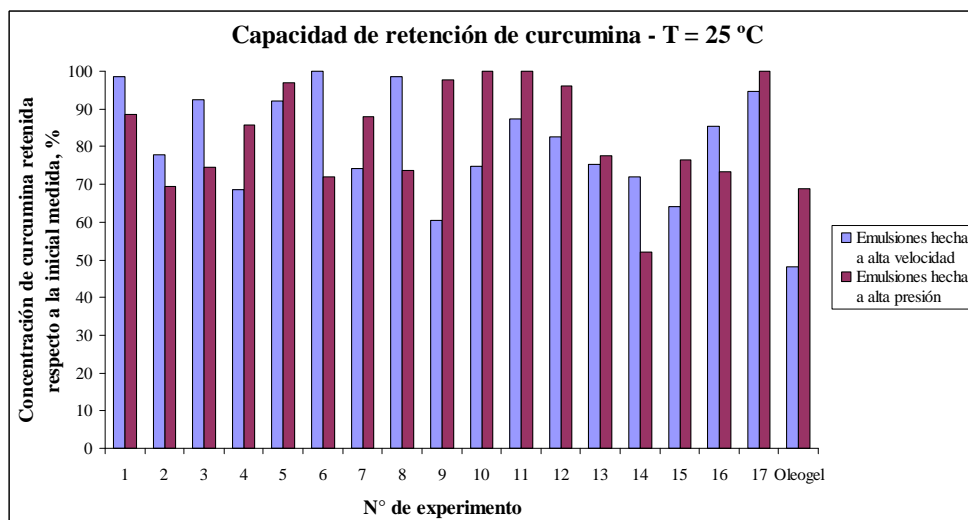
Figura 88. Superficie de respuesta estimada para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión.



4.2.4. Efecto de las variables de operación sobre la capacidad de retención de curcumina

Con el fin de estudiar el efecto de los factores considerados sobre la capacidad de retención de curcumina, se analizaron sus concentraciones en los oleogel de partida y en los sistemas emulsificados W/Og preparados a alta velocidad y a alta presión, mediante espectroscopía de fluorescencia los días 1 y 7 después de su elaboración. La Figura 89 representa los porcentajes de curcumina retenida con respecto a la concentración inicialmente medida; el resto hasta el 100 % representa los porcentajes de curcumina degradada como consecuencia del propio proceso de elaboración.

Figura 89. Capacidad de retención de curcumina de los diferentes sistemas de liberación 7 días después de su elaboración.



Como ya se ha explicado en la introducción, la curcumina es un compuesto bioactivo relativamente soluble en aceite, pero insoluble en medios acuosos (ver apartado 1.2.1.). Por tanto, en términos de cantidad neta, los sistemas oleogelificados –constituidos completamente por aceite de pescado enriquecido con PUFAs ω -3–, contienen concentraciones de curcumina superiores a la de los sistemas emulsificados W/Og derivados, en los que parte de su fase oleosa ha sido sustituida por una fase acuosa. Este hecho puede verse claramente reflejado, por ejemplo, en el caso de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad, donde la concentración de

curcumina inicial en el oleogel de partida fue de 3428.25 mg/L y en el sistema emulsificado con mayor concentración de curcumina fue prácticamente la mitad (1916.25 mg/L). En cambio, en términos de porcentaje de retención de curcumina, sucede justo lo contrario y ahora fueron las emulsiones W/Og las que presentaron porcentajes de retención de curcumina mayores (60.52 % en la emulsión con menor capacidad de retención y 48.14 % en el oleogel, Figura 89). Por tanto, el proceso de emulsificación (fuerza de cizallamiento o alta presión) no parece ejercer ningún efecto sobre la estabilidad de la curcumina.

Con respecto al método de homogenización empleado (alta velocidad o alta presión), los datos obtenidos no fueron concluyentes: si bien es cierto que en algunos experimentos la homogenización a alta velocidad dio lugar a porcentajes de retención de curcumina más elevados que la homogenización a alta presión, en otros sucedió justo lo contrario sin mostrar ningún patrón aparente (Figura 89). Además, mediante observación directa de los resultados, tampoco se aprecia claramente ningún efecto de las variables independientes consideradas sobre la variable respuesta, haciendo necesario un análisis estadístico apropiado para estudiar su impacto. A continuación, se presentan los modelos cuadráticos ajustados para las emulsiones W/Og homogenizadas tanto a alta velocidad como a alta presión, en función de las variables independientes consideradas y sus interacciones.

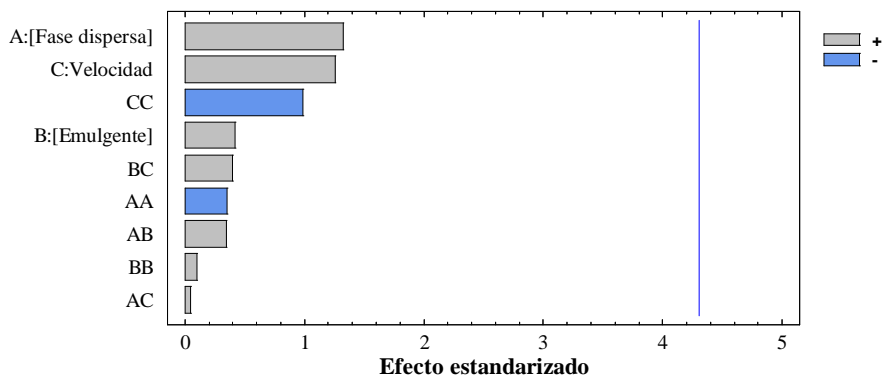
Modelo a alta velocidad de cizalla: % de curcumina retenida = $87.3294 + 6.00437*[Fase\ dispersa] + 1.91926*[Emulgente] + 5.70214*Velocidad - 1.77853*[Fase\ dispersa]^2 + 2.06375*[Fase\ dispersa]*[Emulgente] + 0.29625*[Fase\ dispersa]*Velocidad + 0.500041*[Emulgente]^2 + 2.33875*[Emulgente]*Velocidad - 4.95532*Velocidad^2$ Ec. [36]

Modelo a alta presión: % de curcumina retenida = $85.2826 + 4.79181*[Fase\ dispersa] + 0.264692*[Emulgente] - 2.76571*Presión - 6.57394*[Fase\ dispersa]^2 - 4.0925*[Fase\ dispersa]*[Emulgente] - 3.7725*[Fase\ dispersa]*Presión + 6.02963*[Emulgente]^2 - 6.7075*[Emulgente]*Presión - 1.48466*Presión^2$ Ec. [37]

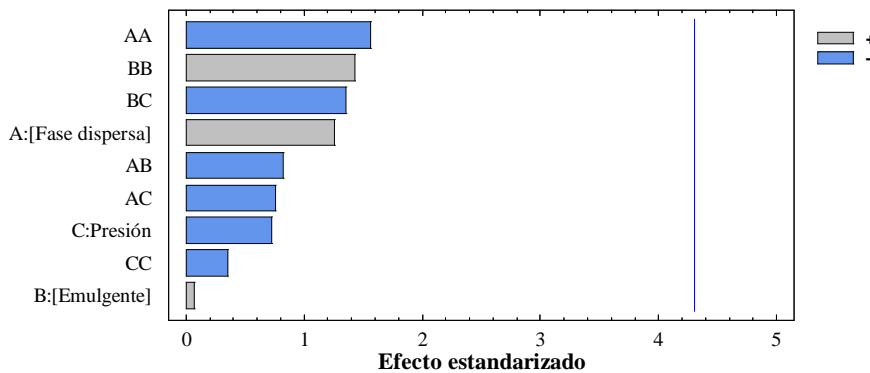
Los modelos obtenidos para las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad y a alta presión (Ec. 36 y 37) presentaron un R^2 del 55.00 % y del 74.21 %, con un valor p_{LOF} de 0.8188 y 0.8184 respectivamente, que permiten afirmar que el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos experimentales; sin embargo, el valor p_{MOD} obtenido fue de 0.5394 y 0.1505, ambos superiores a 0.05, indicando que en ninguno de los casos existe una relación estadísticamente significativa entre las variables independientes y dependiente con un nivel de confianza del 95 %.

Figura 90. Diagrama de Pareto estandarizado para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones W/Og preparadas a: a) alta velocidad y b) alta presión.

a) **Diagrama de Pareto estandarizado para % curcumina retenida a alta velocidad**



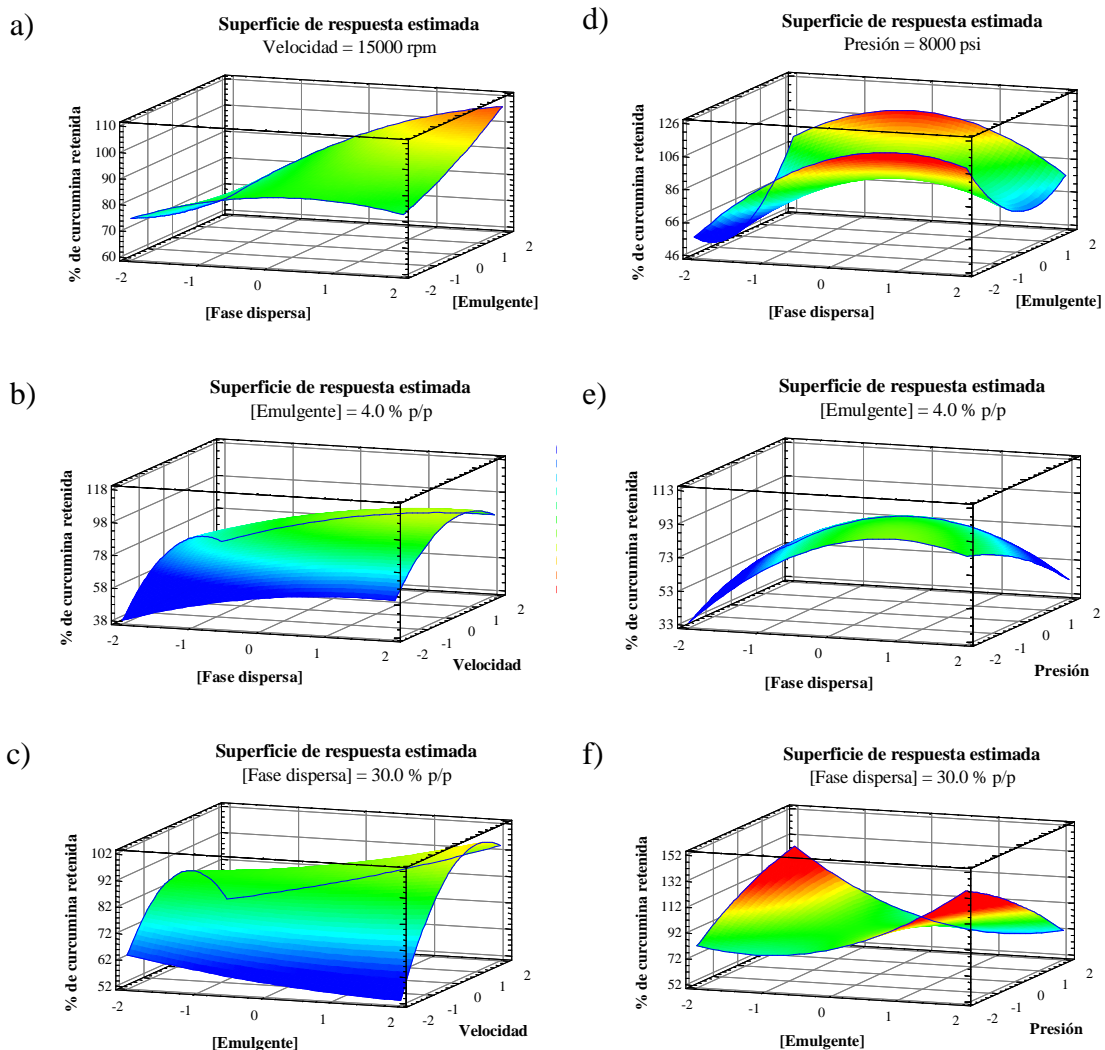
b) **Diagrama de Pareto estandarizado para % curcumina retenida a alta presión**



En vista de la Figura 90 donde se muestra el diagrama de Pareto estandarizado para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones W/Og homogenizadas tanto a alta velocidad como a alta presión, se concluye que ninguna de las variables consideradas resultó ser lo suficientemente significativa como para ser representativa sobre el porcentaje de retención de curcumina.

Finalmente, la Figura 91 representa la superficie de respuesta estimada de las emulsiones W/Og homogenizadas tanto a alta velocidad como a alta presión en función de las diferentes combinaciones de variables independientes. Los valores que permiten maximizar la capacidad de retención de curcumina en las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad son: 38.37 % p/p de fase dispersa, 7.35 % p/p de emulgente y 18000 rpm de velocidad de homogenización; mientras que los valores que permiten optimizar la capacidad de retención de curcumina en las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión son: 28.36 % p/p de fase dispersa, 7.35 % p/p de emulgente y 4500 psi de presión de homogenización.

Figura 91. Superficie de respuesta estimada para el % de curcumina retenida en las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad (a, b, c) y a alta presión (d, e, f).

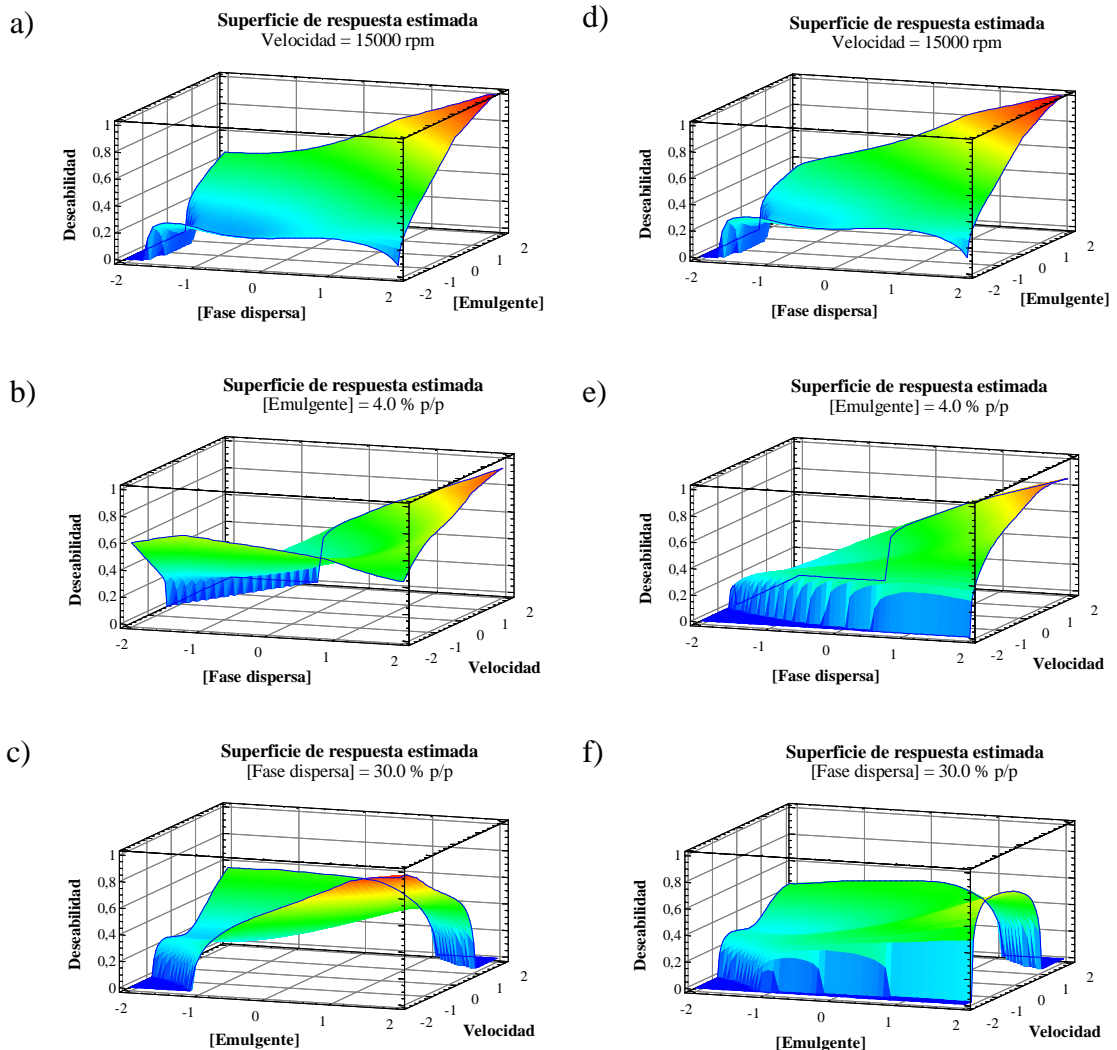


4.2.5. Optimización multivariable de la composición y las condiciones de operación del sistema emulsificado

En los apartados anteriores, se optimizaron las variables independientes consideradas en las emulsiones W/Og, preparadas tanto a alta velocidad como a alta presión, para cada variable respuesta: para minimizar el tamaño de partícula y la oxidación lipídica (primaria y secundaria) y para maximizar la capacidad de retención de curcumina. Como era de esperar, estos conjuntos de condiciones óptimas fueron diferentes en cada variable estudiada. Por tanto, no es posible alcanzar un único conjunto de condiciones para el que todas las respuestas estudiadas, simultáneamente, se encuentren en su valor óptimo y, para hacerlo, se recurre a la metodología de superficie multi-respuesta, que proporciona un óptimo global del sistema dentro de la ventana operativa del diseño.

En primer lugar, se han optimizado las condiciones para estabilizar fisicoquímicamente la emulsión W/Og preparada mediante homogenización a alta velocidad o, lo que es lo mismo, para minimizar conjuntamente el tamaño de partícula y la oxidación lipídica primaria y secundaria. En base al razonamiento expuesto en el apartado 4.1.4. sobre la secuencialidad del proceso de oxidación (la oxidación lipídica secundaria sólo tiene lugar si previamente ocurrió la oxidación lipídica primaria), se ha mantenido la misma ponderación para la oxidación lipídica primaria y secundaria (5.0 y 2.0, respectivamente) y, para el tamaño de partícula, se ha fijado un peso de 4.0 (aproximadamente la mitad del peso total asignado a la oxidación lipídica). Con estas premisas, la composición y condiciones de operación óptimas del sistema emulsificado a alta velocidad ha sido: 38.37 % p/p de fase dispersa, 1.19 % p/p de emulgente hidrofóbico y 10000 rpm de velocidad de homogenización, obteniendo un tamaño medio de partícula mínimo de 6.366 μm y una concentración de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos mínima de 3393.9 y 349.2 mg/L, respectivamente. La deseabilidad global alcanzada con este conjunto de condiciones óptimas es de 0.986. La Figura 92 (a, b y c) representa la deseabilidad global ajustada de esta función objetivo respecto a las diferentes combinaciones de variables independientes.

Figura 92. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada en las emulsiones W/Og homogenizadas a alta velocidad.



Modificando ahora el objetivo de optimización para minimizar conjuntamente el tamaño de partícula y la oxidación lipídica primaria y secundaria y, a su vez, maximizar la capacidad de retención de curcumina de la emulsión W/Og homogenizada a alta velocidad, se obtienen condiciones óptimas diferentes: 38.37 % p/p de fase dispersa, 7.35 % p/p de PGPR y 12600 rpm de velocidad de homogenización, obteniendo un tamaño medio de partícula mínimo de 6.379 μm , una concentración de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos mínima de 3646.9 y 349.2 mg/L respectivamente, una capacidad de retención de curcumina máxima del 91.9 % y un valor de deseabilidad global de 0.940. En este segundo objetivo de optimización, se mantuvieron los pesos asignados a cada variable respuesta: 4.0 para el tamaño de partícula, 5.0 para la

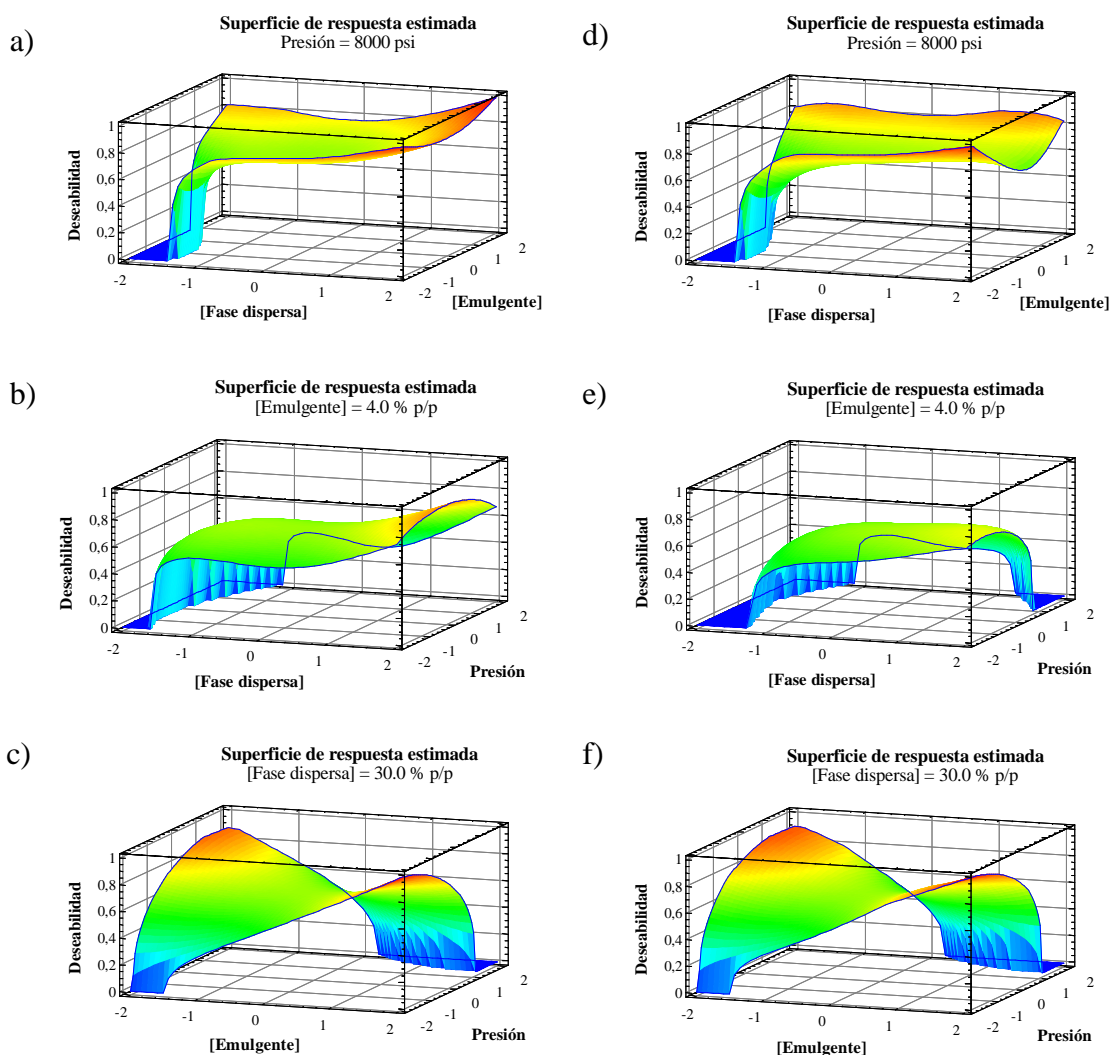
oxidación lipídica primaria, 2.0 para la oxidación secundaria y 3.0 para la capacidad de retención de curcumina. Con estas nuevas condiciones óptimas, el tamaño medio de partícula mínimo que podría obtenerse sería un 53.7 % superior al menor posible (4.151 μm) y la concentración de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos mínima que podría alcanzarse sería un 64.9 y 23.5 % superior a la concentración más baja que se puede obtener (2211.2 y 282.8 mg/L), consiguiendo porcentajes de retención de curcumina de hasta el 91.9 %. La Figura 92 (d, e y f) representa la deseabilidad global ajustada para este nuevo objetivo de optimización en función de las diferentes combinaciones de variables independientes.

Haciendo un tratamiento estadístico totalmente similar al anterior y aplicando la metodología de superficie multi-respuesta a las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión, también se han obtenido los conjuntos de condiciones óptimas (Tabla 30) para, por un lado, minimizar el tamaño de partícula y la oxidación lipídica primaria y secundaria (objetivo de optimización 1) y, por otro, además de los objetivos anteriores, maximizar la capacidad de retención de curcumina (objetivo de optimización 2). La Figura 93 muestra la deseabilidad global ajustada de ambas funciones objetivo respecto a las diferentes combinaciones de variables independientes.

Tabla 30. Conjunto de condiciones óptimas para los dos objetivos de optimización de las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión.

Variable independiente	Objetivo de optimización 1	Objetivo de optimización 2
[Fase dispersa], % p/p	38.01	38.37
[Emulgente], % p/p	7.35	7.11
Presión de homogenización, psi	5500	5500
Variable respuesta	Objetivo de optimización 1	Objetivo de optimización 2
$d_{[1,0]}$, μm	5.999	6.181
[Hidroperóxidos lipídicos], mg/L	2419.0	2509.3
[Compuestos aldehídicos], mg/L	363.7	365.9
Curcumina retenida, %	---	100.0
Deseabilidad global	0.973	0.976

Figura 93. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada en las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión.



4.2.6. Conclusiones

En este segundo capítulo se ha estudiado el impacto de la composición –concentraciones de fase dispersa y emulgente hidrofóbico– y las condiciones de operación –velocidad o presión de homogenización– del sistema emulsificado W/Og rico en PUFAs ω -3 y curcumina sobre su estabilidad física (tamaño de partícula) y oxidativa (primaria y secundaria), así como sobre su capacidad para proteger y estabilizar en el tiempo curcumina vehiculizada.

Como primera conclusión, el método de homogenización a alta presión puede llegar a romper el oleogel de la fase continua y, por tanto, puede dar lugar a emulsiones con tamaños medios de gota mayores e inestables físicamente. Asimismo, la emulsificación de un oleogel para la obtención de emulsiones W/Og, independientemente del método de homogenización utilizado, reduce significativamente la oxidación lipídica primaria y secundaria.

Con respecto a las emulsiones W/Og preparadas mediante homogenización a alta velocidad de cizalla, el tamaño medio de gota está afectado principalmente por la interacción $[Emulgente] * Velocidad$; la oxidación lipídica primaria, por la concentración de fase dispersa y emulgente en su contribución lineal; y, por último, en el caso de la oxidación secundaria, la concentración de fase dispersa es la única variable estadísticamente significativa. En relación a las emulsiones W/Og preparadas mediante homogenización a alta presión, ninguna de las variables independientes consideradas afecta significativamente al tamaño medio de gota ni a la oxidación lipídica primaria; en cambio, al igual que sucede en las emulsiones W/Og preparadas a alta velocidad, la concentración de fase dispersa es el factor más relevante sobre la oxidación lipídica secundaria. Para finalizar, también se concluye que ninguna de las variables independientes estudiadas es lo suficientemente significativa como para ser representativa sobre la capacidad de retención de curcumina, independientemente del método de homogenización empleado para elaborar la emulsión W/Og.

Las condiciones óptimas que minimizan conjuntamente el tamaño de partícula y la oxidación lipídica primaria y secundaria y, a su vez, maximizan la capacidad de retención de curcumina de la emulsión W/Og homogenizada a alta velocidad de cizalla son: 38.37 % p/p de fase dispersa, 7.35 % p/p de PGPR y 12600 rpm de velocidad de homogenización, obteniendo un tamaño medio de partícula de 6.379 μm , una concentración de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos de 3646.9 y 349.2 mg/L, respectivamente, y una capacidad de retención de curcumina del 91.9 %. Para las emulsiones W/Og homogenizadas a alta presión, el conjunto de condiciones óptimas son: 38.37 % p/p de fase dispersa, 7.11 % p/p de PGPR y 5500 psi de presión de homogenización, obteniendo un tamaño medio de partícula de 6.181 μm , una concentración de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos de 2509.3 y 365.9 mg/L, respectivamente, y una capacidad de retención de curcumina del 100.0 %.

4.3. Diseño, desarrollo y optimización de un sistema de liberación basado en emulsiones Og/W rico en PUFAs ω -3 y curcumina

En este nuevo capítulo se presentan los resultados obtenidos para el tercer objetivo de esta Tesis Doctoral, el diseño y desarrollo de un sistema de liberación basado en emulsiones Og/W fisicoquímicamente estable para la encapsulación en la fase dispersa, protección, vehiculización y liberación de altas dosis de PUFAs ω -3 y curcumina por vía oral. Para ello, primero se estudió la influencia de la composición y las condiciones de operación del sistema emulsificado sobre su estabilidad física y oxidativa, así como sobre su capacidad para proteger y estabilizar en el tiempo curcumina vehiculizada. Este estudio se realizó mediante dos metodologías de homogenización diferentes: homogenización a alta velocidad de cizalla y a alta presión. Posteriormente y en base a estos resultados, se aplicó la metodología de superficie de respuesta para obtener la formulación y condiciones de operación óptimas de la emulsión Og/W. Para terminar, sobre esta fórmula óptima se llevaron a cabo estudios reológicos, de estabilidad de la emulsión y la curcumina incorporada con el tiempo frente a distintas condiciones ambientales que podrían afectarle (como el pH, la fuerza iónica, la luz o la temperatura), y de bioaccesibilidad y biodisponibilidad en condiciones fisiológicas humanas.

4.3.1. Diseño de experimentos

En base a nuestra experiencia previa en el diseño y desarrollo de otras emulsiones O/W, se seleccionaron las variables más importantes a considerar en un DOE y sus rangos correspondientes: por un lado las concentraciones de fase dispersa (5–15 % p/p), emulgente hidrofílico (Tween 20, 1.0–5.0 % p/p) y estabilizante (0.20–0.50 % p/p) y, por otro, la velocidad (6000–12000 rpm) o la presión (2000–6000 psi) de homogenización, según corresponda, en función del método utilizado para la

emulsificación. A partir de estas variables independientes, se aplicó un diseño de Box-Behnken que permitiese evaluar simultáneamente los efectos de todas ellas y de sus posibles interacciones sobre el tamaño de partícula, la oxidación primaria y secundaria y la capacidad de retención de curcumina (variables respuesta). Se contemplaron 3 niveles por factor (máximo, medio y mínimo) para facilitar la construcción de modelos polinómicos de segundo grado y se efectuaron 3 repeticiones del punto central para la estimación del error experimental, obteniendo un total de 29 experimentos que se detallan en las Tablas W1 y W2. El diseño fue ejecutado en un solo bloque y el orden de los experimentos fue completamente aleatorizado para garantizar una distribución azarosa de la variabilidad no planificada (ruido aleatorio) y evitar así la introducción de sesgos en el experimento.

A este diseño experimental se le añadió una muestra adicional (control) que consistió en el mismo oleogel que el utilizado para la elaboración de las emulsiones Og/W. Con ella se pretendía evaluar el impacto del proceso de emulsificación del oleogel sobre la oxidación lipídica y la capacidad de retención de curcumina.

Tabla 31. Matriz de experimentos del diseño de Box-Behnken para la emulsión Og/W preparada a alta velocidad.

Nº de experimento	[Fase dispersa], % p/p	[Emulgente], % p/p	[Estabilizante], % p/p	Velocidad de homogenización, rpm
1	15	3.0	0.50	9000
2	10	3.0	0.35	9000
3	10	3.0	0.35	9000
4	10	3.0	0.20	12000
5	10	3.0	0.50	6000
6	10	3.0	0.35	9000
7	15	5.0	0.35	9000
8	10	1.0	0.20	9000
9	10	3.0	0.20	6000
10	5	1.0	0.35	9000
11	5	3.0	0.20	9000
12	5	3.0	0.50	9000
13	10	5.0	0.35	12000
14	10	1.0	0.35	12000
15	5	3.0	0.35	12000
16	10	1.0	0.50	9000
17	15	1.0	0.35	9000
18	10	5.0	0.50	9000
19	10	5.0	0.20	9000
20	15	3.0	0.35	12000
21	10	3.0	0.50	12000
22	15	3.0	0.20	9000
23	10	1.0	0.35	6000
24	5	5.0	0.35	9000
25	10	5.0	0.35	6000
26	5	3.0	0.35	6000
27	15	3.0	0.35	6000
28	10	3.0	0.35	9000
29	10	3.0	0.35	9000

Tabla 32. Matriz de experimentos del diseño de Box-Behnken para la emulsión Og/W preparada a alta presión.

Nº de experimento	[Fase dispersa], % p/p	[Emulgente], % p/p	[Estabilizante], % p/p	Presión de homogenización, psi
1	15	3.0	0.50	4000
2	10	3.0	0.35	4000
3	10	3.0	0.35	4000
4	10	3.0	0.20	6000
5	10	3.0	0.50	2000
6	10	3.0	0.35	4000
7	15	5.0	0.35	4000
8	10	1.0	0.20	4000
9	10	3.0	0.20	2000
10	5	1.0	0.35	4000
11	5	3.0	0.20	4000
12	5	3.0	0.50	4000
13	10	5.0	0.35	6000
14	10	1.0	0.35	6000
15	5	3.0	0.35	6000
16	10	1.0	0.50	4000
17	15	1.0	0.35	4000
18	10	5.0	0.50	4000
19	10	5.0	0.20	4000
20	15	3.0	0.35	6000
21	10	3.0	0.50	6000
22	15	3.0	0.20	4000
23	10	1.0	0.35	2000
24	5	5.0	0.35	4000
25	10	5.0	0.35	2000
26	5	3.0	0.35	2000
27	15	3.0	0.35	2000
28	10	3.0	0.35	4000
29	10	3.0	0.35	4000

4.3.2. Estudio y optimización de una emulsión Og/W preparada mediante homogenización a alta velocidad de cizalla

En el presente apartado se estudia la influencia de la composición y las condiciones de operación de la emulsión Og/W preparada mediante homogenización a alta velocidad sobre su estabilidad física y oxidativa, así como sobre su capacidad para proteger y estabilizar en el tiempo curcumina. Posteriormente y en base a estos resultados, se aplica la metodología de superficie de respuesta para obtener la formulación y condiciones de operación óptimas.

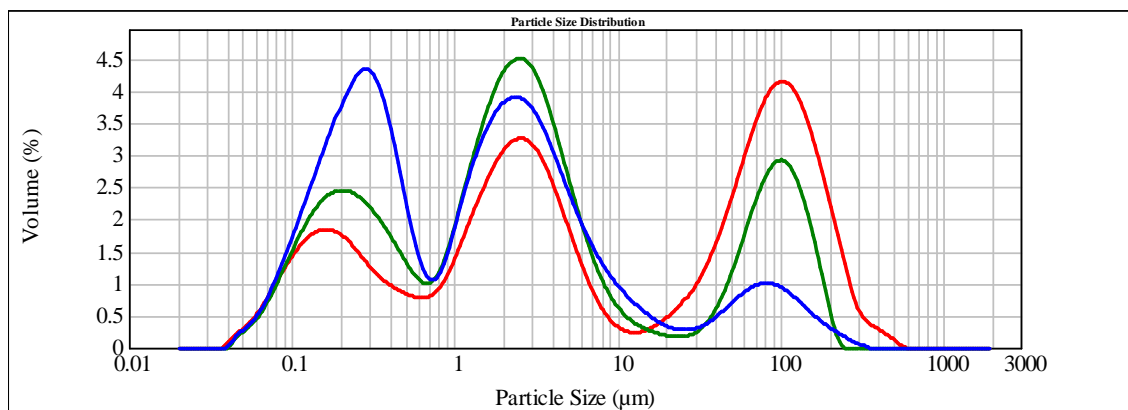
4.3.2.1. Efecto de las variables de operación sobre la estabilidad física

El tamaño de partícula es un parámetro fundamental en los sistemas emulsificados puesto que afecta sobre la reología, la estabilidad, la vida útil, la textura y el sabor de las emulsiones (McClements, 2015; Yildirim et al., 2016). En relación a la estabilidad de una emulsión, un sistema físicamente estable se corresponde generalmente con una distribución de tamaños poco dispersa y con un pico máximo situado en diámetros pequeños. A medida que se desestabiliza el sistema emulsionado con el tiempo, éste tiende a presentar una curva de distribución de tamaños más dispersa y con el pico máximo localizado en diámetros mayores (Mita et al., 1973; Dickinson, 1989). Por tanto, para poder estudiar el efecto de los diferentes factores considerados sobre la estabilidad física de la emulsión Og/W, se va a analizar su influencia sobre la distribución de tamaños de gota de fase dispersa.

Las curvas de distribución de tamaños de gota típicas para las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad son trimodales, según se observa en la Figura 94. El primer pico está localizado entre 0.150 y 0.300 μm , el segundo entre 2 y 3 μm y, el tercero, alrededor de las 100 μm ; todos ellos bastante anchos, indicando

que se trata de emulsiones muy polidispersas. En base a nuestra experiencia previa en emulsiones, el método de homogenización a alta velocidad en las condiciones de operación utilizadas, proporciona tamaños medios de gota superiores a las 0.8–0.9 μm ; por consiguiente, el primero de los picos obtenidos no podría deberse a gotas de fase dispersa, sino que más bien debe corresponder a algún componente de la emulsión en suspensión (por ejemplo, el estabilizante) o formando micelas (como el emulgente). El segundo pico sí correspondería a las gotas de fase dispersa de la emulsión Og/W que, a medida que envejece y aparecen fenómenos de floculación, coagulación o maduración de Ostwald, dan lugar a gotas de diámetros mayores que son las representadas en el tercero de los picos de la curva de distribución de tamaños. Por tanto, el diámetro volumétrico o diámetro medio de De Brouckere, $d_{[4,3]}$, representa el tamaño promedio de la emulsión Og/W, en su conjunto; mientras que la moda de la distribución de tamaños, d_{mode} , informa sobre cuál es el pico más importante.

Figura 94. Curvas de distribución de tamaños de gota de tres emulsiones Og/W, 30 días después de su elaboración.



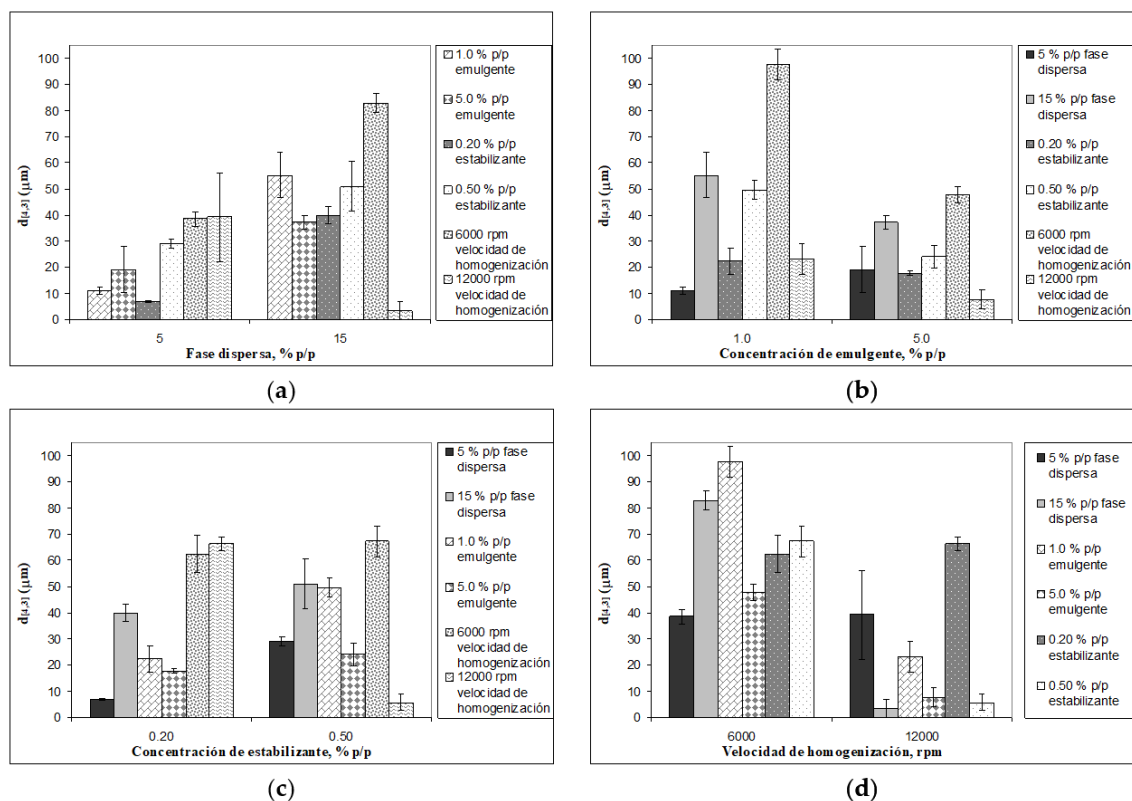
La Tabla 33 recoge el diámetro volumétrico, $d_{[4,3]}$, la moda de la distribución de tamaños, d_{mode} , y la uniformidad, U , de las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad, medidas 30 días después de su elaboración. También muestra el pH de las emulsiones anteriores a día 28, pH que estuvo comprendido entre 4.62 (emulsión 24) y 6.06 (emulsión 1) y que podría tener algún efecto sobre la carga eléctrica de las gotas en la membrana superficial (potencial zeta de las gotas), la viscosidad de la emulsión y, en definitiva, sobre su estabilidad física, como se explicará más adelante.

Tabla 33. Tamaño de gota y pH de las diferentes emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad, 30 y 28 días después de su elaboración.

N° de experimento	$d_{[4,3]}$, μm	d_{mode} , μm	U	pH
1	51.007	102.886	10.5	6.06
2	24.635	2.531	11.2	5.24
3	24.746	2.522	10.9	5.05
4	66.248	0.176	73.4	4.94
5	67.244	73.295	0.64	5.13
6	23.931	2.506	9.87	5.05
7	37.421	2.514	12.9	5.08
8	22.407	2.484	12.6	5.17
9	62.567	122.601	2.82	4.93
10	11.006	0.282	8.03	5.16
11	7.012	2.653	4.40	4.88
12	29.121	2.564	14.0	5.02
13	7.678	0.248	10.7	4.71
14	23.041	0.271	42.3	5.06
15	39.194	130.659	68.9	4.78
16	49.492	121.139	15.4	5.64
17	55.260	133.353	14.7	5.31
18	24.140	2.374	10.9	4.96
19	17.658	2.590	8.91	4.79
20	3.311	1.890	5.43	5.06
21	5.707	0.189	13.3	4.99
22	39.970	2.538	13.9	5.13
23	97.609	82.156	0.92	5.34
24	19.160	2.961	8.09	4.62
25	47.737	89.218	1.75	4.84
26	38.526	69.615	1.84	5.23
27	82.805	108.551	0.67	5.25
28	24.794	2.565	12.0	4.97
29	29.598	2.643	13.1	4.94

Dado el elevado número de experimentos y factores estudiados que pueden llegar a hacer difícil la lectura e interpretación de resultados, estos se han agrupado en diferentes gráficos. Así, la Figura 95 representa el tamaño medio de gota de las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad, medido 30 días después de su elaboración, en función de las diferentes variables independientes consideradas. Cada una de las barras representa el diámetro a dos de estas variables indicadas en la figura. Las otras dos variables, cuyos valores no se indican, toman los valores medios ensayados: 10 % p/p de fase dispersa, 3.0 % p/p de emulgente hidrofílico, 0.35 % p/p de estabilizante y 9000 rpm de velocidad de homogenización.

Figura 95. Tamaño de gota de las emulsiones Og/W, 30 días después de su elaboración, en función de: a) la fracción de fase dispersa, b) la concentración de emulgente, c) la concentración de estabilizante, y d) la velocidad de homogenización.



A continuación, se presenta el modelo cuadrático ajustado para el diámetro volumétrico de las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad, en función de las variables independientes consideradas y de sus correspondientes interacciones.

$$\text{Modelo a alta velocidad de cizalla: } d_{[4,3]} = 26.8041 + 10.4796*[Fase dispersa] - 8.75175*[Emulgente] - 20.9424*Velocidad - 6.49825*[Fase dispersa]*[Emulgente] - 20.0405*[Fase dispersa]*Velocidad - 5.15075*[Emulgente]*[Estabilizante] + 8.62725*[Emulgente]*Velocidad + 4.46106*[Estabilizante]^2 - 16.3045*[Estabilizante]*Velocidad + 16.8478*Velocidad^2 \quad \text{Ec. [38]}$$

Para el diámetro volumétrico, el p_{MOD} fue de 0.0033 (inferior a 0.05) pero el p_{LOF} obtenido al comparar la variabilidad de los residuos del modelo con la variabilidad entre observaciones obtenidas en condiciones repetidas de los factores fue inferior a 0.05, indicando que el modelo así ajustado no representaba adecuadamente los datos experimentales. Eliminando secuencialmente aquellas variables estadísticamente menos significativas ($[Emulgente]^2$, $[Estabilizante]$, $[Fase dispersa]^2$ y $[Fase dispersa]*[Estabilizante]$), se simplificó el modelo y se llegó a obtener uno adecuado (Ec. 38). Así, el nuevo modelo obtenido presentó un R^2 de 82.09 % y un valor p de falta de ajuste de 0.0577 (Tabla 34); con un p_{MOD} de 0.0001 que permite afirmar que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables independientes y dependiente con un nivel de confianza del 95 %. Además, la ausencia de un patrón en la gráfica de los residuos contra los valores ajustados o predichos (Figura 96) indica que el modelo seleccionado describe adecuadamente los datos experimentales.

Figura 96. Gráfica de residuos para el tamaño medio de gota de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.

Gráfica de residuos para $d_{[4,3]}$ a alta velocidad

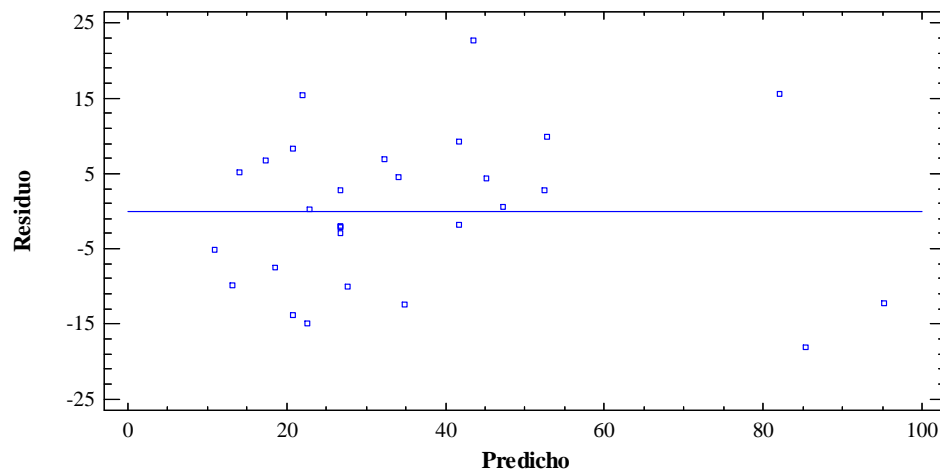


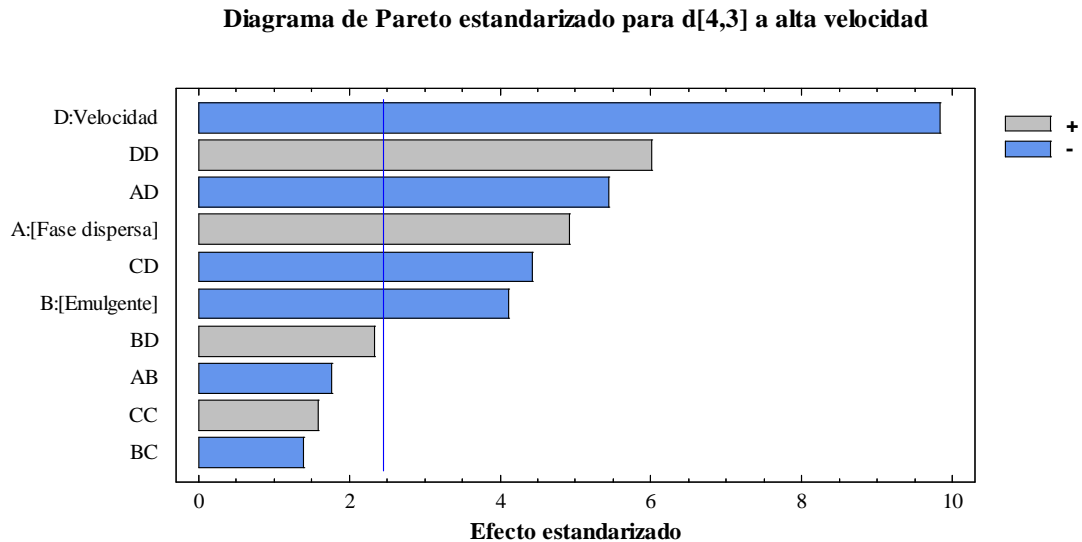
Tabla 34. Análisis de la varianza (ANOVA) para el tamaño medio de gota de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor p*
[Fase dispersa]	1317.86	1	1317.86	24.23	0.0027
[Emulgente]	919.118	1	919.118	16.90	0.0063
Velocidad	5263.02	1	5263.02	96.75	0.0001
[Fase dispersa]*[Emulgente]	168.909	1	168.909	3.11	0.1285
[Fase dispersa]*Velocidad	1606.49	1	1606.49	29.53	0.0016
[Emulgente]*[Estabilizante]	106.121	1	106.121	1.95	0.2120
[Emulgente]*Velocidad	297.718	1	297.718	5.47	0.0579
[Estabilizante] ²	137.356	1	137.356	2.53	0.1631
[Estabilizante]*Velocidad	1063.35	1	1063.35	19.55	0.0045
Velocidad ²	1959.11	1	1959.11	36.02	0.0010
Falta de ajuste	2451.05	12	204.254	3.75	<i>0.0577</i>
Error puro	326.374	6	54.3956		
Total (corr.)	15511.6	28			

* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

Tras un análisis de la varianza (ANOVA) de los valores observados (Tabla 34), se vio que tanto la concentración de fase dispersa como la de emulgente ejercen un efecto estadísticamente significativo en orden lineal sobre el tamaño medio de gota ($p < 0.05$). Asimismo, la velocidad de homogenización, tanto en su término lineal como cuadrático, también afectó significativamente al tamaño de gota. Para terminar, otros efectos de orden superior que también resultaron significativos fueron las interacciones fracción de fase dispersa-velocidad de homogenización y concentración de estabilizante-velocidad de homogenización. Todos estos factores estadísticamente significativos también pueden verse en el diagrama de Pareto estandarizado para el tamaño medio de gota de las emulsiones Og/W homogenizadas a alta velocidad (Figura 97), con indicación de si la variable considerada ejerce un efecto positivo o negativo sobre la variable respuesta.

Figura 97. Diagrama de Pareto estandarizado para el tamaño medio de gota de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.



De todas ellas, la Figura 97 muestra claramente que la variable ‘*velocidad de homogenización*’, tanto en su término lineal como cuadrático, es la que ejerce un efecto estadísticamente más significativo sobre el tamaño medio de gota: un aumento en la velocidad de homogenización de la emulsión Og/W da lugar a gotas de fase dispersa más pequeñas. En menor medida, sus interacciones con la fracción de fase dispersa y la concentración de estabilizante también resultaron significativas (Figura 97). La Figura 95d muestra gráficamente esta influencia de la velocidad de homogenización sobre el diámetro volumétrico y, en efecto, al aumentar la velocidad de homogenización de 6000 a 12000 rpm, se observa una reducción drástica en el tamaño medio de gota que pasa de 97.6 a 23.0 μm en el caso de las emulsiones Og/W al 1.0 % p/p de emulgente o de 47.7 a 7.7 μm en las emulsiones Og/W al 5.0 % p/p de emulgente.

Para explicar la influencia de la agitación dentro de la formación de la emulsión se puede ver lo que sucede con una gota cuando se acerca a las aspas del impulsor y cuando se aleja de éstas. Cuando se encuentra cerca de las aspas es sometida a un proceso de cizallamiento que depende de las características del impulsor, pero que en la gota pueden generar un estiramiento mayor o menor, dependiendo de la tensión interfacial dada por la adsorción del emulgente, viscosidad y presencia de otras gotas en las cercanías. La intensidad del efecto puede producir la ruptura en una o más gotas. Cuando éstas se alejan de las aspas entonces viajan a través de la fase continua

encontrándose con otras gotas donde es posible la coalescencia. Según algunos estudios, el esfuerzo cortante hidrodinámico generado por el flujo turbulento que produce el agitador aumenta con el cubo de la velocidad de homogenización (Scholz & Keck, 2015). Además, cualquier aportación energética a un sistema conduce a la disipación de energía, en este caso, a través de calor. Gracias a ese aumento de temperatura, la viscosidad del oleogel disminuye significativamente y ello facilita también la reducción de tamaño. Estos resultados están en línea con los obtenidos por Scholz & Keck (2015), quienes estudiaron el tamaño y la distribución de tamaños de gota de nanoemulsiones obtenidas con un homogenizador de rotor y estator en función de la velocidad y el tiempo de homogenización.

Por otro lado, la concentración de fase dispersa es otra de las variables que afecta significativamente de forma positiva al tamaño medio de gota, esto es, a mayor cantidad de fase dispersa en la emulsión Og/W, mayor diámetro volumétrico. Así por ejemplo, independientemente de la concentración de emulgente o estabilizante utilizada, el diámetro volumétrico de las gotas al usar una fracción de fase dispersa del 5 % p/p estuvo comprendido entre 7.0 y 29.1 μm en el peor de los casos (tamaños más grandes); sin embargo, cuando se incrementó la fracción de fase dispersa hasta un 15 % p/p, el diámetro volumétrico aumentó hasta valores de 37.4 μm o más (Figura 95a). Por tanto, estos resultados sugieren que disminuyendo la cantidad de fase dispersa, se reduce el tamaño medio de gota de la emulsión Og/W, hecho que también tiene su efecto sobre la superficie expuesta a la oxidación y, por consiguiente, sobre la estabilidad oxidativa (ver apartado 4.3.2.2.).

La concentración de emulgente también influyó significativamente y de forma negativa sobre el tamaño medio de gota: la Figura 95b muestra cómo concentraciones más altas de emulgente (en este caso, 5.0 % p/p) conducen a tamaños de gota promedio menores, que en algunos casos representan el 78.8 % pero pueden alcanzar el 33.3 % del tamaño de gota de la emulsión equivalente cuando se utilizan concentraciones de emulgente más pequeñas (1.0 % p/p). Estos tamaños de gota más pequeños se traducen en una mayor estabilidad física de las emulsiones Og/W a lo largo del tiempo a concentraciones de emulgente más altas. Este resultado concuerda con estudios previos en los que se afirma que la estabilidad física de las emulsiones depende en gran medida del grosor del área interfacial y de la carga electrostática, que a su vez viene

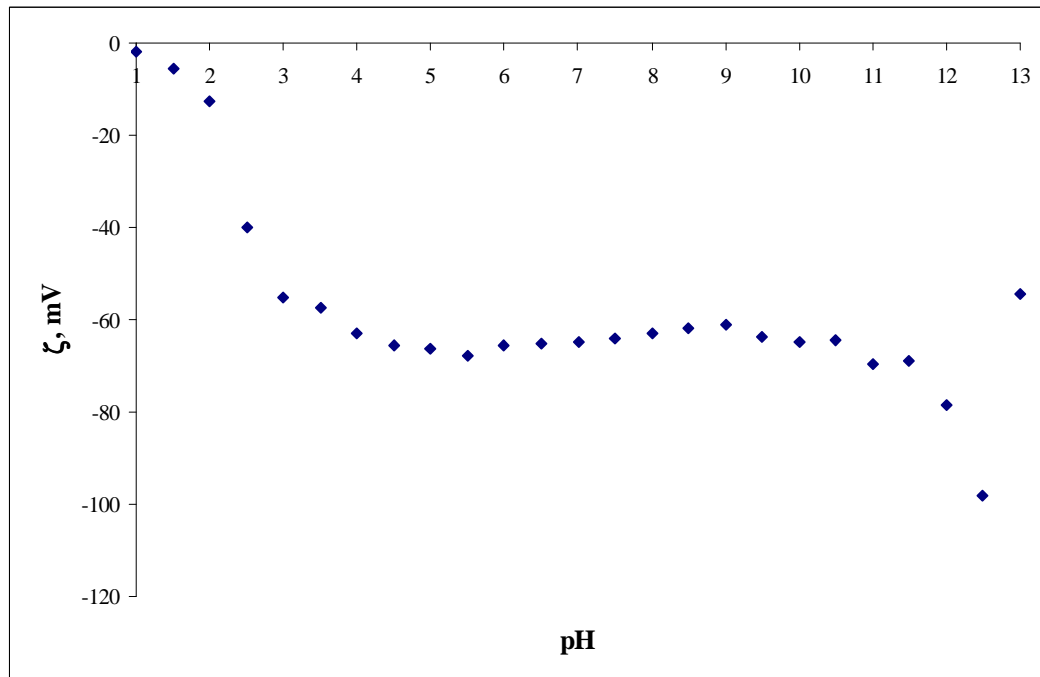
determinada por el tipo y concentración de emulgente utilizado: el emulgente debe estar presente en cantidades suficientes como para recubrir completamente la superficie de las gotas (Friberg et al., 2003; Raikos et al., 2017). En este caso, el emulgente utilizado (Tween 20) es un emulgente no iónico que, como todo emulsionante, estabiliza las gotículas de fase dispersa por disminución de la tensión superficial y, además, el Tween 20 ejerce un impedimento estérico debido a las cadenas de polioxietileno. Por tanto, cabe esperar que una mayor concentración de emulgente produzca un mayor recubrimiento de las gotitas de oleogel y un mayor espesor interfacial, evitando así que las gotitas se acerquen entre sí y, en consecuencia, disminuyendo los mecanismos de desestabilización física como la floculación, la coalescencia o la maduración de Ostwald (Friberg et al., 2003; Raikos et al., 2017). Estos resultados también están en consonancia con el estudio desarrollado por Kowalska et al. (2017) en el que se estudió la estabilidad a largo plazo de seis emulsiones de aceite de rosa con diferentes cantidades de emulgente. Finalmente, los autores llegaron a la conclusión de que cantidades más altas de emulgente conducen a distribuciones estables de tamaños de gota. Sin embargo, este hecho no se verificó en las emulsiones Og/W con una menor cantidad de fase dispersa (5 % p/p), en las que el tamaño de gota aumentó de 11.0 a 19.2 μm al aumentar la concentración de emulgente del 1.0 % p/p al 5.0 % p/p. En este caso, al haber una menor cantidad de fase dispersa, las gotas podrían recubrirse con concentraciones de emulgente más pequeñas y, por tanto, el hecho de añadir una cantidad de emulgente superior a la necesaria produce un exceso de emulgente que quedará en suspensión en la fase acuosa, proporcionando tamaños ligeramente mayores. Por su parte, Ma et al. (2018) estudiaron el impacto del tipo de emulgente y la proporción emulgente:fase dispersa en nanoemulsiones de curcumina, concluyendo que proporciones de emulgente:fase dispersa menores mejoran adecuadamente la estabilidad física de las nanoemulsiones.

Finalmente, cabe mencionar que aunque la variable '*concentración de espesante*' no haya resultado estadísticamente significativa e incluso haya sido eliminada del modelo, la adición de XG resultó fundamental para obtener emulsiones Og/W físicamente estables en el tiempo. El propósito de este tipo de polisacáridos es aumentar la viscosidad de la fase continua, reducir el movimiento browniano entre las gotas de fase dispersa y ralentizar el movimiento vertical que origina procesos de

cremado y/o sedimentación (según la ley de Stokes, la velocidad de caída o sedimentación es inversamente proporcional a la viscosidad del medio continuo) para así mantener los componentes emulsionados estables durante períodos más prolongados (Sun et al., 2007; Krstonošić et al., 2015). Sin embargo, a pesar de ser un ingrediente clave en la estabilidad física de la emulsión, la concentración en la que se encuentra no es significativa sobre el tamaño de gota y puede favorecer o no su estabilidad. De hecho, muchos autores ya han informado que por encima de una determinada concentración de XG, la formación de cremado en las emulsiones O/W aumenta debido al mecanismo de floculación por agotamiento (Sun et al., 2007; Krstonošić et al., 2015). Este efecto puede observarse en la Figura 95c donde, aumentando la concentración de espesante de 0.20 a 0.50 % p/p, se obtuvieron emulsiones Og/W con tamaños de gota hasta 3.15 veces mayores. La explicación radica en que a bajas concentraciones de XG, gracias a sus propiedades estabilizantes, espesantes y gelificantes, estabiliza físicamente las emulsiones aumentando la viscosidad y el límite elástico. Sin embargo, a concentraciones suficientemente altas, se pueden formar agregados indeseados. Esto también concuerda con lo observado por Viana et al. (2018), quienes evaluaron la estabilidad de las emulsiones de aceite de nuez enriquecidas con vitamina D y descubrieron que concentraciones más bajas de XG (0.03–0.3 % p/p) disminuían significativamente el tamaño de las gotas de las emulsiones, utilizando este polisacárido como único emulsionante. Sin embargo, sí que se apreció formación de cremado probablemente debido a las concentraciones excesivamente bajas de XG.

Relacionado también con el estabilizante, otro de los factores que también podría llegar a influir sobre la carga superficial y la viscosidad de la XG y, por tanto, afectar a la estabilidad física de la emulsión, es el pH. Por eso, la Figura 98 muestra la carga superficial de la XG en función del pH, en el intervalo de 1 a 13. En vista de la Figura 98, se observa que el potencial zeta de la XG siempre fue negativo en todo el intervalo de pH estudiado. Particularmente, en el rango de pH 2.5–13.0, su potencial zeta es inferior a -30 mV y da lugar a suspensiones estables por repulsión entre las gotículas de fase dispersa. En el rango de pH de las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad (Tabla 33), el potencial zeta de la XG oscila en torno a -66.4 mV que, al ser un potencial zeta bastante negativo, da lugar a emulsiones estables.

Figura 98. Carga superficial de la XG en función del pH.

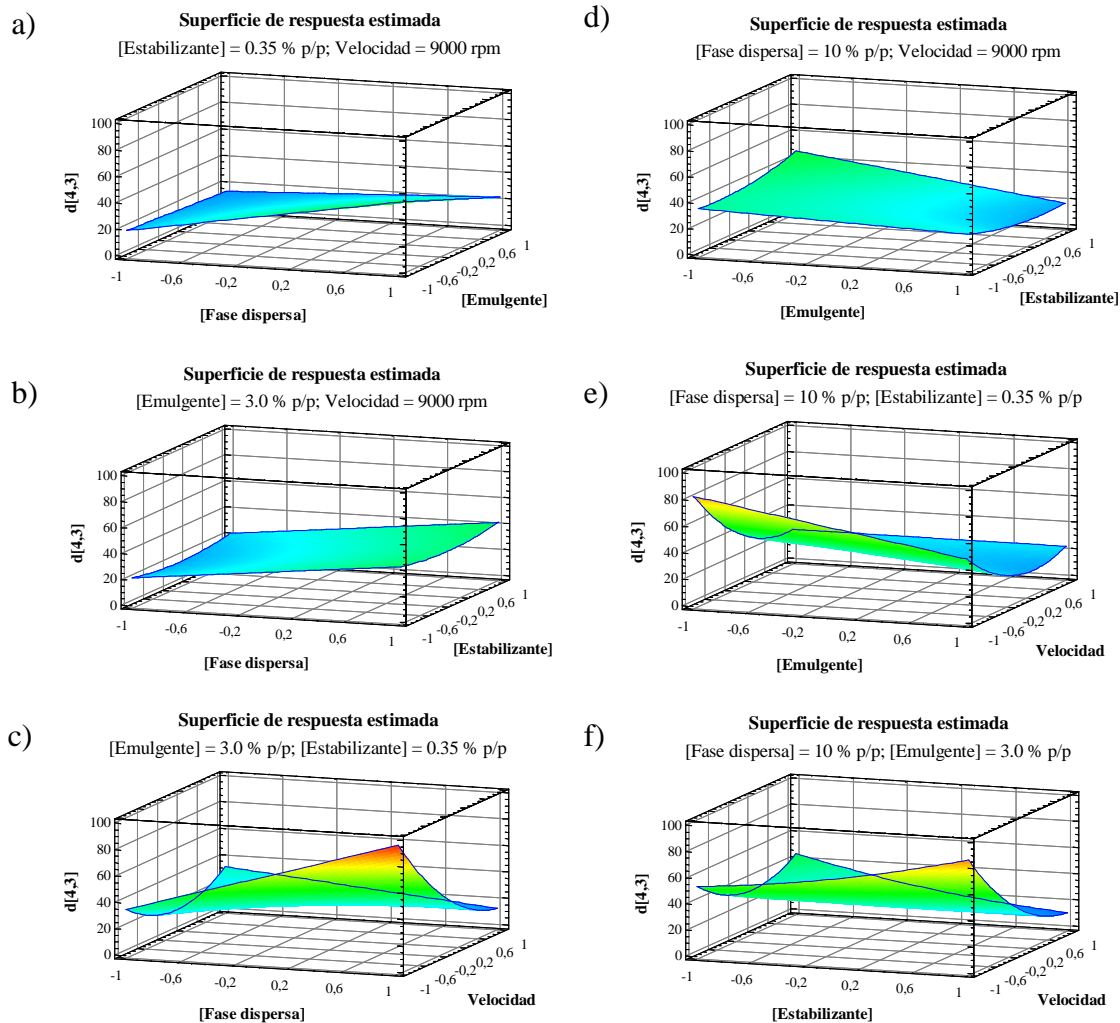


Por otro lado, los valores de viscosidad de la XG son bastantes insensibles a variaciones de pH. Sin embargo, se ha observado que las disoluciones de XG disminuyen ligeramente su viscosidad a valores de pH por debajo de 4, siendo dicha reducción de viscosidad más evidente a bajas velocidades de cizalla. Este es un proceso reversible y si el pH vuelve a aumentar por encima de 4 la disolución recupera su viscosidad original. Dicha reducción de viscosidad podría estar causada por la supresión de las repulsiones electrostática entre las cadenas laterales al pasar los grupos carboxilos de su forma ionizada (COO^{-1}) a la desionizada COOH (Agoub et al., 2007). Por otro lado, a pH superiores a 9, la XG se desacetila gradualmente, sin que esto suponga una gran variación en los valores de viscosidad. Por tanto, de acuerdo con los valores de pH medidos en las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad, éste no afectará a la viscosidad de la fase continua y, por tanto, a la estabilidad física de la emulsión.

Una vez establecido el modelo que permite ajustar el diámetro volumétrico de las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad con las variables independientes, se obtuvieron las condiciones óptimas para minimizar esos diámetros. En efecto, estableciendo una concentración de fase dispersa del 15 % p/p, una concentración de emulgente del 5.0 % p/p, una concentración de estabilizante de

0.49 % p/p y una velocidad de homogenización de 12000 rpm, se podría llegar a alcanzar un tamaño medio de gota mínimo. La Figura 99 muestra las superficies de respuesta ajustadas del tamaño medio de gota para cada par de variables independientes.

Figura 99. Superficie de respuesta estimada para el tamaño medio de gota de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.



4.3.2.2. Efecto de las variables de operación sobre la estabilidad oxidativa

La oxidación lipídica en emulsiones Og/W depende de muchos factores, incluido el tipo y concentración de fase dispersa así como de emulgente y estabilizante, la

presencia de compuestos con propiedades prooxidantes o antioxidantes junto con ingredientes no adsorbidos en cualquiera de las fases, el método de homogenización, el área interfacial y la carga eléctrica de la gota, el pH, etc. (Berton-Carabin et al., 2014). Y muy especialmente la interfase representa una zona crítica dentro de la estructura de la emulsión, ya que es la zona donde se encuentran en contacto todos los sustratos susceptibles de sufrir oxidación y es donde se van a disponer sustancias con actividad superficial como el oxígeno, los hidroperóxidos lipídicos, etc. (Nuchi et al., 2002). Para comprender mejor el papel de la fracción de fase dispersa, las concentraciones de emulgente y estabilizante y la velocidad de homogenización sobre la estabilidad oxidativa de las emulsiones Og/W, se ensayaron diferentes composiciones y condiciones de operación y se midió la oxidación lipídica tanto primaria como secundaria. Las Figuras 100 y 101 representan los porcentajes de aumento de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos el día 30 de su elaboración con respecto a las concentraciones medidas a tiempo 0, a un cierto valor de dos de estas

Figura 100. Oxidación lipídica primaria de las emulsiones Og/W, 30 días después de su elaboración, en función de: a) la fracción de fase dispersa, b) la concentración de emulgente, c) la concentración de estabilizante, y d) la velocidad de homogenización.

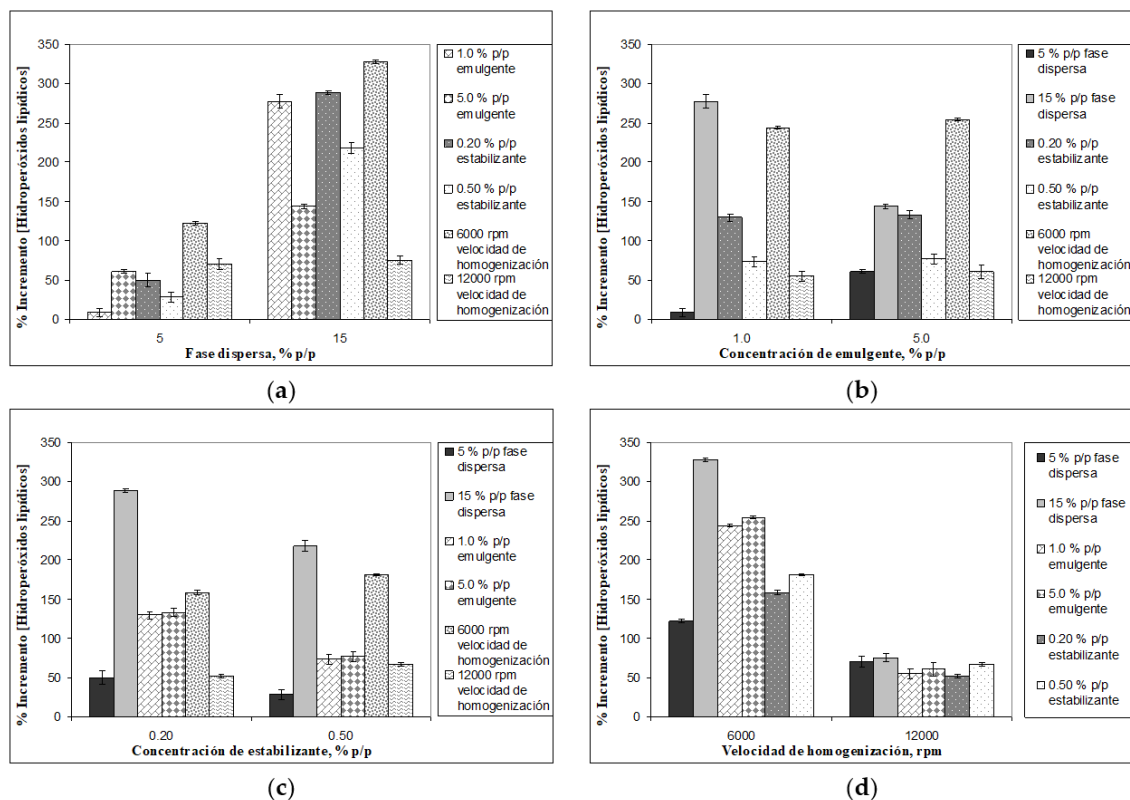
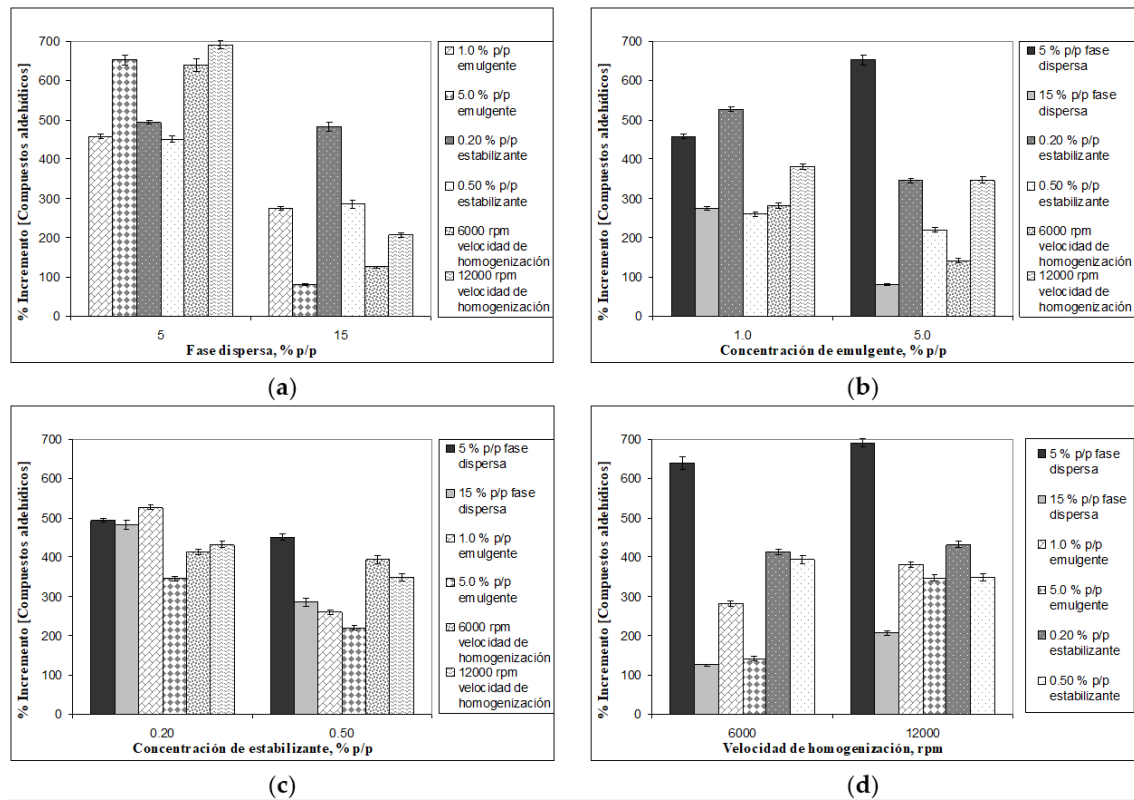


Figura 101. Oxidación lipídica secundaria de las emulsiones Og/W, 30 días después de su elaboración, en función de: a) la fracción de fase dispersa, b) la concentración de emulgente, c) la concentración de estabilizante, y d) la velocidad de homogenización.



variables indicadas en la figura; las otras dos variables independientes cuyos valores no se indican, toman los valores medios ensayados (ver apartado 4.3.1.).

A continuación, se presentan los modelos cuadráticos ajustados para el porcentaje de aumento de la concentración de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos (a día 30) de las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad, en función de las variables independientes consideradas y de sus correspondientes interacciones.

Modelo a alta velocidad de cizalla: % Aumento [*H. lipídicos*] $84.547 + 82.5857*[Fase dispersa] - 4.72717*[Emulgente] - 13.9352*[Estabilizante] - 75.7816*Velocidad + 34.9898*[Fase dispersa]^2 - 46.5193*[Fase dispersa]*[Emulgente] - 12.1095*[Fase dispersa]*[Estabilizante] - 50.292*[Fase dispersa]*Velocidad + 15.7872*[Emulgente]^2 - 0.1125*[Emulgente]*[Estabilizante] - 1.30175*[Emulgente]*Velocidad + 8.27842*[Estabilizante]^2 - 1.7475*[Estabilizante]*Velocidad + 34.8073*Velocidad^2$ Ec. [39]

Modelo a alta velocidad de cizalla: % Aumento [C. aldehídicos] = $291.598 - 161.159*[Fase\ dispersa] - 32.9689*[Emulgente] - 61.2931*[Estabilizante] + 34.0505*Velocidad + 87.3685*[Fase\ dispersa]^2 - 97.4415*[Fase\ dispersa]*[Emulgente] - 38.6857*[Fase\ dispersa]*[Estabilizante] + 7.77375*[Fase\ dispersa]*Velocidad - 21.7204*[Emulgente]^2 + 35.889*[Emulgente]*[Estabilizante] + 26.4032*[Emulgente]*Velocidad + 63.2909*[Estabilizante]^2 - 16.1*[Estabilizante]*Velocidad + 31.9918*Velocidad^2$ Ec. [40]

Los modelos de segundo orden obtenidos (Ec. 39 y 40) presentaron coeficientes de regresión del 90.79 % para la oxidación lipídica primaria y del 78.17 % para la oxidación lipídica secundaria. Por consiguiente, ambos modelos explican relativamente bien la variabilidad de los datos experimentales de oxidación primaria y secundaria. Los p_{MOD} obtenidos fueron de 0.0001 y 0.0115 respectivamente que, al ser inferiores al nivel de significancia prefijado, permiten afirmar que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables independientes y dependiente con un nivel de confianza del 95 %. Finalmente, la ausencia de un patrón definido en las gráficas de los residuos contra los valores ajustados o predichos (Figuras 102 y 103) indica que los modelos seleccionados describen adecuadamente los datos experimentales.

Figura 102. Gráfica de residuos para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.

Gráfica de residuos para % Incr. [Hidroperóxidos lipídicos] a alta velocidad

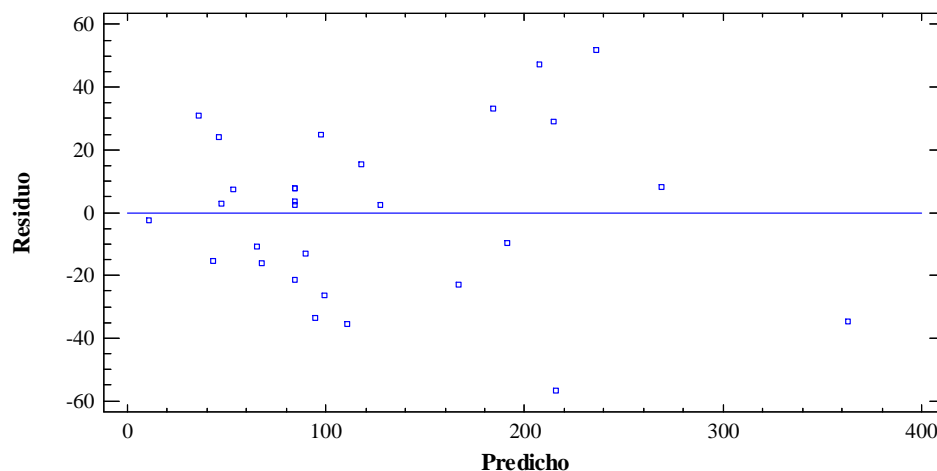
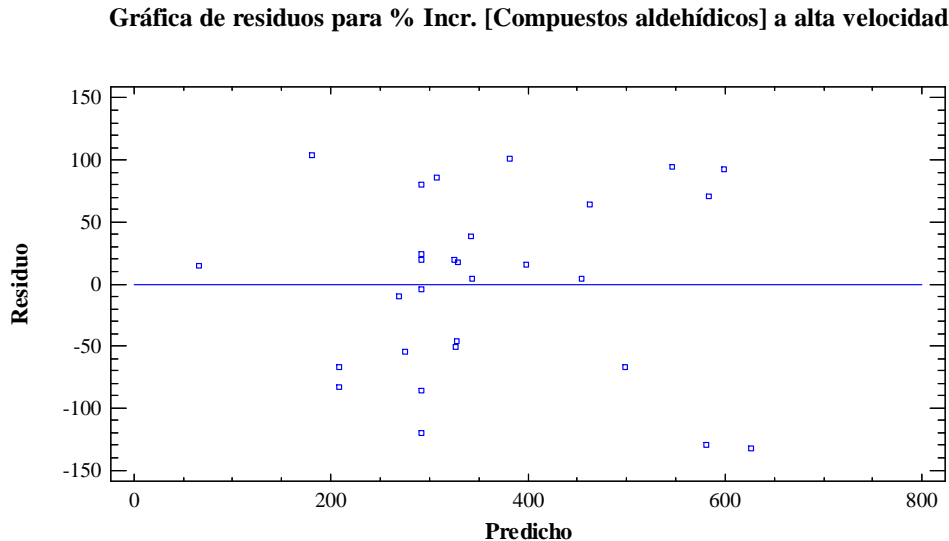
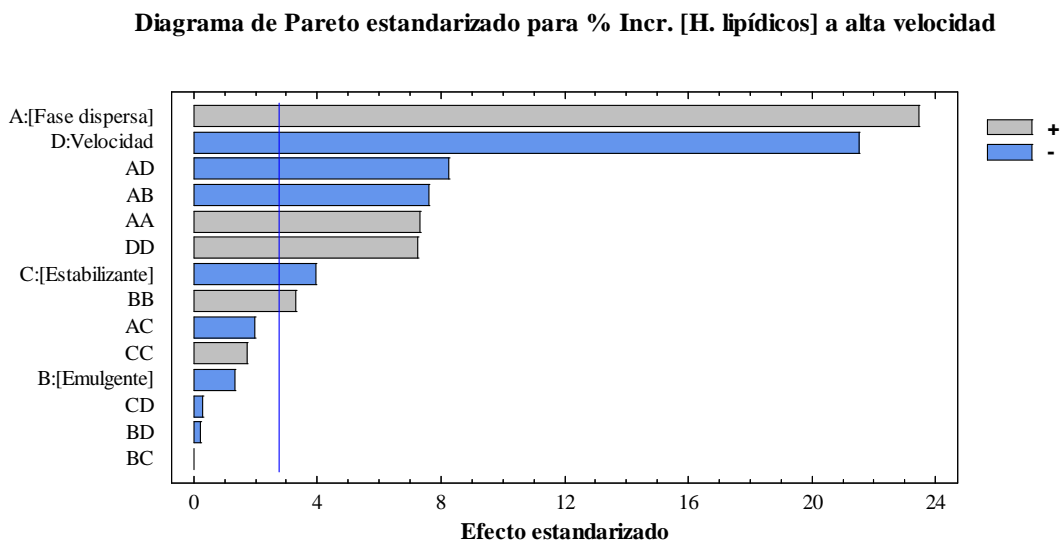


Figura 103. Gráfica de residuos para el porcentaje de aumento de compuestos aldehídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.



En la Tabla 35 se muestra el resultado del análisis de la varianza (ANOVA) entre grupos para el porcentaje de aumento de la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad. Todos los efectos estadísticamente significativos también pueden verse en el diagrama de Pareto estandarizado (Figura 104), con indicación de si la variable considerada ejerce un efecto positivo o negativo sobre la variable respuesta.

Figura 104. Diagrama de Pareto estandarizado para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.



El estudio del análisis de la varianza (ANOVA) revela que tanto la concentración de fase dispersa como la velocidad de homogenización, ambas en sus términos lineales y cuadráticos, ejercen un efecto estadísticamente significativo sobre la oxidación lipídica primaria ($p < 0.05$). Asimismo, la concentración de estabilizante en orden lineal y la concentración de emulgente en orden cuadrático, también afectaron significativamente a la oxidación primaria. Para terminar, otros efectos de orden superior que también fueron significativos son las interacciones fracción de fase dispersa–concentración de emulgente y fracción de fase dispersa–velocidad de homogenización.

Tabla 35. Análisis de la varianza (ANOVA) para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor p^*
[Fase dispersa]	81844.9	1	81844.9	549.80	0.0000
[Emulgente]	268.153	1	268.153	1.80	0.2507
[Estabilizante]	2330.27	1	2330.27	15.65	0.0167
Velocidad	68914.2	1	68914.2	462.94	0.0000
[Fase dispersa] ²	7941.31	1	7941.31	53.35	0.0019
[Fase dispersa]*[Emulgente]	8656.16	1	8656.16	58.15	0.0016
[Fase dispersa]*[Estabilizante]	586.56	1	586.56	3.94	0.1181
[Fase dispersa]*Velocidad	10117.1	1	10117.1	67.96	0.0012
[Emulgente] ²	1616.66	1	1616.66	10.86	0.0301
[Emulgente]*[Estabilizante]	0.050625	1	0.050625	0.00	0.9862
[Emulgente]*Velocidad	6.77821	1	6.77821	0.05	0.8415
[Estabilizante] ²	444.533	1	444.533	2.99	0.1590
[Estabilizante]*Velocidad	12.215	1	12.215	0.08	0.7888
Velocidad ²	7858.69	1	7858.69	52.79	0.0019
Falta de ajuste	18301.5	10	1830.15	12.29	0.0137
Error puro	595.453	4	148.863		
Total (corr.)	205156	28			

* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

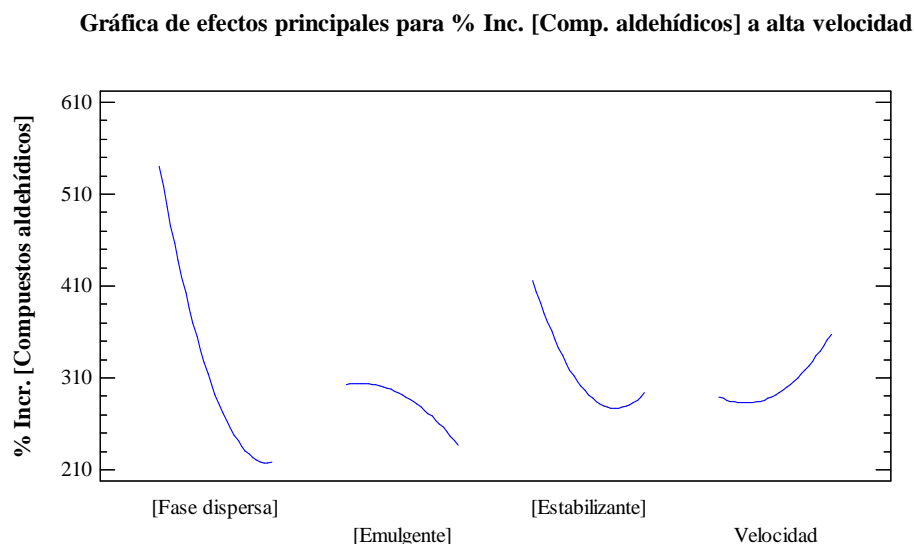
Tabla 36. Análisis de la varianza (ANOVA) para el porcentaje de aumento de compuestos aldehídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor p*
[Fase dispersa]	311665	1	311665	57.29	0.0016
[Emulgente]	13043.4	1	13043.4	2.40	0.1965
[Estabilizante]	45082.1	1	45082.1	8.29	0.0451
Velocidad	13913.2	1	13913.2	2.56	0.1850
[Fase dispersa] ²	49513.0	1	49513.0	9.10	0.0393
[Fase dispersa]*[Emulgente]	37979.4	1	37979.4	6.98	0.0575
[Fase dispersa]*[Estabilizante]	5986.35	1	5986.35	1.10	0.3534
[Fase dispersa]*Velocidad	241.725	1	241.725	0.04	0.8434
[Emulgente] ²	3060.16	1	3060.16	0.56	0.4950
[Emulgente]*[Estabilizante]	5152.08	1	5152.08	0.95	0.3856
[Emulgente]*Velocidad	2788.53	1	2788.53	0.51	0.5136
[Estabilizante] ²	25983.2	1	25983.2	4.78	0.0942
[Estabilizante]*Velocidad	1036.84	1	1036.84	0.19	0.6850
Velocidad ²	6638.74	1	6638.74	1.22	0.3313
Falta de ajuste	122588	10	12258.8	2.25	<i>0.2253</i>
Error puro	21762.0	4	5440.5		
Total (corr.)	661308	28			

* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

En el caso de la oxidación lipídica secundaria, el análisis de la varianza (ANOVA) del espacio experimental (Tabla 36) reveló bastantes menos variables significativas que en el caso de la oxidación lipídica primaria: solamente la concentración de fase dispersa, tanto en su término lineal como cuadrático, y la concentración de estabilizante, en orden lineal, ejercen un efecto estadísticamente significativo sobre la oxidación lipídica secundaria ($p < 0.05$). La influencia de estos factores sobre la variable respuesta queda puesta de manifiesto en la gráfica de efectos principales (Figura 105).

Figura 105. Gráfica de efectos principales para el porcentaje de aumento de compuestos aldehídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.



De acuerdo con lo publicado en la literatura científica y según se ha observado experimentalmente, la fracción de fase dispersa es una de las variables más importantes que influyen sobre la estabilidad oxidativa (Horn et al., 2011). Así, la Figura 100a muestra cómo reduciendo la concentración de fase dispersa del 15 al 5 % p/p, el incremento de productos primarios de la oxidación experimentó una disminución del 75.4 al 70.2 % en el caso de la reducción más pequeña (emulsiones Og/W elaboradas a 12000 rpm) o una disminución del 277.4 al 8.4 % en el caso de la reducción más grande (emulsiones Og/W con 1.0 % p/p de emulgente). Esta ralentización de la oxidación lipídica primaria cuando se reduce la fracción de fase dispersa viene a demostrar que, entre los diferentes ingredientes que componen una emulsión, la fase dispersa es el único susceptible de sufrir procesos oxidativos, que pueden conducir a un deterioro y degradación del producto. Por tanto, para conseguir una emulsión químicamente estable es fundamental centrarse en la fase dispersa seleccionada y en su concentración. En este caso, la fase dispersa elegida es un oleogel compuesto de aceite de pescado enriquecido con PUFAs ω -3. Este hecho corrobora la tendencia de este tipo de aceites a sufrir procesos oxidativos como consecuencia de las insaturaciones de sus ácidos grasos, lo que los convierte en moléculas extremadamente reactivas. Sin embargo, observando los datos correspondientes a la oxidación secundaria recogidos en la Figura 101, se aprecia que las emulsiones que presentaron un desarrollo de la oxidación lipídica primaria más

bajo (las correspondientes a una menor cantidad de fase dispersa), son ahora las que presentan un mayor desarrollo de oxidación secundaria. Así, aquellas emulsiones que presentaron un incremento de productos primarios de la oxidación de 2.77 veces su concentración inicial, ahora presentan 2.75 veces más productos secundarios de la oxidación que a tiempo 0; mientras que las emulsiones que mostraron un aumento de hidroperóxidos lipídicos del 8.4 %, ahora tienen 4.59 veces más compuestos aldehídicos que a tiempo inicial. Según ya se ha explicado, son los hidroperóxidos lipídicos los que dan lugar a la oxidación lipídica secundaria, por lo que esta transformación también podría explicar el menor porcentaje de uno frente al mayor del otro. De la explicación anterior y teniendo en cuenta que los procesos oxidativos son reacciones en cadena en las que se forman una serie de productos a partir de otros que se produjeron anteriormente, es imposible analizar uno u otro por separado y deben analizarse conjuntamente.

Otra de las variables estadísticamente más significativas sobre la oxidación lipídica primaria y secundaria es la concentración de estabilizante. Las Figuras 100c y 101c muestran una clara reducción en el desarrollo de productos primarios y secundarios de la oxidación en las emulsiones con un mayor contenido de XG (0.50 % p/p), en línea con los resultados obtenidos por otros autores (Khouryieh et al., 2015). Esta capacidad para retardar los procesos oxidativos podría atribuirse principalmente al hecho de que la XG aumenta la viscosidad de la fase continua y de la emulsión final, lo que ralentiza la difusión del oxígeno y las especies prooxidantes hacia la zona interfacial y, por tanto, reduce la oxidación lipídica primaria y secundaria. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Chen et al. (2016), quienes informaron que aunque la XG es un compuesto altamente hidrofílico con poca actividad superficial inherente, sí que puede adsorberse parcialmente en la superficie de las gotas de fase dispersa a través de interacciones con el emulgente. Como resultado de esta adsorción, el empaquetamiento de las moléculas de emulgente en la interfase de la emulsión podría ser más compacto y la membrana superficial así formada podría actuar como barrera física limitando el acceso de los iniciadores de la oxidación a las gotitas de fase dispersa. Finalmente, Shimada et al. (1992) también informaron que la XG podía utilizarse como estabilizante de emulsiones para inhibir fuertemente la peroxidación del aceite de soja en el sistema emulsificado.

La velocidad de homogenización, en su término lineal y cuadrático, también es otra de las variables que ejerce un efecto estadísticamente significativo sobre la oxidación lipídica primaria; en cambio, sobre la oxidación secundaria no ha mostrado efecto apreciable alguno. La Figura 104 revela cómo la influencia de la velocidad de homogenización sobre el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad es de forma negativa, es decir, cuanto más velocidad de homogenización, la formación de hidroperóxidos lipídicos con el tiempo se produce más lentamente. Esto queda perfectamente reflejado en la Figura 100d donde, a una velocidad de homogenización de 6000 rpm, el aumento de hidroperóxidos lipídicos a los 30 días de su preparación (de un 121.9 % a un 328.3 %) fue muy superior al aumento producido en las emulsiones Og/W homogenizadas a 12000 rpm (de un 51.6 % a un 75.4 %), algo que a priori podría resultar contradictorio en base al tamaño medio de gota. Y es que, en efecto, velocidades de homogenización más suaves dan lugar a gotas de fase dispersa de un tamaño mayor y, en consecuencia, se crean superficies interfaciales promedio en las emulsiones Og/W más pequeñas (en este trabajo se obtuvieron $1839 \mu\text{m}^2/\text{gota}$ a 12000 rpm y $13718 \mu\text{m}^2/\text{gota}$ a 6000 rpm). Además, también hay que considerar que durante el propio proceso de homogenización, debido a las fuerzas de roce-fricción y cizalla del agitador, se produce un calentamiento momentáneo del sistema que se está emulsionando y este aumento de temperatura contribuye a acelerar las reacciones de oxidación: esta generación de calor es tanto mayor cuanto mayor es la velocidad de homogenización. Por tanto, todo ello parece indicar que cuanto mayor velocidad de homogenización, la formación de hidroperóxidos lipídicos con el tiempo también debería de ser mayor pero, sin embargo, la Figura 100d muestra justamente lo contrario. En cambio, la Figura 101d revela de forma general una mayor formación de compuestos aldehídicos con el tiempo a velocidades de homogenización más altas, lo que justificaría ese menor porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos a 12000 rpm puesto que se habrían transformado en productos secundarios de la oxidación.

Finalmente, al igual que la velocidad de homogenización, la concentración de emulgente (en orden cuadrático) también ejerce un efecto estadísticamente significativo sobre la oxidación lipídica primaria y no ha demostrado ningún efecto relevante sobre la secundaria (Tablas 35 y 36). En este mismo sentido apuntan algunos otros estudios que

afirman que el tipo y la concentración de emulgente utilizado influye tanto en la estabilidad física como química de las emulsiones O/W (Raikos et al., 2017). Sin embargo, el efecto comentado sobre la oxidación lipídica primaria y no sobre la secundaria no queda tan claro a simple vista en las Figuras 100 y 101: en ellas, la concentración de emulgente no parece influir demasiado sobre la velocidad de formación de hidroperóxidos lipídicos –en la Figura 100b se aprecia una ligera diferencia del 11 % cuando se utilizaron diferentes concentraciones de emulgente–, y sí parece mostrar un efecto mucho más significativo sobre la velocidad de formación de compuestos aldehídicos. Así, las Figuras 101b y 101c muestran cómo concentraciones más bajas de emulgente y estabilizante produjeron un aumento de más de 5 veces en la cantidad de productos secundarios de la oxidación en comparación con un aumento inferior a 3.5 veces observado cuando se aumentó la concentración de emulgente al 5 % p/p. Y es que ya se ha mencionado anteriormente que la concentración de emulgente tiene un efecto bastante importante en el tamaño medio de gota. Una disminución en el diámetro volumétrico conduce a un aumento significativo en el área interfacial de la gota, que podría ser la razón principal para la disminución de la estabilidad oxidativa de estas emulsiones. Sin embargo, todavía hay bastante controversia a este respecto y existen estudios contradictorios que apoyan o no esta teoría, como revisaron Berton-Carabin et al. (2014). Por otro lado, también conviene señalar que la concentración de emulgente se relaciona con el impedimento estérico y el grosor de la capa interfacial, por lo que parece lógico deducir que cuanto mayor sea la cantidad de emulgente, mayor debe ser el espesor de la interfase que tiene que atravesar el oxígeno y las especies prooxidantes para producir oxidación.

Una vez establecidas las ecuaciones de segundo orden que permiten ajustar el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos de las emulsiones O/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad, 30 días después de su elaboración, en función de las variables independientes consideradas y de sus correspondientes interacciones, se hallaron las formulaciones y condiciones de operación óptimas para minimizar, de forma individual, cada uno de esos porcentajes. Así, estableciendo una fracción de fase dispersa del 5 % p/p, una concentración de emulgente hidrofílico del 1.0 % p/p, una concentración de estabilizante del 0.34 % p/p y una velocidad de homogenización de 10200 rpm, se podría llegar a alcanzar un

porcentaje de aumento de productos primarios de la oxidación a los 30 días de su preparación de tan sólo el 6.95 %. Por otra parte, la minimización del porcentaje de aumento de compuestos aldehídicos se podría alcanzar utilizando una fracción de fase dispersa del 15 % p/p, una concentración de emulgente hidrofílico del 5.0 % p/p, una concentración de estabilizante del 0.41 % p/p y una velocidad de homogenización de 6200 rpm; con estas condiciones se obtendría un porcentaje de aumento de productos secundarios de la oxidación a los 30 días de su preparación del 20.45 %. Las Figuras 106 y 107 presentan respectivamente las superficies de respuesta ajustadas del porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos y de compuestos aldehídicos, para cada par de variables independientes.

Figura 106. Superficie de respuesta estimada para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.

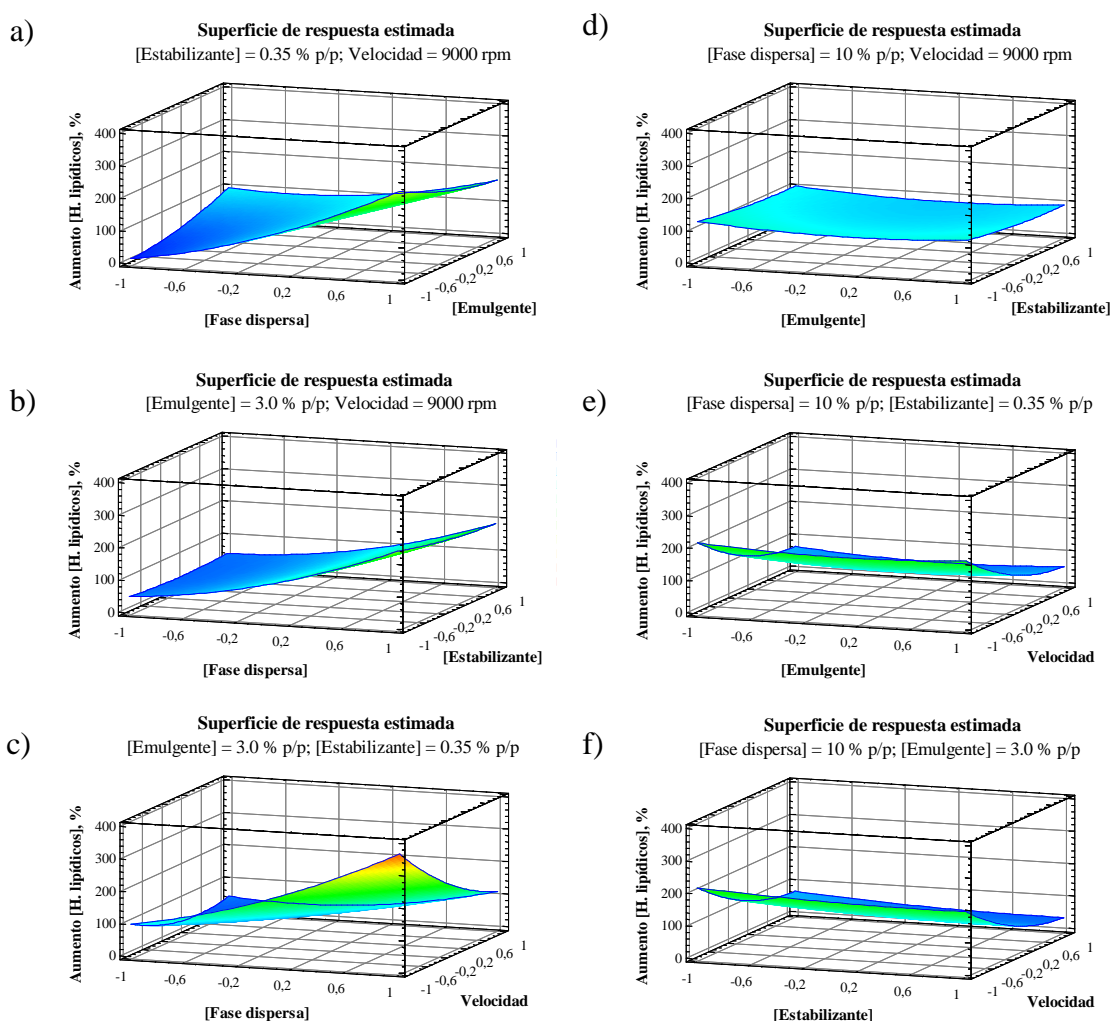
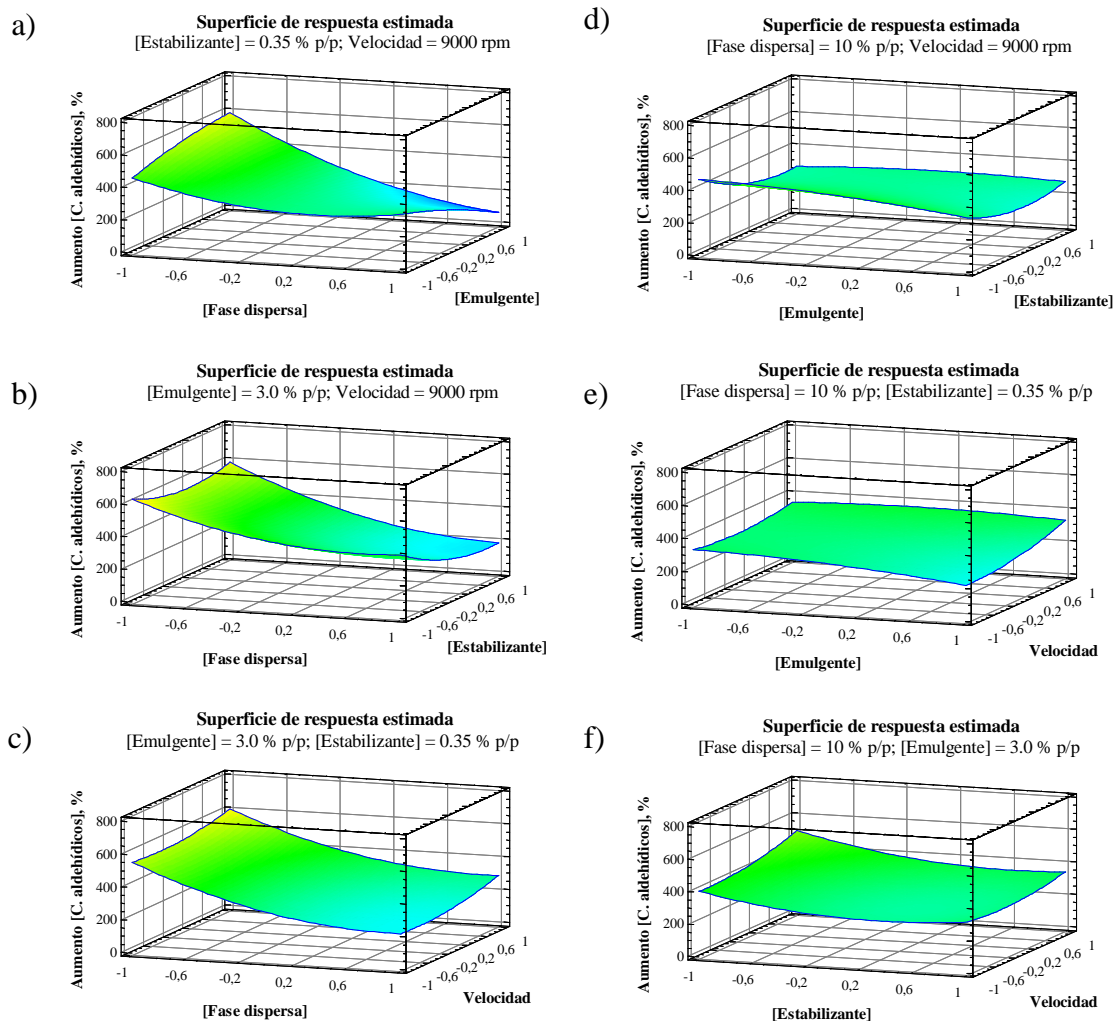


Figura 107. Superficie de respuesta estimada para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.

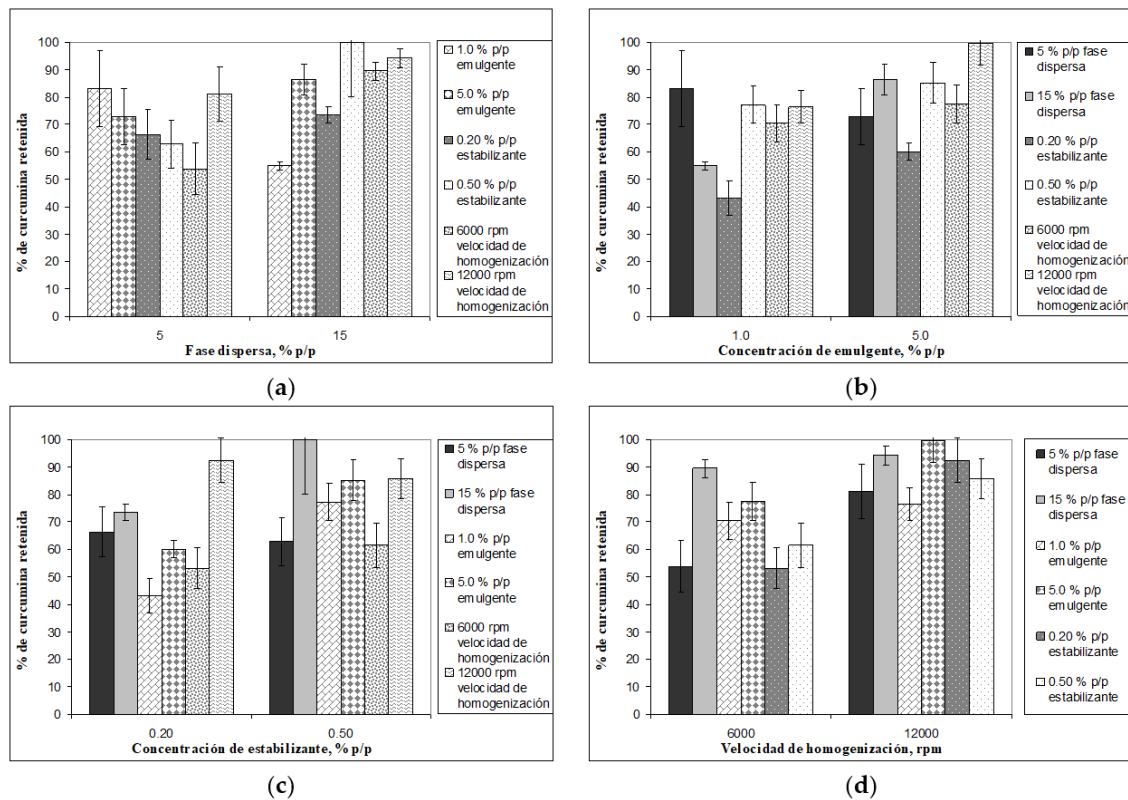


4.3.2.3. Efecto de las variables de operación sobre la capacidad de retención de curcumina

Para estudiar el efecto de las variables independientes consideradas sobre la capacidad de retención de curcumina, se analizaron sus concentraciones en el oleogel de partida y en los sistemas emulsificados Og/W preparados a alta velocidad, mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem, los días 1, 15, y 29 después de su elaboración. La Figura 108 representa los porcentajes de curcumina retenida el día 29 con respecto a la concentración inicialmente

medida; el resto hasta el 100 % representa los porcentajes de curcumina degradada como consecuencia del propio proceso de elaboración. Cada barra del gráfico muestra el porcentaje de curcumina retenida a un cierto valor de dos de las variables indicadas en la figura; las otras dos variables independientes cuyos valores no se indican, toman los valores medios ensayados: 10 % p/p de fase dispersa, 3.0 % p/p de Tween 20, 0.35 % p/p de XG y 9000 rpm de velocidad de homogenización (ver apartado 4.3.1.).

Figura 108. Porcentaje de curcumina retenida en las emulsiones Og/W, 29 días después de su elaboración, en función de: a) la fracción de fase dispersa, b) la concentración de emulgente, c) la concentración de estabilizante, y d) la velocidad de homogenización.



A continuación, se presenta el modelo de segundo grado ajustado para el porcentaje de curcumina retenida por las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad, 29 días después de su elaboración, en función de las variables independientes consideradas y de sus correspondientes interacciones.

Modelo a alta velocidad de cizalla: % de curcumina retenida = 65.6773 + 8.59942*[Fase dispersa] + 6.42042*[Emulgente] + 9.0955*[Estabilizante] +

$$10.3075*Velocidad + 9.99553*[Fase dispersa]^2 + 10.4255*[Fase dispersa]*[Emulgente] + 13.7533*[Fase dispersa]*[Estabilizante] - 5.654*[Fase dispersa]*Velocidad + 8.98115*Velocidad^2 \quad Ec. [41]$$

El valor p del primer modelo obtenido al considerar todas las variables independientes y sus correspondientes interacciones resultó ser superior a 0.05, indicando que no existe una relación significativa entre las variables dependiente e independientes. Eliminando secuencialmente aquellas variables estadísticamente menos significativas ($[Emulgente]*[Estabilizante]$, $[Estabilizante]*Velocidad$, $[Emulgente]*Velocidad$, $[Estabilizante]^2$ y $[Emulgente]^2$), se pudo simplificar el modelo y se llegó a obtener uno adecuado (Ec. 41). El nuevo modelo matemático así obtenido, con un valor p de 0.0385, es capaz de explicar de manera aceptable el 55.12 % de la variabilidad en el porcentaje de retención de curcumina sin presentar falta de ajuste ($p_{LOF} = 0.9843$), lo que revela que el orden del modelo propuesto es adecuado para ajustar los datos experimentales. Asimismo, la ausencia de un patrón definido en la distribución de los residuos representada en la gráfica de los residuos frente a los valores ajustados o predichos (Figura 109) fortalece la hipótesis de idoneidad del modelo; es decir, permite considerar que el modelo de regresión propuesto es adecuado para ajustar los datos experimentales.

Figura 109. Gráfica de residuos para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.

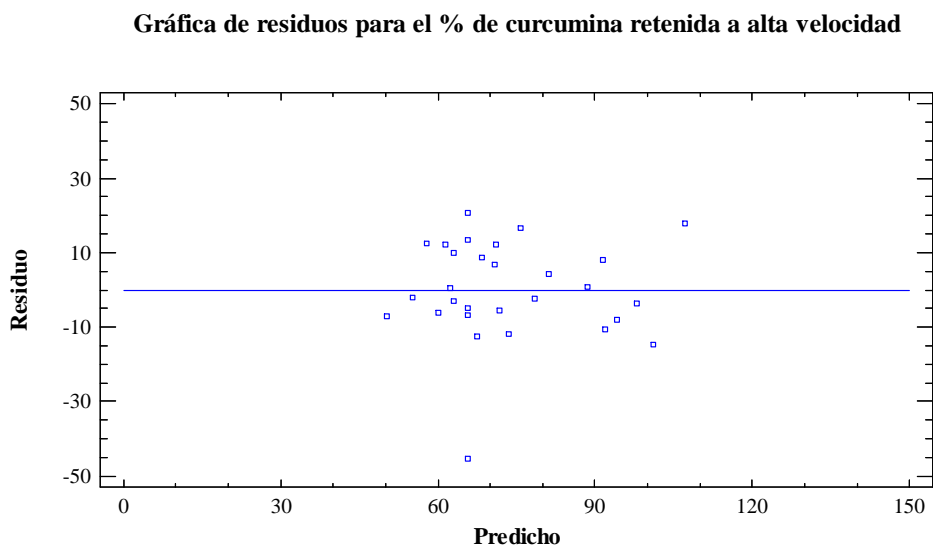


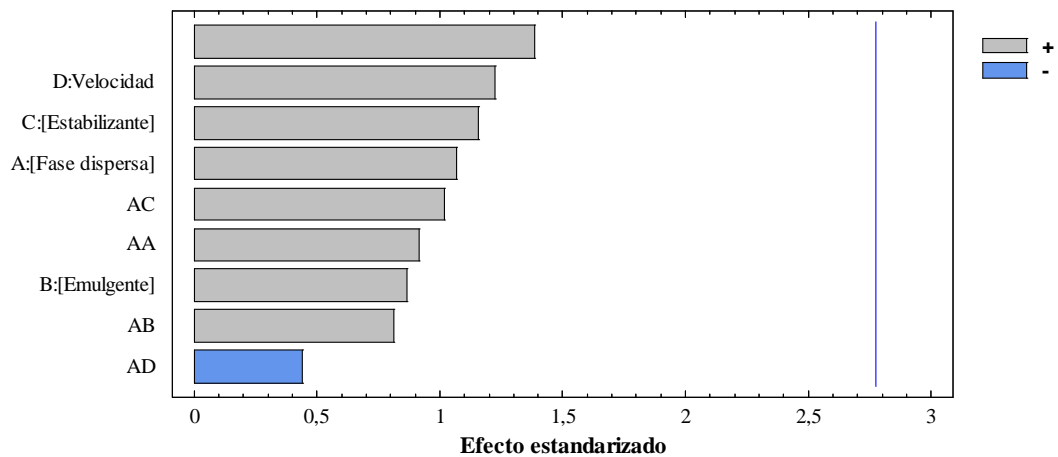
Tabla 37. Análisis de la varianza (ANOVA) para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor p*
[Fase dispersa]	887.4	1	887.4	1.34	0.3116
[Emulgente]	494.661	1	494.661	0.75	0.4363
[Estabilizante]	992.737	1	992.737	1.50	0.2881
Velocidad	1274.93	1	1274.93	1.92	0.2377
[Fase dispersa] ²	689.579	1	689.579	1.04	0.3653
[Fase dispersa]*[Emulgente]	434.764	1	434.764	0.66	0.4634
[Fase dispersa]*[Estabilizante]	756.608	1	756.608	1.14	0.3454
[Fase dispersa]*Velocidad	127.871	1	127.871	0.19	0.6831
Velocidad ²	556.72	1	556.72	0.84	0.4112
Falta de ajuste	2289.12	15	152.608	0.23	<i>0.9843</i>
Error puro	2650.29	4	662.572		
Total (corr.)	11005.3	28			

* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

Figura 110. Diagrama de Pareto estandarizado para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.

Diagrama de Pareto estandarizado para % de curcumina retenida a alta velocidad



El diagrama de Pareto estandarizado para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W homogenizadas a alta velocidad (Figura 110) muestra que, para este tipo de emulsiones, ninguna de las variables independientes consideradas fue lo suficientemente significativa como para ser representativa en el porcentaje de curcumina retenida, estando todas ellas bastante lejos de serlo (Tabla 37). No obstante, a pesar de no ser variables estadísticamente significativas, se hacen algunos comentarios acerca de los resultados observados en la Figura 108.

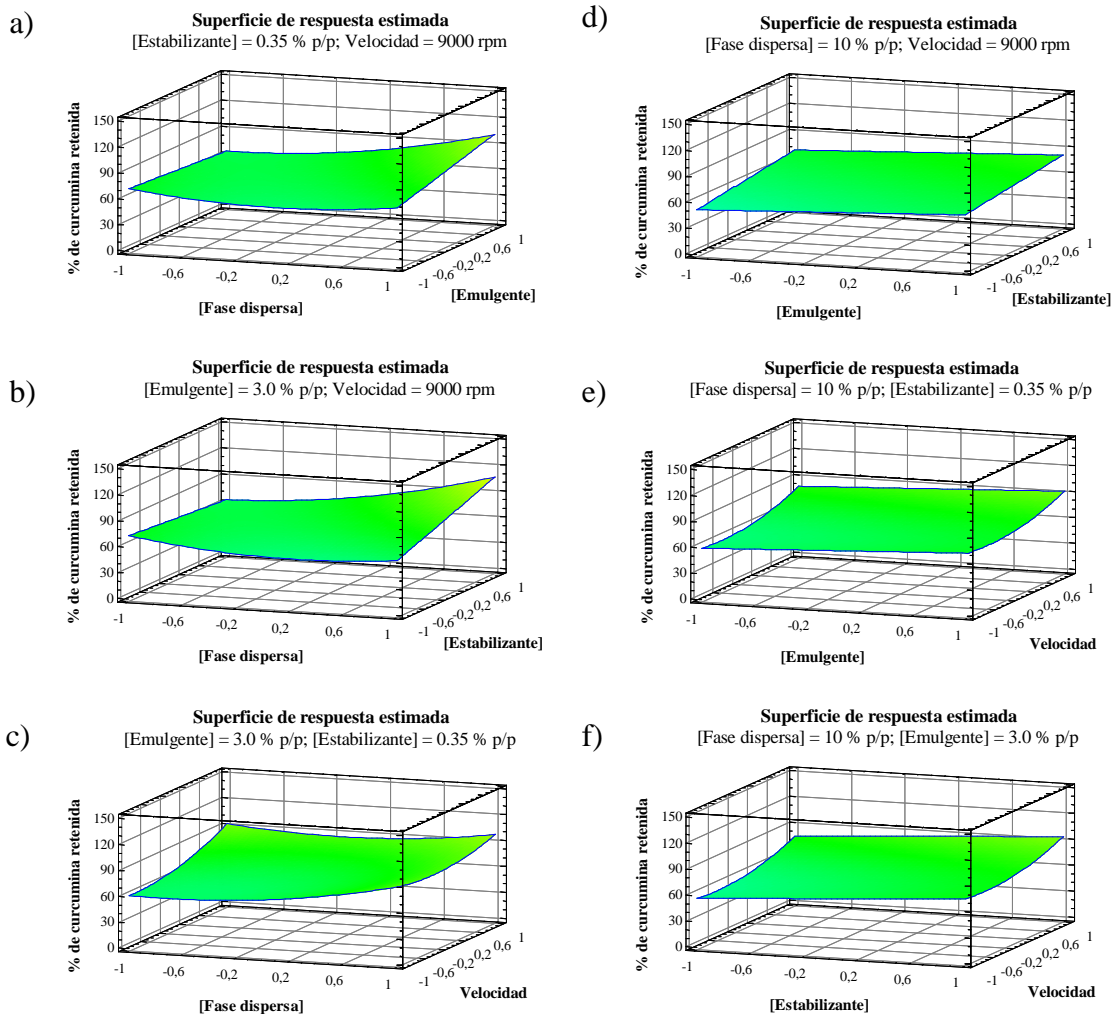
En los sistemas emulsificados O/W cargados con curcumina, su contenido total viene determinado por su solubilidad en la fase oleosa y la concentración de gotas de fase dispersa (Sanidad et al., 2019). En relación al primero de los aspectos mencionados, su solubilidad en diferentes fases oleosas ha sido estudiada en multitud de publicaciones. Básicamente, esta solubilidad depende del tipo de aceite utilizado y de las condiciones de disolución (método, temperatura, tiempo, etc.). En este caso, el tipo de fase oleosa y condiciones de disolución empleadas fueron siempre las mismas y, a este respecto, para incrementar la capacidad de retención de curcumina, se optó por gelificar el aceite de pescado enriquecido con PUFAs ω -3 puesto que la estrategia de la oleogelificación proporciona una mayor capacidad de atrapar compuestos bioactivos. Por otro lado, la concentración de gotas de fase dispersa, factor directamente relacionado con la fracción de fase dispersa, es otra de las variables que influye sobre la capacidad de retención de curcumina. De acuerdo con la Figura 108a, un porcentaje de fase dispersa más elevado da lugar a un mayor porcentaje de curcumina retenida a los 29 días de preparar las emulsiones Og/W. En cambio, a un 1.0 % p/p de emulgente, el porcentaje de retención de curcumina pasó de un 83.1 % (en el caso de las emulsiones con un 5 % p/p de fase dispersa) a un 55.0 % (en el caso de las emulsiones con un 15 % p/p de fase dispersa). Y es que, según la literatura científica, la curcumina normalmente se sitúa dentro del núcleo hidrofóbico de las gotas de oleogel. En el núcleo de las gotas, la curcumina se encuentra a salvo de posibles especies hidrofílicas –como, por ejemplo, los iones hidroxilo– presentes en la fase acuosa que podrían dar lugar a su degradación química. Sin embargo, como consecuencia de los grupos polares de la molécula de curcumina y del propio proceso de homogenización, algunas de estas moléculas también pueden localizarse próximas a la interfase oleogel-agua, donde se encuentra el emulgente (Sanidad et al., 2019). Artiga-Artigas et al. (2018) evaluó el efecto del tipo y

la concentración de emulgente sobre la estabilidad de nanoemulsiones cargadas con curcumina y evaluó su eficiencia de encapsulación, encontrando las mayores eficiencias a tiempo inicial en nanoemulsiones con Tween 20 como emulgente y resultados aún más efectivos a bajas concentraciones de tensioactivo. Estos datos son consistentes con los obtenidos en esta Tesis al utilizar una fracción de fase dispersa del 5 % p/p (Figura 108b): en ese caso, el porcentaje de curcumina retenida fue del 83.1 % (emulsiones con un 1.0 % p/p de emulgente) frente al 72.9 % (emulsiones con un 5.0 % p/p de Tween 20). Sin embargo, aumentando el porcentaje de fase dispersa, esta tendencia no se verificó debido probablemente a la falta de emulgente para recubrir y envolver completamente las gotas de oleogel, lo que hace que el sistema no sea igual de estable en el tiempo: en ese caso, la curcumina queda expuesta a la luz y a las reacciones de degradación que conducen a la pérdida de compuesto con el paso del tiempo.

La velocidad de homogenización es otro de los parámetros considerados en el estudio de la capacidad de retención de curcumina. Como refleja la Figura 108d, una velocidad de homogenización más alta implica un mayor porcentaje de curcumina retenida con el tiempo, alcanzando porcentajes de retención de hasta el 99.6 % en emulsiones Og/W a 12000 rpm frente al 89.5 % máximo obtenido a una velocidad de 6000 rpm. Y es que la velocidad de homogenización está directamente relacionada con el tamaño medio de gota y éste, a su vez, con la viscosidad de la emulsión. Wang et al. (2008) observaron cómo la viscosidad de una emulsión O/W aumenta ligeramente con la disminución del tamaño medio de gota debido al mayor número y área interfacial de gotas al disminuir el diámetro medio de éstas. Este aumento de viscosidad contribuye a mejorar la estabilidad física de la emulsión, manteniendo la curcumina encapsulada y protegiéndola de la acción de cualquier agente externo que pueda conducir a su degradación. Este hecho también queda reflejado en la Figura 117c, donde se observa cómo un aumento en la concentración de estabilizante del 0.30 % da lugar a una mayor capacidad de retención de curcumina con el tiempo, aumentando un 34.2 % (1.0 % p/p de emulgente) o un 25.2 % (5.0 % p/p de tensioactivo). Además, uno de los efectos producidos por la adición de estabilizante es la modificación de la viscosidad y las propiedades reológicas de la emulsión. Sin embargo y a pesar de todo ello, el análisis estadístico ha revelado que ninguna de estas variables consideradas ejerció un efecto relevante sobre la capacidad de retención de curcumina.

Una vez establecida la ecuación del modelo que permite ajustar el porcentaje de curcumina retenida en las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad en función de las diferentes combinaciones de variables independientes, se obtuvieron las condiciones óptimas para maximizar esos porcentajes. En efecto, estableciendo una concentración de fase dispersa del 15 % p/p, una concentración de emulgente del 5.0 % p/p, una concentración de estabilizante de 0.50 % p/p y una velocidad de homogenización de 6000 rpm, se podría llegar a alcanzar una capacidad de retención de curcumina máxima. La Figura 111 representa las superficies de respuesta ajustadas en función de las diferentes combinaciones de variables independientes.

Figura 111. Superficie de respuesta estimada para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad.

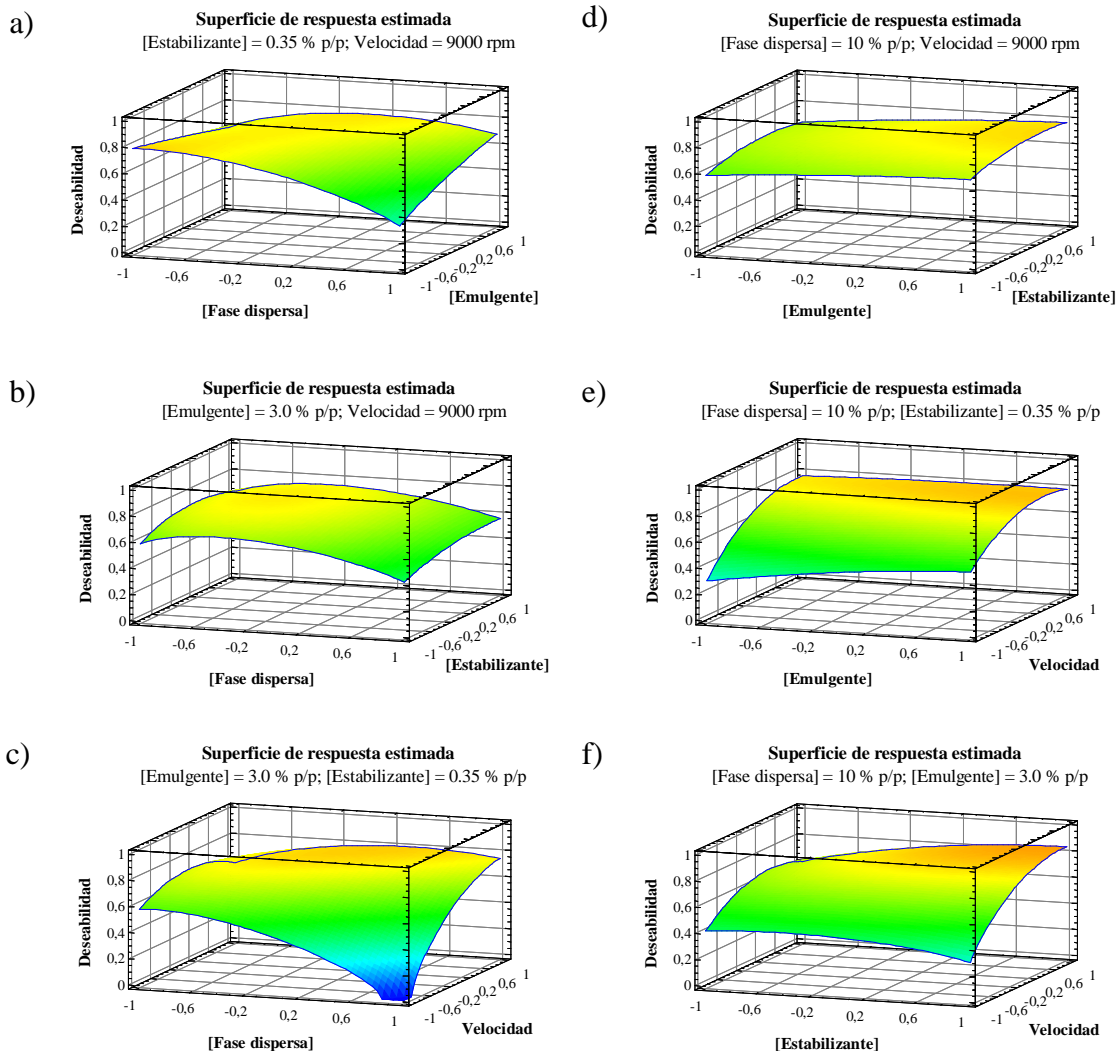


4.3.2.4. Optimización multivariable de la composición y las condiciones de operación del sistema emulsificado

En los apartados anteriores, se hallaron las variables de formulación y las condiciones operativas óptimas para minimizar individualmente el diámetro volumétrico o diámetro medio de De Brouckere y la oxidación lipídica (primaria y secundaria) y maximizar la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad, 30 días después de su elaboración. Naturalmente, estos conjuntos de condiciones óptimas fueron distintos para cada variable respuesta. Por tanto, para optimizar de forma conjunta varias de las respuestas consideradas en el diseño, se utiliza la metodología de superficie multi-respuesta que proporciona un óptimo global del sistema dentro de las condiciones de trabajo.

En primer lugar, se ha considerado un primer objetivo de optimización con el que se pretende encontrar las condiciones óptimas para estabilizar fisicoquímicamente la emulsión Og/W preparada mediante homogenización a alta velocidad o, lo que es lo mismo, para minimizar el tamaño medio de gota y la oxidación lipídica primaria y secundaria de forma simultánea (objetivo 1). En base al razonamiento expuesto en el apartado 4.1.4. sobre la secuencialidad de las reacciones de oxidación lipídica y siguiendo el mismo criterio que en capítulos anteriores, se ha mantenido la ponderación para las distintas variables respuesta: 5.0 para la oxidación lipídica primaria, 2.0 para la oxidación secundaria y 4.0 para el diámetro volumétrico. Bajo estas premisas, la composición y condiciones de operación óptimas del sistema emulsificado Og/W a alta velocidad son: 13.9 % p/p de fracción de fase dispersa, 5.0 % p/p de emulgente hidrofílico, 0.49 % p/p de estabilizante y 12000 rpm de velocidad de homogenización. De acuerdo con la predicción de los modelos matemáticos ajustados, en estas condiciones se obtendría un tamaño medio de gota mínimo y un porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos del 47.4 y 174.2 %, respectivamente. La deseabilidad global alcanzada con este conjunto de condiciones óptimas es de 0.914. La Figura 112 representa la deseabilidad global ajustada de esta primera función objetivo para cada par de variables independientes.

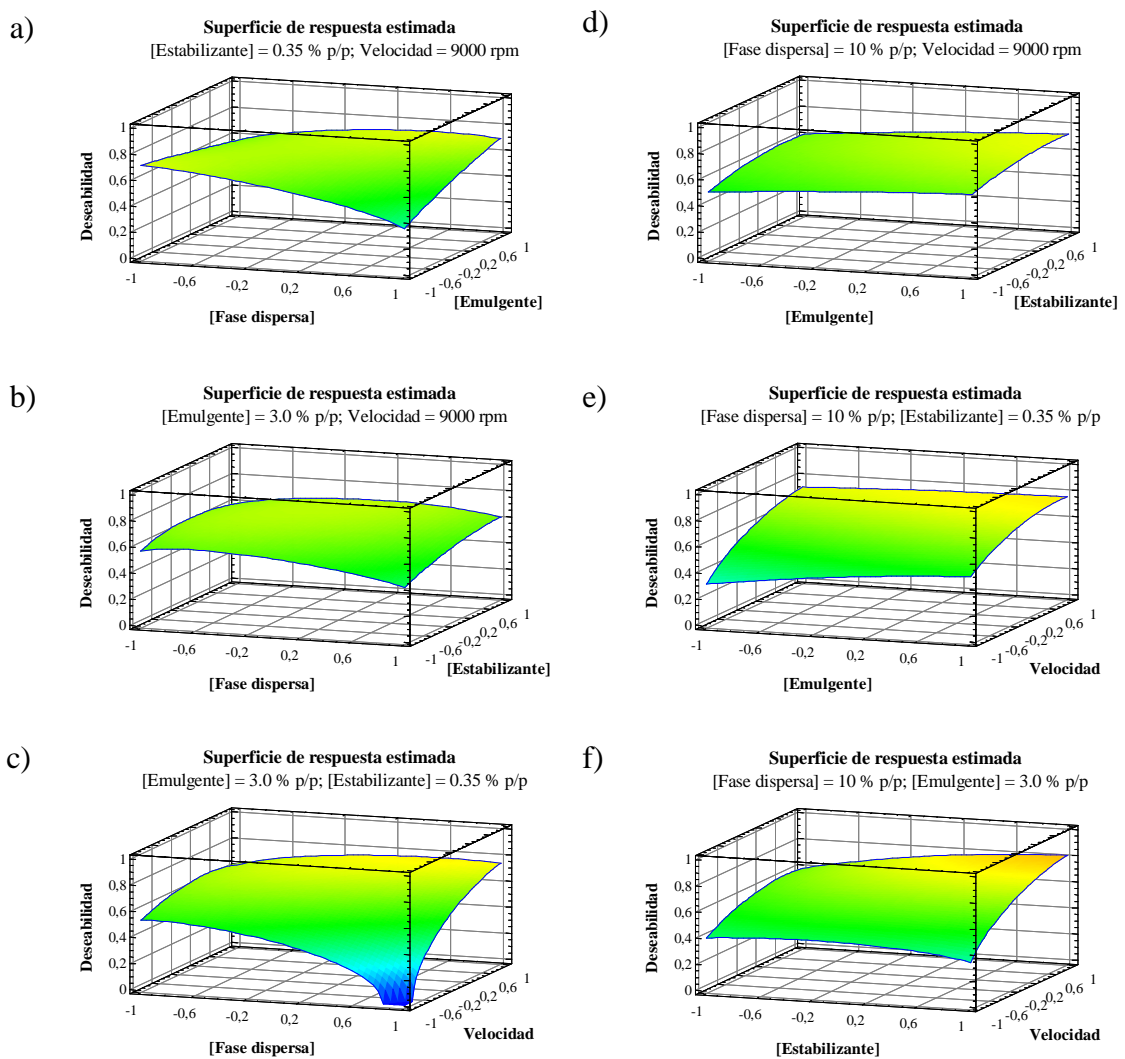
Figura 112. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada del primer objetivo de optimización en las emulsiones Og/W homogenizadas a alta velocidad.



Si, por el contrario, se pretende minimizar simultáneamente el tamaño medio de gota y la oxidación lipídica primaria y secundaria y, a su vez, maximizar la capacidad de retención de curcumina de la emulsión Og/W homogenizada a alta velocidad, cambia el objetivo de optimización (objetivo 2) y, por tanto, conduce a condiciones óptimas diferentes: 13.9 % p/p de fracción de fase dispersa, 5.0 % p/p de emulgente hidrofílico, 0.48 % p/p de estabilizante y 12000 rpm de velocidad de homogenización. Esta formulación y condiciones de operación de la emulsión permitirían obtener un tamaño medio de gota mínimo, un porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos del 47.7 y 173.0 %, respectivamente, y una capacidad de

retención de curcumina del 100 %, alcanzando una deseabilidad global de 0.932. Para este segundo objetivo de optimización, también se mantuvieron los pesos asignados a cada respuesta en capítulos anteriores: 4.0 para el diámetro volumétrico, 5.0 para la oxidación lipídica primaria, 2.0 para la oxidación secundaria y 3.0 para la capacidad de retención de curcumina. La Figura 113 representa la deseabilidad global ajustada para este segundo objetivo de optimización en función de cada par de variables independientes.

Figura 113. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada del segundo objetivo de optimización en las emulsiones Og/W homogenizadas a alta velocidad.



4.3.3. Estudio y optimización de una emulsión Og/W preparada mediante homogenización a alta presión

En el presente apartado se estudia la influencia de la composición y las condiciones de operación de la emulsión Og/W preparada mediante homogenización a alta presión sobre su estabilidad física y oxidativa, así como sobre su capacidad para proteger y estabilizar en el tiempo curcumina. Posteriormente y en base a estos resultados, se aplica la metodología de superficie de respuesta para obtener la formulación y condiciones de operación óptimas.

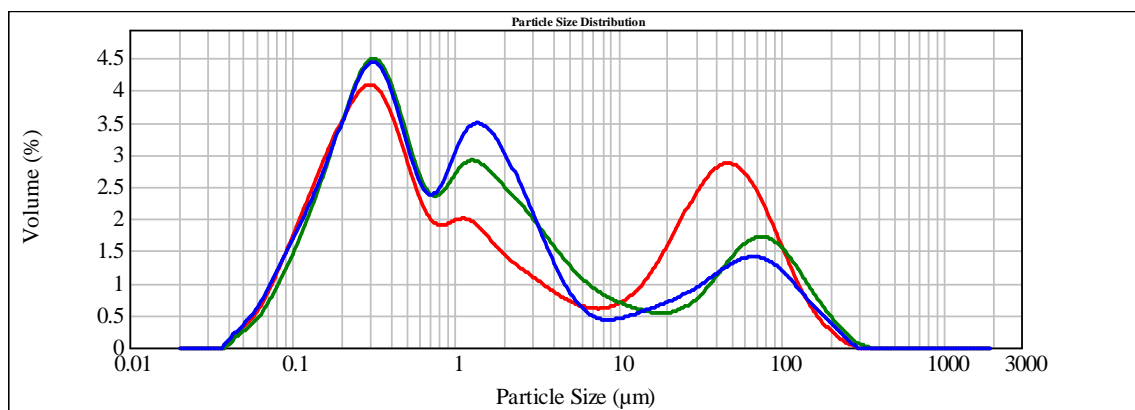
4.3.3.1. Efecto de las variables de operación sobre la estabilidad física

Al igual que se hizo en las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad de cizalla para estudiar el efecto de los diferentes factores sobre la estabilidad física, se va a analizar su influencia sobre la distribución de tamaños de gota de fase dispersa.

Las curvas de distribución de tamaños de gota típicas para las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta presión también son trimodales (Figura 114), si bien es cierto que los dos primeros picos se encuentran más o menos solapados dependiendo de la emulsión Og/W de que se trate. En este caso, el primer pico está localizado en torno a 0.300 μm , el segundo está comprendido entre 1 y 2 μm , y el tercero, entre 50 y 100 μm ; todos ellos también bastante anchos, indicando que se trata de emulsiones polidispersas ($U > 4.02$). A diferencia de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad, a alta presión se observa un desplazamiento del segundo pico (el correspondiente a las gotas de fase dispersa de la emulsión) hacia tamaños menores (el máximo del segundo pico se reduce en aproximadamente 1 μm) y un importante número de gotas con tamaños comprendidos entre 0.5 y 1 μm . Por otro lado, también se aprecia un desplazamiento importante del tercer pico (el correspondiente a

las gotas de gran tamaño como consecuencia del proceso de desestabilización física de la emulsión) hacia tamaños mucho más pequeños y un volumen de gotas grandes mucho más reducido que implica un menor número de gotas. Estas distribuciones de tamaños de gota sugieren que, de forma general, el método de homogenización a alta presión proporciona gotas más pequeñas que el método de homogenización a alta velocidad y, por tanto, emulsiones Og/W más estables físicamente. En efecto, la homogenización a alta velocidad produce una combinación de gradiente de velocidad longitudinal, rotacional y radial en los líquidos, que rompe la interfase y favorece que los líquidos se mezclen y divide las gotas formadas en otras menores, aunque no resulta demasiado efectiva y da lugar a emulsiones relativamente groseras con tamaños de gota más o menos grandes (Fellows, 1988); sin embargo, en la homogenización a alta presión, la emulsión inicial experimenta una combinación de intensa cizalla y condiciones de flujo cavitacional y turbulento que provoca la ruptura de las gotas de gran tamaño en otras menores, siendo mucho más efectiva reduciendo el tamaño de las gotas de una emulsión (Phipps, 1985; Pandolfe, 1995).

Figura 114. Curvas de distribución de tamaños de gota de diferentes emulsiones Og/W, 30 días después de su elaboración.



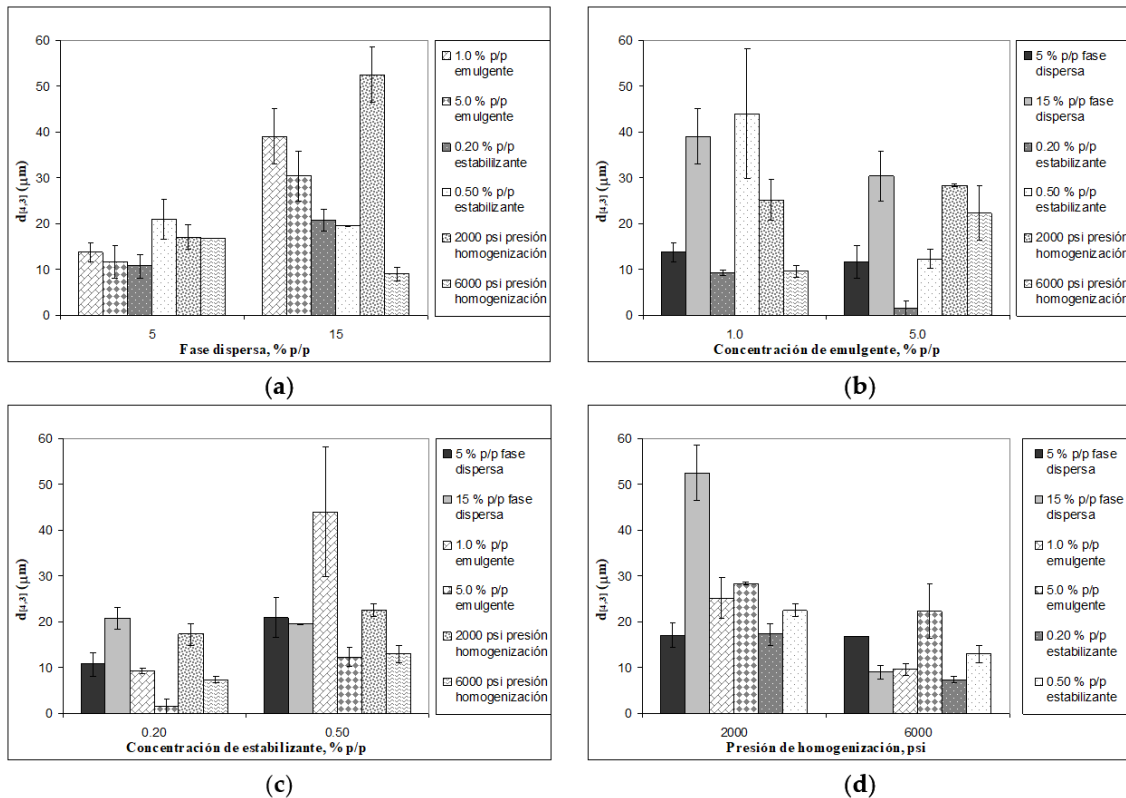
La Tabla 38 recoge el diámetro volumétrico o diámetro medio de De Brouckere, $d_{[4,3]}$, la moda de la distribución de tamaños, d_{mode} , y la uniformidad, U , de las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta presión, medidas 30 días después de su elaboración. También muestra el pH de las emulsiones anteriores a día 28, pH que estuvo comprendido entre 5.41 (emulsión 4) y 6.43 (emulsión 1), siendo ligeramente superior al de las emulsiones Og/W homogenizadas a alta velocidad.

Tabla 38. Tamaño de gota y pH de las diferentes emulsiones Og/W preparadas a alta presión, 30 y 28 días después de su elaboración.

N° de experimento	$d_{[4,3]}$, μm	d_{mode} , μm	U	pH
1	19.544	0.297	17.3	6.43
2	14.563	0.296	31.2	6.18
3	16.404	0.313	18.3	6.15
4	7.424	0.283	21.1	5.41
5	22.530	0.311	17.7	6.11
6	16.836	0.314	17.3	6.15
7	30.404	0.293	35.3	6.17
8	9.198	0.289	21.9	5.51
9	17.308	0.307	14.3	5.55
10	13.803	0.311	15.1	6.27
11	10.746	0.328	14.1	6.17
12	20.930	0.319	22.1	6.25
13	22.358	0.295	40.0	6.24
14	9.639	0.293	23.0	6.28
15	16.717	0.307	36.1	6.28
16	43.974	0.308	47.4	6.34
17	39.005	0.314	34.9	6.29
18	12.214	0.311	24.3	6.04
19	1.586	0.293	4.02	6.22
20	9.007	0.277	27.5	6.31
21	13.022	0.288	34.5	6.21
22	20.722	0.298	43.1	5.97
23	25.170	0.308	23.0	6.33
24	11.663	0.304	25.7	6.37
25	28.317	0.314	30.5	6.34
26	17.009	0.323	18.4	6.30
27	52.440	102.797	23.1	6.37
28	13.674	0.319	19.7	6.27
29	23.483	0.312	24.9	6.32

Como ya se hizo en las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad, para facilitar la lectura e interpretación de resultados y obtener conclusiones generales acerca del efecto de los diferentes factores sobre el tamaño medio de gota de las emulsiones Og/W, éste se ha agrupado en diferentes gráficos. Así, la Figura 115 representa el tamaño medio de gota de las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta presión, medido 30 días después de su elaboración, en función de las diferentes variables independientes consideradas. Cada una de las barras representa el valor de dos de estas variables indicadas en la figura. Las otras dos variables cuyos valores no se indican, toman los valores medios ensayados: 10 % p/p de fase dispersa, 3.0 % p/p de emulgente hidrofílico, 0.35 % p/p de estabilizante y 4000 psi de presión de homogenización.

Figura 115. Tamaño de gota de las emulsiones Og/W, 30 días después de su elaboración, en función de: a) la fracción de fase dispersa, b) la concentración de emulgente, c) la concentración de estabilizante, y d) la presión de homogenización.



A continuación, se presenta el modelo ajustado para el diámetro volumétrico de las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta presión, en función de las variables independientes consideradas y de sus correspondientes interacciones.

Modelo a alta presión: $d_{[4,3]} = 16.992 + 6.68783*[Fase\ dispersa] - 2.85392*[Emulgente] + 5.43583*[Estabilizante] - 7.05058*Presión + 4.47233*[Fase\ dispersa]^2 - 1.61525*[Fase\ dispersa]*[Emulgente] - 2.8405*[Fase\ dispersa]*[Estabilizante] - 10.7853*[Fase\ dispersa]*Presión + 2.63996*[Emulgente]^2 - 6.037*[Emulgente]*[Estabilizante] + 2.393*[Emulgente]*Presión - 3.37667*[Estabilizante]^2 + 0.094*[Estabilizante]*Presión + 1.84121*Presión^2$ Ec. [42]

El modelo matemático obtenido (Ec. 42), con un R^2 del 73.99 %, es capaz de explicar de manera aceptable el 73.99 % de la variabilidad en el diámetro volumétrico de las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta presión (algo menos que el 82.09 % alcanzado en las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad) y un p_{LOF} de 0.0545 (Tabla 39); al ser este número superior al nivel de significancia prefijado, se consideró que el modelo es adecuado para describir los datos experimentales. Además, el p_{MOD} obtenido fue de 0.0300, inferior a 0.05, por lo que puede afirmarse que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables independientes y dependiente con un nivel de confianza del 95 %. Finalmente, la ausencia de un patrón definido en la gráfica de los residuos contra los valores ajustados o predichos (Figura 116) indica que el modelo seleccionado describe adecuadamente los datos experimentales.

Figura 116. Gráfica de residuos para el tamaño medio de gota de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.

Gráfica de residuos para $d_{[4,3]}$ a alta presión

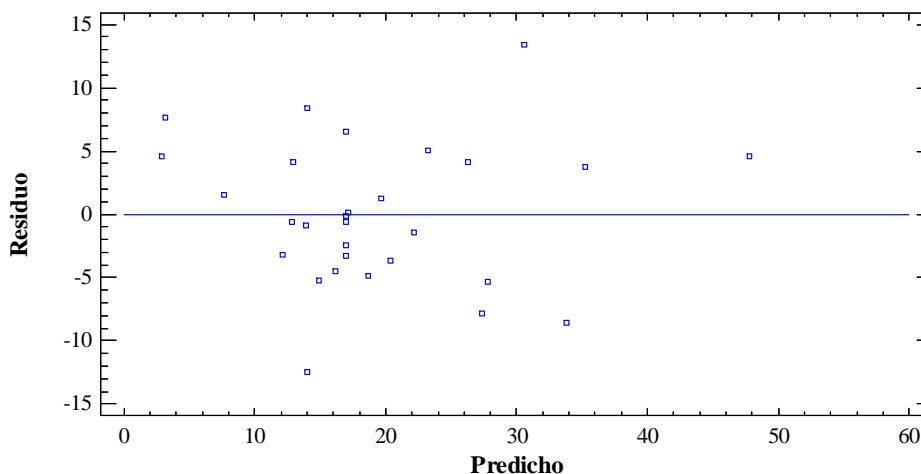


Tabla 39. Análisis de la varianza (ANOVA) para el tamaño medio de gota de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.

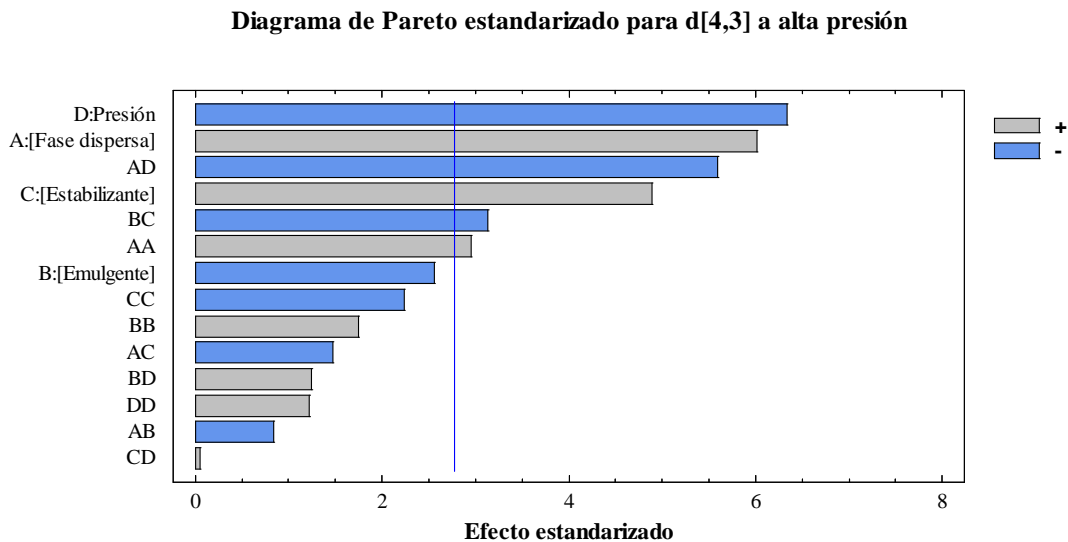
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor p*
[Fase dispersa]	536.725	1	536.725	36.14	0.0039
[Emulgente]	97.7381	1	97.7381	6.58	0.0623
[Estabilizante]	354.579	1	354.579	23.87	0.0081
Presión	596.529	1	596.529	40.16	0.0032
[Fase dispersa] ²	129.741	1	129.741	8.73	0.0417
[Fase dispersa]*[Emulgente]	10.4361	1	10.4361	0.70	0.4491
[Fase dispersa]*[Estabilizante]	32.2738	1	32.2738	2.17	0.2145
[Fase dispersa]*Presión	465.286	1	465.286	31.33	0.0050
[Emulgente] ²	45.2068	1	45.2068	3.04	0.1560
[Emulgente]*[Estabilizante]	145.781	1	145.781	9.81	0.0351
[Emulgente]*Presión	22.9058	1	22.9058	1.54	0.2821
[Estabilizante] ²	73.9581	1	73.9581	4.98	0.0895
[Estabilizante]*Presión	0.035344	1	0.035344	0.00	0.9634
Presión ²	21.9895	1	21.9895	1.48	0.2906
Falta de ajuste	842.587	10	84.2587	5.67	<i>0.0545</i>
Error puro	59.4123	4	14.8531		
Total (corr.)	3468.37	28			

* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

Tras un análisis de la varianza (ANOVA) de los valores observados (Tabla 34), se vio que tanto la concentración de estabilizante como la presión de homogenización ejercen un efecto estadísticamente significativo en orden lineal sobre el tamaño medio de gota ($p < 0.05$). Asimismo, la concentración de fase dispersa, tanto en su término lineal como cuadrático, también afectó significativamente al tamaño de gota. Para terminar, otros efectos de orden superior que también resultaron significativos fueron las interacciones fracción de fase dispersa–presión de homogenización y concentración de emulgente–concentración de estabilizante. Todos estos factores estadísticamente significativos también pueden verse en el diagrama de Pareto estandarizado para el tamaño medio de gota de las emulsiones Og/W homogenizadas a alta presión (Figura

117), con indicación de si la variable considerada ejerce un efecto positivo o negativo sobre la variable respuesta.

Figura 117. Diagrama de Pareto estandarizado para el tamaño medio de gota de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.



Al igual que ocurrió con las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad, las condiciones de homogenización –en este caso, la presión de homogenización– es la variable que ejerce un efecto estadísticamente más significativo sobre el tamaño medio de gota: un aumento en la presión de homogenización de la emulsión Og/W dio lugar a gotas de fase dispersa más pequeñas. En menor medida, aunque también de forma importante, su interacción con la fracción de fase dispersa también resultó ser significativa de forma negativa (Figura 117). Este hecho puede verse claramente reflejado en la Figura 115d donde, al aumentar la presión de homogenización de 2000 a 6000 psi en emulsiones con un 5 % p/p de fase dispersa, se vio una reducción en el tamaño medio de gota de 17.0 a 16.7 μm (porcentaje de reducción igual a 1.7 %) o, en emulsiones con un 15 % p/p de fase dispersa, de 52.4 a 9.0 μm (porcentaje de reducción igual a 82.8 %); en emulsiones con una fracción de fase dispersa intermedia (10 % p/p) y distintas concentraciones de emulgente y/o estabilizante, este porcentaje de reducción se encontró entre los dos valores extremos anteriores (entre el 21.0 % y el 61.7 %). El efecto de la presión de homogenización sobre el tamaño medio de gota era de esperar puesto que una mayor presión de homogenización aporta una mayor cantidad de energía a la emulsión y parece lógico

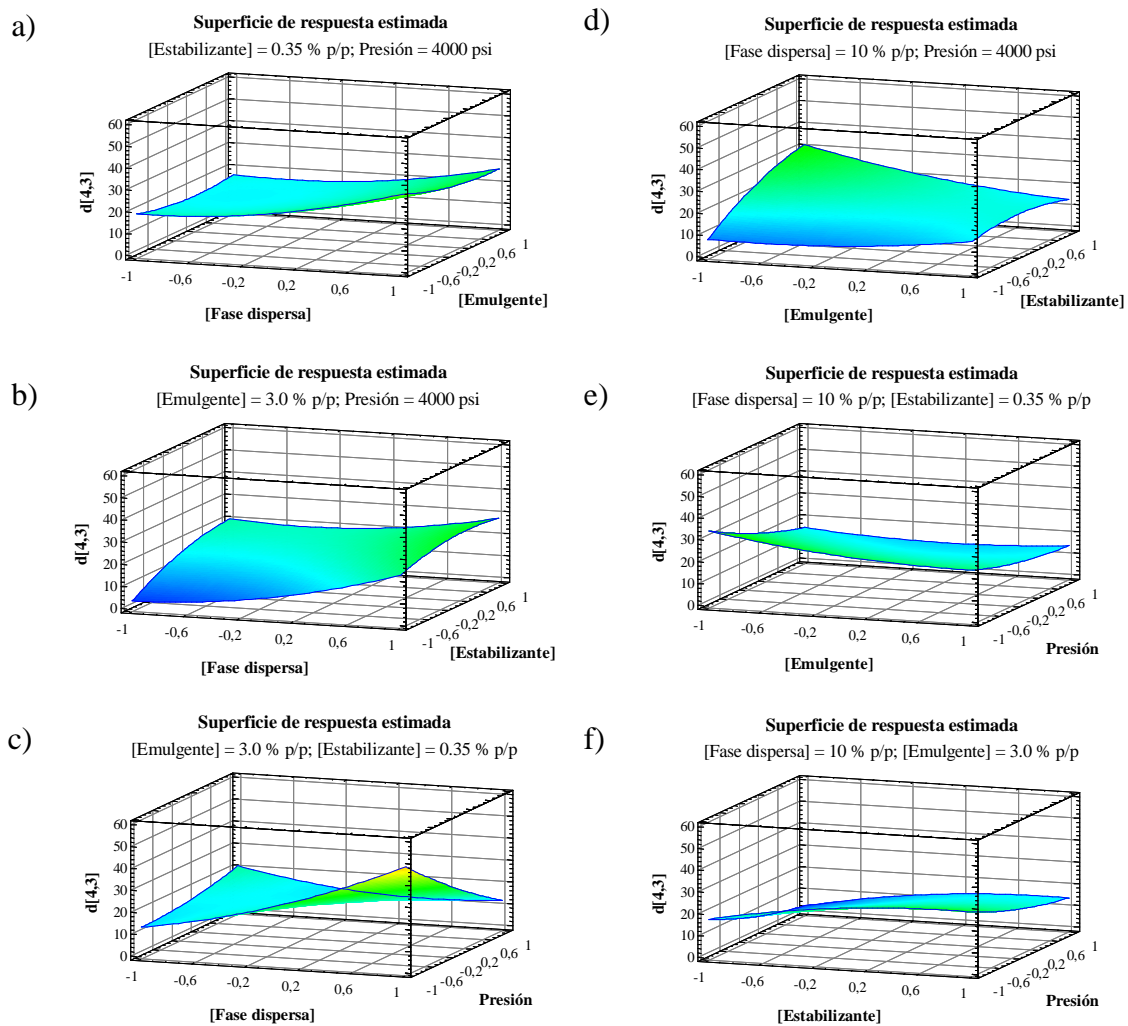
suponer que cuanto mayor sea la entrada de energía, menor debe ser el tamaño de gota de la fase dispersa. Estos resultados están en consonancia con aquellos obtenidos por Pandolfe (1995), quien estudió la influencia de la presión de homogenización (1000–5000 psi) y la calidad de la premezcla, entre otros factores, sobre el tamaño medio de gota de emulsiones O/W con carboximetilcelulosa sódica. Además de la presión de homogenización, cuyo efecto ya se ha comentado, el autor concluye que una buena premezcla conduce a una mejor emulsión final con respecto al tamaño medio de gota.

La fracción de fase dispersa es otra de las variables que afecta significativamente y de forma positiva al tamaño medio de gota, esto es, cuanto más cantidad de fase dispersa en la emulsión Og/W, el $d_{[4,3]}$ obtenido también es mayor. Este efecto queda reflejado en las emulsiones de la Figura 115a donde, a excepción de las emulsiones con un 0.50 % p/p de estabilizante y de las emulsiones preparadas a 6000 psi, el tamaño de gota se duplica (emulsiones 11 y 22), e incluso se llega a triplicar (emulsiones 10 y 17), aumentando la fracción de fase dispersa del 5 al 15 % p/p, efecto que también ha sido observado por Phipps (1983) y Pandolfe (1995) y que podría estar relacionado con la densidad de energía en la zona de homogenización durante el proceso de emulsificación. A una presión de homogenización dada, se dispone de un cierto nivel de energía para la emulsificación. A medida que aumenta el contenido de fase dispersa, más cantidad de oleogel compite por la energía disponible y esto reduce la densidad de energía por cantidad de fase dispersa. El resultado es una menor energía disponible para reducir el tamaño de las gotas. Además, debido a que la homogenización es un proceso estocástico, una mayor cantidad de oleogel aumenta la probabilidad de que algo de ese oleogel no esté sujeto a la zona de máxima densidad energética.

Finalmente, la concentración de estabilizante es otra variable que, a diferencia de lo que sucede en las emulsiones Og/W homogenizadas a alta velocidad, afecta significativamente y de forma positiva al tamaño medio de gota. Así, la Figura 115c muestra aumentos de tamaño de gota que pueden ser desde moderados –en el caso de las emulsiones homogenizadas a 6000 psi (de 7.4 a 13.0 μm)– hasta ser muy importantes –como en el caso de las emulsiones con un 5.0 % p/p de emulgente (de 1.6 a 12.2 μm). La justificación del aumento de tamaño con el aumento de la concentración de estabilizante, a pesar de ser un ingrediente crítico para obtener emulsiones Og/W

estables en el tiempo, ya se dio en el apartado 4.3.2.1.: a concentraciones suficientemente altas, se pueden formar agregados indeseados y, además, el aumento de viscosidad de la fase continua puede dificultar en parte el proceso de emulsificación y rotura de las gotas para formar otras nuevas de tamaño más pequeño.

Figura 118. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada en las emulsiones Og/W homogenizadas a alta presión.



Una vez establecido el modelo que ajusta el $d_{[4,3]}$ de las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta presión en función de las diferentes variables independientes, se obtuvieron las condiciones óptimas para minimizar esos diámetros. En efecto, estableciendo una concentración de fase dispersa del 10.5 % p/p, una concentración de emulgente del 1.1 % p/p, una concentración de estabilizante de 0.20 % p/p y una presión de homogenización de 6000 psi, se podría llegar a alcanzar un

tamaño medio de gota mínimo. La Figura 118 muestra las superficies de respuesta ajustadas del tamaño medio de gota para cada par de variables independientes.

4.3.3.2. Efecto de las variables de operación sobre la estabilidad oxidativa

La propia estructura de las emulsiones hace que los lípidos presentes en la misma sean muy susceptibles a sufrir procesos de oxidación en los que se generan radicales libres, así como compuestos volátiles, que afectan a las propiedades organolépticas de la emulsión y a su estabilidad. Esto es debido a la gran superficie de contacto entre las gotas de los lípidos –sustrato oxidable– y compuestos solubles en agua –oxígeno molecular y metales prooxidantes– que pueden contribuir a la iniciación y a la propagación de las reacciones que tienen lugar durante la oxidación lipídica.

Figura 119. Oxidación lipídica primaria de las emulsiones Og/W, 29 días después de su elaboración, en función de: a) la fracción de fase dispersa, b) la concentración de emulgente, c) la concentración de estabilizante, y d) la presión de homogenización.

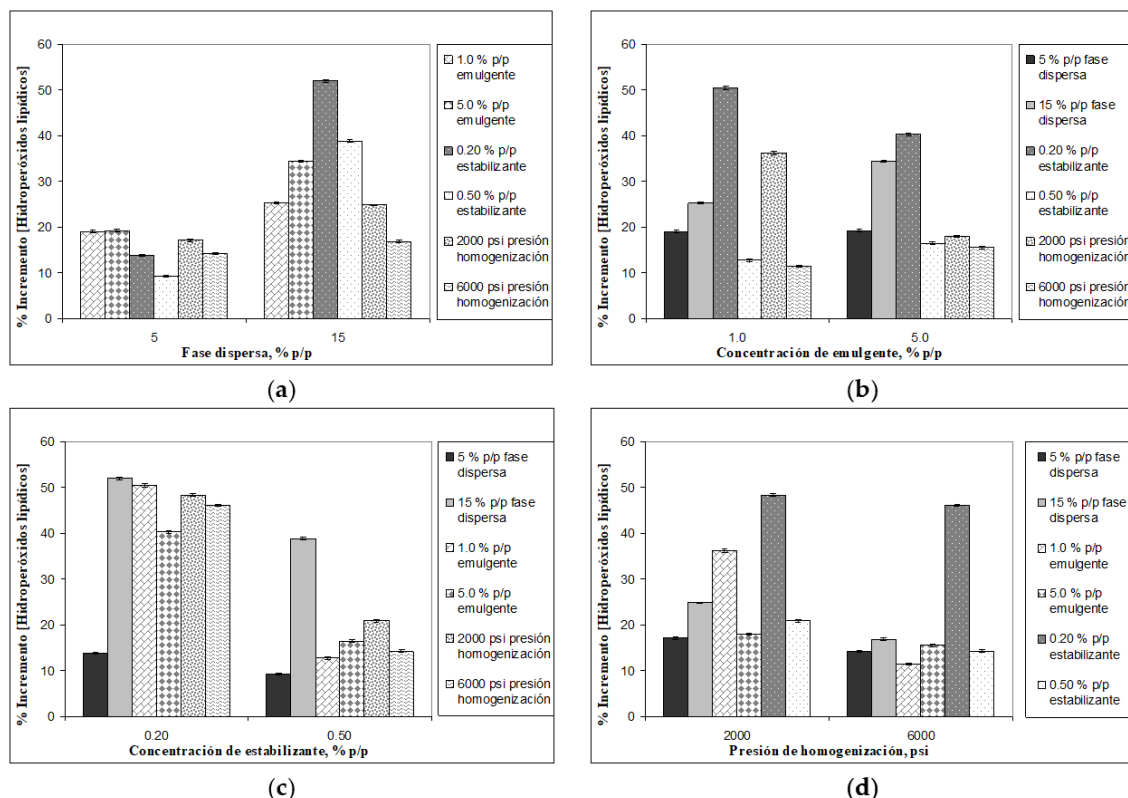
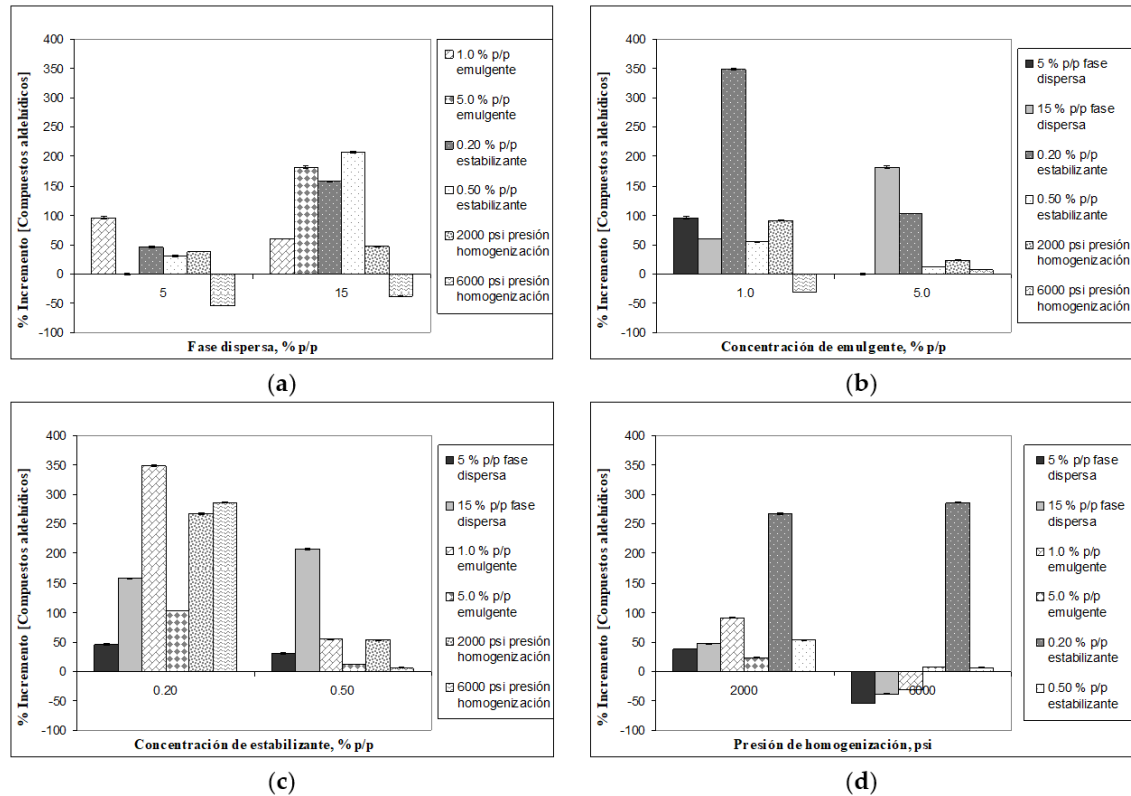


Figura 120. Oxidación lipídica secundaria de las emulsiones Og/W, 29 días después de su elaboración, en función de: a) la fracción de fase dispersa, b) la concentración de emulgente, c) la concentración de estabilizante, y d) la presión de homogenización.



Al igual que se hizo en las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad, aquí se estudia la influencia de los diferentes factores sobre la estabilidad oxidativa (primaria y secundaria) de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión. Así, las Figuras 119 y 120 representan los porcentajes de aumento de hidropéroxidos lipídicos y compuestos aldehídicos el día 29 de su elaboración con respecto a las concentraciones medidas a tiempo 0, a un cierto valor de dos de estas variables indicadas en la figura; las otras dos variables cuyos valores no se indican, toman los valores medios ensayados: 10 % p/p de fase dispersa, 3.0 % p/p de Tween 20, 0.35 % p/p de XG y 4000 psi de presión de homogenización.

A continuación, se presentan los modelos cuadráticos ajustados para el porcentaje de aumento de la concentración de hidropéroxidos lipídicos y compuestos aldehídicos (a día 29) de las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta presión, en función de las variables independientes consideradas y de sus correspondientes interacciones.

$$\begin{aligned} \text{Modelo a alta presión: \% Aumento [H. lipídicos]} = & 23.5036 + 8.29675*[Fase \\ & dispersa] - 0.951667*[Emulgente] - 11.5391*[Estabilizante] - 3.91817*Presión - \\ & 1.78843*[Fase dispersa]^2 + 2.21975*[Fase dispersa]*[Emulgente] - 2.1465*[Fase \\ & dispersa]*[Estabilizante] - 1.243*[Fase dispersa]*Presión + 0.02695*[Emulgente]^2 + \\ & 3.48075*[Emulgente]*[Estabilizante] + 5.602*[Emulgente]*Presión + \\ & 8.03558*[Estabilizante]^2 - 1.0825*[Estabilizante]*Presión - 1.9463*Presión^2 \quad \text{Ec. [43]} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Modelo a alta presión: \% Aumento [C. aldehídicos]} = & 82.061 + 38.46*[Fase dispersa] \\ & - 24.3702*[Emulgente] - 70.2548*[Estabilizante] - 28.6444*Presión - 28.9842*[Fase \\ & dispersa]^2 + 54.3758*[Fase dispersa]*[Emulgente] + 16.208*[Fase \\ & dispersa]*[Estabilizante] + 50.5323*[Emulgente]*[Estabilizante] + \\ & 26.4165*[Emulgente]*Presión + 71.2742*[Estabilizante]^2 - \\ & 16.304*[Estabilizante]*Presión - 38.2021*Presión^2 \quad \text{Ec. [44]} \end{aligned}$$

El modelo matemático obtenido para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos a día 29 al considerar todas las variables independientes y sus correspondientes interacciones (Ec. 43) presentó un coeficiente de regresión del 73.31 % y un valor p de falta de ajuste de 0.3522 (Tabla 40); al ser este número superior al nivel de significancia prefijado, se consideró que el modelo es adecuado para describir los datos experimentales. Asimismo, el valor p del modelo ajustado fue de 0.0344, inferior a 0.05, por lo que puede afirmarse que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables independientes y dependiente con un nivel de confianza del 95 %.

Con respecto al porcentaje de aumento de compuestos aldehídicos a día 29, el valor p del primer modelo obtenido al considerar todas las variables independientes y sus correspondientes interacciones resultó ser superior a 0.05, indicando que no existe una relación estadísticamente significativa entre las variables dependiente e independientes con un nivel de confianza del 95 %. Eliminando secuencialmente las variables estadísticamente menos significativas, en este caso $[Fase dispersa]*Presión$ y $[Emulgente]^2$, se pudo simplificar el modelo y se llegó a obtener uno adecuado (Ec. 44). El nuevo modelo obtenido ($p_{MOD} = 0.0429$) presentó un R^2 del 65.44 % y un valor p_{LOF} de 0.2754 (Tabla 41) que, al ser mayor de 0.05, sí que es apropiado para ajustar los

datos observados con un nivel de significancia del 5 %. Finalmente, la ausencia de un patrón definido en las gráficas de los residuos contra los valores ajustados o predichos (Figuras 121 y 122) indica que los dos modelos seleccionados describen adecuadamente los datos experimentales.

Figura 121. Gráfica de residuos para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.

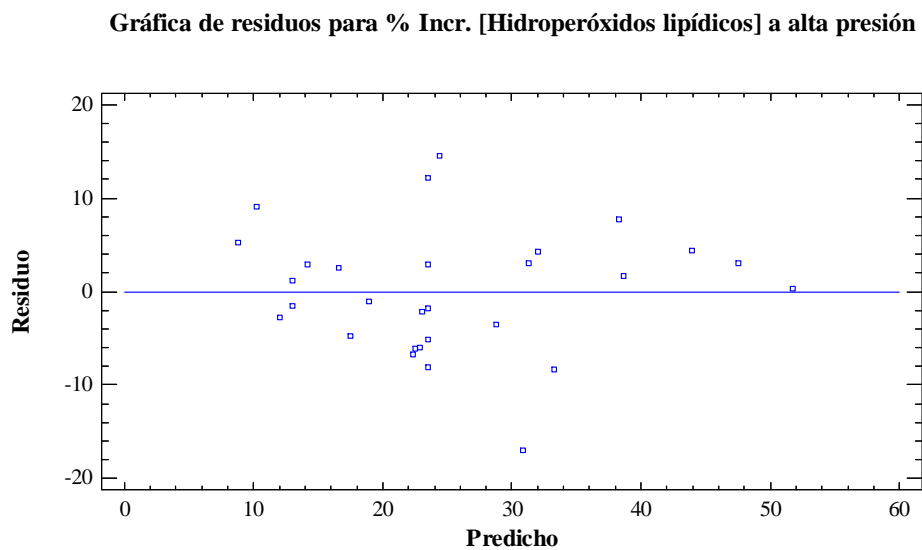
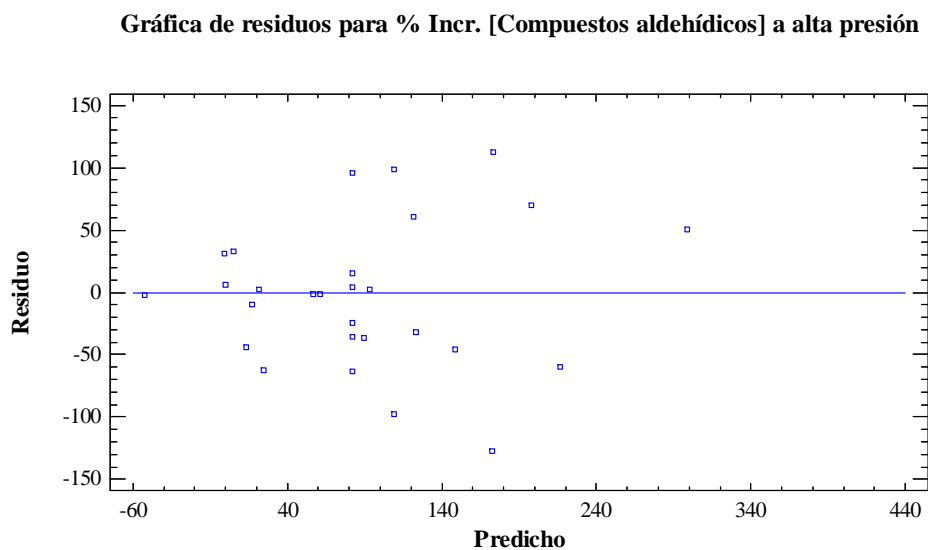


Figura 122. Gráfica de residuos para el porcentaje de aumento de compuestos aldehídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.



En la Tabla 40 se muestra el resultado del análisis de la varianza entre grupos para el porcentaje de aumento de la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión. De todas las variables consideradas, la concentración de fase dispersa y de estabilizante, ambas en orden lineal, fueron las únicas variables que arrojaron un valor p inferior a 0.05, por lo que puede afirmarse que son las únicas que ejercieron un efecto estadísticamente significativo sobre la oxidación lipídica primaria. Todos los efectos estadísticamente significativos también pueden verse en el diagrama de Pareto estandarizado (Figura 123), con indicación de si la variable considerada ejerce un efecto positivo o negativo sobre la variable respuesta.

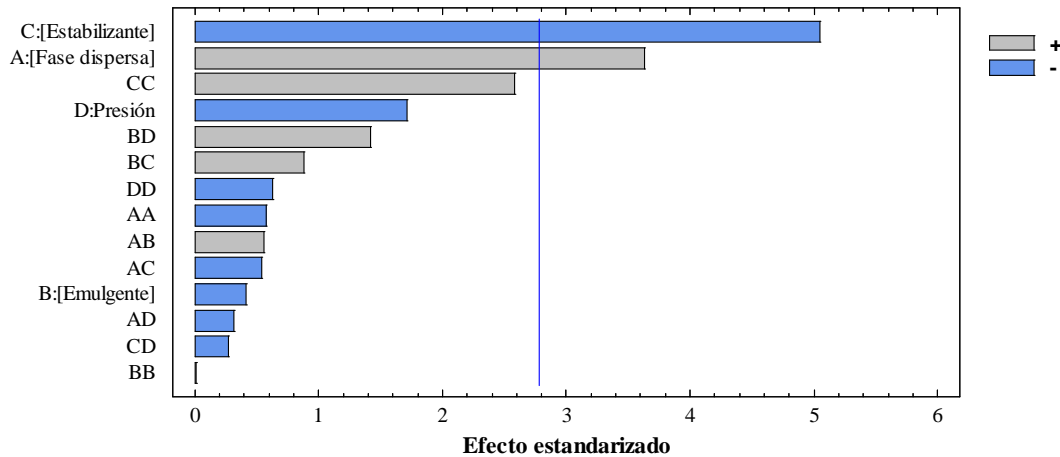
Tabla 40. Análisis de la varianza (ANOVA) para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor p^*
[Fase dispersa]	826.033	1	826.033	13.16	0.0222
[Emulgente]	10.868	1	10.868	0.17	0.6987
[Estabilizante]	1597.81	1	1597.81	25.45	0.0073
Presión	184.224	1	184.224	2.93	0.1618
[Fase dispersa] ²	20.7468	1	20.7468	0.33	0.5961
[Fase dispersa]*[Emulgente]	19.7092	1	19.7092	0.31	0.6051
[Fase dispersa]*[Estabilizante]	18.4298	1	18.4298	0.29	0.6167
[Fase dispersa]*Presión	6.1802	1	6.1802	0.10	0.7694
[Emulgente] ²	0.00471115	1	0.00471115	0.00	0.9935
[Emulgente]*[Estabilizante]	48.4625	1	48.4625	0.77	0.4292
[Emulgente]*Presión	125.53	1	125.53	2.00	0.2302
[Estabilizante] ²	418.835	1	418.835	6.67	0.0611
[Estabilizante]*Presión	4.68722	1	4.68722	0.07	0.7982
Presión ²	24.5714	1	24.5714	0.39	0.5655
Falta de ajuste	985.274	10	98.5274	1.57	0.3522
Error puro	251.086	4	62.7714		
Total (corr.)	4632.67	28			

* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

Figura 123. Diagrama de Pareto estandarizado para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.

Diagrama de Pareto estandarizado para % Aumento [H. lipídicos] a alta presión



A diferencia de las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad, a alta presión se obtuvieron menos efectos estadísticamente significativos, si bien los obtenidos fueron comunes a ambos tipos de emulsiones. Una de estas variables significativas fue la concentración de fase dispersa ($p = 0.0222$). La Figura 123 revela que una fracción de fase dispersa más alta da lugar a una mayor oxidación lipídica primaria. Este efecto queda claramente representado en la Figura 119a donde, al aumentar en un 10 % la concentración de fase dispersa (del 5 al 15 % p/p), el porcentaje de aumento de productos primarios de la oxidación incrementó en al menos un 2.8 % en el caso de las emulsiones Og/W preparadas a 12000 rpm, y alcanzó un 38.2 % en las emulsiones con un 0.20 % p/p de estabilizante. Y es que, como ya se ha mencionado previamente, la fase dispersa está constituida por un aceite de pescado enriquecido con PUFAs ω -3, que es el único componente susceptible de sufrir oxidación lipídica. Por tanto, una mayor concentración de fase dispersa implica una mayor cantidad de sustrato que puede ser oxidado. En cambio, al igual que ocurría en las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad, aquellas que contienen una concentración de fase dispersa más alta (un 15 % p/p) y que, por tanto, presentan un mayor porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos, también presentan generalmente un menor porcentaje de aumento de productos secundarios de la oxidación, y viceversa. Así por ejemplo, cuando el porcentaje de productos primarios de

la oxidación aumentó en un 2.8 %, el de productos secundarios disminuyó en un 16.8 % (emulsiones Og/W a 12000 rpm); y cuando el porcentaje de primarios aumentó en un 38.2 %, el de secundarios disminuyó en un 112.6 % (emulsiones Og/W con un 0.20 % p/p de XG) (Figura 120a). Este hecho vuelve a poner de manifiesto cómo los productos secundarios de la oxidación se forman a partir de la descomposición de los productos primarios.

La otra variable que ha resultado ser estadísticamente significativa sobre el porcentaje de aumento de productos primarios de la oxidación es la concentración de estabilizante ($p = 0.0073$). Así, la Figura 123 revela que el efecto de la concentración de XG sobre el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión es de forma negativa, esto es, cuanto mayor es la cantidad de estabilizante en la formulación, la formación de hidroperóxidos lipídicos con el tiempo disminuye. Este efecto queda claramente representado en la Figura 119c donde, al aumentar en un 0.30 % la concentración de estabilizante (del 0.20 al 0.50 % p/p), el porcentaje de aumento de productos primarios de la oxidación disminuyó en al menos un 4.5 % en el caso de las emulsiones Og/W con un 5 % p/p de fase dispersa, y alcanzó un 37.8 % en las emulsiones con un 1.0 % p/p de emulgente. Las razones que permiten justificar este efecto de la concentración de XG sobre la oxidación lipídica son dos. Por un lado, la XG es un hidrocoloide ampliamente utilizado en la industria por sus propiedades espesantes y estabilizantes: la adición de XG tiene un efecto significativo sobre las propiedades reológicas de las emulsiones, aumentando significativamente su viscosidad a medida que aumenta su concentración (Li et al., 2020). Este aumento de la viscosidad de la emulsión reduce la movilidad de las especies disueltas en la fase continua y complica los procesos de difusión hasta la región interfacial, donde tiene lugar la oxidación lipídica. Por otro lado, otros estudios aseguran que la XG tiene una fuerte actividad antioxidante gracias a sus grupos aniónicos que pueden quelar metales de transición catiónicos, los cuales actúan como catalizadores de las reacciones de oxidación (Waraho et al., 2011). Por tanto, mediante este otro mecanismo, la XG también podría llegar a evitar que los iones metálicos prooxidantes interactúen con las gotitas de fase dispersa y disminuir así la velocidad de la oxidación lipídica (Ma et al., 2020).

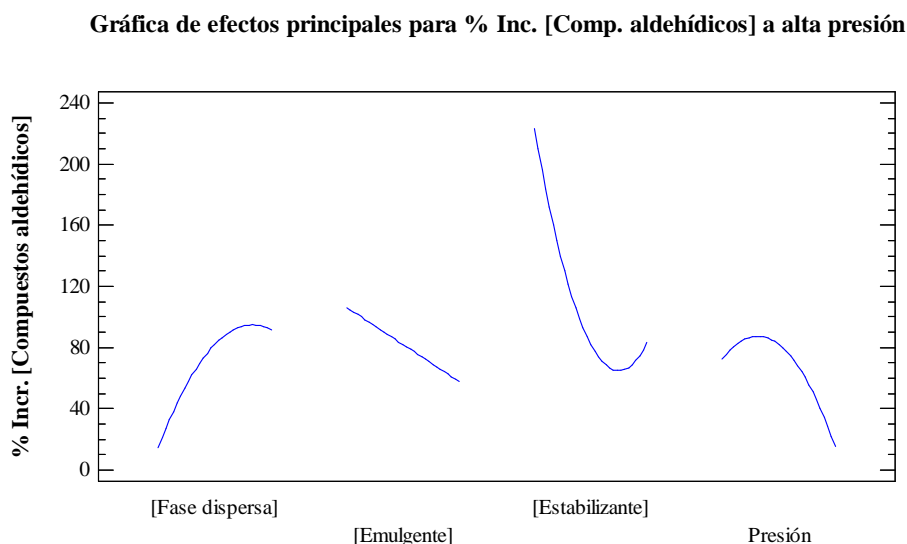
Con respecto a la oxidación lipídica secundaria, la Tabla 41 muestra el resultado del análisis de la varianza entre grupos para el porcentaje de aumento de la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión. De todas las variables consideradas, la concentración de estabilizante, tanto en su término lineal como cuadrático, fue la única variable que arrojó un valor p inferior a 0.05, por lo que puede afirmarse que es la única que ejerció un efecto estadísticamente significativo sobre la oxidación lipídica secundaria. A diferencia de las emulsiones Og/W a alta velocidad, a alta presión la concentración de fase dispersa no fue una variable estadísticamente significativa, si bien es cierto que estuvo muy cerca de serlo en su término lineal ($p = 0.0873$). La influencia de la concentración de XG sobre la variable respuesta aparece en la gráfica de efectos principales (Figura 124).

Tabla 41. Análisis de la varianza (ANOVA) para el porcentaje de aumento de compuestos aldehídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor p^*
[Fase dispersa]	17750.1	1	17750.1	5.08	0.0873
[Emulgente]	7126.86	1	7126.86	2.04	0.2265
[Estabilizante]	59228.8	1	59228.8	16.95	0.0147
Presión	9846.03	1	9846.03	2.82	0.1686
[Fase dispersa] ²	5651.48	1	5651.48	1.62	0.2724
[Fase dispersa]*[Emulgente]	11826.9	1	11826.9	3.38	0.1397
[Fase dispersa]*[Estabilizante]	1050.8	1	1050.8	0.30	0.6126
[Emulgente]*[Estabilizante]	10214.0	1	10214.0	2.92	0.1625
[Emulgente]*Presión	2791.33	1	2791.33	0.80	0.4220
[Estabilizante] ²	34174.6	1	34174.6	9.78	0.0353
[Estabilizante]*Presión	1063.28	1	1063.28	0.30	0.6106
Presión ²	9817.78	1	9817.78	2.81	0.1690
Falta de ajuste	81030.7	12	6752.56	1.93	<i>0.2754</i>
Error puro	13979.6	4	3494.89		
Total (corr.)	274928	28			

* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

Figura 124. Gráfica de efectos principales para el porcentaje de aumento de compuestos aldehídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.



De igual forma que sucede en la oxidación lipídica primaria y ocurría en las emulsiones Og/W homogenizadas a alta velocidad, un aumento en la concentración de estabilizante produce una disminución del porcentaje de aumento de la concentración de compuestos aldehídicos, 29 días después de su elaboración. La justificación para ello es la misma que ya se ha indicado anteriormente para la oxidación lipídica primaria. Este efecto puede verse claramente representado en la Figura 120c donde, aumentando en un 0.30 % la concentración de estabilizante (del 0.20 al 0.50 % p/p), el porcentaje de aumento de productos secundarios de la oxidación disminuyó entre 1.5 (emulsiones Og/W con un 5 % p/p de fase dispersa) y 47.1 veces (emulsiones preparadas a 12000 rpm); esta reducción se vio en todas las formulaciones salvo en las emulsiones con un 15 % p/p de fase dispersa, donde tuvo lugar un ligero incremento (un 50.3 %).

Una vez establecidas las ecuaciones de segundo orden que permiten ajustar el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos de las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta presión, 29 días después de su elaboración, en función de las variables independientes consideradas y de sus correspondientes interacciones, se hallaron las formulaciones y condiciones de operación óptimas para minimizar, de forma individual, cada uno de esos porcentajes. Así, estableciendo una fracción de fase dispersa del 5 % p/p, una concentración de emulgente hidrofílico del 1.0 % p/p, una concentración de estabilizante del 0.48 % p/p y

una presión de homogenización de 6000 psi, se podría llegar a alcanzar un porcentaje de aumento de productos primarios de la oxidación a los 29 días de su preparación de tan sólo el 0.36 %. Por otra parte, la minimización del porcentaje de aumento de compuestos aldehídicos se podría alcanzar utilizando una fracción de fase dispersa del 5 % p/p, una concentración de emulgente hidrofílico del 4.0 % p/p, una concentración de estabilizante del 0.42 % p/p y una presión de homogenización de 6000 psi; con estas condiciones se obtendría un porcentaje de aumento de productos secundarios de la oxidación a los 29 días de su preparación del – 99.58 %. Las Figuras 125 y 126 presentan respectivamente las superficies de respuesta ajustadas del porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos y de compuestos aldehídicos, para cada par de variables independientes.

Figura 125. Superficie de respuesta estimada para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.

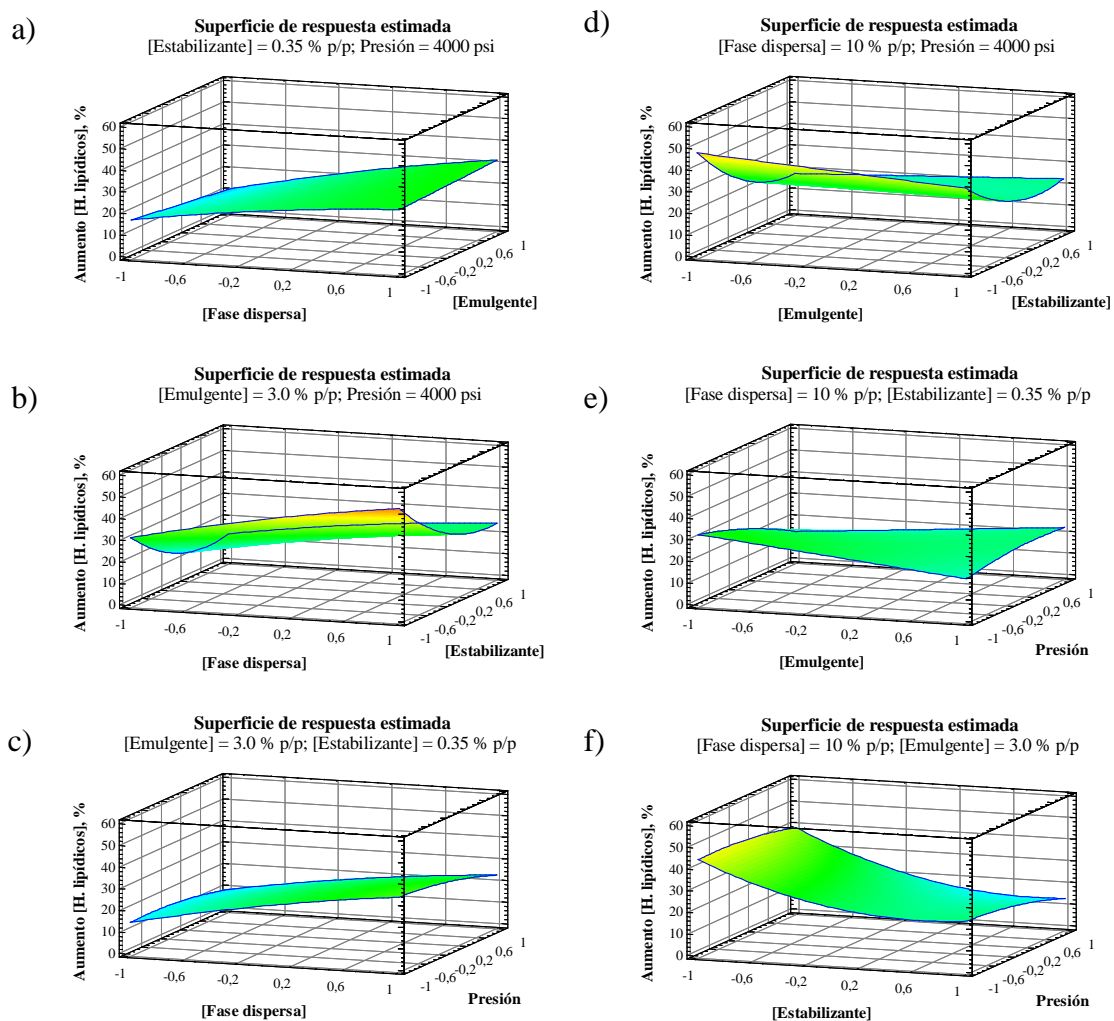
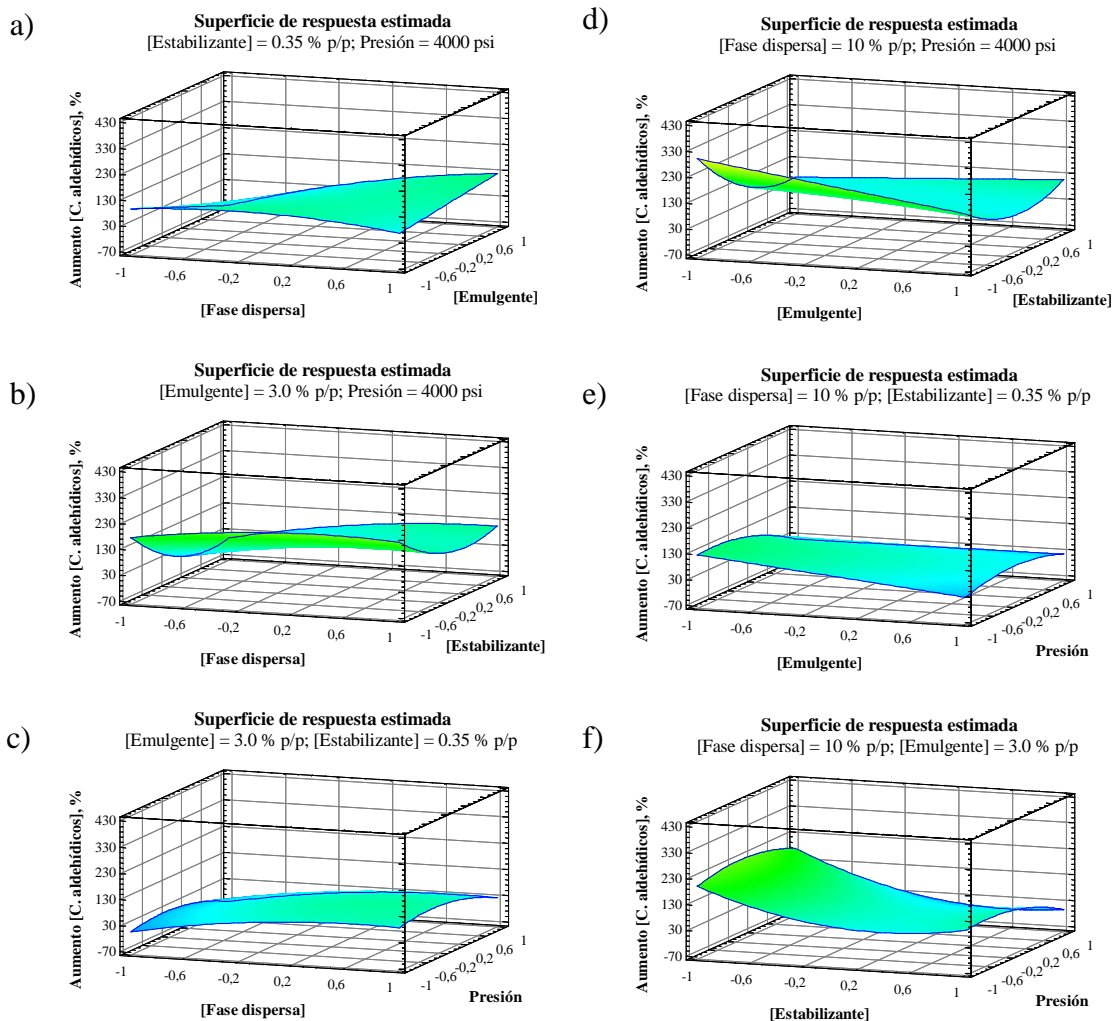


Figura 126. Superficie de respuesta estimada para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.

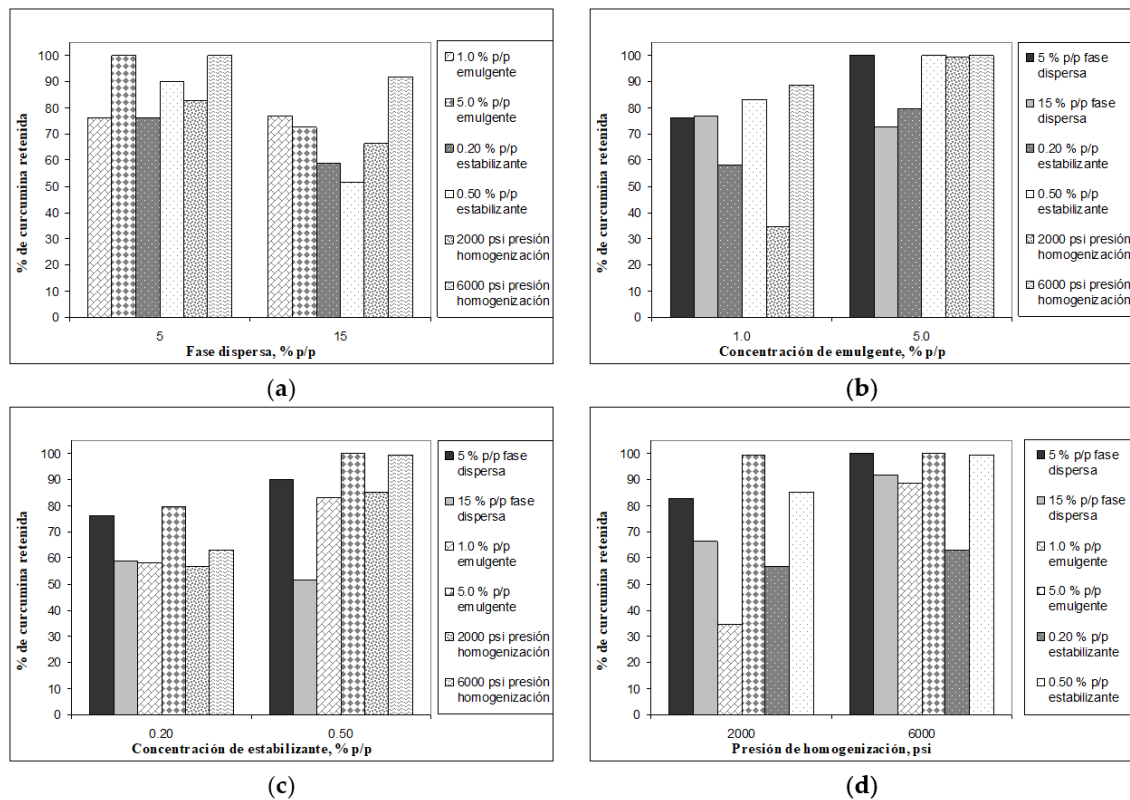


4.3.2.3. Efecto de las variables de operación sobre la capacidad de retención de curcumina

Para estudiar cómo influyen las variables independientes consideradas sobre la capacidad de retención de curcumina, se analizaron sus concentraciones en el oleogel de partida y en los sistemas emulsificados Og/W preparados a alta presión, mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem, los días 1, 15, y 30 después de su elaboración. La Figura 127 representa los porcentajes de curcumina retenida el día 30 con respecto a la concentración inicialmente

medida; el resto hasta el 100 % representa los porcentajes de curcumina degradada como consecuencia del propio proceso de emulsificación. Cada barra del gráfico representa el porcentaje de curcumina retenida a un cierto valor de dos de los factores indicados en la figura; los otros dos factores cuyos valores no se indican, toman los valores medios ensayados (ver apartado 4.3.1.).

Figura 127. Porcentaje de curcumina retenida en las emulsiones Og/W, 30 días después de su elaboración, en función de: a) la fracción de fase dispersa, b) la concentración de emulgente, c) la concentración de estabilizante, y d) la presión de homogenización.



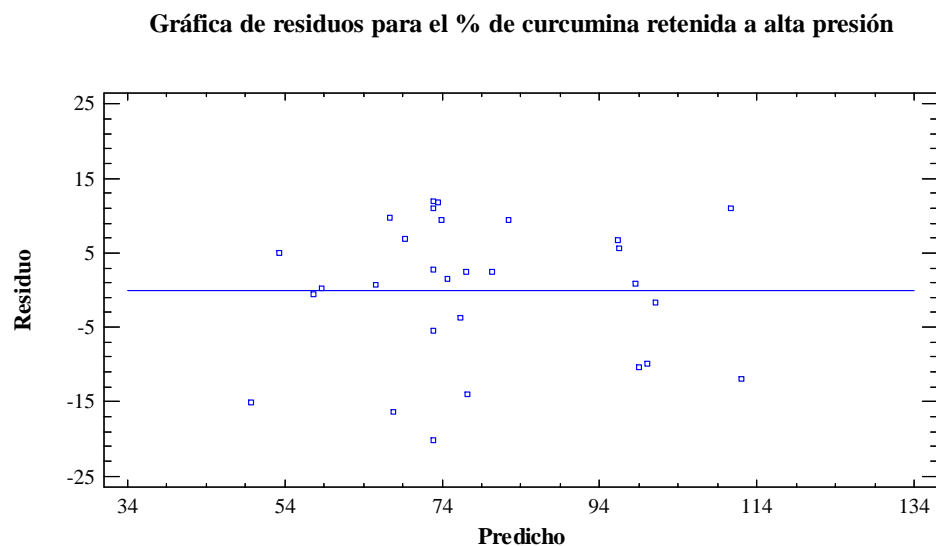
A continuación, se presenta la ecuación de segundo grado del modelo ajustado para el porcentaje de curcumina retenida por las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta presión, 30 días después de su elaboración, en función de las variables independientes consideradas y de sus interacciones correspondientes.

Modelo a alta presión: % de curcumina retenida = 72.8566 – 10.7564*[Fase dispersa] + 11.5663*[Emulgente] + 9.99725*[Estabilizante] + 11.7993*Presión + 4.2567*[Fase dispersa]² – 7.049*[Fase dispersa]*[Emulgente] – 5.4235*[Fase

$$\begin{aligned} & dispersa] * [Estabilizante] - 3.38325 * [Fase dispersa] * Presión + 5.45132 * [Emulgente]^2 \\ & - 0.33925 * [Emulgente] * [Estabilizante] - 12.8462 * [Emulgente] * Presión - \\ & 3.17655 * [Estabilizante]^2 + 2.0105 * [Estabilizante] * Presión + 7.66807 * Presión^2 \text{ Ec. [45]} \end{aligned}$$

El modelo matemático obtenido (Ec. 45), con un R^2 del 75.66 %, permite explicar de manera aceptable el 75.66 % de la variabilidad en el porcentaje de curcumina retenida por las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta presión, y con un p_{MOD} de 0.0210, inferior a 0.05, puede afirmarse que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables independientes y dependiente con un nivel de confianza del 95 %. Además, el modelo ajustado presentó un valor p de falta de ajuste de 0.5545 (Tabla 42) que, al ser superior al nivel de significancia prefijado, se consideró que el modelo es adecuado para describir los datos experimentales. Finalmente, la ausencia de un patrón definido en la gráfica de los residuos contra los valores ajustados o predichos (Figura 128) indica que el modelo seleccionado describe adecuadamente los datos experimentales.

Figura 128. Gráfica de residuos para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.



Tras un análisis de la varianza (ANOVA) de los valores observados (Tabla 42), se encontró que tanto la fracción de fase dispersa como la concentración emulgente y la presión de homogenización ejercen un efecto estadísticamente significativo en orden lineal sobre la capacidad de retención de curcumina ($p < 0.05$); ninguno de sus efectos

de orden superior ni sus interacciones fueron significativas. La forma en que influyen todos estos factores sobre la variable respuesta queda puesta de manifiesto en la gráfica de efectos principales (Figura 129).

Tabla 42. Análisis de la varianza (ANOVA) para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.

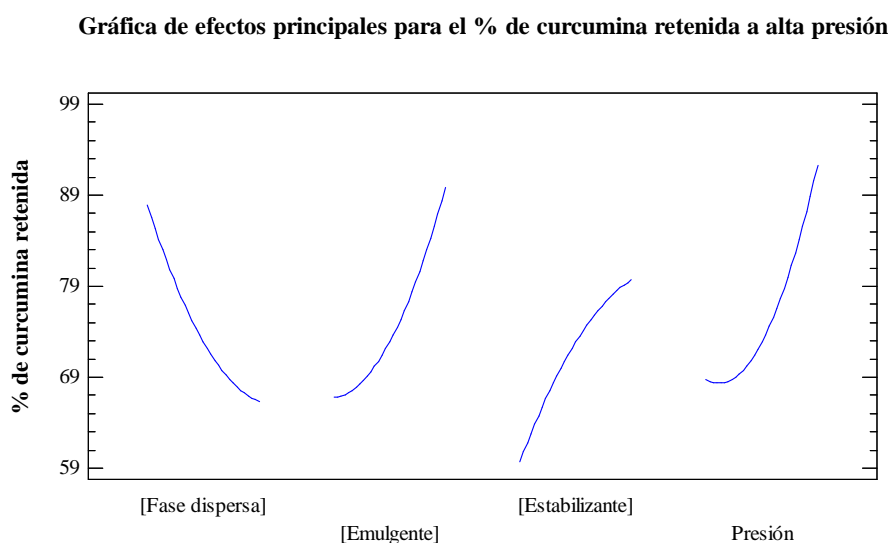
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón <i>F</i>	Valor <i>p</i> *
[Fase dispersa]	1388.41	1	1388.41	7.83	0.0489
[Emulgente]	1605.36	1	1605.36	9.05	0.0396
[Estabilizante]	1199.34	1	1199.34	6.76	0.0600
Presión	1670.69	1	1670.69	9.42	0.0373
[Fase dispersa] ²	117.532	1	117.532	0.66	0.4613
[Fase dispersa]*[Emulgente]	198.754	1	198.754	1.12	0.3494
[Fase dispersa]*[Estabilizante]	117.657	1	117.657	0.66	0.4610
[Fase dispersa]*Presión	45.7855	1	45.7855	0.26	0.6381
[Emulgente] ²	192.759	1	192.759	1.09	0.3560
[Emulgente]*[Estabilizante]	0.460362	1	0.460362	0.00	0.9618
[Emulgente]*Presión	660.105	1	660.105	3.72	0.1259
[Estabilizante] ²	65.4517	1	65.4517	0.37	0.5763
[Estabilizante]*Presión	16.1684	1	16.1684	0.09	0.7777
Presión ²	381.401	1	381.401	2.15	0.2164
Falta de ajuste	1749.76	10	174.976	0.99	<i>0.5545</i>
Error puro	709.307	4	177.327		
Total (corr.)	10100.9	28			

* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

La influencia de la concentración de fase dispersa sobre la capacidad de retención de curcumina es de forma negativa. Así, la Figura 129 revela que una fracción de fase dispersa más alta da lugar a un porcentaje de curcumina retenida más bajo. Conviene recordar aquí, pues podría llevar a confusión, la diferencia entre la concentración de curcumina encapsulada (cantidad total de curcumina presente en la emulsión) y el porcentaje de curcumina retenida (cantidad de curcumina con respecto a

la concentración inicialmente añadida). Así, un aumento en la concentración de fase dispersa se asocia con un mayor contenido de curcumina en el sistema emulsificado, pero esto generalmente no implica una capacidad de retención de curcumina más alta. Por ejemplo, la Figura 127a muestra el efecto de aumentar la fracción de fase dispersa del 5 al 15 % p/p y, como consecuencia de ese aumento, se produce una reducción del porcentaje de curcumina retenida de entre un 0.8 y un 38.9 %. Esto podría estar relacionado con el hecho de que, a una mayor concentración de fase dispersa, podría haber menos cantidad disponible de emulgente para recubrir las gotitas de oleogel y, con el paso del tiempo, esas gotitas no envueltas podrían salir a la superficie. Por tanto, se puede concluir que se necesitan cantidades apropiadas de emulgente y fase dispersa para preparar sistemas emulsionados robustos que consigan retener el máximo porcentaje de compuestos bioactivos encapsulados. En este sentido apunta también el estudio de Sharma et al. (2021) quienes estudiaron las condiciones óptimas de emulsificación de nanoemulsiones O/W para mejorar la eficiencia de encapsulación de curcumina y observaron una disminución significativa en los porcentajes de curcumina encapsulada cuando aumentaron los niveles de aceite de 5 mL/100 mL a 15 mL/100 mL, manteniendo fijas la cantidad de emulgente y el tiempo de sonicación: al aumentar la fracción de aceite de 5 mL/100 mL a 10 mL/100 mL y 15 mL/100 mL, el porcentaje de curcumina encapsulada pasó de un 82.3 % a un 76.8 y 64.3 %, respectivamente.

Figura 129. Gráfica de efectos principales para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones O/W preparadas a alta presión.



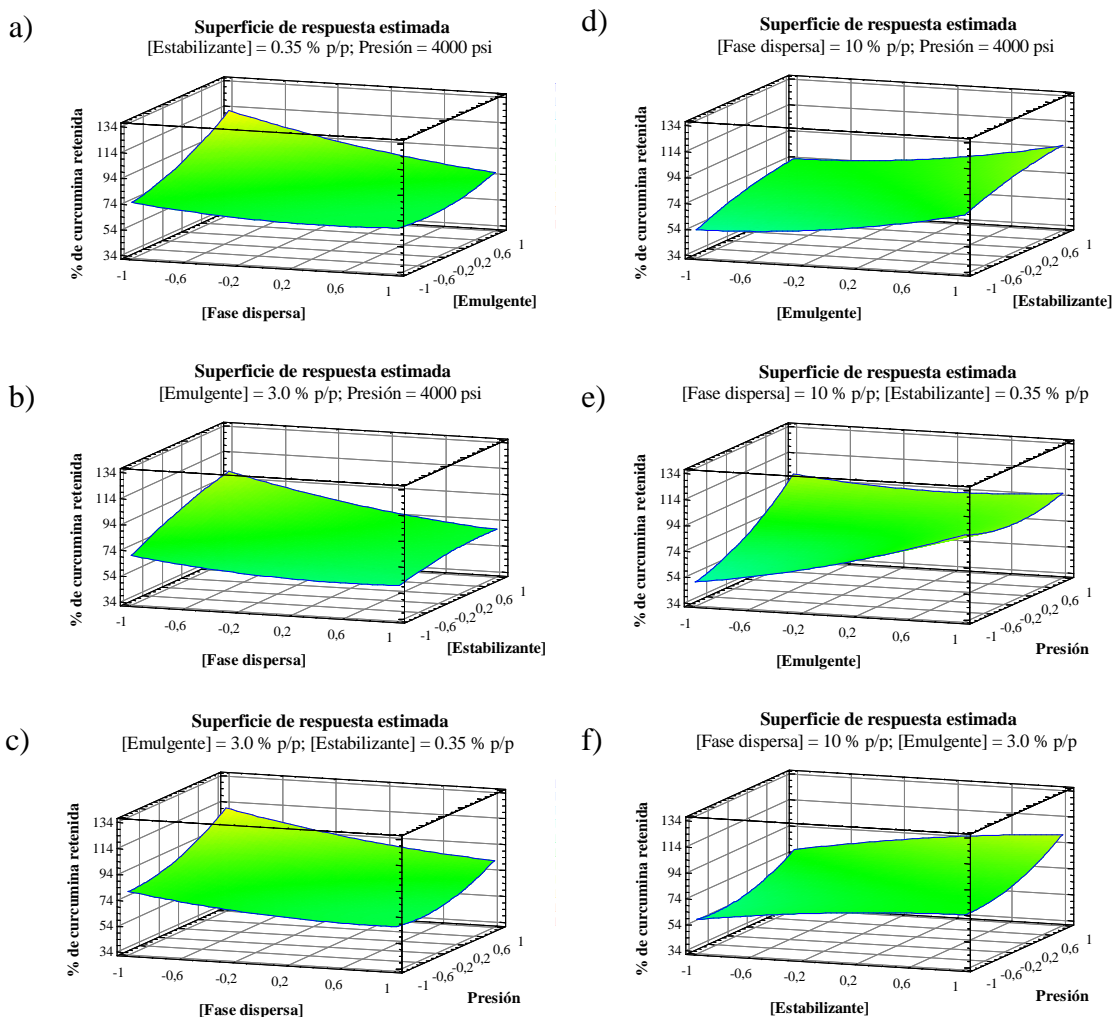
Otra de las variables estadísticamente más significativas sobre la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta presión es la concentración de emulgente hidrofílico. La Figura 129 muestra cómo la influencia de la concentración de emulgente sobre el porcentaje de retención de curcumina es de forma positiva, esto es, cuanto mayor es la cantidad de emulgente, el porcentaje de curcumina retenida también es más alto. Este efecto queda claramente representado en la Figura 127b donde, al aumentar en un 4 % la concentración de Tween 20 (del 1.0 al 5.0 % p/p), el porcentaje de curcumina retenida aumentó entre un 11.3 % en el caso de las emulsiones Og/W preparadas a 6000 psi, y un 64.8 % en las emulsiones preparadas a 2000 psi. Solamente en el caso de las emulsiones con un 15 % p/p de fase dispersa se observó una disminución del porcentaje de retención de curcumina del 4.3 %. Este aumento de la capacidad de retención de curcumina con la cantidad de emulgente se puede atribuir a un mejor recubrimiento de las gotitas de fase dispersa debido a la presencia de un mayor número de capas de Tween 20 que rodean y envuelven las gotitas de oleogel. La capacidad de retención de curcumina del Tween 20 también se puede explicar mediante la formación de puentes de hidrógeno entre el resto hidroxilo fenólico de la curcumina y las cadenas alifáticas del emulgente, que favorece un mayor atrapamiento de la curcumina en el seno de la fase dispersa. Asimismo, otros estudios informan que un exceso de emulgente puede formar micelas capaces de atrapar en su interior compuestos bioactivos lipofílicos, protegiendo así la curcumina encapsulada (Ratanajiaroen et al., 2012). Otros autores como Chuacharoen et al. (2019) también confirman el aumento de la eficiencia de encapsulación de curcumina (del 92.86 al 99.51 %) en nanoemulsiones cargadas con este biocompuesto a una concentración de emulgente (lecitina y Tween 80) del 0.3 al 9.0 %.

Finalmente, la presión de homogenización también demostró afectar significativamente a la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W. De igual modo que la concentración de emulgente, su influencia sobre el porcentaje de retención de curcumina fue de forma positiva, esto es, cuanto mayor era la presión de homogenización, el porcentaje de curcumina retenida también fue más alto (entre un 0.5 y un 54.0 %, Figura 127d). Y es que, en efecto, la capacidad de retención de curcumina de los sistemas emulsionados parece aumentar con el aporte energético realizado durante la emulsificación del sistema. Así fue también constatado por Sharma et al.

(2021) quienes, cuando aumentaron el tiempo de sonicación de 10 a 20 min, observaron un aumento de la eficiencia de encapsulación de curcumina del 2.8 %.

Una vez establecido el modelo que ajusta el porcentaje de curcumina retenida de las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta presión, se obtuvieron las condiciones óptimas para minimizar esos porcentajes. En efecto, estableciendo una concentración de fase dispersa del 5 % p/p, una concentración de emulgente del 5.0 % p/p, una concentración de estabilizante de 0.50 % p/p y una presión de homogenización de 2500 psi, se podría llegar a alcanzar una capacidad de retención de curcumina máxima. La Figura 130 representa las superficies de respuesta ajustadas en función de las diferentes combinaciones de variables independientes.

Figura 130. Superficie de respuesta estimada para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W preparadas a alta presión.

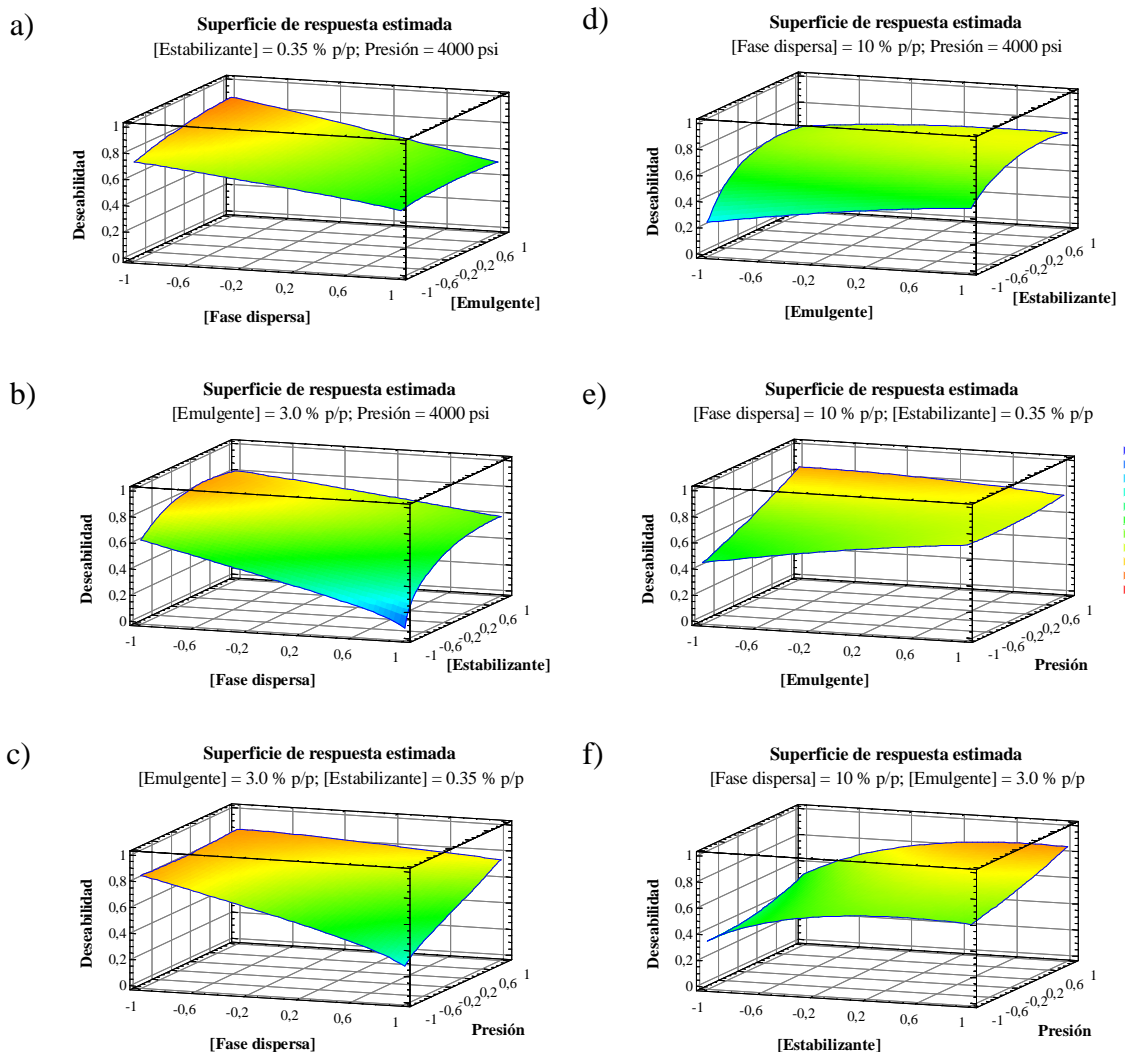


4.3.2.4. Optimización multivariable de la composición y las condiciones de operación del sistema emulsificado

En los apartados anteriores, se hallaron las variables de formulación y las condiciones operativas óptimas para minimizar individualmente el diámetro volumétrico o diámetro medio de De Brouckere y la oxidación lipídica (primaria y secundaria) y maximizar la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta presión, 30 días después de su elaboración. Naturalmente, estos conjuntos de condiciones óptimas fueron distintos para cada variable respuesta. Por tanto, para optimizar de forma conjunta varias de las respuestas consideradas en el diseño, se utiliza la metodología de superficie multi-respuesta que proporciona un óptimo global del sistema dentro de las condiciones de trabajo.

En primer lugar, se ha considerado un primer objetivo de optimización con el que se pretende encontrar las condiciones óptimas para estabilizar fisicoquímicamente la emulsión Og/W preparada mediante homogenización a alta presión o, lo que es lo mismo, para minimizar el tamaño medio de gota y la oxidación lipídica primaria y secundaria de forma simultánea (objetivo 1). En base al razonamiento expuesto en el apartado 4.1.4. sobre la secuencialidad de las reacciones de oxidación lipídica y siguiendo el mismo criterio que en capítulos anteriores, se ha mantenido la ponderación para las distintas variables respuesta: 5.0 para la oxidación lipídica primaria, 2.0 para la oxidación secundaria y 4.0 para el diámetro volumétrico. Bajo estas premisas, la composición y condiciones de operación óptimas del sistema emulsificado Og/W a alta presión son: 5.2 % p/p de fracción de fase dispersa, 5.0 % p/p de emulgente hidrofílico, 0.47 % p/p de estabilizante y 2300 psi de presión de homogenización. De acuerdo con la predicción de los modelos matemáticos ajustados, en estas condiciones se obtendría un tamaño medio de gota de 11.963 μm y un porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos del 8.2 y - 54.3 %, respectivamente. La deseabilidad global alcanzada con este conjunto de condiciones óptimas es de 0.920. La Figura 131 representa la deseabilidad global ajustada de esta primera función objetivo para cada par de variables independientes.

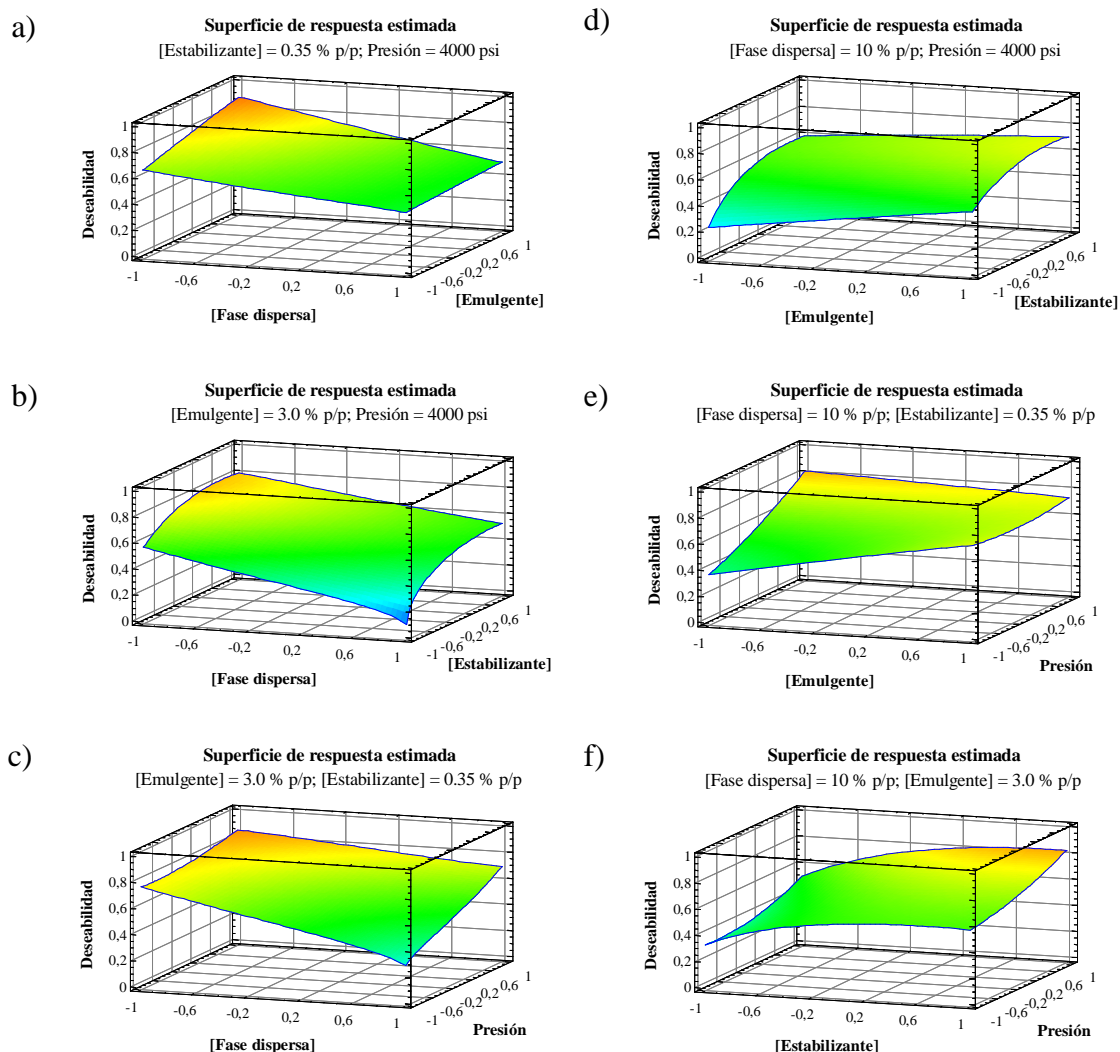
Figura 131. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada del primer objetivo de optimización en las emulsiones Og/W homogenizadas a alta presión.



Si, por el contrario, se pretende minimizar simultáneamente el tamaño medio de gota y la oxidación lipídica primaria y secundaria y, a su vez, maximizar la capacidad de retención de curcumina de la emulsión Og/W homogenizada a alta presión, cambia el objetivo de optimización (objetivo 2) y, por tanto, conduce a condiciones óptimas diferentes: 5.1 % p/p de fracción de fase dispersa, 5.0 % p/p de emulgente hidrofílico, 0.49 % p/p de estabilizante y 2000 psi de presión de homogenización. Esta formulación y condiciones de operación de la emulsión permitirían obtener un tamaño medio de gota de 11.143 μm , un porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos del 8.0 y - 54.5 %, respectivamente, y una capacidad de retención de curcumina del 100 %, alcanzando una deseabilidad global de 0.942. Para este segundo

objetivo de optimización, también se mantuvieron los pesos asignados a cada respuesta en capítulos anteriores: 4.0 para el diámetro volumétrico, 5.0 para la oxidación lipídica primaria, 2.0 para la oxidación secundaria y 3.0 para la capacidad de retención de curcumina. La Figura 132 representa la deseabilidad global ajustada para este segundo objetivo de optimización en función de cada par de variables independientes.

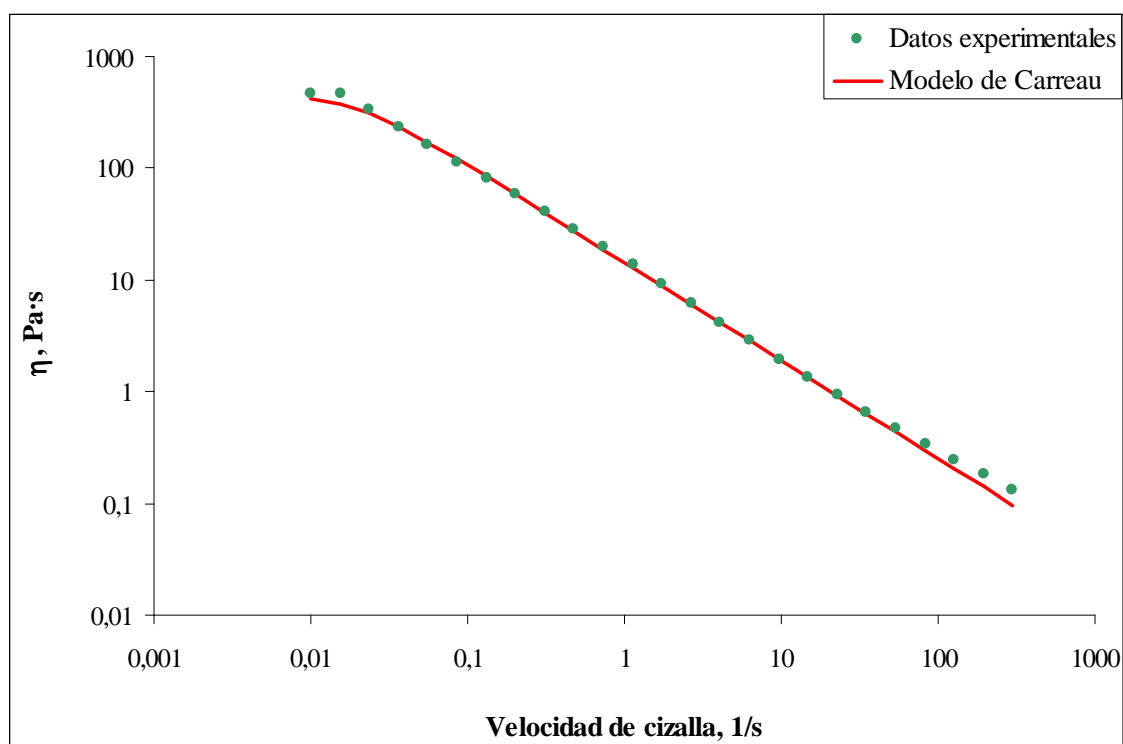
Figura 132. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada del segundo objetivo de optimización en las emulsiones O_g/W homogenizadas a alta presión.



4.3.4. Estudio reológico de la emulsión Og/W óptima

Una vez obtenida la formulación y condiciones de operación óptimas del sistema de liberación basado en emulsiones Og/W rico en PUFAs ω -3 y curcumina (14.04 % p/p de fase dispersa, 5.0 % p/p de Tween 20, 0.49 % p/p de XG y 12000 rpm de velocidad de homogenización), se estudió su comportamiento reológico a temperatura constante (25 °C), y más concretamente, la curva de viscosidad y los módulos viscoelásticos en función de la frecuencia –para determinar la zona viscoelástica lineal, previamente se realizó un barrido de esfuerzos. La Figura 133 muestra, en escala doblemente logarítmica, la viscosidad de la emulsión Og/W óptima para distintas velocidades de cizalla (entre 0.01 s⁻¹ y 300 s⁻¹).

Figura 133. Curva de viscosidad de la emulsión Og/W óptima a 25 °C.



Al igual que en el caso del oleogel, la curva de viscosidad obtenida para la emulsión Og/W óptima representa un comportamiento pseudoplástico, es decir, su viscosidad disminuye de 464.8 Pa·s a 0.132 Pa·s al aumentar la velocidad de cizalla en el rango antes indicado, fenómeno que habitualmente está relacionado con una

reorientación de las gotículas del sistema. En cambio, a diferencia de aquel, la curva de viscosidad presentó una pequeña meseta newtoniana –de viscosidad constante– para velocidades de cizalla muy bajas, cercanas al reposo, y para velocidades de agitación más altas, la viscosidad fue disminuyendo siguiendo una evolución como la que se muestra en la Figura 133. Y es que, en efecto, la mayor parte de las emulsiones concentradas presentan un comportamiento no newtoniano y viscoelástico (Bengoechea-Ruiz, 2006). Este comportamiento tradicionalmente se ha relacionado tanto con la floculación de las gotas de fase dispersa como con las características no newtonianas de la fase continua (Pal, 2011). Por tanto, las curvas de viscosidad de estas emulsiones corresponden generalmente a las de un fluido estructural, aunque dependiendo de la fracción en volumen de fase dispersa es posible que no aparezcan todas las regiones que caracterizan a este tipo de comportamiento, como sucede en la emulsión Og/W óptima que nos ocupa. Una de las expresiones más utilizadas para modelizar matemáticamente este tipo de comportamiento es el *modelo de Carreau*:

$$\eta = \eta_{\infty} + (\eta_0 - \eta_{\infty}) \cdot \left[1 + (\lambda \cdot \dot{\gamma})^2 \right]^{\frac{n-1}{2}} \quad \text{Ec. [46]}$$

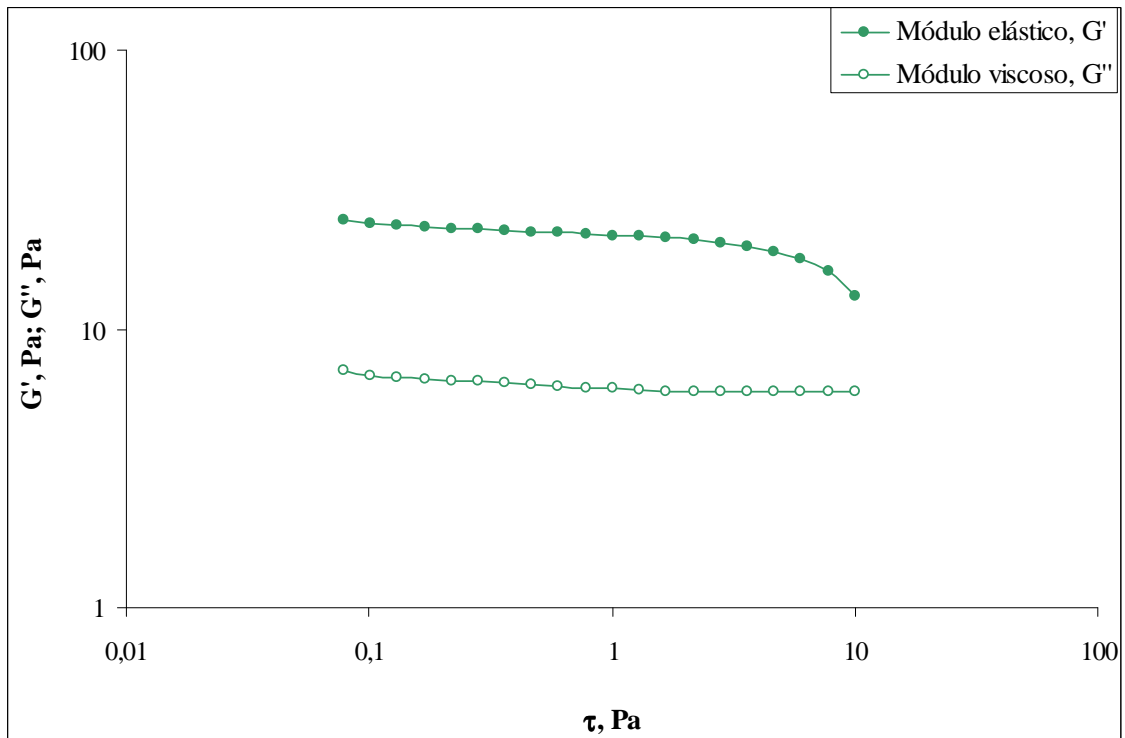
donde η_0 y η_{∞} son los valores asintóticos de la viscosidad a muy bajo y muy elevado gradiente de cizalla, respectivamente, λ es la constante de relajación (con unidades de s^2 en el SI) y n es el índice de comportamiento de flujo o índice de Ostwald (adimensional) del modelo de la *ley de la potencia*. Las curvas de viscosidad representadas por este modelo son el resultado de una dramática ruptura estructural que puede atribuirse tanto a un proceso irreversible (coalescencia entre gotas), como a uno reversible (defloculación, deformación de gotas, etc.) (Figoni & Shoemaker, 1983).

Aplicando el *modelo de Carreau* a la curva de viscosidad de la emulsión Og/W óptima y considerando una viscosidad inicial, η_0 , igual a 463.1 Pa·s y una viscosidad límite, η_{∞} , igual a 0 Pa·s, se obtuvieron los siguientes parámetros: $\lambda = 52.619 s^2$ y $n = 0.122$. El valor de n obtenido, muy por debajo de la unidad e inferior al del oleogel óptimo, vuelve a poner de manifiesto un marcado comportamiento pseudoplástico característico de sistemas estructurados. A partir de esos valores de los parámetros, se ha representado el *modelo de Carreau* en la Figura 133. De acuerdo con la mencionada figura, se observa un buen grado de ajuste entre los datos experimentales y el modelo matemático y unos valores de viscosidad muy superiores a los del oleogel óptimo.

Para analizar la viscoelasticidad de la emulsión Og/W óptima, comportamiento que está relacionado con su respuesta temporal y con la estructura interna del sistema, se realizaron medidas oscilatorias de pequeña amplitud y se calcularon los módulos viscoelásticos G' y G'' al ir variando la frecuencia de oscilación (espectro dinámico).

Estos ensayos se realizaron en la zona de comportamiento lineal, donde el esfuerzo y la deformación son proporcionales (región elástica del espectro mecánico) y, por tanto, los módulos viscoelásticos no dependen del esfuerzo aplicado (Lim & Ahn, 2013). Así pues, como fase previa fue necesario determinar esta zona viscoelástica lineal y, para ello, se realizaron medidas oscilatorias a una frecuencia constante de 1 Hz (6.283 rad/s) y se variaron las amplitudes de esfuerzo entre 0.07851 Pa y 10 Pa (también llamado barrido de esfuerzos). En esta zona lineal es donde se cumplen las ecuaciones del apartado 3.2.4.7. y se pueden definir adecuadamente ambos módulos viscoelásticos. La Figura 134 representa, en escala doblemente logarítmica, la gráfica de barrido de esfuerzos obtenida con la emulsión Og/W óptima para detectar la región lineal.

Figura 134. Barrido de esfuerzos de la emulsión Og/W óptima a 25 °C.

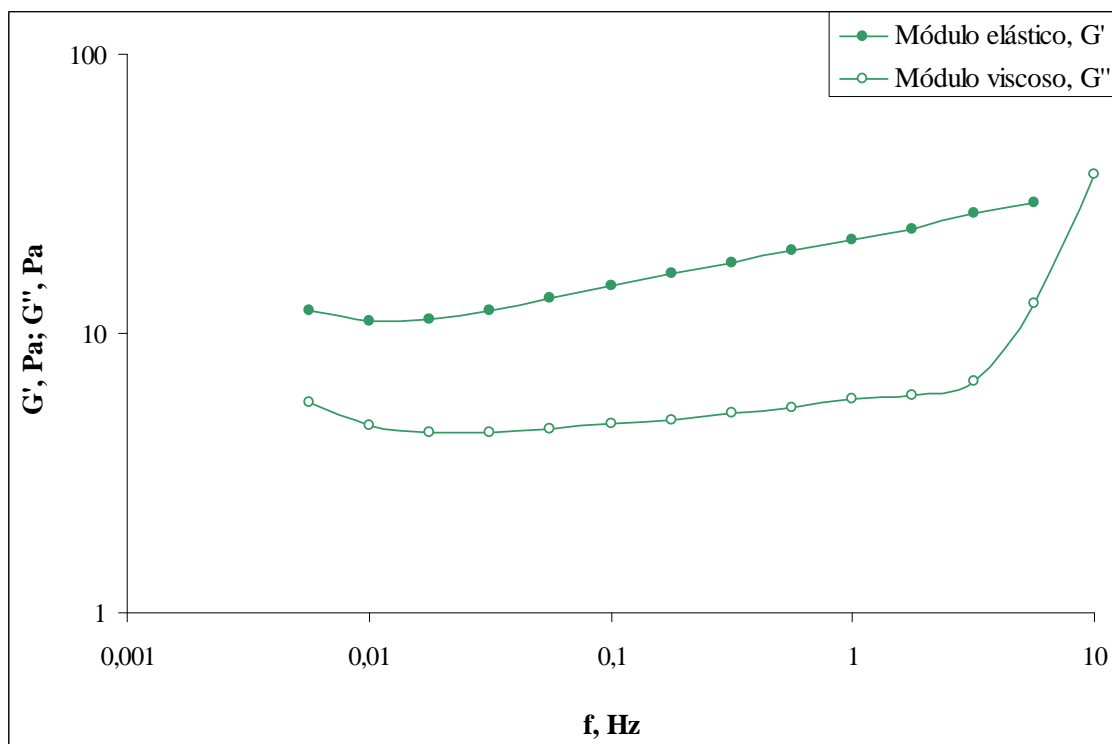


En la Figura 134 se observa que, a esfuerzos pequeños, por debajo de 2 Pa, ambos módulos son más o menos constantes, lo que quiere decir que el esfuerzo y la

deformación son proporcionales (ya que estos módulos corresponden al cociente de ambos multiplicado por una función del desfase). También es interesante destacar que los valores de sus respectivos módulos, tanto el elástico como el viscoso, ambos medidos en la región lineal, son ligeramente diferentes entre sí, y que la extensión de la región viscoelástica lineal es independiente de los valores absolutos de dichos módulos.

Una vez seleccionada una determinada amplitud del esfuerzo dentro de la región lineal (en este caso, 0.8 Pa), se mantuvo ese esfuerzo constante y se realizó un barrido de frecuencias de 0.005623 Hz a 10.00 Hz, obteniendo el llamado espectro dinámico, esto es, la representación gráfica de las funciones viscoelásticas G' y G'' en función de la frecuencia de oscilación (Figura 135).

Figura 135. Espectro dinámico de la emulsión Og/W óptima a 25 °C.



El espectro obtenido en la Figura 135 muestra un espectro mecánico característico de emulsiones altamente floculadas, en el que el módulo de almacenamiento, G' , se encuentra siempre por encima del módulo de pérdida, G'' , en todo el intervalo de frecuencias estudiado. Este comportamiento es representativo de un carácter predominantemente elástico. Normalmente, es posible distinguir en este espectro tres zonas características: (i) una zona pseudo-terminal a bajas frecuencias, que

muestra una tendencia al cruce de los dos módulos viscoelásticos; (ii) una zona intermedia, en la que G' se mantiene prácticamente constante y en la que G'' presenta un mínimo; y (iii), por último, el principio de una zona de transición a altas frecuencias. Esta zona, en la que aparece un mínimo en la evolución del módulo de pérdidas, acompañado de una zona de pendiente nula o ligeramente positiva del módulo de almacenamiento, se conoce como zona “plateau” y se relaciona con un comportamiento de tipo gel. Esta respuesta es propia de emulsiones en las que se desarrolla un entramado elástico debido a un proceso de floculación extensiva de las gotas de fase dispersa (Dickinson, 1989; Gallegos & Franco, 1999; Franco et al., 2000).

4.3.5. Estudios de estabilidad de la emulsión Og/W óptima con el pH, la fuerza iónica y la temperatura

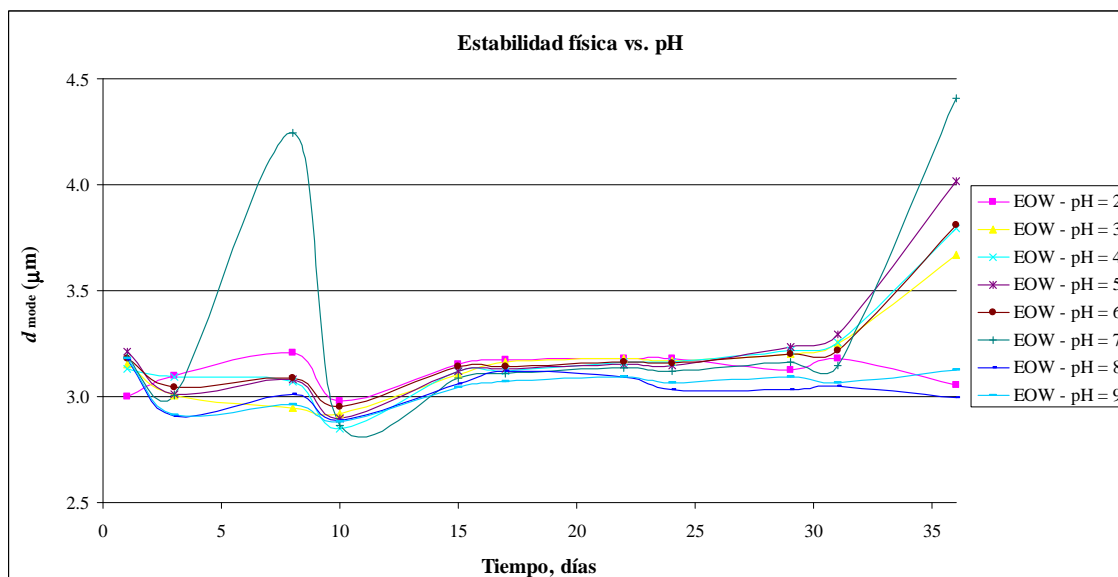
El pH, la presencia de electrolitos y la temperatura de almacenamiento, son tres de los muchos factores que pueden hacer que las emulsiones pierdan su estabilidad, especialmente las estabilizadas con proteínas y/o polisacáridos (Sriprabhom et al., 2019). Así, por ejemplo, a valores de pH próximos al punto isoeléctrico de las proteínas, se produce la pérdida de la repulsión electrostática entre las gotas de fase dispersa y, por consiguiente, las emulsiones tienen poca estabilidad a la agregación. En relación a la presencia de electrolitos, estos pueden afectar a la estabilidad de las emulsiones con proteínas ya sea reduciendo la repulsión electrostática mediante un efecto pantalla o uniéndose a grupos con carga opuesta en la superficie de las gotas, lo que puede producir procesos de floculación (Demetriades et al., 1997; McClements, 2004; Tangsuphoom & Coupland, 2008). En el caso de las emulsiones de esta Tesis Doctoral, dado que el emulgente utilizado es un tensioactivo no iónico (Tween 20) estable tanto en medios con un pH de 2 a 12 como en disoluciones de electrolitos, cambios en el pH o la fuerza iónica no deben ocasionar efecto alguno sobre el emulgente. Sin embargo, el estabilizante utilizado para aumentar la viscosidad de la fase continua y mejorar la estabilidad de la emulsión (XG) es un polisacárido aniónico (Sun et al., 2007; Long et al., 2013) y, por consiguiente, el potencial zeta y las propiedades reológicas del sistema

sí que podrían verse afectadas por el pH o la presencia de electrolitos y ejercer algún tipo de influencia sobre la estabilidad física de la emulsión Og/W óptima.

Con objeto de estudiar la estabilidad física de la emulsión Og/W óptima preparada mediante homogenización a alta velocidad (14.04 % p/p de fase dispersa, 5.0 % p/p de Tween 20, 0.49 % p/p de XG y 12000 rpm de velocidad de homogenización) en función del pH y la fuerza iónica, estos parámetros se ajustaron en el intervalo de pH de 2 a 9 y de fuerza iónica de 0 a 1000 mM, y se analizó la evolución de la moda de la distribución de tamaños, d_{mode} , durante un total de 36 días. Los resultados se muestran en las Figuras 136 y 137, respectivamente.

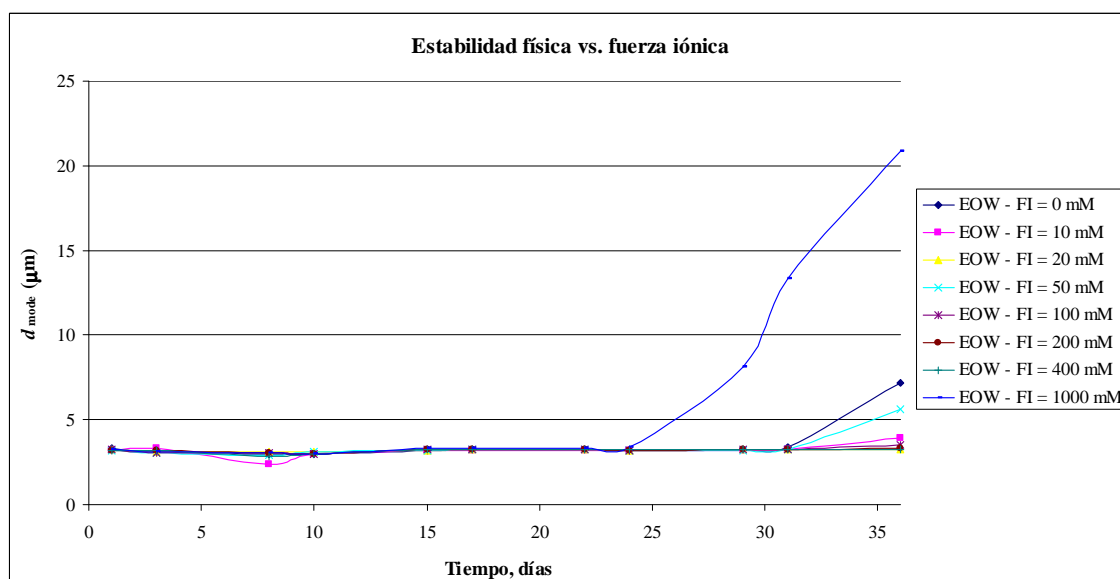
De acuerdo con la Figura 136, la emulsión Og/W óptima preparada mediante homogenización a alta velocidad fue estable los 31 primeros días, independientemente del pH de la emulsión. Durante ese tiempo, la moda de tamaños estuvo comprendida entre 3.00 y 3.25 μm y todas las emulsiones presentaron comportamientos similares; no fue hasta el día 36 cuando se empieza a observar comportamientos diferentes y los primeros signos de desestabilización física. El día 36, las emulsiones Og/W óptimas con pH comprendidos entre 3 y 7 experimentan un aumento del d_{mode} de entre un 12.8 % (pH = 3) y un 40.1 % (pH = 7), mientras que las emulsiones Og/W con los pH ácidos o básicos más extremos (2, 8 y 9) no presentaron una variación apreciable en su d_{mode} .

Figura 136. Evolución temporal de la moda de la distribución de tamaños de la emulsión Og/W óptima a distintos pH (entre 2 y 9).



En relación a la fuerza iónica, la Figura 137 muestra emulsiones Og/W estables durante los 24 primeros días, independientemente de la concentración de electrolitos de la emulsión. A partir del día 24, la emulsión con mayor concentración de NaCl (1000 mM) comienza a desestabilizarse físicamente y su d_{mode} aumenta hasta alcanzar una moda de tamaños el día 36 de 20.849 μm , tamaño que refleja un sistema claramente inestable. El resto de emulsiones Og/W permanecen estables durante unos días más, hasta el día 31, con un d_{mode} promedio de $3.262 \pm 0.057 \mu\text{m}$ pero, ya el día 36, se observa un aumento del d_{mode} de las emulsiones con una concentración de electrolitos más baja (0, 10 y 50 mM) que llega a alcanzar hasta las 2.13 veces el tamaño del día 31. Por tanto, en vista de los resultados, la fuerza iónica parece ejercer una mayor influencia que el pH sobre la estabilidad física de las emulsiones Og/W óptimas preparadas mediante homogenización a alta velocidad.

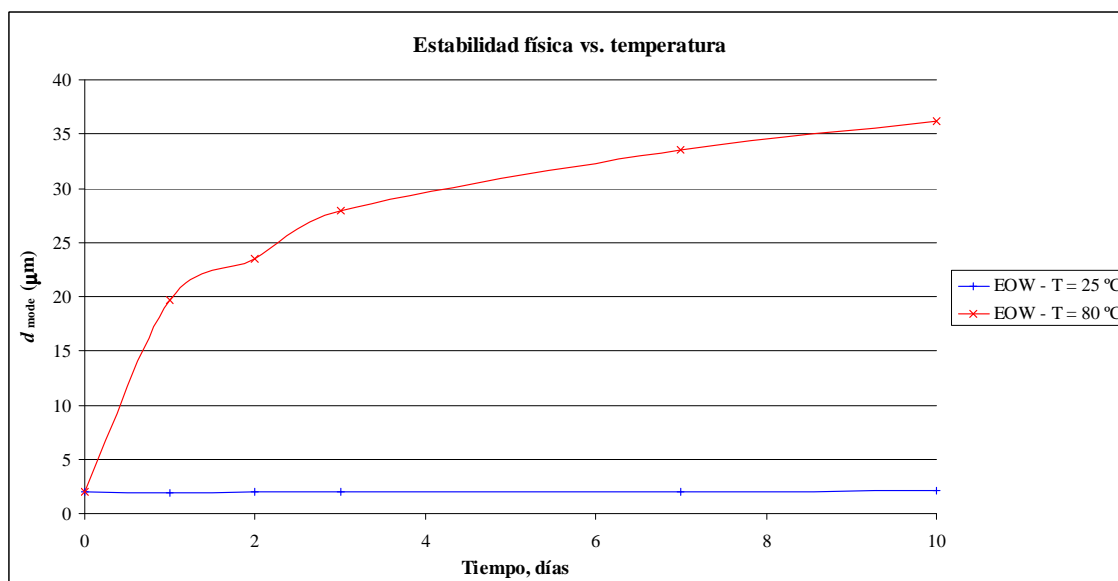
Figura 137. Evolución temporal de la moda de la distribución de tamaños de la emulsión Og/W óptima a diferentes concentraciones de electrolitos (de 0 a 1000 mM).



En efecto, el NaCl es un compuesto iónico que, al añadirse a la fase acuosa de una emulsión, sus cristales se descomponen en iones Na^+ y Cl^- . La adición de NaCl en cantidades moderadas mejora la repulsión electrostática de la XG en la emulsión. La interacción entre cargas iónicas disminuye el potencial zeta y aumenta la conductividad. Un alto valor absoluto de potencial zeta puede provocar una alta repulsión electrostática entre las gotas de fase dispersa, evitando así su agregación (Sriprabhom et al., 2019). Al mismo tiempo, la adición de NaCl también afecta a la estructura de los segmentos de la

cadena molecular de la XG, lo que produce que la estructura interfacial de las gotas de fase dispersa se reordene y dé lugar a una capa interfacial más apretada (Cai et al., 2020). Tan et al. (2017) también observaron resultados parecidos al aumentar la concentración de NaCl en emulsiones O/W. Por tanto, puede concluirse que la estabilidad física de una emulsión Og/W aumenta con el aumento (moderado) de la concentración de NaCl.

Figura 138. Evolución temporal de la moda de la distribución de tamaños de la emulsión Og/W óptima a dos temperaturas de almacenamiento diferentes (25 y 80 °C).



Finalmente, la Figura 138 representa la evolución de la moda de la distribución de tamaños, d_{mode} , de la emulsión Og/W óptima preparada mediante homogenización a alta velocidad, durante un total de 10 días, a dos temperaturas de almacenamiento diferentes: 25 y 80 °C. Según la Figura 138, la emulsión Og/W almacenada a 25 °C mantiene una moda de tamaños prácticamente constante durante los 10 días de estudio ($d_{\text{mode}} = 2.002 \pm 0.048 \mu\text{m}$), mientras que la emulsión Og/W almacenada a 80 °C presentó un aumento de su d_{mode} en tan solo 1 día a esa temperatura de 17.740 μm , llegando a alcanzar las 36.217 μm a los 10 días a 80 °C (18.3 veces mayor). Por tanto, se demuestra que la temperatura de almacenamiento es un parámetro fundamental para la estabilidad física de una emulsión Og/W: un aumento importante en la temperatura de almacenamiento puede causar la desnaturalización, el cambio de propiedades y/o la degradación de los compuestos responsables de estabilizar físicamente el sistema emulsionado, reducir la viscosidad del sistema, y todo ello favorecer la movilidad de las

gotas de fase dispersa y acelerar los mecanismos de desestabilización física (Sarkar et al., 2016).

4.3.6. Estudios de estabilidad de la curcumina vehiculizada con la luz y la temperatura

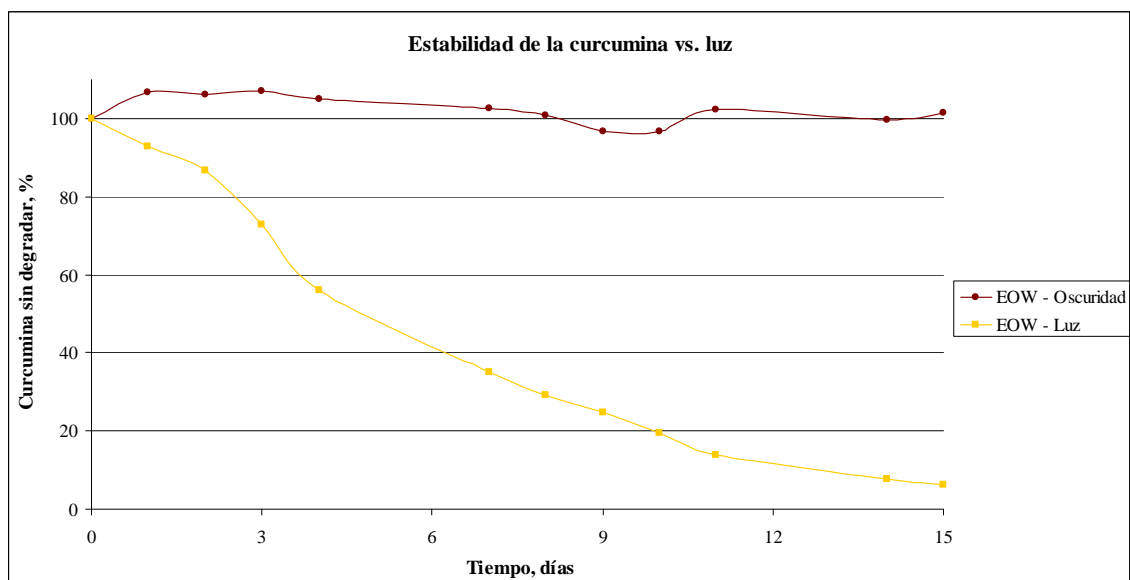
Además de estudiar la estabilidad de la emulsión Og/W óptima con el pH, la fuerza iónica o la temperatura, aspecto, sin duda, de gran importancia en el diseño y desarrollo de un sistema de liberación rico en PUFAs ω -3 y curcumina, también se debe tomar en consideración y analizar la estabilidad de los compuestos bioactivos en ella encapsulados, muchos de ellos altamente sensibles a multitud de condiciones ambientales que pueden llegar a alterarlos y/o degradarlos. Por ello, en este apartado se estudia el efecto de la luz y la temperatura de almacenamiento sobre la estabilidad de la curcumina incorporada en la emulsión Og/W óptima con el tiempo.

En primer lugar, para evaluar la susceptibilidad de la curcumina encapsulada en la emulsión Og/W óptima preparada mediante homogenización a alta velocidad (14.04 % p/p de fase dispersa, 5.0 % p/p de Tween 20, 0.49 % p/p de XG y 12000 rpm de velocidad de homogenización) a la degradación fotoquímica, se midieron las concentraciones de curcumina presentes tanto en una muestra almacenada en oscuridad, en condiciones de temperatura controladas y sin filtraciones de luz ambiental, como en otra muestra de la misma emulsión irradiada con dos lámparas halógenas de 18 W cada una de ellas, en las mismas condiciones anteriores, a lo largo del tiempo (durante un total de 15 días) y, a partir de ellas, se calcularon los porcentajes de retención de curcumina y se compararon los resultados. Estos datos se muestran en la Figura 139.

Según pone de manifiesto la Figura 139, la emulsión Og/W óptima almacenada en ausencia de luz es capaz de retener el 100 % de la curcumina encapsulada, lo cual indica que, en estas condiciones, ninguno de los restantes componentes de la emulsión interactúa con ella para degradarla. Sin embargo, la emulsión Og/W en presencia de luz experimenta una pérdida de curcumina muy importante de forma que, a los 15 días de su elaboración, solamente queda el 6.19 % de la curcumina inicial. Por tanto, queda

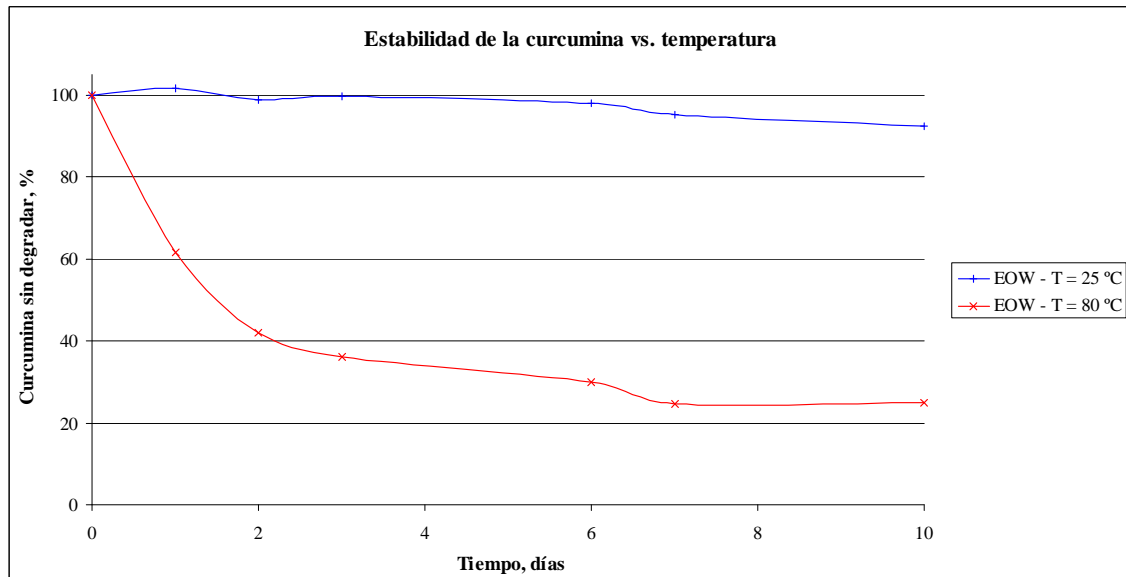
claro que la molécula de curcumina es fotosensible y la exposición a la luz visible es la que degrada la curcumina incorporada en la emulsión Og/W óptima y, por tanto, es uno de los factores determinantes para aumentar el porcentaje de retención de curcumina en el sistema. Y es que, como ya se ha comentado anteriormente, la degradación fotoquímica de la curcumina a través de luz visible ocurre mediante ROS producidas por la curcumina a través del estado triplete de ésta. Este procedimiento se da a través de la llamada transferencia fotogenerada al oxígeno molecular y transferencia energética a ROS (Albadalejo et al., 2015).

Figura 139. Porcentaje de curcumina encapsulada en la emulsión Og/W óptima con el tiempo en presencia y en ausencia de luz.



Por su parte, la temperatura de almacenamiento de una emulsión es otro de los factores que puede afectar a la estabilidad de la curcumina encapsulada (Kharat et al., 2017). Para estudiar la influencia de la temperatura de almacenamiento sobre el porcentaje de curcumina sin degradar en el sistema Og/W óptimo, éste se preparó y se almacenó tanto a temperatura ambiente (25 °C) como a alta temperatura (80 °C) durante 10 días y se fueron midiendo las concentraciones de curcumina presentes en cada uno de ellos con el tiempo y calculando los porcentajes de curcumina sin degradar. Los resultados se muestran en la Figura 140.

Figura 140. Porcentaje de curcumina encapsulada en la emulsión Og/W óptima con el tiempo a dos temperaturas de almacenamiento diferentes (25 y 80 °C).



Como se desprende de la Figura 140, la emulsión Og/W óptima almacenada a 25 °C es capaz de retener la mayor parte de la curcumina encapsulada, perdiendo solamente el 7.66 % de la curcumina inicial. Sin embargo, la emulsión Og/W almacenada a 80 °C experimenta una pérdida de curcumina bastante más importante de forma que, a los 10 días de su elaboración, solamente queda el 24.81 % de la curcumina inicial. Además, en esta última emulsión Og/W, prácticamente el 60 % de la curcumina se degrada durante los 2 primeros días de almacenamiento a 80 °C y, en los 8 días restantes, sólo se pierde el 17.15 % hasta alcanzar un porcentaje de retención de curcumina más o menos constante. Por tanto, estos datos permiten afirmar que la cantidad de curcumina restante tras 10 días de almacenamiento disminuye a medida que aumenta la temperatura de almacenamiento de las emulsiones Og/W. Así, estos resultados sugieren que es aconsejable almacenar las emulsiones Og/W cargadas con curcumina a temperaturas más bajas para aumentar la estabilidad fisicoquímica del compuesto bioactivo. Kharat et al. (2017) también investigaron el efecto de diferentes condiciones ambientales, la temperatura de almacenamiento entre ellas, sobre el porcentaje de retención de curcumina de emulsiones O/W con TCM como fase dispersa y Tween 80 como emulgente, obteniendo resultados muy similares a los aquí presentados.

4.3.7. Conclusiones

En este tercer capítulo se ha examinado el efecto de la composición –concentraciones de fase dispersa, emulgente hidrofílico y estabilizante– y las condiciones de operación –velocidad o presión de homogenización– del sistema emulsificado Og/W rico en PUFAs ω -3 y curcumina sobre su estabilidad física (tamaño de partícula) y oxidativa (tanto primaria como secundaria), así como sobre su capacidad para proteger y estabilizar en el tiempo curcumina vehiculizada.

Las curvas de distribución de tamaños de gota típicas para las emulsiones Og/W son trimodales, si bien es cierto que en las emulsiones preparadas mediante homogenización a alta presión los dos primeros picos se encuentran más o menos solapados dependiendo de la emulsión de que se trate. Además, a diferencia de las emulsiones Og/W preparadas a alta velocidad, a alta presión se observa un desplazamiento del segundo pico (el correspondiente a las gotas de fase dispersa) hacia tamaños menores (el máximo del segundo pico se reduce en aproximadamente 1 μ m) y un importante número de gotas con tamaños comprendidos entre 0.5 y 1 μ m. Por otro lado, también se aprecia un desplazamiento importante del tercer pico (el correspondiente a las gotas de gran tamaño como consecuencia del proceso de desestabilización física de la emulsión) hacia tamaños mucho más pequeños y un volumen de gotas grandes mucho más reducido. Estas distribuciones de tamaños de gota sugieren que, de forma general, el método de homogenización a alta presión proporciona gotas más pequeñas que el método de homogenización a alta velocidad y, por tanto, emulsiones Og/W más estables físicamente. En relación a la estabilidad oxidativa, las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad presentaron porcentajes de aumento de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos bastante superiores (6.95 % vs. 0.36 % de aumento de primarios y 20.45 % vs. – 99.58 % de aumento de secundarios) a los de las emulsiones Og/W a alta presión.

Las Tablas 43 y 44 recogen, para las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad y a alta presión respectivamente, qué variables fueron estadísticamente significativas sobre cada variable respuesta considerada: en color verde las que ejercieron un efecto positivo y en rojo las que ejercieron un efecto negativo.

Las variables de operación óptimas para minimizar simultáneamente el tamaño de partícula y la oxidación lipídica primaria y secundaria y, a su vez, maximizar la capacidad de retención de curcumina de la emulsión Og/W homogenizada a alta velocidad de cizalla son: 13.9 % p/p de fracción de fase dispersa, 5.0 % p/p de emulgente hidrofílico, 0.48 % p/p de estabilizante y 12000 rpm de velocidad de homogenización, obteniendo un tamaño medio de gota mínimo, un porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos del 47.7 y 173.0 %, respectivamente, y una capacidad de retención de curcumina del 100.0 %. Para el caso de las emulsiones Og/W homogenizadas a alta presión, el conjunto de condiciones óptimas son: 5.1 % p/p de fracción de fase dispersa, 5.0 % p/p de Tween 20, 0.49 % p/p de XG y 2000 psi de presión de homogenización, obteniendo un tamaño medio de gota de 11.143 μm , un porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos del 8.0 y -54.5 %, respectivamente, y una capacidad de retención de curcumina del 100.0 %.

Tabla 43. Variables estadísticamente significativas sobre cada variable respuesta considerada en la emulsión Og/W preparada a alta velocidad.

Fuente	$d_{[4.3]}$, μm	Aumento [H. lipídicos], %	[Compuestos aldehídicos], mg/L	Curcumina sin degradar, %
[Fase dispersa]	X	X	X	
[Emulgente]	X			
[Estabilizante]		X	X	
Velocidad	X	X		
[Fase dispersa] ²		X	X	
[Fase dispersa]*[Emulgente]		X		
[Fase dispersa]*[Estabilizante]				
[Fase dispersa]*Velocidad	X	X		
[Emulgente] ²		X		
[Emulgente]*[Estabilizante]				
[Emulgente]*Velocidad				
[Estabilizante] ²				
[Estabilizante]*Velocidad	X			
Velocidad ²	X	X		

Tabla 44. Variables estadísticamente significativas sobre cada variable respuesta considerada en la emulsión Og/W preparada a alta presión.

Fuente	$d_{[4,3]}$, μm	Aumento [H. lipídicos], %	[Compuestos aldehídicos], mg/L	Curcumina sin degradar, %
[Fase dispersa]	X	X		X
[Emulgente]				X
[Estabilizante]	X	X	X	
Presión	X			X
[Fase dispersa] ²	X			
[Fase dispersa]*[Emulgente]				
[Fase dispersa]*[Estabilizante]				
[Fase dispersa]*Presión	X			
[Emulgente] ²				
[Emulgente]*[Estabilizante]	X			
[Emulgente]*Presión				
[Estabilizante] ²			X	
[Estabilizante]*Presión				
Presión ²				

La curva de viscosidad obtenida para la emulsión Og/W óptima preparada mediante homogenización a alta velocidad muestra un comportamiento pseudoplástico, comportamiento característico de los materiales estructurados, y unos valores de viscosidad hasta 30 veces superiores a los del oleogel óptimo. Además, el espectro obtenido muestra un espectro mecánico típico de emulsiones altamente floculadas, en el que el módulo G' se encuentra siempre por encima del módulo G'' en todo el intervalo de frecuencias estudiado. Este comportamiento es representativo de un carácter predominantemente elástico.

Finalmente, con respecto a la estabilidad de la emulsión Og/W óptima preparada a alta velocidad frente a distintas condiciones ambientales que podrían afectarle, esta emulsión fue estable a pH muy ácidos o ligeramente básicos, con un contenido salino medio (entre 100 y 400 mM) y a temperaturas de almacenamiento bajas. La curcumina en ella vehiculizada se degrada de forma importante en presencia de luz o temperaturas elevadas, perdiéndose el 93.81 y el 75.19 % en 15 días y 10 días, respectivamente.

4.3.8. Publicaciones derivadas de la investigación

A continuación, se adjunta la publicación derivada de este trabajo de investigación:

Vellido-Perez José Antonio [Orcid ID: 0000-0002-1795-3268]
Ochando-Pulido J. M. [Orcid ID: 0000-0001-5564-7619]

Effect of operating parameters on the physical and chemical stability of oil gelled-in-water emulsified curcumin delivery system

Short Title: Effect of operating parameters on the stability of oil gelled-in-water curcumin-loaded emulsions

J.A. Vellido-Perez^{1*}, J.M. Ochando-Pulido², E. Brito-de la Fuente², A. Martínez-Pérez²

¹ Department of Chemical Engineering, Faculty of Sciences, University of Granada, Avenida Fuente Nueva s/n, 18071 Granada, Andalucía, Spain

² Innovation & Development Centers China & Germany Business Unit Parenteral Nutrition, Ketoanalogue & IV Fluids Pharmaceuticals & Devices Division, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Siemensstraße 27, D-81332 Bad Homburg, Germany

Abstract

Background: Curcumin is a natural antioxidant with important beneficial properties for health but its low bioavailability and sensitivity to many environmental agents limits its use in the food industry. Besides, some studies mention a potential synergistic effect with omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFAs), other bioactive compounds extremely unstable and

* Corresponding author at Department of Chemical Engineering, Faculty of Sciences, University of Granada, Avenida Fuente Nueva s/n, 18071 Granada, Andalucía, Spain.

Email addresses: javel@ugr.es (J.A. Vellido-Perez), jmo@ugr.es (J.M. Ochando-Pulido), eduardo.brito@fresenius-kabi.com (E. Brito-de la Fuente), amart@ugr.es (A. Martínez-Pérez).

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/jsfa.11330

This article is protected by copyright. All rights reserved

1 **Effect of operating parameters on the physical and**
2 **chemical stability of oil gelled-in-water emulsified**
3 **curcumin delivery system**

4 **Short Title:** Effect of operating parameters on the stability of oil gelled-in-
5 water curcumin-loaded emulsions

6
7 **J.A. Vellido-Perez^{2,*}, J.M. Ochando-Pulido¹, E. Brito-de la Fuente², A. Martinez-Ferez¹**

8 ¹ Department of Chemical Engineering, Faculty of Sciences, University of Granada, Avenue Fuente
9 Nueva s/n, 18071 Granada, Andalusia, Spain

10 ² Innovation & Development Centers China & Germany Business Unit Parenteral Nutrition,
11 Ketoanalogues & IV Fluids Pharmaceuticals & Devices Division, Fresenius Kabi Deutschland GmbH,
12 Siemensstraße 27,
13 D-61352 Bad Homburg, Germany

14

15 **Abstract**

16 *Background:* Curcumin is a natural antioxidant with important beneficial properties for health
17 but its low bioavailability and sensitivity to many environmental agents limits its use in the
18 food industry. Besides, some studies mention a potential synergistic effect with omega-3

* Corresponding author at: Department of Chemical Engineering, Faculty of Sciences, University of Granada, Avenue Fuente Nueva s/n, 18071 Granada, Andalusia, Spain.

Email addresses: javellido@ugr.es (J.A. Vellido-Perez), jmochandop@ugr.es (J.M. Ochando-Pulido), edmundobrito@fresenius-kabi.com (E. Brito-de la Fuente), amferez@ugr.es (A. Martinez-Ferez).

1 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFAs), other bioactive compounds extremely unstable and
2 susceptible to oxidation. A relatively novel strategy to avoid oxidation processes is to
3 transform liquid oils into three-dimensional structures by adding a gelling agent to form a
4 self-assembled network that can later be vectorized by incorporating it into other systems. The
5 aim of this research was to design and optimize an oil gelled-in-water curcumin-loaded
6 emulsion to maximize curcumin stability and minimize lipid oxidation in terms of some
7 critical operating parameters such as dispersed phase, emulsifier, and stabilizer
8 concentrations, and homogenization rate.

9 *Results:* The operating conditions that had a significant effect on the formulation were the
10 dispersed phase weight fraction affecting droplet size and total lipid oxidation,
11 homogenization conditions affecting droplet size and primary lipid oxidation, and emulsifier
12 concentration affecting droplet size (significance level = 95 %). The optimal formulation for
13 maximizing curcumin load and minimizing lipid oxidation in the oleogelified matrix was
14 140.4 g·kg⁻¹ dispersed phase, 50.0 g·kg⁻¹ emulsifier, 4.9 g·kg⁻¹ stabilizer, and 1016 xg.

15 *Conclusion:* The results obtained provide a valuable tool for the rational design and
16 development of oil gelled-in-water emulsions to stabilize and transport bioactive compounds
17 such as curcumin.

18 **Keywords:** Curcumin; Oleogel-based delivery systems; Emulsion-based delivery systems; Oil
19 gelled-in-water emulsions; ω -3 PUFAs

20

21 1. Introduction

22 Curcumin is a natural low-molecular-weight polyphenolic compound¹ mainly present in
23 the rhizome of *Curcuma longa* L. or turmeric. Over the past decade, curcumin has been the

1 subject of a multitude of investigations to verify its therapeutic potential²⁻⁴. Recently, numerous
2 modern scientific studies support a wide range of physiological effects and therapeutic
3 properties such as anti-inflammatory, antimicrobial, antiproliferative, anticarcinogenic,
4 antioxidant, hypoglycemic, hepatoprotective, thrombosuppressive, hypocholesterolemic,
5 cardiovascular, antiarthritic, etc.⁵⁻⁹. Therefore, curcumin is considered a “polypharmacological
6 agent” due to a large number of *in vitro* cellular effects, with review articles that list more than
7 100 different targets¹⁰⁻¹². After promising *in vitro* results, animal studies, and safe use as a
8 dietary agent for centuries, curcumin is currently being tested in hundreds of clinical trials¹³.

9 However, we must not lose sight of the fact that the curcumin molecule is predominantly
10 lipophilic (*n*-octanol-water partition coefficient equal to 3.29¹⁴) and quite sensitive to heat¹⁵,
11 light¹⁶, and physiological pH conditions¹⁷ or in the presence of metal ions¹⁸. Hence, as a
12 consequence of its poor water-solubility and high rate of degradation during storage, the use of
13 curcumin in food manufacturing is very limited. In addition to the aforementioned
14 physicochemical instability, curcumin presents a very low bioavailability¹⁹ due to its poor
15 intestinal absorption, rapid metabolism into inactive end-products –especially by
16 glucuronidation conjugation– within the gastrointestinal tract and swift elimination from the
17 body²⁰. All these factors seriously condition the use of curcumin in nutritional or clinical
18 applications²¹.

19 To overcome these important limitations, the scientific community studied the
20 incorporation of curcumin on other delivery vehicles that improve its bioavailability,
21 absorption, and stability. Good examples of it are the studies of Baglolle et al. (2005)²²
22 investigated the incorporation of curcumin in complexes composed of α -, β -, and γ -
23 cyclodextrin and their hydroxypropylated derivatives. The inclusion complexes formed showed
24 an important enhancement in the solubility of curcumin in water. Nevertheless, major research
25 efforts have been devoted to propose and develop distinct kinds of aqueous colloidal delivery

1 vehicles and non-aqueous systems for the improvement of encapsulation, preservation,
2 delivery, and bioavailability of hydrophobic bioactive compounds, including many lipid-based
3 systems, which will facilitate its application in the food and pharmaceutical industries, among
4 others. Some of the delivery systems studied were hydrogels²³, oleogels²⁴, nanoparticles²⁵,
5 micelles²⁶, liposomes²⁷ and emulsions²⁸. Each of them has certain advantages and disadvantages
6 depending on their structure, composition, and functional performance.

7 A relatively novel strategy is to transform liquid oils into three-dimensional structures by
8 adding a gelling agent to form a self-assembled network. In recent years, interest in gelled oils
9 has increased dramatically due to their great potential for improving food fat profile and their
10 effectiveness in modulating lipid digestion and delivering nutrients and bioactive compounds
11 in food matrices²⁹⁻³¹. For example, Li et al. (2019)³² studied β -sitosterol/lecithin-structured
12 curcumin-loaded oleogels as potential systems to release nutrients and drugs. The oleogel
13 exhibited a lower oxidation rate than bulk oil and a very significant improvement in the
14 bioaccessibility of curcumin was observed, making these delivery systems interesting
15 alternatives such as transporters and protectors of sensitive lipophilic bioactive compounds.
16 Indeed, we have previous studies in which we developed and optimized a physicochemically
17 stable curcumin-loaded oleogel²⁴. The oil phase chosen was a fish oil-enriched in
18 eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) and fully hydrogenated
19 rapeseed oil as the gelling agent. EPA and DHA are two very interesting omega-3
20 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFAs), whose bioactivity has been verified in countless
21 epidemiological studies. They are involved in visual and neurological/brain development and
22 maternal and child health. Moreover, they can promote human health and prevent the
23 development of certain diseases such as cancer, cardiovascular diseases, diabetes, Alzheimer's
24 disease, dementia, depression, and other mental illnesses³³. Furthermore, it has been found that
25 when combined with curcumin, they show synergistic anti-inflammatory and antioxidative

1 stress effects³⁴. However, these highly unsaturated bioactive lipids are quite unstable and
2 susceptible to chemical degradation, producing volatile compounds with unpleasant smells and
3 tastes, lower nutritional value, and relative toxicity^{35,36}. According to the authors' knowledge,
4 there are no previous studies available in the scientific literature on the transport of curcumin
5 together with ω -3 PUFAs by emulsions containing oil gelled.

6 On the other hand, food colloid researchers have highlighted the enormous potential of
7 emulsions to encapsulate, protect and transport interesting compounds –such as curcumin– and
8 enhance its stability and bioavailability by manipulating the compositions and structures of
9 these colloidal delivery systems, and because of this they are already widely utilized in the food
10 industry^{37,38}. Fundamentally, two main emulsion-based approaches have been considered to
11 deliver curcumin: *excipient emulsion systems* and *emulsion-based delivery systems*, of which we will
12 focus on the latter²¹. In *emulsion-based delivery systems*, the curcumin isolated from its original
13 environment is added to the oil phase as yet another ingredient in the emulsion. In this case,
14 curcumin dissolves in the oil phase before the formation of the emulsion. Preliminary evidence
15 suggests that *emulsion-based delivery systems* can be used to improve the intestinal bioavailability,
16 permeability, and resistance to metabolic processes of curcumin and other hydrophobic
17 bioactive compounds by altering their bioaccessibility, absorption or transformation in the
18 gastrointestinal tract^{39,21}. Furthermore, these colloidal delivery systems are usually inexpensive,
19 robust, and suitable for introduction into a food product without adversely altering their
20 physicochemical or sensory properties⁴⁰. In this context, *emulsion-based delivery systems* are
21 postulated as promising technology to meet this challenge.

22 In the present study, we have combined both delivery systems previously described to
23 encapsulate, protect, and transport curcumin and ω -3 PUFAs, trying to enhance its stability and
24 retention capacity and reduce oxidation processes. To this end we have prepared oil-in-water
25 emulsions in which the dispersed phase is not a liquid oil but an oleogel. We called these

1 systems “oil gelled-in-water emulsions” or “Og/W emulsions”. This research paper aims to
2 study the influence of four different variables –dispersed phase concentrations, emulsifier
3 concentrations, stabilizer concentrations, and homogenization rate– on the physical and
4 chemical stabilities of curcumin-loaded oil gelled-in-water emulsions. Finally, by using the
5 multi-response surface methodology (M-RSM), the emulsion formulation was optimized to
6 maximize the supplied curcumin load and minimize lipid oxidation of the oleogelified matrix.

7

8 **2. Experimental**

9 *2.1. Materials*

10 The dispersed phases were composed of: a) fish oil-enriched in ω -3 PUFAs (PronovaPure
11 oil containing 36.0 % EPA and 24.0 % DHA TG Deodorized, BASF, Ludwigshafen am Rhein,
12 Germany) as oil phase for the preparation of all oleogels and Og/W emulsions in this study; b)
13 fully hydrogenated rapeseed oil (Palsgaard® 6111 powder, Palsgaard, Juelsminde, Denmark) as
14 gelling agent; and c) curcumin powder (85 % purity) supplied by Solutex (Zaragoza, Spain).

15 The continuous phases were composed by: a) deionized water; b) potassium sorbate and
16 sodium benzoate as preservative agents to prevent the microbiological growth in the Og/W
17 emulsions; c) tween 20 as a hydrophilic emulsifier to stabilize Og/W emulsions (Merck); and d)
18 xanthan gum (XG) as a thickening agent (HELM Iberica, S.A.).

19 Other reagents used in this study for lipid oxidation and curcumin concentration
20 measurements were: ferrous sulphate heptahydrate, barium chloride dihydrate, hydrochloric
21 acid, and ammonium thiocyanate were, all purchased from PanReac AppliChem; cumene
22 hydroperoxide from Alfa Aesar; *p*-anisidine from Acros Organics and *trans,trans*-2,4-decadienal
23 was acquired from Sigma-Aldrich. All of them were used as reagents for measuring lipid
24 oxidation rates. Isooctane, 2-propanol, 1-butanol, and methanol were all bought from PanReac

1 AppliChem and acetic acid glacial from J.T. Baker™. All of them were used as solvents during
2 the measurements of the lipid oxidation rate. Ethanol was purchased from Guinama and was
3 used as the solvent during the measurements of the curcumin content. All the materials used
4 were of analytical grade without any purification or modification of their properties.

5 2.2. Methods

6 2.2.1. Preparation of oleogel

7 The procedures for oleogel preparation and optimization have been previously described
8 in Vellido-Pérez et al. (2019)²⁴. In short, previously weighed gelling agent and curcumin were
9 premixed for 2 min using a magnetic stirrer at 168 rad/s. Later, the mixture was heated to 66.5
10 °C as quickly as possible to minimize curcumin and fish oil exposure to heat. Heating was
11 performed in a bain-marie and under mild agitation (42 rad/s). Dispersion of curcumin was
12 then immediately cooled to 23 °C while being stirred using the magnetic stirrer at 168 rad/s for
13 3 min, resulting in the formation of oleogel. The oleogel composition used for the preparation of
14 all Og/W emulsions was optimal to minimize oxidation: gelling agent concentration equal to
15 46.483 g·kg⁻¹, curcumin concentration equal to 1.500 g·kg⁻¹, and manufacturing temperature
16 equal to 66.5 °C.

17 2.2.2. Preparation of oil gelled-in-water emulsions

18 All the Og/W emulsions in this study were prepared at room temperature (25 °C) and were
19 formulated with different oleogel (dispersed phase) concentrations (50 g·kg⁻¹, 100 g·kg⁻¹, and 150
20 g·kg⁻¹), emulsifier concentrations (10 g·kg⁻¹, 30 g·kg⁻¹, and 50 g·kg⁻¹), stabilizer concentrations (2.0
21 g·kg⁻¹, 3.5 g·kg⁻¹, and 5.0 g·kg⁻¹), and homogenization speed (254 xg, 572 xg, and 1016 xg)
22 according to the experimental design shown in Table A1. Accurately weighed emulsifier was
23 added to deionized water –containing 0.6 g·kg⁻¹ sodium benzoate and 0.6 g·kg⁻¹ potassium

1 sorbate to prevent the microbiological contamination of the Og/W emulsion– and the aqueous
2 solution was blended using a vortex for 30 s until completely dissolved. The oleogel detailed in
3 Section 2.2.1., was then added to the previous aqueous solution and the Og/W emulsion was
4 formed using a rotor-stator homogenizer (Ultra-Turrax® T 25, IKA, Germany) for 5 min at the
5 corresponding speed. Finally, the thickening agent was added to the previous Og/W emulsion,
6 being dispersed by soft homogenization for 3 min at 64 xg to form the final Og/W emulsion.
7 Lastly, Og/W emulsions (50 g) were placed immediately after manufacture in sealed screw cap
8 plastic tubes and stored in an oven at 25 °C for 30 days to monitor their stabilities.

9 2.2.3. Characterization of the different delivery systems

10 2.2.3.1. Droplet size measurements

11 Emulsion physical stability was determined by measuring the average droplet size
12 immediately after its formation and at day 30 after its manufacture. Droplet sizes and droplet
13 size distributions were measured by a Malvern Particle Size Analyser (Mastersizer 2000,
14 Malvern Instruments Ltd., UK) using the static light scattering methodology. The optical
15 parameters used for emulsions were a dispersed phase refractive index of 1.500 (experimentally
16 determined for fish oil), a dispersed phase absorption index of 0.01, and a continuous phase
17 refractive index of 1.33 (water refractive index). Emulsions were diluted in water continuously
18 recirculated to the measurement cell until it reached an obscuration of 10-20 %. Three
19 measurements were made for each emulsion and the mean value was taken as droplet volume
20 diameter, $d_{[4,3]}$, as is indicated in the Equation (1):

$$d_{[4,3]} = \frac{\sum_i n_i d_i^4}{\sum_i n_i d_i^3} \quad (1)$$

21 where n_i is the frequency of occurrence of particles in size class i , having a mean d_i diameter.

1 2.2.3.2. Lipid oxidation measurements

2 Oleogel and emulsion chemical stabilities were determined by measuring lipid oxidation
3 after its preparation and at day 30 after its manufacture. To this end, both primary and
4 secondary lipid oxidation products were measured.

5 The first ones were quantified by the peroxide value method (PV) using the colorimetric
6 ferric-thiocyanate method, adapted from Shantha and Decker⁴¹. First, 0.1 mL of the emulsion –
7 or 10 µL in the case of the oleogel– were taken and added to 1 mL of isooctane/2-propanol (3:1,
8 v/v) solution, vortexed (3 times, 10 s) and the resulting mixture was centrifuged at 12521 xg for
9 10 min. Afterwards, 0.2 mL of the clear upper solvent layer were taken and mixed with a 2.8 mL
10 of methanol/1-butanol (2:1, v/v) solution and 30 µL of ferrous thiocyanate solution and vortexed
11 for a few s. The ferrous thiocyanate solution was obtained by mixing 15 µL of 0.072 M ferrous
12 chloride solution with 15 µL of 3.94 M ammonium thiocyanate solution. The ferrous chloride
13 solution was prepared from the supernatant of a mixture of 25 mL of 0.144 M ferrous sulphate
14 solution and 25 mL of barium chloride solution (0.132 M BaCl₂ in 0.4 M HCl). The reaction tubes
15 were kept in a dark room for 20 min at 25 °C. During this time, the lipid hydroperoxides in the
16 sample would react with the ferrous ion, oxidizing it to ferric ion. Ferric thiocyanate is a red-
17 violet complex that absorbs at a wavelength of 500 nm to 510 nm. Therefore, after 20 min, the
18 absorbance values of samples were measured at a wavelength of 510 nm using a
19 spectrophotometer (Spectronic Helios Gamma UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Fisher
20 Scientific, UK). To quantify the lipid hydroperoxides, a calibration curve was made with
21 cumene hydroperoxide. The slope of the calibration curve was used for calculating
22 hydroperoxide concentration in each sample. The final result was expressed as the molar ratio
23 between the increase in lipid hydroperoxides 30 days after their manufacture and the quantity
24 initially present, according to Equation (2):

$$\% PV = \frac{[Lipid Hydroperoxides]_{Day 30} - [Lipid Hydroperoxides]_{Day 0}}{[Lipid Hydroperoxides]_{Day 0}} \times 100 \quad (2)$$

1 The secondary lipid oxidation products were quantified by using the *p*-anisidine value
2 method (*p*-AnV), described in the American Oil Chemical Society (AOCS) CD 18-90 (1998)⁴².
3 This technique is based on the reaction of the unsaturated aldehydes with the *p*-anisidine,
4 resulting in the formation of a yellowish product that absorbs at 350 nm. For this, 1 mL of the
5 emulsion –or 100 µL in the case of the oleogel– was taken and mixed with 10 mL isooctane as
6 the solvent and vortexed 3 times for 10 s. This mixture was centrifuged at 6662 xg for 20 min.
7 Afterwards, 5 mL of the clear upper solvent layer were taken and added to 1 mL of 0.020 M *p*-
8 anisidine solution (made by mixing *p*-anisidine in acetic acid). The reaction tubes were kept in a
9 dark room for 10 min at 25 °C. After 10 min, the absorbance of samples was measured at a
10 wavelength of 350 nm. To quantify the secondary lipid oxidation products, a calibration curve
11 was made with *trans,trans*-2,4-decadienal. This pattern was used because it is a major
12 decomposition product from sunflower oil oxidation. The slope of the calibration curve was
13 used for calculating secondary lipid oxidation product concentration in each sample. The final
14 result was expressed as the molar ratio between the increase in secondary lipid oxidation
15 products 30 days after their manufacture and the quantity initially present, according to
16 Equation (3):

$$\% p - AnV = \frac{[Unsaturated Aldehydes]_{Day 30} - [Unsaturated Aldehydes]_{Day 0}}{[Unsaturated Aldehydes]_{Day 0}} \times 100 \quad (3)$$

17 2.2.3.3. Curcumin concentration measurements

18 Firstly, an amount of 2 µL of the curcumin-loaded Og/W emulsion was added to 1 mL of
19 ethanol and vortexed for 30 s. The incorporated curcumin concentration was determined by
20 ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)

1 technique. The UPLC-MS/MS analysis was carried out in positive ion ESI mode on a Waters
2 Xevo TQ-S Triple Quadrupole Mass Spectrometer connected to a Waters Acquity UPLC H-
3 Class System (Waters Corporation, USA). The analysis was conducted on a Waters Acquity
4 UPLC BEH C18 130Å column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) with a target column temperature of
5 40.0 °C. The mobile phase consisted of 13 mM ammonium fluoride solution and 1.0 g·kg⁻¹
6 ammonia (A) and acetonitrile (B) pumped at a constant flow rate of 0.300 mL/min. The gradient
7 elution program was as follows: 0–0.50 min, 95.0 % A; 0.50–1.50 min, 95.0–5.0 % A; 1.50–
8 5.00 min, 5.0 % A; 5.00–5.10 min, 5.0–95.0 % A; and 5.10–7.00 min, 95.0 % A. Other MS
9 conditions were also optimized and set as follows: nebulizer gas flow, 7.00 bar; desolvation gas
10 flow, 800 L/h (nitrogen was used as the drying gas); capillary voltage, 2.50 kV; source
11 temperature, 150 °C; and desolvation temperature, 500 °C. The analyte was quantified using
12 selected ion reaction monitoring (SRM). The ion transitions *m/z* 369.29→116.95, *m/z*
13 369.29→144.98, *m/z* 369.29→176.99, and *m/z* 369.29→285.22 were used for the determination of
14 curcumin. The injection volume set on the Waters Acquity FTN AutoSampler was 5.00 μL.

15 The maintenance of drug content (DC) in the curcumin-loaded Og/W emulsion was
16 determined as the molar ratio between the amount of curcumin present in the emulsion 30 days
17 after their manufacture and the quantity initially incorporated into the emulsion, according to
18 Equation (4):

$$\% DC = \frac{[\text{Curcumin}]_{\text{Day 30}}}{[\text{Curcumin}]_{\text{Day 0}}} \times 100 \quad (4)$$

19 2.2.4. Statistical analysis, experimental design and optimization

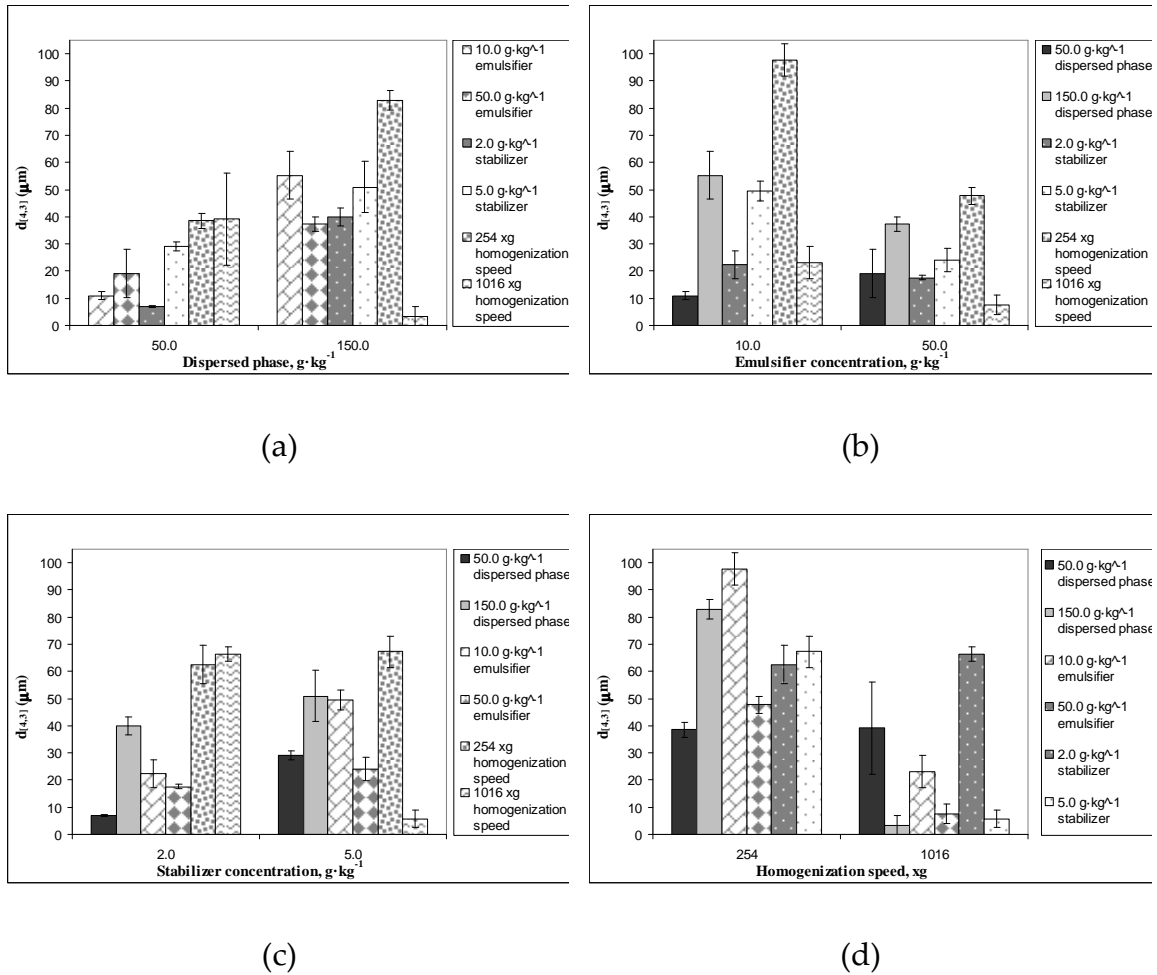
20 Both the Og/W emulsion formulation and the manufacturing conditions were optimized
21 by a statistical experimental design in combination with an analysis of the multi-response
22 surface. In this study, the dispersed phase percentage, the emulsifier and stabilizer

1 concentrations, and the homogenization speed were chosen as independent variables. On the
2 other hand, the droplet size, the oxidation degree of the O_g/W emulsion and the maintenance of
3 curcumin content were selected as response variables. The ranges tested for the selected
4 variables were indicated previously (Section 2.2.2.). Analysis of variance (ANOVA) was carried
5 out to determine any significant differences (p -value < 0.05) among the operating parameters
6 studied. The significance level used was 95 %.

7 A Box-Behnken design (BBD) was applied to simultaneously calculate the effect of the
8 change in each of these variables and also their possible interactions. Five repetitions of the
9 central point were included to verify the reproducibility of the model, resulting in a total of 29
10 experiments (which can be seen in table A1 together with the obtained values of the response
11 variables). Finally, the optimization was carried out with the software '*Statgraphics Centurion*
12 *XV*' and the results were interpreted using the multi-response surface methodology (M-RSM).

1 **3. Results and Discussion**

2 **3.1. Physical stability of Og/W emulsions**



3 **Figure 1.** Average droplet size of Og/W emulsions 30 days after their manufacture as a function
 4 of: (a) dispersed phase percentage, (b) emulsifier concentration, (c) stabilizer concentration, and
 5 (d) homogenization speed.

6 Figure 1 represents the average droplet size of Og/W emulsions 30 days after their
 7 manufacture as a function of the different studied variables. Each of the bars represents the
 8 $d_{[4,3]}$ at a certain value of two of these variables indicated in the graph. The other two variables,
 9 whose values are not indicated, take the tested medium values: 100 g·kg⁻¹ dispersed phase, 30

1 g·kg⁻¹ emulsifier, 3.5 g·kg⁻¹ stabilizer, and 572 xg homogenization speed. According to ANOVA
2 testing, the amount of dispersed phase (p -value = 0.0208), emulsifier concentration (p -value =
3 0.0473) and homogenization rate (p -value = 0.0001) were the variables that significantly
4 influenced droplet size. Indeed, regardless of the concentration of emulsifier or stabilizer used
5 (Fig. 1a), the average droplet sizes when 50 g·kg⁻¹ dispersed phase was used were between $7.0 \pm$
6 0.3 and $29.1 \pm 11.1 \mu\text{m}$ in the worst case; however, when the dispersed phase was increased to
7 150 g·kg⁻¹, the sizes increased to values of $37.4 \pm 2.9 \mu\text{m}$ or greater. Therefore, these data suggest
8 that the smaller the amount of dispersed phase, the smaller the final droplet size of the
9 emulsion, which has influence on the surface exposed to oxidation and thus on chemical
10 stability (point studied in more detail in Section 3.2.).

11 Regarding the emulsifier concentration, Figure 1b shows how higher concentrations of
12 emulsifier (in our case, 50 g·kg⁻¹) lead to smaller average droplet sizes, which in some cases
13 represent 78.8 % but can reach 33.3 % of the droplet size of the equivalent emulsion when
14 smaller emulsifier concentrations (10 g·kg⁻¹) were used. This translates into greater physical
15 stability of the O_g/W emulsions over time at higher emulsifier concentrations. This result agrees
16 with previous studies in which the physical stability of emulsions depends largely on the
17 thickness of the interfacial area and electrostatic charge, which in turn is determined by the type
18 and concentration of the emulsifier used: the emulsifier must be present in sufficient quantities
19 to completely cover the droplet surfaces^{43,44}. In our case, the emulsifier used is a non-ionic
20 emulsifier that stabilizes oleogel droplets by exerting a steric hindrance due to the
21 polyoxyethylene chains. Therefore, a higher emulsifier concentration would be expected to
22 produce a greater coating of the oleogel droplets and a greater interfacial thickness, preventing
23 the droplets from approaching each other and, consequently, reducing physical destabilization
24 mechanisms such as flocculation, coalescence or Ostwald ripening^{43,44}. These results are in line
25 with the study developed by Kowalska et al. (2017)⁴⁵ in which the long-term stability of six rose

1 oil emulsions with different amounts of emulsifier was studied. They concluded that higher
2 emulsifier amounts lead to stable particle size distributions. However, this was not verified at
3 50 g·kg⁻¹ dispersed phase where droplet size increased from 11.0 ± 1.7 to 19.2 ± 5.8 μm when we
4 increased the emulsifier concentration from 10 g·kg⁻¹ to 50 g·kg⁻¹ because the droplets could be
5 covered with smaller emulsifier concentrations. In this case, adding a higher amount of
6 emulsifier than necessary, will produce an excess that will dissolve in the aqueous phase,
7 providing slightly bigger sizes. For its part, Ma et al. (2018)⁴⁶ studied the impact of the
8 emulsifier type and surfactant-to-oil ratios on curcumin nanoemulsions and they concluded
9 that reduced surfactant-to-oil ratio values were found to appropriately improve the physical
10 stability of nanoemulsions.

11 On the other hand, the addition of XG as a stabilizer is essential for obtaining physically
12 stable emulsions over time. The purpose of these types of polysaccharides is to increase the
13 viscosity of the continuous phase, reduce the Brownian motion between the dispersed droplets
14 and thus maintain stable emulsified components for longer periods^{47,48}. However, despite being
15 a key ingredient in the emulsion's physical stability, the concentration in which it is found may
16 or may not favor its stability. Many authors have already reported that above a certain XG
17 concentration the creaming of O/W emulsions due to flocculation depletion has shown an
18 increase^{47,48}. This is what we can see in Figures 1a and 1b where, by increasing the concentration
19 of the thickener from 2.0 g·kg⁻¹ to 5.0 g·kg⁻¹, we obtained Og/W emulsions with droplet sizes up
20 to 3.15 times larger. The explanation for this is that at low XG concentrations, thanks to the
21 stabilizing, thickening, and gelling properties, they physically stabilize emulsions by increasing
22 viscosity and yielding stress. However, at sufficiently high concentrations aggregates can be
23 formed. This agrees with what was observed by Viana et al. (2018)⁴⁹, who evaluated the stability
24 of vitamin D-enriched pecan oil emulsions. They found that smaller XG concentrations (0.3-3.0
25 g·kg⁻¹) significantly decreased the droplet size of omega-3 vegetable oil emulsions, using this

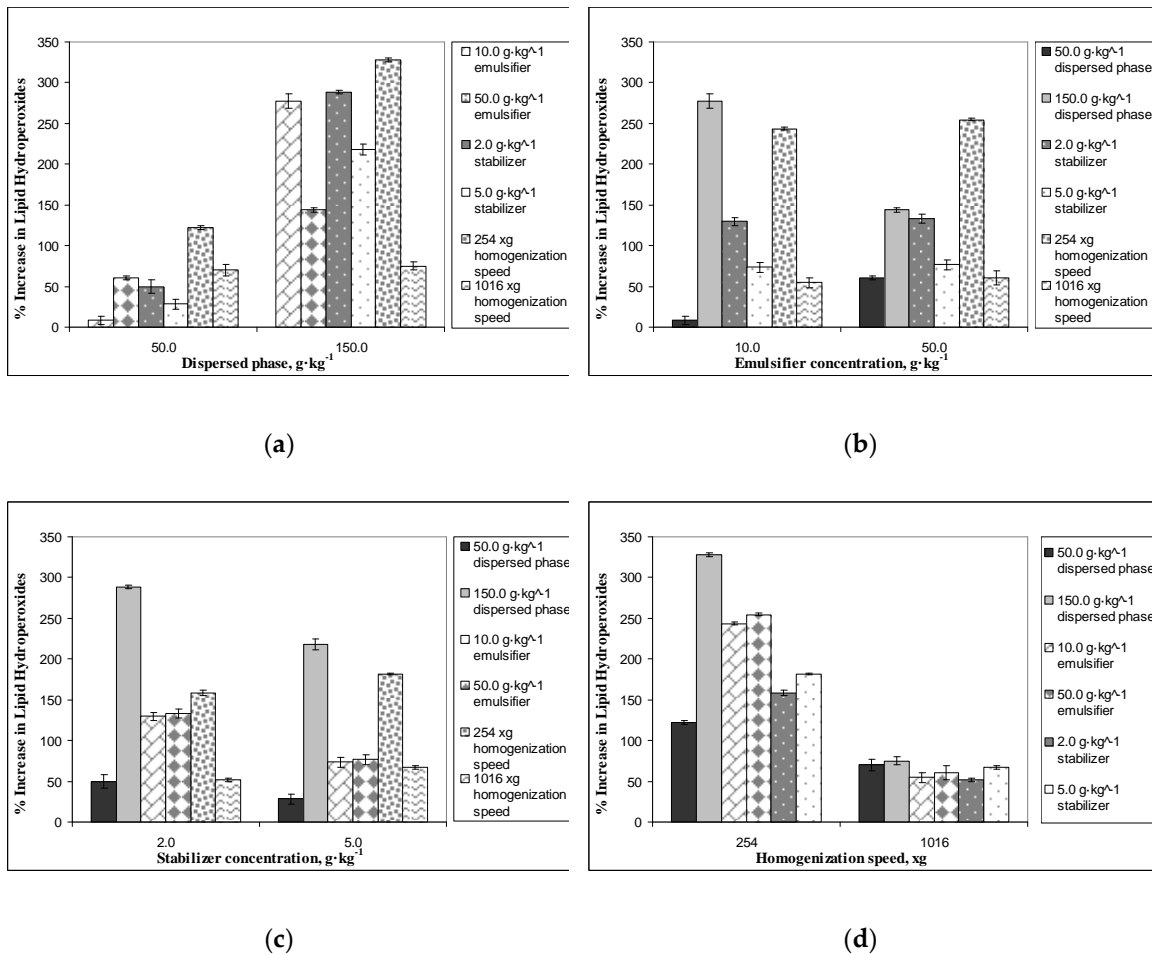
1 polysaccharide as the sole emulsifier. However, cream formation was observed probably due to
2 the very low concentrations.

3 Figure 1d also shows the huge impact that homogenization speed has on droplet size: it
4 states, an increase in the homogenization rate from 254 to 1016 xg led to a drastic reduction in
5 droplet size from 97.6 ± 6.6 to 23.0 ± 6.5 μm at $10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ emulsifier or from 47.7 ± 3.5 to 7.7 ± 3.9
6 μm at $50 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$. The reason for this is that the oleogel droplets decrease in size as a consequence
7 of the hydrodynamic shear stress generated by turbulent flow, which increases with the cube of
8 the homogenization speed⁵⁰. Furthermore, any contribution of energy made to a system leads to
9 dissipation, in this case through heat. Thanks to the increased temperature, the oleogel viscosity
10 decreases significantly and this greatly facilitates their size reduction. These results are in line
11 with those obtained by Scholz & Keck (2015)⁵⁰, who studied the droplet size and size
12 distribution of nanoemulsions obtained by a high-speed stirrer as a function of stirring speed
13 and production time.

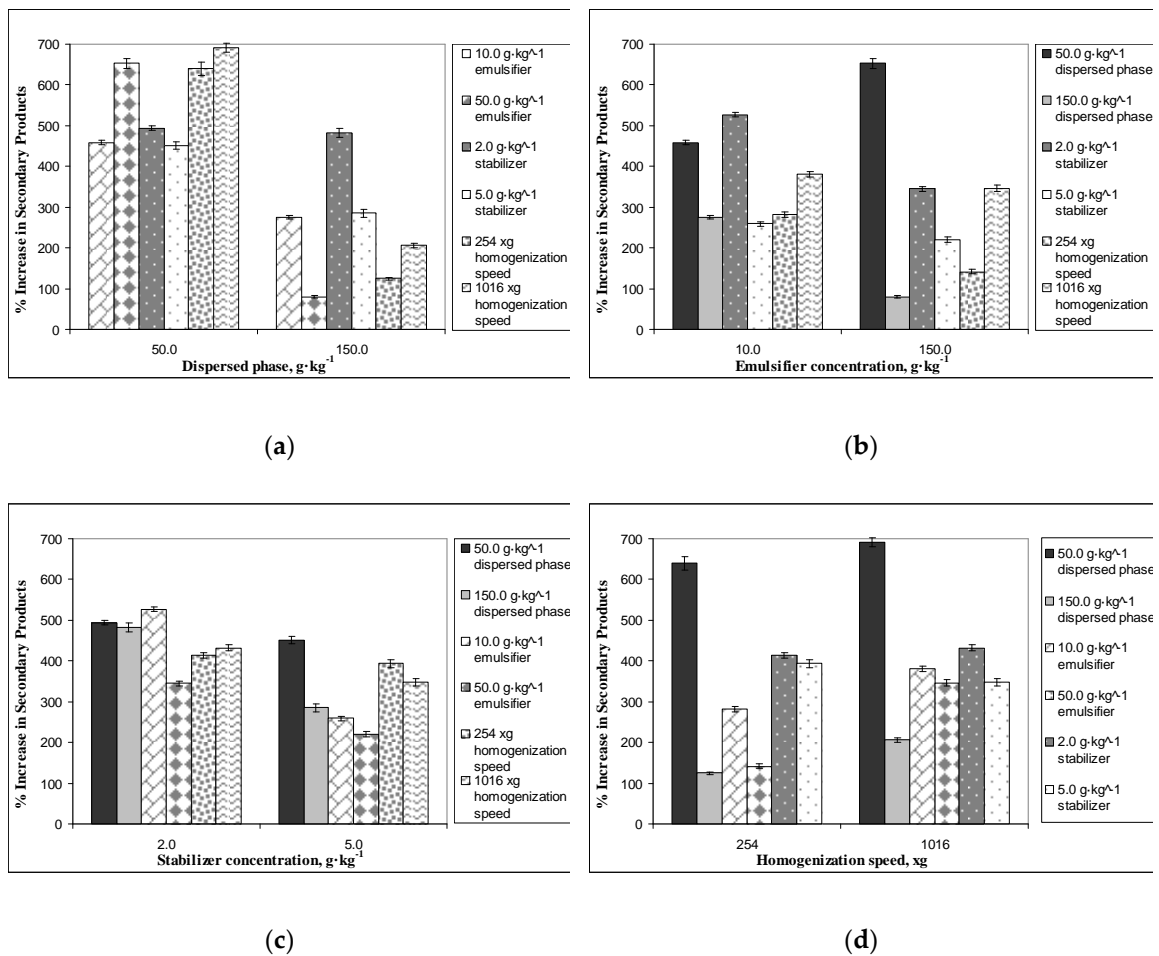
14 3.2. *Oxidative stability of Og/W emulsions*

15 Lipid oxidation in Og/W emulsions is a complex process, depending on many factors
16 including the type and concentration of the dispersed phase as well as the emulsifier and
17 stabilizer, presence of compounds with antioxidant or pro-oxidant properties together with
18 non-adsorbed ingredients in either of the phases, homogenization method, surface area, charge
19 of the droplets, and pH⁵¹. To better understand the role of some of these factors, different values
20 for the dispersed phase percentage, emulsifier and stabilizer concentrations, and
21 homogenization speeds were tested. Of them, the dispersed phase percentage was the only
22 parameter that turned out to be statistically significant in both primary and secondary lipid
23 oxidation (p -value < 0.05); the homogenization rate was only statistically significant in primary
24 lipid oxidation (p -value < 0.05) and the rest of the factors were not statistically significant with a

1 significance level of 95 %. The results can be seen in Figures 2 and 3. Each of the bars represents
 2 the percentage of PV or p-AnV, respectively, at a certain value of two of these variables
 3 indicated in the graph. The other two variables (with no stated values) take the previously
 4 indicated tested medium values.



5 **Figure 2.** Primary lipid oxidation of O/W emulsions 30 days after their manufacture as a
 6 function of: (a) dispersed phase percentage, (b) emulsifier concentration, (c) stabilizer
 7 concentration, and (d) homogenization speed.



1 **Figure 3.** Secondary lipid oxidation of O/W emulsions 30 days after their manufacture as a
 2 function of: (a) dispersed phase percentage, (b) emulsifier concentration, (c) stabilizer
 3 concentration, and (d) homogenization speed.

4 According to scientific literature, one of the most important factors to affect oxidative
 5 stability of emulsions is oil concentration⁵². Indeed, Figure 2a demonstrates that by reducing
 6 dispersed phase quantities from 150 g·kg⁻¹ to 50 g·kg⁻¹, primary lipid oxidation can be reduced
 7 from 75.4 ± 4.5 to 70.2 ± 7.2 % of lipid hydroperoxides increase (at 1016 xg, where the reduction
 8 of primary lipid oxidation products was lower) to reductions from 277.4 ± 8.9 to 8.4 ± 5.1 % in
 9 the case of the largest reduction (at 10 g·kg⁻¹ emulsifier). This shows that, among the different
 10 ingredients making up the emulsion, the dispersed phase is the only one susceptible to
 11 oxidative processes leading to product degradation. Therefore, we must especially focus on this

1 dispersed phase to achieve a chemically stable emulsion. Let us remember that the dispersed
2 phase used was an oleogel composed of fish oil enriched in ω -3 PUFAs. This corroborates the
3 tendency of these types of polyunsaturated compounds to undergo oxidative processes as a
4 consequence of the molecule unsaturations, thus making them extremely reactive compounds.
5 However, observing the data corresponding to secondary oxidation collected in Figure 3, we
6 found that the emulsions that showed less primary oxidation (those corresponding to a lesser
7 dispersed phase amount), are those now exhibiting a greater secondary oxidation percentage.
8 The one that showed an increase 2.77 times greater than its initial quantity in primary products,
9 now shows 2.75 times more secondary products than the initial one, while the one that showed
10 8.4 ± 5.1 %, now produces 4.59 times more in secondary products. According to scientific
11 literature, it is lipid hydroperoxides that give rise to secondary oxidation, so this transformation
12 could also explain the lower percentage of one versus the greater of the other⁵³. From the
13 previous explanation and bearing in mind that oxidative processes are chain reactions in which
14 a series of products are formed from others that previously occurred, it is evidently impossible
15 to analyze one or the other separately. They should be analyzed together.

16 Another important variable to consider in the study of the oxidative stability of emulsions
17 is the thickener concentration. Figures 2 and 3 show the distinct decrease of peroxide and *p*-
18 anisidine values for emulsions with $5.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of XG, in line with those observed previously⁵⁴.
19 The ability of XG to delay lipid oxidation could be mainly attributed to the fact that XG
20 increases the viscosity of the continuous phase, which could result in hindering oxygen
21 diffusion and oxidizing species to the oil droplet surface area and, therefore, the lipid oxidation
22 rate could be reduced. Also, these results agree with those of Chen et al. (2016)⁵⁵, who reported
23 that although XG are highly hydrophilic molecules with little inherent surface activity, they can
24 be partially adsorbed to the surfaces of the oil droplets through interactions with the emulsifier.
25 As a result, the packing of the emulsifier molecules at the emulsion interface could be tighter, so

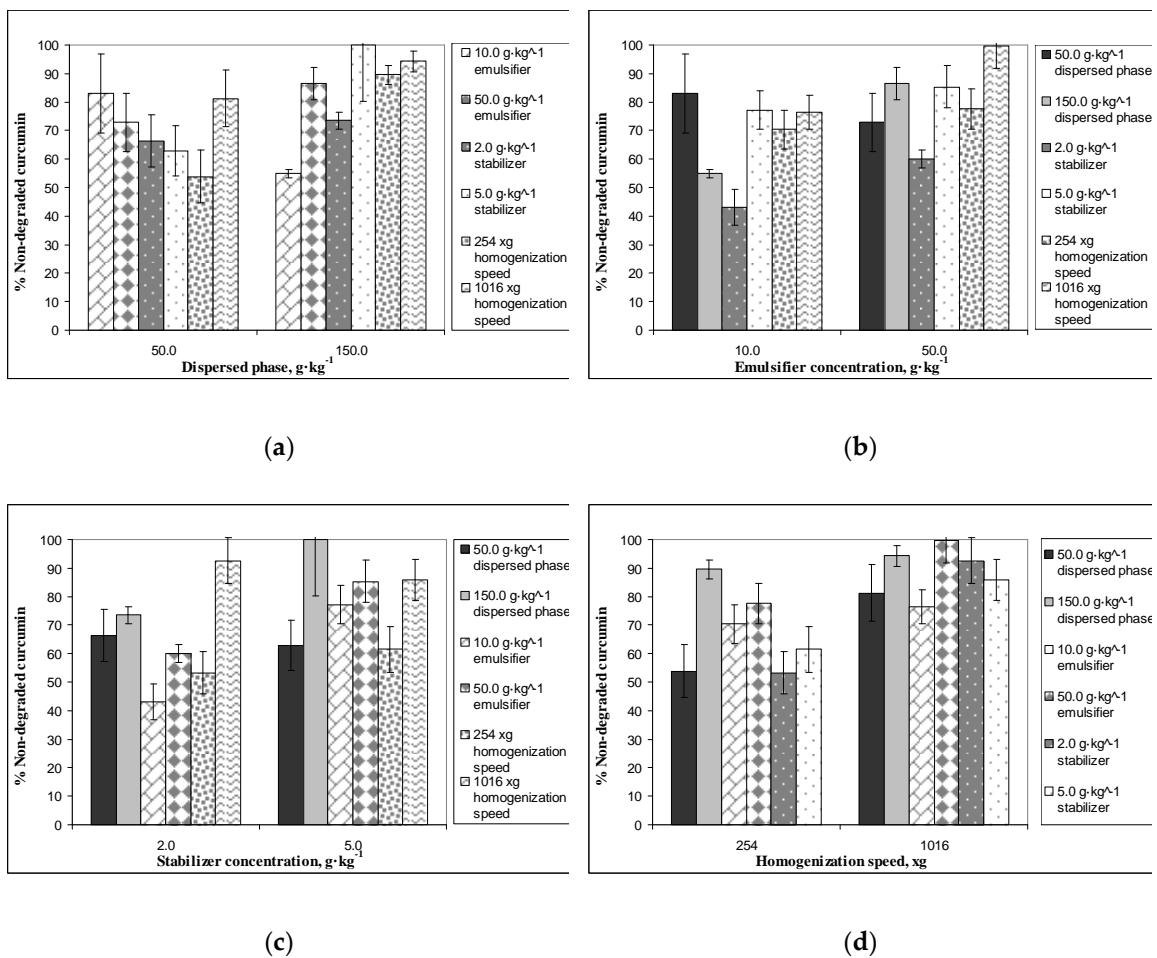
1 that the membrane could serve as a valid barrier to restrict the lipid oxidation initiators into oil
2 droplets to some extent. Finally, Shimada et al. (1992)⁵⁶ reported that XG can be used as an
3 emulsion's stabilizer to strongly inhibit the peroxidation of soybean oil in the emulsion system.

4 Lipid oxidation has been carefully studied over the last decades^{35,57-60}. Most published
5 works agree on the fact that oxidative processes take place at the interface of the system, that is,
6 on the contact surface between the oil and aqueous phases^{61,62}. This seems to contradict the
7 results obtained in Figure 2, where higher primary oxidation can be observed the lower the
8 homogenization rate. Lower homogenization speeds imply larger droplet sizes and
9 consequently less average surface area; for example, in our case we attained 1839 μm^2 /droplet at
10 1016 xg to 13718 μm^2 /droplet at 254 xg. Moreover, during the homogenization process, due to
11 friction and shear, there is momentary heating of the product being emulsified, and this
12 temperature increase should accelerate oxidation reactions. Said heat generation will be greater
13 the higher the homogenization speed. However, if we look at the corresponding bars in Figure
14 3, we observe that secondary oxidation was generally greater at higher oxidation rates.

15 Finally, the type and concentration of the emulsifier used have been shown to influence
16 both the physical and chemical stability of O_g/W emulsions⁴⁴. Although the emulsifier
17 concentration does not seem to influence the primary oxidation rate too much –in Figures 2b
18 there is a slight difference of 11 % when different emulsifier concentrations were used–, it did
19 however show a much more significant effect on the secondary oxidation rate. Figures 3b and
20 3c show how the lower emulsifier and thickener concentrations produced an increase more than
21 5 times greater in secondary products compared to a less than 3.5 times increase observed when
22 incrementing emulsifier concentration to 50 g·kg⁻¹. We have already mentioned in the previous
23 section that emulsifier concentration had quite an important impact on droplet size. A decrease
24 in droplet size leads to a significant increase in droplet surface area, which could be the main
25 reason for the decreased oxidative stability of emulsions. There are however, conflicting studies

1 supporting and disagreeing this theory, as extensively reviewed by Berton-Carabin et al.
 2 (2014)⁵¹. On the other hand, it is important to note that the amount of emulsifier is related to
 3 steric hindrance and the thickness of the interfacial layer, so it seems logical to deduce that the
 4 greater the amount of emulsifier, the greater the interface that oxygen will have to pass through
 5 to produce oxidation.

6 3.3. Maintenance of curcumin content in Og/W emulsions



7 **Figure 4.** Maintenance of drug content in Og/W emulsions 30 days after their manufacture as a
 8 function of: (a) dispersed phase percentage, (b) emulsifier concentration, (c) stabilizer
 9 concentration, and (d) homogenization speed.

1 In curcumin-loaded emulsions, the total curcumin content that can be incorporated into the
2 delivery system is determined by its oil solubility and the concentration of oil droplets⁶³. The
3 dispersion of curcumin into the oil phase has been extensively studied in many publications. It
4 basically depends on the type of carrier oil and dissolution conditions (temperature, time, etc.).
5 In our case, the type of carrier phase and dissolution conditions used were always the same:
6 increasing the curcumin loading capacity by replacing the liquid oil with an oleogel, which has
7 a greater ability to trap bioactive compounds. Therefore, oil droplet concentration directly
8 related to the amount of dispersed phase is another of the fundamental factors in determining
9 the curcumin incorporation efficiency. As shown in Figure 4a, generally a higher percentage of
10 dispersed phase implies a higher curcumin loading percentage one month after its manufacture.
11 However, please note that this is not always true, the opposite being the case at low emulsifier
12 concentrations (Fig. 4b) where the curcumin loading percentage went from 83.1 % with 50 g·kg⁻¹
13 of the dispersed phase, to 55.0 % when increasing the percentage of dispersed phase to 150 g·kg⁻¹.
14 ¹. As reported in scientific literature, curcumin is usually located within the hydrophobic core of
15 the oleogel droplets. Within the core, curcumin is safe from possible hydrophilic species (such
16 as hydroxyl ions) present in the aqueous phase which could cause its chemical degradation).
17 However, as a consequence of the polar groups and homogenization process itself on the
18 curcumin, some of them may also be found close to the oleogel-water interface where the
19 emulsifier is present⁶³. Artiga-Artigas et al. (2018)⁶⁴ assessed the impact of emulsifier nature and
20 concentration on curcumin-loaded nanoemulsions' stability and evaluated their encapsulation
21 efficiency. They found the highest initial time encapsulation efficiency values in nanoemulsions
22 containing Tween 20, with results even more effective at low emulsifier concentrations. This is
23 consistent with the results obtained here and reported in Figure 4a using a 50 g·kg⁻¹ dispersed
24 phase: in this case, the curcumin retained percentage was 83.1 % for 10 g·kg⁻¹ emulsifier
25 compared to 72.9 % retained using 50 g·kg⁻¹ emulsifier. However, at higher percentages of the

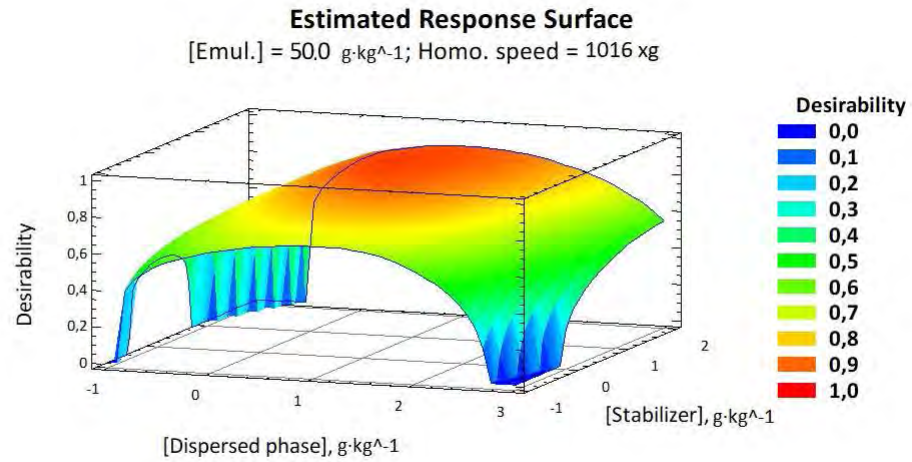
1 dispersed phase, this trend is probably not verified due to the insufficient amount of emulsifier
2 to completely coat the oleogel droplets, causing the system to destabilize over time. In that case,
3 curcumin may be exposed to light and oxidation reactions thus leading to degradation.

4 The homogenization speed is another parameter to consider in the study of curcumin
5 incorporation efficiency. As shown in Figure 4d, a higher homogenization rate implies a higher
6 amount of curcumin retained in the emulsion over time, reaching percentages of up to 99.6 % at
7 1016 xg compared to a maximum of 89.5 % reached when the homogenization speed was 254
8 xg. The homogenization rate is directly related to droplet size and this, in turn, to the
9 emulsion's viscosity. Wang et al. (2008)⁶⁵ noted that the emulsion viscosity increases slightly as
10 the average droplet diameter decreases due to the greater number and the interfacial area of
11 emulsion droplets when droplet size decreases. This slight increase in viscosity contributes to
12 the physical stability of the emulsion, keeping curcumin encapsulated and protecting it from
13 any external agent's action leading to degradation. This can also be seen in Figure 4c, which
14 verifies how an increase in the stabilizing concentration from 2.0 g·kg⁻¹ to 5.0 g·kg⁻¹ translated
15 into a greater amount of curcumin present over time –increasing 34.2 % at 10 g·kg⁻¹ emulsifier or
16 25.2 % at 50 g·kg⁻¹ emulsifier. Moreover, one of the effects produced by adding stabilizer is
17 viscosity modification as well as rheological properties modification of the emulsion. However,
18 the statistical analysis revealed that none of these studied variables had a significant influence
19 on maintaining curcumin content to a 95 % significance level.

20 *3.4. Optimization of Og/W emulsion formulation*

21 Finally, M-RSM was carried out to obtain the optimal formulation that, in this case, would
22 maximize the amount of curcumin provided and, in turn, minimize both droplet size and lipid
23 oxidation in the Og/W emulsion. The results are shown in Figure 5, which represents the
24 estimated response surface for the effect of dispersed phase percentage and stabilizer

- 1 concentration on the overall desirability for a constant emulsifier concentration and
- 2 homogenization speed (equal to the optimum reached).



- 3 **Figure 5.** Estimated multi-response surface for the effect of dispersed phase percentage and
- 4 stabilizer concentration on the overall desirability for a constant emulsifier concentration and
- 5 homogenization speed.

6 In multivariate optimization, if all response variables are of equal relative importance, it
7 seems reasonable to weigh all of them equally. However, when they have different variability
8 and distinct deviation from the target value, the unit weight is not the most appropriate. In
9 these cases, different weights can be assigned to each of the response variables, depending on
10 the importance or influence these have variables on the pursued objective. In our study we have
11 to develop a new stable carrier capable of encapsulating, protecting, and transporting curcumin;
12 therefore, the variables related to the physicochemical stability of our system have been
13 weighted with a higher value, prioritizing them over the curcumin's load capacity. Following
14 this criterion, droplet size has been given a weight of 4.0, primary oxidation a value of 5.0,
15 secondary oxidation a weight of 2.0, and 3.0 for curcumin content. The reason why primary
16 oxidation weighs more than secondary is because of something already mentioned in Section
17 3.2.: secondary oxidation occurs from the products generated in primary oxidation; therefore, if

1 we manage to reduce the extension of the first, it will be necessary to reduce the second as well.
2 With all these previous considerations, multivariate optimization has yielded the following
3 optimal values for the variables studied (shown in Table 1).

4 For these values of the variables studied, the desirability function reached its optimum –
5 maximum– in 0.932. Based on these data, we consider the obtained desirability value to be
6 adequate, which reveals that designed emulsion meets the global expectations we had set for
7 ourselves. According to these results, we can conclude that high concentrations of emulsifier
8 and thickener contribute to the stability of Og/W emulsions, both physically and chemically. In
9 effect, the stabilizing action of the emulsifier, widely reported in scientific literature, and the
10 change in viscosity caused by the thickener, hinders the mobility of both droplets and the
11 oxidizing species and diffusion processes, favoring the physicochemical stability of the
12 emulsion. We also observe that maximum values of homogenization speed also contribute to
13 stabilizing the system. Finally, employing an intermediate value for dispersed phase
14 concentration, this balance is achieved between obtaining a stable emulsion and maximizing the
15 content of curcumin supplied.

16 **Table 1.** Optimized input parameters for Og/W emulsion formulation.

FACTOR	VALUE
Dispersed phase, g·kg ⁻¹	140.4
Emulsifier concentration, g·kg ⁻¹	50.0
Stabilizer concentration, g·kg ⁻¹	4.9
Homogenization speed, xg	1016

17 4. Conclusions

18 In this work an oil gelled-in-water emulsion was designed for maximizing the stability,
19 encapsulation, protection and transportation of curcumin-enriched with ω -3 PUFAs. The

1 influence of dispersed phase percentage, emulsifier and stabilizer concentrations, and
2 homogenization speed on the physical and chemical stabilities over time of curcumin-loaded
3 emulsions were evaluated.

4 In general, homogenization speed was the variable that most influenced both reduction of
5 the average droplet size and encapsulated curcumin maintenance. In the first case, sizes up to
6 25 times smaller were reached when we increased the homogenization speed from 254 to 1016
7 xg. Regarding curcumin content, we reached percentages higher than 75 % of retained
8 curcumin even reaching 99.6 % at speeds of 1016 xg; with some exceptions, the percentages of
9 preserved curcumin ranged from 50 to 75 % at 254 xg. Regarding lipid oxidation, higher
10 stabilizer concentrations achieved lower oxidation rates, reaching reductions of around 56.7 %
11 in primary lipid oxidation products and 57.4 % in secondary lipid oxidation products. Finally,
12 by using the multi-response surface methodology, the optimal operating parameters were
13 found: 140.4 g·kg⁻¹ dispersed phase, 50.0 g·kg⁻¹ emulsifier, 4.9 g·kg⁻¹ stabilizer, and 1016 xg.
14 Thereby, oil gelled-in-water emulsion technology has proven to be a potential tool to transport
15 and stabilize hydrophobic bioactive compounds such as ω -3 PUFAs and curcumin.

16 **Funding:** This research was funded by the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport, via the grant
17 FPU17/03005 given to Mr. Vellido-Perez, and the University of Granada through the program
18 “Precompetitive Research Projects for Young Researchers 2018–Modality B” with the project entitled
19 “Design and development of stable oleogelified structures for vehiculization and protection of curcumin”
20 (PPJIB2018-24).

21 **Acknowledgments:** This study was supported by the TEP025 “Technologies for Chemical and
22 Biochemical Processes” Research Group from the Chemical Engineering Department of the University of
23 Granada. We would like to thank Prof. Angel Delgado, from the Applied Physics Department, who made
24 the Mastersizer 2000 available whenever we needed it.

25 **Conflicts of Interest:** The authors declare there are no conflicts of interest.

1 **Appendix A**

2 **Table A1.** BBD matrix for the optimization of Og/W emulsion formulation and measured values of the response variables.

EXPERIMENT	Dispersed phase		Emulsifier		Stabilizer		Homogenization		% Increase in		% Curcumin transported
	concentration, g·kg ⁻¹	concentration, g·kg ⁻¹	concentration, g·kg ⁻¹	concentration, g·kg ⁻¹	concentration, g·kg ⁻¹	speed, xg	$d_{[4,3]}$, μm	Lipid Hydroperoxydes	Secondary Products		
1	150.0	30.0	30.0	5.0	572	51.01 ± 9.42	217.701 ± 6.800	285.246 ± 10.172	100.000 ± 19.963		
2	100.0	30.0	30.0	3.5	572	24.64 ± 3.10	92.228 ± 3.111	287.778 ± 3.880	79.235 ± 9.584		
3	100.0	30.0	30.0	3.5	572	24.75 ± 4.75	87.982 ± 5.711	315.686 ± 3.806	86.500 ± 9.011		
4	100.0	30.0	30.0	2.0	1016	66.25 ± 2.69	51.566 ± 2.290	431.818 ± 7.363	92.531 ± 7.961		
5	100.0	30.0	30.0	5.0	254	67.24 ± 5.71	181.638 ± 1.228	393.388 ± 9.396	61.603 ± 8.047		
6	100.0	30.0	30.0	3.5	572	23.93 ± 1.08	92.299 ± 2.139	311.494 ± 3.200	58.929 ± 7.247		
7	150.0	50.0	50.0	3.5	572	37.42 ± 2.60	143.665 ± 2.915	80.233 ± 2.813	86.464 ± 5.549		

Diseño, desarrollo y optimización de diferentes sistemas de liberación modificada para la protección y vehiculización de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y curcumina

8	100.0	10.0	2.0	572	22.41 ± 5.08	129.598 ± 5.056	526.984 ± 5.511	43.027 ± 6.187
9	100.0	30.0	2.0	254	62.57 ± 6.95	158.938 ± 3.338	413.265 ± 6.290	53.261 ± 7.311
10	50.0	10.0	3.5	572	11.01 ± 1.55	8.388 ± 5.072	458.621 ± 6.109	83.108 ± 13.790
11	50.0	30.0	2.0	572	7.01 ± 0.28	50.064 ± 7.972	493.548 ± 5.650	66.332 ± 9.042
12	50.0	30.0	5.0	572	29.12 ± 1.67	28.077 ± 6.150	451.515 ± 8.633	62.857 ± 8.717
13	100.0	50.0	3.5	1016	7.68 ± 3.55	60.597 ± 8.726	346.667 ± 7.412	99.588 ± 7.919
14	100.0	10.0	3.5	1016	23.04 ± 6.03	54.532 ± 6.423	381.034 ± 7.353	76.301 ± 5.947
15	50.0	30.0	3.5	1016	39.19 ± 16.96	70.207 ± 7.224	690.476 ± 10.760	81.287 ± 10.058
16	100.0	10.0	5.0	572	49.49 ± 3.62	73.213 ± 6.507	258.929 ± 4.914	77.170 ± 6.808
17	150.0	10.0	3.5	572	55.26 ± 8.72	277.352 ± 8.901	275.287 ± 5.354	54.978 ± 1.441
18	100.0	50.0	5.0	572	24.14 ± 4.17	76.605 ± 6.091	220.238 ± 6.522	85.348 ± 7.361
19	100.0	50.0	2.0	572	17.66 ± 0.96	133.440 ± 5.622	344.737 ± 6.078	60.081 ± 3.226

Diseño, desarrollo y optimización de diferentes sistemas de liberación modificada para la protección y vehiculización de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y curcumina

20	150.0	30.0	3.5	1016	3.31 ± 3.70	75.369 ± 4.519	206.186 ± 4.888	94.218 ± 3.615
21	100.0	30.0	5.0	1016	5.71 ± 3.10	67.276 ± 2.163	347.541 ± 9.099	85.862 ± 7.095
22	150.0	30.0	2.0	572	39.97 ± 3.41	288.126 ± 2.054	482.022 ± 11.879	73.462 ± 2.936
23	100.0	10.0	3.5	254	97.61 ± 5.96	243.436 ± 1.549	281.529 ± 6.446	70.288 ± 6.783
24	50.0	50.0	3.5	572	19.16 ± 8.94	60.778 ± 2.107	653.333 ± 11.881	72.892 ± 10.275
25	100.0	50.0	3.5	254	47.74 ± 3.16	254.708 ± 1.354	141.549 ± 5.362	77.544 ± 7.170
26	50.0	30.0	3.5	254	38.53 ± 2.88	121.938 ± 2.158	640.385 ± 16.376	53.927 ± 9.302
27	150.0	30.0	3.5	254	82.81 ± 3.71	328.268 ± 2.282	125.000 ± 3.247	89.474 ± 3.251
28	100.0	30.0	3.5	572	24.79 ± 4.51	87.083 ± 2.371	371.429 ± 6.640	60.880 ± 4.561
29	100.0	30.0	3.5	572	29.60 ± 4.25	63.143 ± 6.170	171.605 ± 39.109	20.216 ± 5.340

References

1. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer*. 2005; 41(13):1955-68.
2. Gupta SC, Patchva S, Koh W, Aggarwal BB. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012; 39(3):283-99.
3. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK, Aggarwal BB. Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back. *Biotechnol Adv*. 2014; 32(6):1053-64.
4. Shanmugam MK, Rane G, Kanchi MM, Arfuso F, Chinnathambi A, Zayed ME, Alharbi SA, Tan BKH, Kumar AP, Sethi G. The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment. *Molecules*. 2015; 20(2):2728-69.
5. Sunagawa Y, Katanasaka Y, Hasegawa K, Morimoto T. Clinical applications of curcumin. *PharmaNutrition*. 2015; 3(4):131-5.
6. Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Ramirez-Tortosa MC. Curcumin and health. *Molecules*. 2016; 21(3):264.
7. Rauf A, Imran M, Orhan IE, Bawazeer S. Health perspectives of a bioactive compound curcumin: a review. *Trends Food Sci Technol*. 2018; 74:33-45.
8. Xu X-Y, Meng X, Li S, Gan R-Y, Li Y, Li H-B. Bioactivity, health benefits, and related molecular mechanisms of curcumin: current progress, challenges, and perspectives. *Nutrients*. 2018; 10(10):1553.
9. Cheng C, Wu Z, McClements DJ, Zou L, Peng S, Zhou W, Liu W. Improvement on stability, loading capacity and sustained release of rhamnolipids modified curcumin liposomes. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019; 183:110460.
10. Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: an «old-age» disease with an «age-old» solution. *Cancer Lett*. 2008; 267(1):133-64.
11. Shehzad A, Lee YS. Curcumin: multiple molecular targets mediate multiple pharmacological actions – A review. *Drugs Future*. 2010; 35(2):113-9.
12. Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Padmavathi G, Monisha J, Roy NK, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *Br J Pharmacol*. 2017; 174(11):1325-48.
13. Gordon ON, Luis PB, Sintim HO, Schneider C. Unraveling curcumin degradation: autoxidation proceeds through spiroepoxide and vinyl ether intermediates en route to the main bicyclopentadione. *J Biol Chem*. 2015; 290(8):4817-28.
14. PubChem-969516. PubChem Compound Database; CID=969516. National Center for Biotechnology Information [Internet]. [Accessed May 12, 2020]. Available in: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/969516>
15. Wang Y, Lu Z, Lv F, Bie X. Study on microencapsulation of curcumin pigments by spray drying. *Eur Food Res Technol*. 2009; 229(3):391-6.
16. Mangolim CS, Moriwaki C, Nogueira AC, Sato F, Baesso ML, Neto AM, Matioli G. Curcumin- β -cyclodextrin inclusion complex: stability, solubility, characterisation by FT-

- IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. *Food Chem.* 2014; 153:361-70.
17. Wang Y-J, Pan M-H, Cheng A-L, Lin L-I, Ho Y-S, Hsieh C-Y, Lin J-K. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal.* 1997; 15(12):1867-76.
18. Jankun J, Wyganowska-Świątkowska M, Dettlaff K, Jelińska A, Surdacka A, Wątróbska-Świetlikowska D, Skrzypczak-Jankun E. Determining whether curcumin degradation/condensation is actually bioactivation. *Int J Mol Med.* 2016; 37(5):1151-8.
19. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm.* 2007; 4(6):807-18.
20. Bansal SS, Goel M, Aqil F, Vadhanam MV, Gupta RC. Advanced drug delivery systems of curcumin for cancer chemoprevention. *Cancer Prev Res (Phila Pa).* 2011; 4(8):1158-71.
21. Araiza-Calahorra A, Akhtar M, Sarkar A. Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: from encapsulation to bioaccessibility. *Trends Food Sci Technol.* 2018; 71:155-69.
22. Baglolle KN, Boland PG, Wagner BD. Fluorescence enhancement of curcumin upon inclusion into parent and modified cyclodextrins. *J Photochem Photobiol Chem.* 2005; 173(3 Spec. Iss.):230-7.
23. Zeeb B, Saberi AH, Weiss J, McClements DJ. Formation and characterization of filled hydrogel beads based on calcium alginate: factors influencing nanoemulsion retention and release. *Food Hydrocoll.* 2015; 50:27-36.
24. Vellido-Pérez JA, Rodríguez-Remacho C, Rodríguez-Rodríguez J, Ochando-Pulido JM, la Fuente EB-D, Martínez-Férez A. Optimization of oleogel formulation for curcumin vehiculization and lipid oxidation stability by multi-response surface methodology. *Chem Eng Trans.* 2019; 75:427-32.
25. Xie H, Xiang C, Li Y, Wang L, Zhang Y, Song Z, Ma X, Lu X, Lei Q, Fang W. Fabrication of ovalbumin/ κ -carrageenan complex nanoparticles as a novel carrier for curcumin delivery. *Food Hydrocoll.* 2019; 89:111-21.
26. Chen D, Gong F, Han X, Chi L, Sun J, Shen Y. Preparation and characterization of glutathione-responsive polymeric micelles functionalized with core cross-linked disulfide linkage for curcumin delivery. *J Polym Res.* 2019; 26(5):103.
27. Wei X-Q, Zhu J-F, Wang X-B, Ba K. Improving the stability of liposomal curcumin by adjusting the inner aqueous chamber pH of liposomes. *ACS Omega.* 2020; 5(2):1120-6.
28. Kharat M, Zhang G, McClements DJ. Stability of curcumin in oil-in-water emulsions: impact of emulsifier type and concentration on chemical degradation. *Food Res Int.* 2018; 111:178-86.
29. Yu H, Shi K, Liu D, Huang Q. Development of a food-grade organogel with high bioaccessibility and loading of curcuminoids. *Food Chem.* 2012; 131(1):48-54.
30. Osullivan CM, Davidovich-Pinhas M, Wright AJ, Barbut S, Marangoni AG. Ethylcellulose oleogels for lipophilic bioactive delivery-effect of oleogelation on: in vitro bioaccessibility and stability of beta-carotene. *Food Funct.* 2017; 8(4):1438-51.

31. Ashkar A, Laufer S, Rosen-Kligvasser J, Lesmes U, Davidovich-Pinhas M. Impact of different oil gelators and oleogelation mechanisms on digestive lipolysis of canola oil oleogels. *Food Hydrocoll.* 2019; 97:105218.
32. Li L, Wan W, Cheng W, Liu G, Han L. Oxidatively stable curcumin-loaded oleogels structured by β -sitosterol and lecithin: physical characteristics and release behaviour in vitro. *Int J Food Sci Technol.* 2019; 54(7):2502-10.
33. Shahidi F, Ambigaipalan P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefits. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2018; 9(1):345-81.
34. Saw CLL, Huang Y, Kong A-N. Synergistic anti-inflammatory effects of low doses of curcumin in combination with polyunsaturated fatty acids: docosahexaenoic acid or eicosapentaenoic acid. *Biochem Pharmacol.* 2010; 79(3):421-30.
35. Coupland JN, McClements DJ. Lipid oxidation in food emulsions. *Trends Food Sci Technol.* 1996; 7(3):83-91.
36. Kargar M. Emulsion design for protection of chemically sensitive bioactive ingredients [Doctor of Philosophy]. [Birmingham]: University of Birmingham; 2014.
37. Sarkar A, Mackie AR. Engineering oral delivery of hydrophobic bioactives in real-world scenarios. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2020; 48:40-52.
38. Vellido-Perez JA, Ochando-Pulido JM, Brito-de la Fuente E, Martinez-Ferez A. Novel emulsions-based technological approaches for the protection of omega-3 polyunsaturated fatty acids against oxidation processes – A comprehensive review. *Food Struct.* 2021; 27:100175.
39. McClements DJ. Nanoscale nutrient delivery systems for food applications: improving bioactive dispersibility, stability, and bioavailability. *J Food Sci.* 2015; 80(7):N1602-11.
40. Zhang R, McClements DJ. Enhancing nutraceutical bioavailability by controlling the composition and structure of gastrointestinal contents: emulsion-based delivery and excipient systems. *Food Struct.* 2016; 10:21-36.
41. Shantha NC, Decker EA. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *J AOAC Int.* 1994; 77(2):421-4.
42. American Oil Chemists' Society. AOCS official method CD 18-90 – p-anisidine value. Sampling and analysis of commercial fats and oils. In: *Official methods and recommended practices of the AOCS.* Champaign: AOCS Press; 1998. p. 1-2.
43. Friberg S, Larsson K, Sjoblom J. *Food emulsions.* CRC Press; 2003. p. 658
44. Raikos V, Duthie G, Ranawana V. Comparing the efficiency of different food-grade emulsifiers to form and stabilise orange oil-in-water beverage emulsions: influence of emulsifier concentration and storage time. *Int J Food Sci Technol.* 2017; 52(2):348-58.
45. Kowalska M, Zbikowska A, Wozniak M, Kucharczyk K. Long-term stability of emulsion based on rose oil. *J Dispers Sci Technol.* 2017; 38(11):1563-9.
46. Ma P, Zeng Q, Tai K, He X, Yao Y, Hong X, Yuan F. Development of stable curcumin nanoemulsions: effects of emulsifier type and surfactant-to-oil ratios. *J Food Sci Technol.* 2018; 55(9):3485-97.

47. Sun C, Gunasekaran S, Richards MP. Effect of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocoll.* 2007; 21(4):555-64.
48. Krstonošić V, Dokić L, Nikolić I, Milanović M. Influence of xanthan gum on oil-in-water emulsion characteristics stabilized by OSA starch. *Food Hydrocoll.* 2015; 45:9-17.
49. Viana VR, Silva MBF, Azero EG, Silva KGH, Andrade CT. Assessing the stabilizing effect of xanthan gum on vitamin D-enriched pecan oil in oil-in-water emulsions. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp.* 2018; 555:646-52.
50. Scholz P, Keck CM. Nanoemulsions produced by rotor–stator high speed stirring. *Int J Pharm.* 2015; 482(1):110-7.
51. Berton-Carabin CC, Ropers M-H, Genot C. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: involvement of the interfacial layer. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2014; 13(5):945-77.
52. Horn AF, Nielsen NS, Andersen U, Søgaard LH, Horsewell A, Jacobsen C. Oxidative stability of 70 % fish oil-in-water emulsions: impact of emulsifiers and pH. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2011; 113(10):1243-57.
53. Shahidi F, Zhong Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem Soc Rev.* 2010; 39(11):4067-79.
54. Khouryieh H, Puli G, Williams K, Aramouni F. Effects of xanthan–locust bean gum mixtures on the physicochemical properties and oxidative stability of whey protein stabilised oil-in-water emulsions. *Food Chem.* 2015; 167:340-8.
55. Chen X, Li W, Zhao Q, Selomulya C, Zhu X, Xiong H. Physical and oxidative stabilities of O/W emulsions formed with rice dreg protein hydrolysate: effect of xanthan gum rheology. *Food Bioprocess Technol.* 2016; 9(8):1380-90.
56. Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J Agric Food Chem.* 1992; 40(6):945-8.
57. Kamal-Eldin A. Lipid oxidation pathways [Internet]. AOCS Publishing; 2003 [Accessed May 7, 2020]. Available in: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781003040316>
58. Frankel EN. Lipid oxidation [Internet]. 2nd edition. Oily Press; 2005 [Accessed December 28, 2020]. p. 488. Available in: <https://www.sciencedirect.com/book/9780953194988/lipid-oxidation>
59. Hammond EG, White PJ. A brief history of lipid oxidation. *J Am Oil Chem Soc.* 2011; 88(7):891-7.
60. Waraho T, McClements DJ, Decker EA. Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends Food Sci Technol.* 2011; 22(1):3-13.
61. Nuchi CD, Hernandez P, McClements DJ, Decker EA. Ability of lipid hydroperoxides to partition into surfactant micelles and alter lipid oxidation rates in emulsions. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(19):5445-9.
62. Decker EA, Warner K, Richards MP, Shahidi F. Measuring antioxidant effectiveness in food. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(10):4303-10.

63. Sanidad KZ, Sukamtoh E, Xiao H, McClements DJ, Zhang G. Curcumin: recent advances in the development of strategies to improve oral bioavailability. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2019; 10(1):597-617.
64. Artiga-Artigas M, Lanjari-Pérez Y, Martín-Belloso O. Curcumin-loaded nanoemulsions stability as affected by the nature and concentration of surfactant. *Food Chem.* 2018; 266:466-74.
65. Wang X, Jiang Y, Wang Y-W, Huang M-T, Ho C-T, Huang Q. Enhancing anti-inflammation activity of curcumin through O/W nanoemulsions. *Food Chem.* 2008; 108(2):419-24.

4.4. Diseño, desarrollo y optimización de un sistema de liberación basado en emulsiones $W_1/Og/W_2$ rico en PUFAs ω -3 y curcumina

En este cuarto capítulo se recogen los resultados obtenidos para el objetivo 4 de esta Tesis Doctoral, el diseño y desarrollo de un sistema de liberación basado en emulsiones múltiples $W_1/Og/W_2$ fisicoquímicamente estable para la encapsulación en la fase oleosa intermedia, protección, vehiculización y liberación de altas dosis de PUFAs ω -3 y curcumina por vía oral. Para ello, primero se estudió la influencia de la composición y las condiciones de operación del sistema emulsificado sobre su estabilidad física y oxidativa, así como sobre su capacidad para proteger y estabilizar en el tiempo curcumina encapsulada. Este estudio se realizó solamente mediante homogenización a alta velocidad de cizalla, tanto para la emulsión primaria W_1/Og como para la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$. Posteriormente y en base a estos resultados, se aplicó la metodología de superficie de respuesta para obtener la formulación y condiciones de operación óptimas de la emulsión $W_1/Og/W_2$. Para terminar, sobre esta fórmula óptima se llevaron a cabo estudios reológicos, de estabilidad de la emulsión y la curcumina incorporada con el tiempo frente a distintas condiciones ambientales que podrían afectarle (como el pH, la fuerza iónica, la luz o la temperatura), y de bioaccesibilidad y biodisponibilidad en condiciones fisiológicas humanas.

4.4.1. Diseño de experimentos

Tras una revisión bibliográfica bastante meticulosa y toda una serie de ensayos de emulsificación previos en base a la composición y las condiciones de operación de las emulsiones W/Og y Og/W ya estudiadas, se fijaron algunas variables (la concentración de fase dispersa en la emulsión primaria W_1/Og igual a 40 % p/p y la concentración de estabilizante en la fase acuosa externa igual a 0.31 % p/p) y se seleccionaron algunas otras como variables independientes importantes a considerar en

un DOE, estableciendo los siguientes rangos de estudio: con relación a la emulsión primaria W_1/Og , se eligieron la concentración total de emulgente (6.0–14.0 % p/p), la ratio emulgente hidrofóbico:emulgente hidrofílico (PGPR:Tween 20, 50–90 % p/p) y la velocidad de homogenización (9000–21000 rpm); con respecto a la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$, se escogieron la concentración total de oleogel en el sistema de liberación que determina la fracción de fase dispersa (W_1/Og) en la emulsión múltiple (0–20 % p/p), la concentración de emulgente hidrofílico (Tween 20, 5.0–13.0 % p/p) y la velocidad de homogenización (3000–7000 rpm). A partir de estas seis variables independientes, se aplicó un diseño compuesto reducido de Draper–Lin, que permite la optimización con un número de puntos experimentales mínimo, en un único bloque completamente aleatorizado para evaluar simultáneamente los efectos de todas ellas y de sus posibles interacciones sobre el tamaño de partícula, la oxidación primaria y secundaria y la capacidad de retención de curcumina (variables respuesta). Se contemplaron 5 niveles por factor (punto axial máximo, punto factorial máximo, punto central, punto factorial mínimo y punto axial mínimo) para facilitar la construcción de modelos polinómicos de segundo grado y se eligió una distancia axial adecuada para cumplir la propiedad de rotabilidad del diseño. Además, se efectuaron 8 repeticiones del punto central para la estimación del error experimental, haciendo un total de 36 ensayos que se recogen en la Tabla 45.

A este diseño experimental se le añadió una muestra adicional (control) que consistió en el mismo oleogel que el utilizado para la elaboración de las emulsiones $W_1/Og/W_2$. Con ella se pretendía evaluar el impacto del proceso de emulsificación del oleogel sobre la oxidación lipídica y la capacidad de retención de curcumina.

Tabla 45. Matriz de experimentos del diseño compuesto reducido de Draper-Lin para la emulsión $W_1/Og/W_2$.

Nº de experimento	[Em.] _{TOTAL} , % p/p	Ratio [Em.] _{LPO/HIDRO} , % p/p	Velocidad de homogenización, rpm	[F. dispersa] _(W1/Og) , % p/p	[Em.] _{HIDRO} , % p/p	Velocidad de homogenización, rpm
1	10.0	70	9000	10	9	5000
2	10.0	70	15000	10	9	3000
3	10.0	70	15000	10	13	5000
4	14.0	70	15000	10	9	5000
5	12.0	80	18000	15	7	4000
6	8.0	60	18000	15	11	6000
7	12.0	80	12000	15	7	6000
8	10.0	50	15000	10	9	5000
9	10.0	70	15000	10	9	5000
10	8.0	60	12000	15	11	4000
11	8.0	80	18000	15	11	4000
12	12.0	60	12000	15	7	4000
13	10.0	70	15000	10	5	5000
14	12.0	60	18000	15	7	6000
15	10.0	70	15000	20	9	5000
16	10.0	70	15000	10	9	5000
17	8.0	80	12000	15	11	6000

Diseño, desarrollo y optimización de diferentes sistemas de liberación modificada para la protección y vehiculización de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y curcumina

18	10.0	70	15000	10	9	5000
19	10.0	70	15000	0	9	5000
20	10.0	70	21000	10	9	5000
21	10.0	70	15000	10	9	5000
22	8.0	80	18000	5	7	4000
23	12.0	60	18000	5	11	6000
24	6.0	70	15000	10	9	5000
25	10.0	70	15000	10	9	7000
26	10.0	70	15000	10	9	5000
27	10.0	70	15000	10	9	5000
28	12.0	80	18000	5	11	4000
29	8.0	60	18000	5	7	6000
30	8.0	60	12000	5	7	4000
31	10.0	70	15000	10	9	5000
32	12.0	60	12000	5	11	4000
33	10.0	90	15000	10	9	5000
34	8.0	80	12000	5	7	6000
35	10.0	70	15000	10	9	5000
36	12.0	80	12000	5	11	6000

4.4.2. Efecto de las variables de operación sobre la estabilidad física

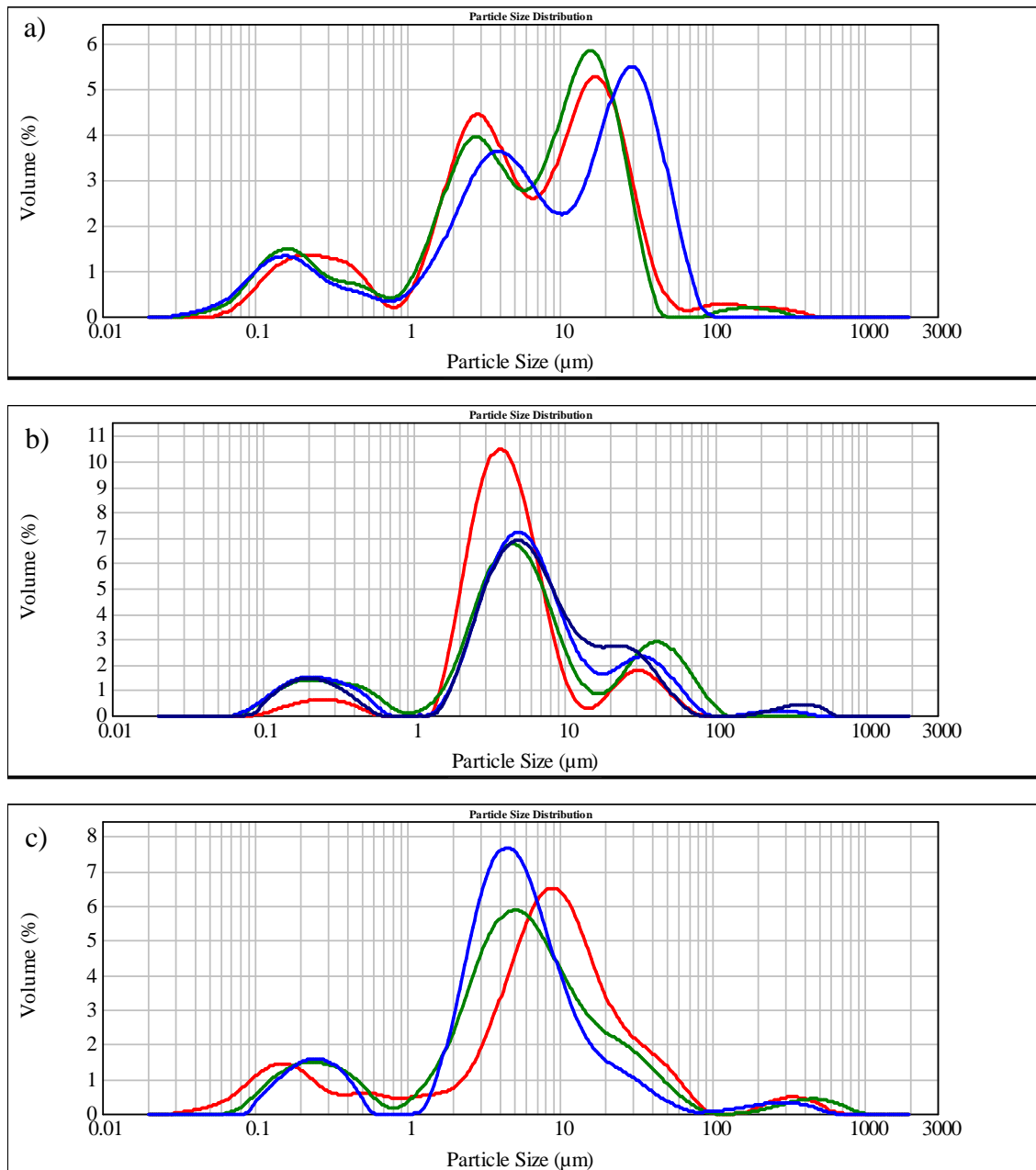
Para estudiar el efecto de las diferentes variables independientes consideradas sobre la estabilidad física de la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$, se analizó la influencia de estos factores sobre la distribución de tamaños de gota de fase dispersa.

De forma general, las curvas de distribución de tamaños de gota típicas para las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas mediante homogenización a alta velocidad suelen presentar entre tres y cuatro picos (Figura 141), si bien es cierto que en ocasiones los picos 2 y 3 pueden encontrarse más o menos solapados dependiendo de la emulsión de que se trate y que el pico 4 puede o no aparecer en función del grado de envejecimiento de la emulsión. He aquí, por tanto, una primera diferencia con respecto a las emulsiones Og/W : en las emulsiones $W_1/Og/W_2$ es habitual encontrar un desdoblamiento del pico central –correspondiente a las gotas de fase dispersa– en dos picos diferentes más o menos solapados entre sí que reflejan dos tamaños de gota distintos. Su et al. (2006) y Hemar et al. (2010) también obtuvieron distribuciones de tamaños de gota bimodales para emulsiones múltiples preparadas con PGPR como emulsionante hidrofóbico.

Generalmente, el primero de los picos se encuentra localizado entre 0.150 y 0.300 μm , pico que como ya se ha explicado anteriormente (ver apartado 4.3.2.1.) debe atribuirse a algún componente en suspensión o formando micelas y que, por tanto, no aporta ninguna información sobre el tamaño de gota de la emulsión; el segundo y tercer pico están comprendidos entre 2.5 y 9.0 μm (pico 2) y entre 15 y 40 μm (pico 3), correspondiendo ambos a las gotas de fase dispersa de la emulsión múltiple; y el cuarto pico se sitúa por encima de las 100 μm , correspondiendo a las gotas de gran tamaño formadas como consecuencia de la desestabilización física de la emulsión. Todos ellos son bastante anchos, indicando que se trata de emulsiones polidispersas. Además, el cuarto pico no siempre aparece en las curvas de distribución de tamaños de gota de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ y, en caso de hacerlo, aparece con porcentajes en volumen mucho más pequeños que en las emulsiones Og/W . Ello pone de manifiesto para las emulsiones $W_1/Og/W_2$ una estabilidad física más prolongada en el tiempo, estabilidad

que probablemente está relacionada con la mayor concentración de emulgente utilizada en este tipo de emulsiones.

Figura 141. Curvas de distribución de tamaños de gota de diferentes emulsiones $W_1/Og/W_2$, 30 días después de su elaboración.



Centrándonos en los picos 2 y 3, que son los más grandes y los correspondientes a las gotas de fase dispersa de la emulsión, se han identificado tres tipos de curvas de distribución de tamaños de gota distintas (Figura 141). La primera de ellas (Figura 141a) presenta dos picos bien definidos y diferenciados: el primero, algo más pequeño,

está localizado entre 2.5 y 4.0 μm ; el segundo, algo más grande, se sitúa entre 15 y 30 μm . Este tipo de curvas de distribución de tamaños corresponde a emulsiones $W_1/\text{Og}/W_2$ donde el proceso de homogenización de la múltiple no ha sido demasiado satisfactorio y, en consecuencia, aunque aparecen bastantes gotas pequeñas, también hay un número importante de gotas con tamaños relativamente grandes. A priori, este tipo de emulsiones son más susceptibles a desestabilizarse físicamente. El segundo tipo de curvas de distribución de tamaños (Figura 141b) también presenta dos picos diferentes que pueden estar más o menos solapados: el primero de ellos, mucho más grande, entre 3.5 y 5.5 μm ; el segundo, bastante más pequeño, entre 25 y 40 μm . Este segundo tipo de curvas de distribución de tamaños corresponde a emulsiones $W_1/\text{Og}/W_2$ cuyo proceso de homogenización de la múltiple ha resultado más eficaz y, por tanto, se tienen muchas más gotas pequeñas pese a que sigan quedando todavía algunas gotas relativamente grandes. Este segundo tipo de emulsiones suelen ser más estables físicamente. Finalmente, el tercero de los tipos (Figura 141c) presenta un único pico bastante grande entre 4.5 y 9.0 μm . Este último tipo de curvas de distribución de tamaños corresponde a emulsiones $W_1/\text{Og}/W_2$ cuyo proceso de homogenización de la múltiple ha sido mucho más homogéneo y, por tanto, la mayoría de las gotas de fase dispersa muestran tamaños parecidos y relativamente pequeños.

La Tabla 46 recoge el diámetro volumétrico o diámetro medio de De Brouckere, $d_{[4,3]}$, la moda de la distribución de tamaños, d_{mode} , y la uniformidad, U , de las emulsiones $W_1/\text{Og}/W_2$ preparadas mediante homogenización a alta velocidad, medidas 30 días después de su elaboración. Los $d_{[4,3]}$ de la tabla han sido calculados omitiendo el primero de los picos de las curvas de distribución de tamaños (diámetros inferiores a 0.7627 μm), puesto que tamaños tan pequeños no pueden corresponder a gotas de fase dispersa obtenidas mediante homogenización a alta velocidad y, por tanto, este primer pico contribuye a falsear el tamaño medio de gota de la emulsión. La Tabla 46 también muestra el pH de las emulsiones $W_1/\text{Og}/W_2$ a día 29, pH que estuvo comprendido entre 5.81 (emulsión 23) y 6.54 (emulsión 31).

Otra de las diferencias más importantes entre las emulsiones Og/W y $W_1/\text{Og}/W_2$ radica en el tamaño de las gotas con mayor presencia en el sistema emulsificado, esto es, en la moda de la distribución de tamaños. Si bien las emulsiones Og/W presentaron un mayor número de gotas con tamaños comprendidos entre 2.0 y 3.0 μm , las

Tabla 46. Tamaño de gota y pH de las diferentes emulsiones $W_1/Og/W_2$, 30 y 29 días después de su elaboración.

Nº de experimento	$d_{[4,3]}$, μm	d_{mode} , μm	U	pH
1	13.087	17.237	1.09	5.98
2	13.797	8.948	0.879	6.21
3	7.663	3.775	1.11	6.26
4	10.935	4.904	1.08	6.26
5	15.807	21.738	0.926	6.51
6	15.848	3.014	3.7	6.24
7	11.697	3.264	1.26	6.27
8	15.215	4.507	1.97	6.15
9	11.737	4.959	1.28	6.33
10	13.217	3.360	1.38	6.15
11	20.764	28.814	0.733	6.20
12	10.997	15.983	0.818	6.19
13	18.909	29.497	0.998	6.53
14	11.201	3.464	1.97	6.52
15	3.984	3.519	0.37	6.34
16	9.544	5.025	0.967	6.37
17	7.428	2.666	1.75	6.43
18	12.424	4.702	1.42	6.46
19	---	---	---	6.34
20	7.990	3.918	1.16	6.22
21	10.906	4.483	1.44	6.35
22	13.887	8.930	0.879	6.36
23	10.415	3.575	1.87	5.81
24	10.248	4.444	1.31	6.35
25	14.658	3.660	2.7	6.31
26	12.294	4.918	1.38	6.38
27	9.463	4.542	1.18	6.50
28	10.511	5.491	1.04	5.87
29	17.086	4.678	2.43	6.45
30	23.114	29.262	0.671	6.39
31	11.140	4.702	1.38	6.54
32	14.206	7.124	1.1	6.35
33	9.866	4.081	1.33	6.48
34	10.551	5.070	1.11	6.43
35	10.823	4.945	1.22	6.44
36	7.867	4.520	0.843	6.30

emulsiones $W_1/Og/W_2$ están constituidas mayoritariamente por gotas de tamaños más grandes (entre 4.5 y 5.5 μm). Esta diferencia en el tamaño de gota más frecuente de las emulsiones Og/W y $W_1/Og/W_2$ encuentra su justificación en sus respectivas velocidades de homogenización que, como ya se vio en el apartado 4.3.2.1., es la variable independiente que influye de manera más significativa sobre el tamaño medio de gota de una emulsión Og/W : en efecto, las emulsiones Og/W fueron homogenizadas a 6000–12000 rpm mientras que las emulsiones $W_1/Og/W_2$ se homogenizaron en el intervalo de 3000 a 7000 rpm para evitar que, en la medida de lo posible, las fuerzas de cizallamiento rompiesen la emulsión primaria W_1/Og que conforma la fase dispersa de la múltiple; por tanto, la menor velocidad de homogenización influye inevitablemente sobre el tamaño de gota. Por otra parte conviene recordar que, en una emulsión múltiple, cada gota de fase dispersa contiene, a su vez, gotitas más pequeñas igualmente dispersas que necesitan de gotas más grandes para contenerlas y además, al haber una emulsión dentro de otra, los mecanismos de rotura se multiplican y aparecen procesos de rotura como consecuencia de la migración de agua hacia fuera (vaciamiento) o hacia dentro (hinchamiento) debida a la diferencia de presión osmótica entre las fases acuosas interna y externa.

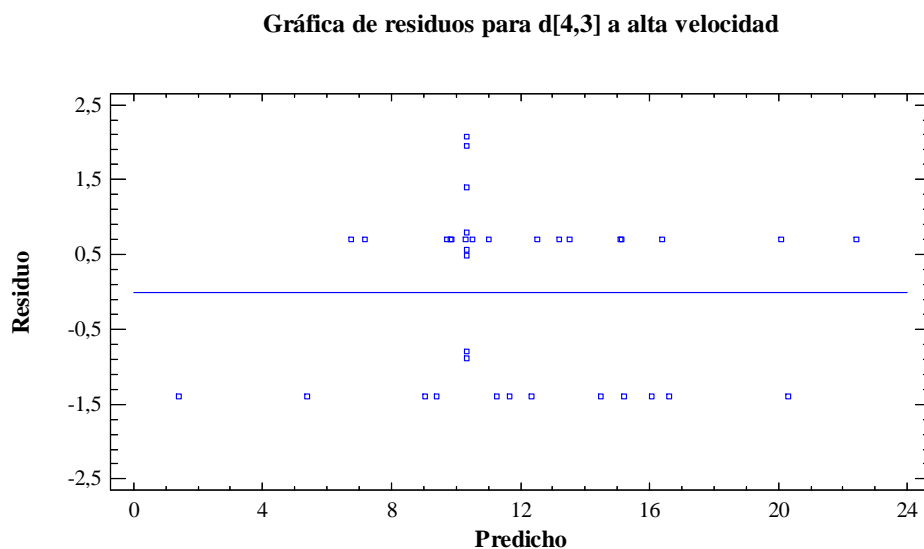
Los valores de uniformidad obtenidos (Tabla 46) son bastante parecidos a los medidos por Yildirim et al. (2017), quienes analizaron las distribuciones de tamaños de gota de tres emulsiones $W/O/W$ diferentes: una de caseinato sódico ($U = 1.012$), otra de XG ($U = 1.783$) y la última de lecitina y concentrado de proteína de suero ($U = 1.299$). Con un valor de uniformidad promedio de 1.34 ± 0.63 , mucho más pequeño que el de las emulsiones Og/W homogenizadas a alta velocidad (13.00 ± 1.41) y a alta presión (28.67 ± 9.81), las emulsiones $W_1/Og/W_2$ siguen siendo sistemas polidispersos aunque con un índice de polidispersidad mucho más bajo que el de las emulsiones Og/W estudiadas con anterioridad. El alto valor de uniformidad de las emulsiones Og/W probablemente se deba a la presencia de gotas de gran tamaño (superior a las 100 μm) formadas como consecuencia de la desestabilización física de la emulsión, que origina distribuciones de tamaños de gota bastante amplias; sin embargo, las emulsiones $W_1/Og/W_2$ presentan un número de gotas de gran tamaño mucho más reducido y, por consiguiente, una estabilidad física en el tiempo mayor que hace que el valor de uniformidad promedio sea mucho más pequeño que el de las emulsiones Og/W .

A continuación, se presenta el modelo cuadrático ajustado para el diámetro volumétrico, $d_{[4,3]}$, de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas mediante homogenización a alta velocidad, 30 días después de su elaboración, en función de las variables independientes consideradas y de sus interacciones.

$$\begin{aligned}
 d_{[4,3]} = & 10.3438 + 0.17175*[Em.]_{TOTAL} - 1.33725*Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.} - \\
 & 1.27425*Velocidad_{(W1/Og)} + 0.996*[F. dispersa]_{(W1/Og)} - 2.8115*[Em.]_{HIDRO.} + \\
 & 0.21525*Velocidad_{(W1/Og/W2)} + 0.410687*[Em.]_{TOTAL}^2 + 0.981125*[Em.]_{TOTAL}*Ratio \\
 & [Em.]_{LIPO./HIDRO.} - 0.63175*[Em.]_{TOTAL}*Velocidad_{(W1/Og)} - 1.93125*[Em.]_{TOTAL}*[F. \\
 & dispersa]_{(W1/Og)} + 1.03837*[Em.]_{TOTAL}*[Em.]_{HIDRO.} + \\
 & 0.608*[Em.]_{TOTAL}*Velocidad_{(W1/Og/W2)} + 0.897938*Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.}^2 + \\
 & 2.11588*Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.}*Velocidad_{(W1/Og)} + 1.65238*Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.}*[F. \\
 & dispersa]_{(W1/Og)} + 0.20875*Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.}*[Em.]_{HIDRO.} - 2.30187*Ratio \\
 & [Em.]_{LIPO./HIDRO.}*Velocidad_{(W1/Og/W2)} + 0.397437*Velocidad_{(W1/Og)}^2 + \\
 & 1.5075*Velocidad_{(W1/Og)}*[F. dispersa]_{(W1/Og)} + 0.824875*Velocidad_{(W1/Og)}*[Em.]_{HIDRO.} - \\
 & 0.239*Velocidad_{(W1/Og)}*Velocidad_{(W1/Og/W2)} - 1.73919*[F. dispersa]_{(W1/Og)}^2 + \\
 & 1.99638*[F. dispersa]_{(W1/Og)}*[Em.]_{HIDRO.} + 0.07425*[F. \\
 & dispersa]_{(W1/Og)}*Velocidad_{(W1/Og/W2)} + 1.08431*[Em.]_{HIDRO.}^2 - \\
 & 0.241875*[Em.]_{HIDRO.}*Velocidad_{(W1/Og/W2)} + 1.31969*Velocidad_{(W1/Og/W2)}^2 \quad Ec. [47]
 \end{aligned}$$

El modelo propuesto (Ec. 47) es capaz de explicar de manera aceptable el 93.25 % de la variabilidad en el diámetro volumétrico de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas mediante homogenización a alta velocidad, presentando un p_{MOD} de 0.0218, inferior a 0.05, por lo que puede afirmarse que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables independientes y dependiente con un nivel de confianza del 95 %. Además, el estadístico de Durbin-Watson examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo de datos. Puesto que el valor p de dicho estadístico es mayor que 0.05 ($p_{DW} = 0.4465$), no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5 %. Finalmente, la ausencia de un patrón en la gráfica de los residuos contra los valores ajustados o predichos (Figura 142) indica que el modelo seleccionado describe adecuadamente los datos experimentales.

Figura 142. Gráfica de residuos para el tamaño medio de gota de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.



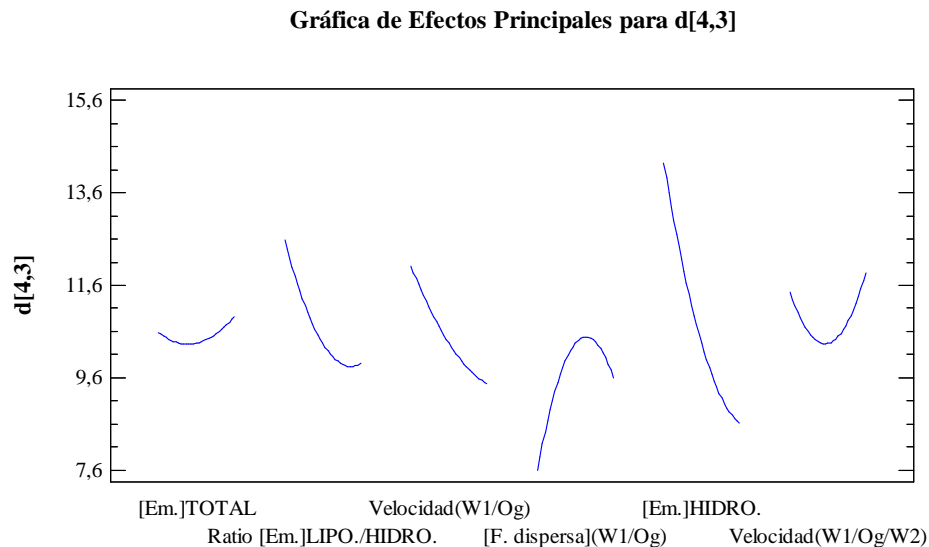
Tras un análisis de la varianza (ANOVA) de los valores observados (Tabla 47), se hallaron un total de 16 efectos estadísticamente significativos ($p < 0.05$) sobre el diámetro volumétrico de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas mediante homogenización a alta velocidad: la velocidad de homogenización de la emulsión primaria W_1/Og ejerció un efecto estadísticamente significativo en orden lineal, mientras que la velocidad de homogenización de la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$ lo hizo en orden cuadrático; asimismo, la ratio emulgente hidrofóbico:emulgente hidrofílico en la emulsión primaria W_1/Og , la fracción de fase dispersa (W_1/Og) en la emulsión múltiple y la concentración de emulgente hidrofílico en la fase acuosa externa W_2 , todas ellas en sus términos lineales y cuadráticos, también afectaron significativamente al tamaño medio de gota. Finalmente, 8 de las interacciones entre las variables mencionadas también fueron significativas ($[Em.]_{TOTAL} * Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.}$, $[Em.]_{TOTAL} * [F. dispersa]_{(W_1/Og)}$, $Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.} * Velocidad_{(W_1/Og)}$, $Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.} * [F. dispersa]_{(W_1/Og)}$, $Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.} * Velocidad_{(W_1/Og/W_2)}$, $Velocidad_{(W_1/Og)} * [F. dispersa]_{(W_1/Og)}$, $Velocidad_{(W_1/Og)} * [Em.]_{HIDRO.}$ y $[F. dispersa]_{(W_1/Og)} * [Em.]_{HIDRO.}$). La forma en que influyen todos estos factores sobre la variable respuesta queda puesta de manifiesto en la gráfica de efectos principales (Figura 143).

Tabla 47. Análisis de la varianza (ANOVA) para el tamaño medio de gota de las emulsiones $W_1/Og/W_2$.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor p^*
[Em.] _{TOTAL}	0.235985	1	0.235985	0.19	0.6774
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.}	14.3059	1	14.3059	11.41	0.0118
Velocidad _(W1/Og)	12.9897	1	12.9897	10.36	0.0147
[F. dispersa] _(W1/Og)	7.93613	1	7.93613	6.33	0.0400
[Em.] _{HIDRO.}	63.2363	1	63.2363	50.45	0.0002
Velocidad _(W1/Og/W2)	0.37066	1	0.37066	0.30	0.6035
[Em.] _{TOTAL} ²	5.39726	1	5.39726	4.31	0.0766
[Em.] _{TOTAL} *Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.}	15.4017	1	15.4017	12.29	0.0099
[Em.] _{TOTAL} *Velocidad _(W1/Og)	6.38573	1	6.38573	5.09	0.0586
[Em.] _{TOTAL} *[F. dispersa] _(W1/Og)	19.8919	1	19.8919	15.87	0.0053
[Em.] _{TOTAL} *[Em.] _{HIDRO.}	5.75052	1	5.75052	4.59	0.0694
[Em.] _{TOTAL} *Velocidad _(W1/Og/W2)	5.91462	1	5.91462	4.72	0.0664
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} ²	25.8013	1	25.8013	20.59	0.0027
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} *Velocidad _(W1/Og)	23.8769	1	23.8769	19.05	0.0033
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} *[F. dispersa] _(W1/Og)	43.6855	1	43.6855	34.85	0.0006
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} *[Em.] _{HIDRO.}	0.697225	1	0.697225	0.56	0.4801
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} *Velocidad _(W1/Og/W2)	28.2594	1	28.2594	22.55	0.0021
Velocidad _(W1/Og) ²	5.05461	1	5.05461	4.03	0.0846
Velocidad _(W1/Og) *[F. dispersa] _(W1/Og)	36.3609	1	36.3609	29.01	0.0010
Velocidad _(W1/Og) *[Em.] _{HIDRO.}	10.8867	1	10.8867	8.69	0.0215
Velocidad _(W1/Og) *Velocidad _(W1/Og/W2)	0.304645	1	0.304645	0.24	0.6371
[F. dispersa] _(W1/Og) ²	96.7927	1	96.7927	77.22	0.0000
[F. dispersa] _(W1/Og) *[Em.] _{HIDRO.}	21.2561	1	21.2561	16.96	0.0045
[F. dispersa] _(W1/Og) *Velocidad _(W1/Og/W2)	0.088209	1	0.088209	0.07	0.7984
[Em.] _{HIDRO.} ²	37.6235	1	37.6235	30.02	0.0009
[Em.] _{HIDRO.} *Velocidad _(W1/Og/W2)	0.936056	1	0.936056	0.75	0.4161
Velocidad _(W1/Og/W2) ²	55.7304	1	55.7304	44.46	0.0003
Falta de ajuste	35.0326	1	35.0326	27.95	<i>0.0011</i>
Error puro	8.77376	7	1.25339		
Total (corr.)	649.324	35			

* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

Figura 143. Gráfica de efectos principales para el tamaño medio de gota de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.



Como ya se vio en el capítulo anterior, las condiciones de operación para la producción de un sistema emulsificado Og/W –bien sea la velocidad o la presión de homogenización– son un parámetro crítico sobre el tamaño medio de gota. En el caso de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ sucede lo mismo y, por tanto, las velocidades de homogenización de la emulsión primaria y secundaria también son estadísticamente significativas, si bien es cierto que en órdenes diferentes y con efectos contrarios. Con respecto a la velocidad de homogenización de la emulsión primaria, esta velocidad afecta significativamente de forma negativa al tamaño medio de gota de la secundaria, es decir, velocidades de homogenización de la W_1/Og más altas producen gotas de fase acuosa en la primaria más pequeñas de forma que al utilizar esta emulsión para la múltiple, el diámetro volumétrico resultante también es menor y, a priori, eso implica una estabilidad física más prolongada en el tiempo. En efecto, reducir el tamaño de gota implica aportar grandes cantidades de energía; por tanto, cuanto mayor es la cantidad de energía aportada a un sistema, ya sea aumentando la velocidad de agitación o las condiciones de operación en el caso de cualquier otro método de homogenización, se obtienen tamaños de gota en la primaria menores y esos tamaños, a su vez, influyen sobre los tamaños de gota y la estabilidad de la emulsión múltiple (Chandrapala et al., 2012; Schuch et al., 2014). Así, Garti & Aserin (1996) sugirieron reducir el tamaño de gota de la emulsión primaria (W_1/Og) tanto como fuese posible para producir

emulsiones múltiples estables. Con respecto a la velocidad de homogenización de la emulsión múltiple ocurre justo lo contrario y su cuadrado afecta significativamente de forma positiva al tamaño medio de gota de la secundaria, esto es, velocidades de homogenización de la emulsión $W_1/Og/W_2$ más altas dan lugar a tamaños de gota en la secundaria más grandes. A este aumento del tamaño medio de gota de una emulsión cuando se aumenta la cantidad de energía aportada al sistema se le conoce como 'sobrepesamiento' y es un fenómeno que ha sido observado por muchos autores (Tornberg, 1980; Robin et al., 1992; Desrumaux & Marcand, 2002; Kentish et al., 2008; Yildirim et al., 2017). El 'sobrepesamiento' ocurre cuando se aumentan las condiciones de operación en un sistema y se produce una densidad de energía en exceso que se disipa parcialmente en forma de calor. Como consecuencia del aumento de temperatura que se origina, aumenta el movimiento browniano de las partículas y la probabilidad de colisión y coalescencia que conduce a un aumento del tamaño promedio de gota.

La concentración de fase dispersa (W_1/Og) en la emulsión múltiple es otro de los parámetros clave para modificar el tamaño medio de gota de la emulsión (Yildirim et al., 2017). La Figura 143 revela cómo la influencia de la fracción de fase dispersa sobre el tamaño medio de gota es de forma positiva, esto es, cuanto mayor es la cantidad de fase dispersa, el diámetro volumétrico obtenido también es más grande. Este resultado está en línea con los obtenidos por Saeidy et al. (2014), quienes estudiaron la formulación óptima para la encapsulación de calcio en forma de fosfato tricálcico en la fase acuosa interna de una emulsión W/O/W. Y es que altos contenidos de fase dispersa necesitan de un mayor aporte de energía para romperla y dispersarla en forma de pequeñas gotitas e, incrementando su concentración, se puede llegar a inhibir la actividad del homogenizador y producir gotitas más grandes. Además, si la emulsión contiene XG o algún otro tipo de estabilizante que aumente su viscosidad, este efecto es todavía más pronunciado (Yildirim et al., 2017). Sin embargo, también hay otros estudios como los de Raymundo et al. (2002) que refieren justo el efecto contrario: que un aumento en la fracción de fase dispersa da lugar a gotitas más pequeñas.

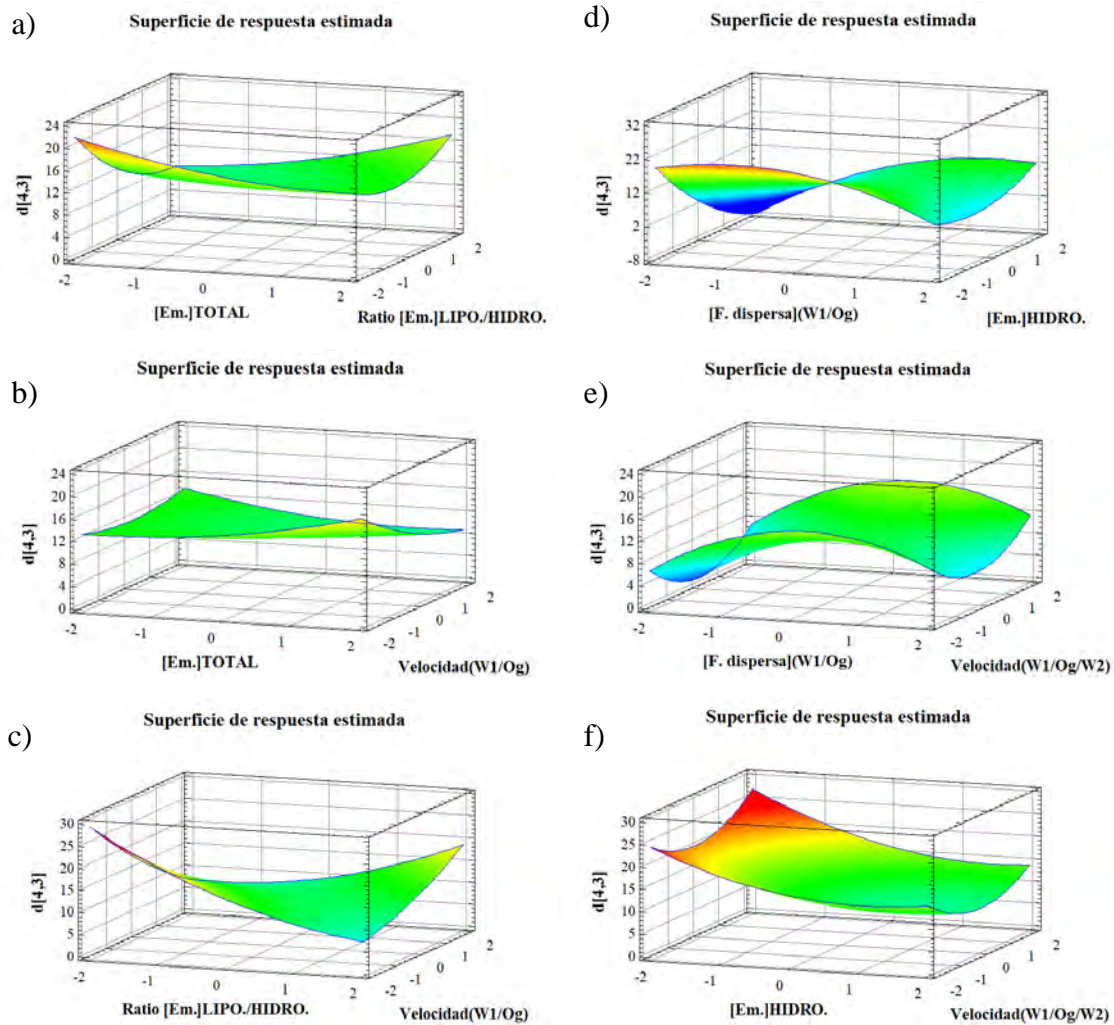
Finalmente, la selección del tipo y la concentración de emulgentes hidrofóbico e hidrofílico utilizados para estabilizar las interfases (W_1/Og y Og/W_2) de una emulsión $W_1/Og/W_2$ también es fundamental para el tamaño medio de gota y la estabilidad del

sistema (Oppermann et al., 2018). Son varios los estudios que aseguran que el tipo y la concentración de emulgente influye en gran medida sobre la probabilidad de coalescencia de W_1-W_1 y W_1-W_2 , y que las emulsiones múltiples son bastante más propensas a experimentar fenómenos de desestabilización física (cremado) debido a sus tamaños de gota mayores (Kanouni et al., 2002; Jiao & Burgess, 2003; Schmidts et al., 2009; Chávez-Páez et al., 2012; Balcaen et al., 2017; Yildirim et al., 2017). En esta Tesis se ha elegido el par Tween 20–PGPR como emulgentes hidrofílico e hidrofóbico, respectivamente, para la formación de emulsiones $W_1/Og/W_2$, puesto que esta pareja ya se ha utilizado con éxito en diferentes ocasiones para producir emulsiones múltiples estables (Wolf et al., 2009; Matos et al., 2018; Oppermann et al., 2018; Anarakdim et al., 2020). Con respecto a sus concentraciones, el análisis de la varianza (ANOVA) reveló que tanto la ratio emulgente hidrofóbico:emulgente hidrofílico en la emulsión W_1/Og como la concentración de emulgente hidrofílico en W_2 ejercieron un efecto estadísticamente significativo sobre el tamaño medio de gota: un aumento en cualquiera de estas dos variables independientes daría lugar a gotas de fase dispersa más pequeñas. En efecto, en el caso de la emulsión W_1/Og , un aumento en la concentración de emulgente hidrofóbico permite rodear y estabilizar una superficie mayor de gotas de W_1 y, por tanto, éstas pueden ser más pequeñas y estables aunque eso conlleve una mayor superficie expuesta; de forma análoga, en el caso de la emulsión secundaria $(W_1/Og)/W_2$, el aumento en la cantidad de emulgente hidrofílico permite recubrir una superficie mayor de gotas de fase dispersa (W_1/Og) y obtener tamaños más pequeños.

Una vez establecido el modelo matemático que permite ajustar el diámetro volumétrico de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas mediante homogenización a alta velocidad, 30 días después de su elaboración, en función de las variables independientes consideradas y de sus correspondientes interacciones, se halló la formulación y condiciones de operación óptimas para minimizar ese diámetro. En efecto, en relación a la emulsión primaria W_1/Og , estableciendo una concentración total de emulgente del 6.9 % p/p, una ratio emulgente hidrofóbico:emulgente hidrofílico del 90 % p/p y una velocidad de homogenización de 9000 rpm; y con respecto a la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$, fijando una fracción de fase dispersa (W_1/Og) del 0.16 % p/p, una concentración de emulgente hidrofílico en W_2 del 13.0 % p/p y una velocidad de homogenización de 5400 rpm, se podría llegar a alcanzar un tamaño medio de gota de la

emulsión múltiple mínimo. La Figura 144 muestra las superficies de respuesta ajustadas del tamaño medio de gota para cada par de variables independientes; en cada gráfico, el resto de variables se encontraron en su valor medio.

Figura 144. Superficie de respuesta estimada para el tamaño medio de gota de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.



4.4.3. Efecto de las variables de operación sobre la estabilidad oxidativa

La Tabla 48 recoge la evolución de la concentración de hidroperóxidos lipídicos (productos primarios de la oxidación) con el tiempo a 25 °C. Esta evolución se presenta en términos del porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos a un tiempo

Tabla 48. Evolución de la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ con el tiempo a 25 °C.

N° de experimento	Aumento [H. lipídicos], %				
	Día 9	Día 16	Día 23	Día 31	Día 40
Muestra control	615.2	1422.0	2074.1	2293.8	3169.2
1	10.3	20.7	32.3	25.6	42.7
2	9.7	34.0	47.0	45.0	63.4
3	10.5	23.7	33.5	24.1	40.6
4	11.0	24.1	29.3	38.8	57.8
5	10.8	22.1	29.4	27.1	42.5
6	11.9	27.8	35.8	29.7	53.2
7	8.5	24.8	32.7	20.4	43.8
8	9.7	25.3	34.8	30.0	49.9
9	10.4	26.8	34.5	30.3	46.8
10	12.7	25.0	33.0	40.4	65.2
11	11.4	22.3	29.3	30.1	56.2
12	15.5	28.1	34.7	41.3	52.6
13	9.3	26.7	30.4	24.7	36.1
14	10.3	24.5	29.2	31.4	57.9
15	4.8	15.8	14.7	6.9	30.5
16	11.7	19.5	17.3	12.4	31.2
17	9.6	19.2	14.5	10.1	33.1
18	9.0	23.7	25.6	21.8	41.9
19	2.9	8.8	10.5	2.5	18.2
20	8.1	17.3	17.9	11.5	32.0
21	7.9	25.5	25.3	16.2	40.2
22	8.9	25.3	27.4	20.4	37.0
23	8.1	23.6	22.7	14.0	30.5
24	7.2	21.4	35.3	31.6	48.0
25	10.3	25.7	28.2	23.1	44.5
26	12.3	25.7	34.8	35.7	58.7
27	8.1	22.8	26.9	24.1	42.1
28	8.9	22.5	26.9	26.0	41.4
29	10.6	24.4	26.9	21.1	35.8
30	9.7	23.4	36.2	26.1	44.5
31	8.0	24.9	25.7	21.1	41.4
32	9.3	24.9	34.8	26.1	39.3
33	9.0	19.6	24.9	19.4	38.2
34	9.1	25.1	30.4	23.2	40.4
35	10.6	26.3	36.7	33.6	68.5
36	10.7	26.5	33.5	33.1	61.3

determinado con respecto a la concentración medida a tiempo 0, de acuerdo con la ecuación:

$$\% \text{ Aumento } [H. \text{ lipídicos}] = \frac{[H. \text{ lipídicos}]_{Día \ x} - [H. \text{ lipídicos}]_{Día \ 0}}{[H. \text{ lipídicos}]_{Día \ 0}} \cdot 100 \quad \text{Ec. [48]}$$

Como ya se ha explicado en capítulos anteriores, los aumentos y disminuciones de la cantidad de hidroperóxidos con el tiempo corresponden a periodos en los que predominan las reacciones de formación y de descomposición de productos primarios de la oxidación, respectivamente. En todo caso, el grado de oxidación del sistema oleogelificado sin emulsionar fue mucho mayor que emulsionado en una emulsión W₁/Og/W₂. Un estudio previo de Willett & Akoh (2019) ya había arrojado una tendencia similar en micropartículas de alginato: tanto el aceite de pescado enriquecido con PUFAs ω-3 sin gelificar como gelificado, ambos encapsulados en micropartículas de alginato utilizando el método de la emulsión múltiple, presentaron valores OSI y PV significativamente superiores que sin microencapsular; asimismo, el oleogel (microencapsulado o no microencapsulado) también presentó valores OSI y PV significativamente mayores que los del aceite sin gelificar correspondiente. Estos resultados demuestran que las estrategias de oleogelificación, emulsificación o microencapsulación permiten mejorar la estabilidad oxidativa de aceites enriquecidos con PUFAs ω-3 debido a la protección que ejercen frente a la exposición al oxígeno, que es uno de los factores principales que origina oxidación lipídica (Lee et al., 2019).

A continuación, se presenta el modelo cuadrático ajustado para la evolución de la concentración de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones W₁/Og/W₂ preparadas mediante homogenización a alta velocidad, 31 días después de su elaboración, en función de las variables independientes consideradas y de sus interacciones.

$$\begin{aligned} \% \text{ Aumento } [H. \text{ lipídicos}] = & 23.7115 + 1.7985*[Em.]_{TOTAL} - 2.54413*Ratio \\ & [Em.]_{LIPO./HIDRO.} - 3.5185*Velocidad_{(W1/Og)} + 1.12225*[F. \text{ dispersa}]_{(W1/Og)} - \\ & 5.4685*Velocidad_{(W1/Og/W2)} + 3.21453*[Em.]_{TOTAL}^2 + 1.70069*[Em.]_{TOTAL}*Ratio \\ & [Em.]_{LIPO./HIDRO.} - 1.48119*[Em.]_{TOTAL}*Velocidad_{(W1/Og)} - \\ & 1.39256*[Em.]_{TOTAL}*[Em.]_{HIDRO.} + 0.713437*[Em.]_{TOTAL}*Velocidad_{(W1/Og/W2)} + \\ & 0.588156*Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.}^2 - 2.05869*Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.}*Velocidad_{(W1/Og)} - \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &4.41469 * Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.} * [F. dispersa]_{(W1/Og)} + 1.12019 * Ratio \\
 &[Em.]_{LIPO./HIDRO.} * [Em.]_{HIDRO.} - 2.21331 * Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.} * Velocidad_{(W1/Og/W2)} - \\
 &0.946719 * Velocidad_{(W1/Og)}^2 + 2.07069 * Velocidad_{(W1/Og)} * [F. dispersa]_{(W1/Og)} - \\
 &4.41234 * [F. dispersa]_{(W1/Og)}^2 + 0.646313 * [F. dispersa]_{(W1/Og)} * [Em.]_{HIDRO.} - \\
 &2.49294 * [F. dispersa]_{(W1/Og)} * Velocidad_{(W1/Og/W2)} + 0.520656 * [Em.]_{HIDRO.}^2 - \\
 &1.05181 * [Em.]_{HIDRO.} * Velocidad_{(W1/Og/W2)} + 2.92778 * Velocidad_{(W1/Og/W2)}^2 \quad \text{Ec. [49]}
 \end{aligned}$$

El valor p del primer modelo obtenido al considerar todas las variables independientes y sus correspondientes interacciones resultó ser superior a 0.05, indicando que no existe una relación significativa entre las variables dependiente e independientes. Eliminando secuencialmente aquellas variables estadísticamente menos significativas ($[Em.]_{TOTAL} * [F. dispersa]_{(W1/Og)}$, $Velocidad_{(W1/Og)} * [Em.]_{HIDRO.}$, $Velocidad_{(W1/Og)} * Velocidad_{(W1/Og/W2)}$ y $[Em.]_{HIDRO.}$), se pudo simplificar el modelo y se llegó a obtener uno adecuado (Ec. 49). El nuevo modelo matemático ($p_{MOD} = 0.0333$) presentó un R^2 del 84.34 % y un valor p_{LOF} de 0.9616 (Tabla 49) que, al ser mayor de 0.05, puede decirse que sí que es apropiado para ajustar los datos observados con un nivel de confianza del 95 %. Asimismo, la ausencia de un patrón definido en la gráfica de los residuos contra los valores ajustados o predichos (Figura 145) confirma la idoneidad del modelo propuesto.

Figura 145. Gráfica de residuos para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.

Gráfica de residuos para % Aumento [H. lipídicos] a alta velocidad

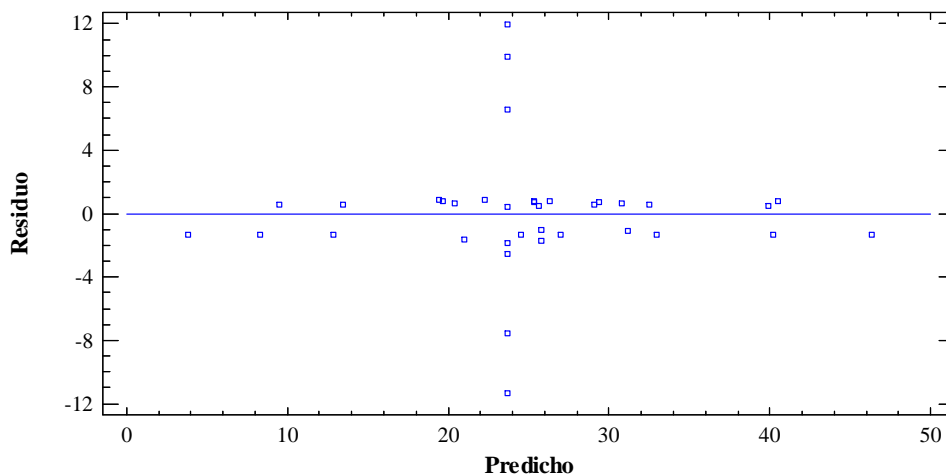
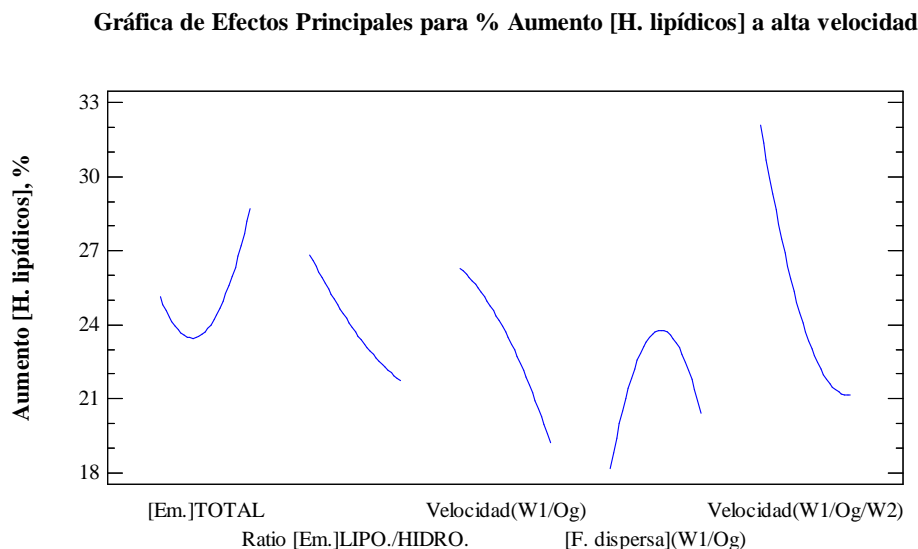


Tabla 49. Análisis de la varianza (ANOVA) para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor p^*
[Em.] _{TOTAL}	25.8768	1	25.8768	0.43	0.5283
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.}	155.342	1	155.342	2.61	0.1450
Velocidad _(W1/Og)	99.0387	1	99.0387	1.66	0.2333
[F. dispersa] _(W1/Og)	10.0756	1	10.0756	0.17	0.6917
Velocidad _(W1/Og/W2)	239.236	1	239.236	4.02	0.0800
[Em.] _{TOTAL} ²	330.663	1	330.663	5.55	0.0462
[Em.] _{TOTAL} *Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.}	46.2774	1	46.2774	0.78	0.4038
[Em.] _{TOTAL} *Velocidad _(W1/Og)	35.1027	1	35.1027	0.59	0.4647
[Em.] _{TOTAL} *[Em.] _{HIDRO.}	10.3426	1	10.3426	0.17	0.6879
[Em.] _{TOTAL} *Velocidad _(W1/Og/W2)	8.14389	1	8.14389	0.14	0.7212
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} ²	11.0697	1	11.0697	0.19	0.6778
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} *Velocidad _(W1/Og)	22.6037	1	22.6037	0.38	0.5550
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} *[F. dispersa] _(W1/Og)	311.831	1	311.831	5.24	0.0514
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} *[Em.] _{HIDRO.}	20.0771	1	20.0771	0.34	0.5775
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} *Velocidad _(W1/Og/W2)	26.1267	1	26.1267	0.44	0.5264
Velocidad _(W1/Og) ²	28.6808	1	28.6808	0.48	0.5074
Velocidad _(W1/Og) *[F. dispersa] _(W1/Og)	68.6039	1	68.6039	1.15	0.3145
[F. dispersa] _(W1/Og) ²	623.001	1	623.001	10.46	0.0120
[F. dispersa] _(W1/Og) *[Em.] _{HIDRO.}	2.22784	1	2.22784	0.04	0.8515
[F. dispersa] _(W1/Og) *Velocidad _(W1/Og/W2)	99.4358	1	99.4358	1.67	0.2324
[Em.] _{HIDRO.} ²	8.67465	1	8.67465	0.15	0.7127
[Em.] _{HIDRO.} *Velocidad _(W1/Og/W2)	17.701	1	17.701	0.30	0.6005
Velocidad _(W1/Og/W2) ²	274.301	1	274.301	4.61	0.0642
Falta de ajuste	33.8335	4	8.45838	0.14	<i>0.9616</i>
Error puro	476.5	8	59.5625		
Total (corr.)	3259.18	35			

* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

Figura 146. Gráfica de efectos principales para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.



El análisis de la varianza (ANOVA) de los valores observados (Tabla 49) permitió determinar el valor p para cada una de las variables independientes y de sus interacciones. De todas ellas, la concentración de fase dispersa (W_1/Og) en la emulsión múltiple y la concentración total de emulgente en la emulsión primaria, ambas en orden cuadrático, fueron las únicas variables que arrojaron un valor p inferior a 0.05, por lo que puede afirmarse que son las únicas que ejercieron un efecto estadísticamente significativo sobre la oxidación lipídica primaria. La forma en que influyen estos factores sobre la variable respuesta queda puesta de manifiesto en la gráfica de efectos principales (Figura 146).

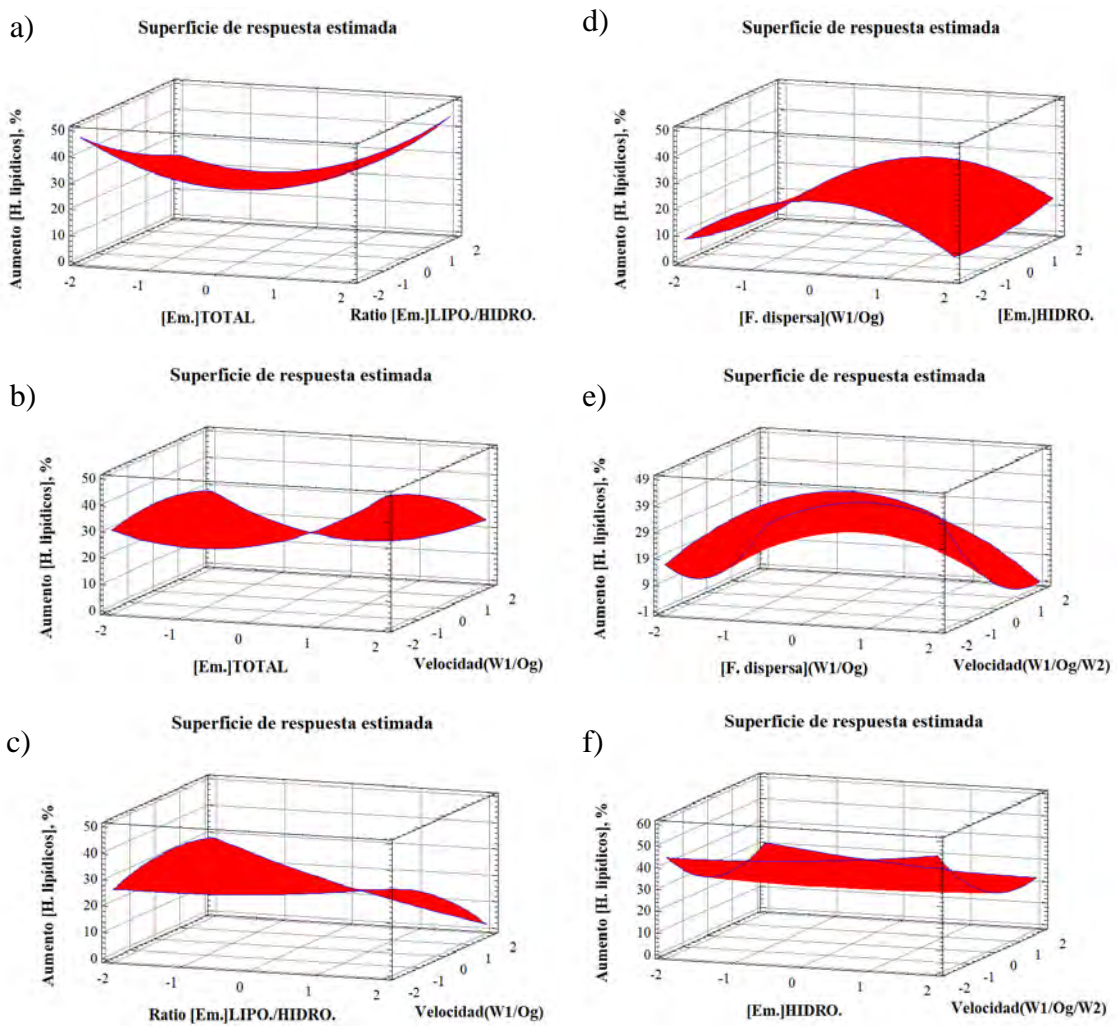
Con respecto a la concentración de fase dispersa (W_1/Og) en la emulsión múltiple, la Figura 146 revela que una fracción de fase dispersa más alta da lugar a una mayor oxidación lipídica primaria. Este mismo efecto también fue observado en las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta velocidad, si bien es cierto que en aquéllas la influencia fue tanto en su término lineal como cuadrático mientras que en éstas la influencia fue solamente en orden cuadrático. Y es que, como ya se ha mencionado previamente, la fase dispersa está constituida por un aceite de pescado enriquecido con PUFAs ω -3, que es el único componente susceptible de sufrir oxidación lipídica. Por tanto, una mayor concentración de fase dispersa implica una mayor cantidad de sustrato que puede ser oxidado.

En relación a la concentración total de emulgente en la emulsión primaria, la Figura 146 revela que una concentración más alta también da lugar a una mayor oxidación lipídica primaria. Una posible justificación para ello se encuentra en la concentración y el tamaño promedio de gota de la fase acuosa interna, W_1 : tamaños de gota más pequeños implican un mayor área interfacial que a menudo se asocia con un incremento de la oxidación lipídica como consecuencia del aumento del área de contacto entre la fase oleosa y los prooxidantes de la fase acuosa (Duque-Estrada et al., 2019). Así, el aumento de la concentración total de emulgente en la emulsión primaria conducirá a una reducción sustancial del tamaño medio de gota de la W_1 que resulta en un área interfacial más grande. Sin embargo, la importancia de esta característica no está del todo clarificada en la literatura científica ya que, cuando se ha estudiado la influencia de este parámetro, los resultados obtenidos han sido diversos. En algunos estudios obtuvieron un incremento de la oxidación lipídica cuando se incrementa el área superficial (Gohtani et al., 1999; Duque-Estrada et al., 2019). En otros, concluyeron que se produjo un incremento en la velocidad de la oxidación lipídica al disminuir el área superficial (Nakaya et al., 2005; Imai et al., 2008). Otros autores reportaron que la oxidación lipídica no estaba muy influenciada por el área superficial (Kiokias et al., 2007; Sun & Gunasekaran, 2009). Esta variabilidad en los resultados sugiere que, probablemente, el área interfacial de la gota no sea el parámetro más importante que influye en la cinética de la oxidación lipídica: hay evidencias de que el tamaño de gota y el área interfacial pueden afectar a la oxidación lipídica pero el mecanismo de reacción depende de la composición de la emulsión.

Una vez establecido el modelo matemático que permite ajustar el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas mediante homogenización a alta velocidad, 31 días después de su elaboración, en función de las variables independientes consideradas y de sus correspondientes interacciones, se halló la formulación y condiciones de operación óptimas para minimizar ese porcentaje. En efecto, en relación a la emulsión primaria W_1/Og , estableciendo una concentración total de emulgente del 6.9 % p/p, una ratio emulgente hidrofóbico:emulgente hidrofílico del 90 % p/p y una velocidad de homogenización de 9000 rpm; y con respecto a la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$, fijando una fracción de fase dispersa (W_1/Og) del 0.16 % p/p, una concentración de emulgente hidrofílico en W_2 del 13.0 % p/p y una velocidad

de homogenización de 5400 rpm, se podría llegar a alcanzar un porcentaje de aumento de productos primarios de la oxidación mínimo. La Figura 144 muestra las superficies de respuesta ajustadas del porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos para cada par de variables independientes; en cada gráfico, el resto de variables se encontraron en su valor medio.

Figura 147. Superficie de respuesta estimada para el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.



Una vez analizada la oxidación lipídica primaria y los factores que más le afectan, la Tabla 50 recoge la evolución de la concentración de compuestos aldehídicos (productos secundarios de la oxidación) con el tiempo a 25 °C.

Tabla 50. Evolución de la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ con el tiempo a 25 °C.

N° de experimento	[Compuestos aldehídicos], mg/L				
	Día 9	Día 16	Día 23	Día 31	Día 40
Muestra control	388.2	453.8	521.2	661.2	880.1
1	5.5	5.5	6.0	4.6	6.5
2	3.5	3.3	4.3	4.3	4.8
3	1.9	2.7	2.8	2.7	3.1
4	3.4	4.4	5.9	6.8	6.2
5	5.9	5.0	7.9	7.2	8.2
6	2.6	3.6	3.5	2.9	3.3
7	4.8	4.6	6.9	6.5	6.4
8	2.9	3.9	3.8	3.9	4.7
9	2.8	2.7	2.9	3.3	3.7
10	7.6	6.9	7.5	9.0	10.0
11	9.9	9.3	10.8	13.1	17.3
12	8.3	8.6	7.7	5.4	5.1
13	8.1	7.0	9.6	8.8	9.0
14	3.5	4.3	5.1	5.4	5.9
15	2.7	2.5	2.1	2.4	1.9
16	1.9	1.9	1.4	1.8	1.8
17	4.1	3.8	4.5	4.7	5.1
18	3.5	4.1	4.0	4.4	4.3
19	0.4	0.1	0.1	0.1	0.7
20	1.5	1.2	1.2	1.6	1.7
21	1.9	1.8	2.0	2.5	2.4
22	1.5	1.9	1.7	1.9	1.9
23	1.6	3.5	1.6	1.3	1.9
24	2.0	2.4	3.0	3.2	3.5
25	3.2	3.1	3.5	2.4	3.2
26	2.7	2.9	4.1	5.1	6.3
27	1.9	2.8	2.4	2.8	2.8
28	1.2	1.8	1.2	1.7	2.5
29	1.7	2.1	2.0	2.3	2.4
30	5.3	6.8	9.0	8.0	9.8
31	2.6	3.1	3.0	2.8	3.0
32	1.6	1.9	2.3	2.5	2.4
33	1.8	3.0	2.6	2.7	3.2
34	1.9	3.8	2.9	3.2	3.5
35	2.4	3.1	3.0	4.7	5.1
36	2.7	3.3	4.3	4.7	7.7

Como ya también se ha comentado en capítulos anteriores, los aumentos y disminuciones de la cantidad de compuestos aldehídicos con el tiempo corresponden a periodos en los que predominan las reacciones de formación y de descomposición de productos secundarios de la oxidación, respectivamente, productos cuya formación se produce a partir de los hidroperóxidos lipídicos y cuya descomposición da lugar a toda una serie de compuestos orgánicos más o menos volátiles de sabor y olor desagradables. Aquí también el grado de oxidación del sistema oleogelificado sin emulsionar fue mucho mayor que emulsionado en una emulsión $W_1/Og/W_2$.

A continuación, se presenta el modelo cuadrático ajustado para la evolución de la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas mediante homogenización a alta velocidad, 31 días después de su elaboración, en función de las variables independientes consideradas y de sus interacciones.

$$\begin{aligned}
 [Compuestos\ aldehídicos] = & 3.14036 + 0.9085*[Em.]_{TOTAL} - 0.288*Ratio \\
 [Em.]_{LIPO./HIDRO.} - & 0.7535*Velocidad_{(W1/Og)} + 0.576*[F.\ dispersa]_{(W1/Og)} - \\
 1.529*[Em.]_{HIDRO.} - & 0.46525*Velocidad_{(W1/Og/W2)} + 0.608479*[Em.]_{TOTAL}^2 + \\
 0.2935*[Em.]_{TOTAL}*Ratio & [Em.]_{LIPO./HIDRO.} + 0.072*[Em.]_{TOTAL}*Velocidad_{(W1/Og)} - \\
 1.53463*[Em.]_{TOTAL}*[F.\ dispersa]_{(W1/Og)} & - 1.21337*[Em.]_{TOTAL}*[Em.]_{HIDRO.} + \\
 1.2575*[Em.]_{TOTAL}*Velocidad_{(W1/Og/W2)} & + 0.187479*Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.}^2 + \\
 0.64825*Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.}*Velocidad_{(W1/Og)} & + 0.703375*Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.}*[F. \\
 dispersa]_{(W1/Og)} + 0.670375*Ratio & [Em.]_{LIPO./HIDRO.}*[Em.]_{HIDRO.} - 0.24925*Ratio \\
 [Em.]_{LIPO./HIDRO.}*Velocidad_{(W1/Og/W2)} & + 0.131979*Velocidad_{(W1/Og)}^2 + \\
 0.880875*Velocidad_{(W1/Og)}*[F. & dispersa]_{(W1/Og)} + \\
 0.271375*Velocidad_{(W1/Og)}*[Em.]_{HIDRO.} - & 0.67025*Velocidad_{(W1/Og)}*Velocidad_{(W1/Og/W2)} \\
 - 0.333271*[F.\ dispersa]_{(W1/Og)}^2 & + 1.56775*[F.\ dispersa]_{(W1/Og)}*[Em.]_{HIDRO.} - \\
 0.792125*[F.\ dispersa]_{(W1/Og)}*Velocidad_{(W1/Og/W2)} & + 0.785729*[Em.]_{HIDRO.}^2 - \\
 0.470875*[Em.]_{HIDRO.}*Velocidad_{(W1/Og/W2)} & + 0.187354*Velocidad_{(W1/Og/W2)}^2 \quad Ec. [50]
 \end{aligned}$$

El modelo matemático propuesto (Ec. 50) es capaz de explicar de manera aceptable el 93.63 % de la variabilidad en la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas mediante homogenización a alta velocidad con un valor p_{LOF} de 0.0795 (Tabla 51) que, al ser mayor de 0.05, puede decirse que sí que

es apropiado para ajustar los datos observados con un nivel de confianza del 95 %, y con un valor p_{MOD} de 0.0180, inferior a 0.05, permite afirmar que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables independientes y dependiente con un nivel de confianza del 95 %. Finalmente, la ausencia de un patrón definido en la gráfica de los residuos contra los valores ajustados o predichos (Figura 148) indica que el modelo seleccionado describe adecuadamente los datos experimentales.

Tras un análisis de la varianza (ANOVA) de los valores observados (Tabla 51), se hallaron un total de 10 efectos estadísticamente significativos ($p < 0.05$) sobre la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas mediante homogenización a alta velocidad: de igual forma que en la oxidación lipídica primaria, la concentración total de emulgente en la emulsión W_1/Og ejerció un efecto estadísticamente significativo en orden cuadrático; además, la concentración de emulgente hidrofílico en la fase acuosa externa W_2 lo hizo en su término lineal y cuadrático y un total de 7 interacciones también fueron significativas ($[Em.]_{TOTAL}*[F. dispersa]_{(W_1/Og)}$, $[Em.]_{TOTAL}*[Em.]_{HIDRO.}$, $[Em.]_{TOTAL}*Velocidad_{(W_1/Og/W_2)}$, $Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.}*[F. dispersa]_{(W_1/Og)}$, $Velocidad_{(W_1/Og)}*[F. dispersa]_{(W_1/Og)}$, $[F. dispersa]_{(W_1/Og)}*[Em.]_{HIDRO.}$ y $[F. dispersa]_{(W_1/Og)}*Velocidad_{(W_1/Og/W_2)}$). La forma en que influyen todos estos factores sobre la variable respuesta queda puesta de manifiesto en la gráfica de efectos principales (Figura 149).

Figura 148. Gráfica de residuos para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.

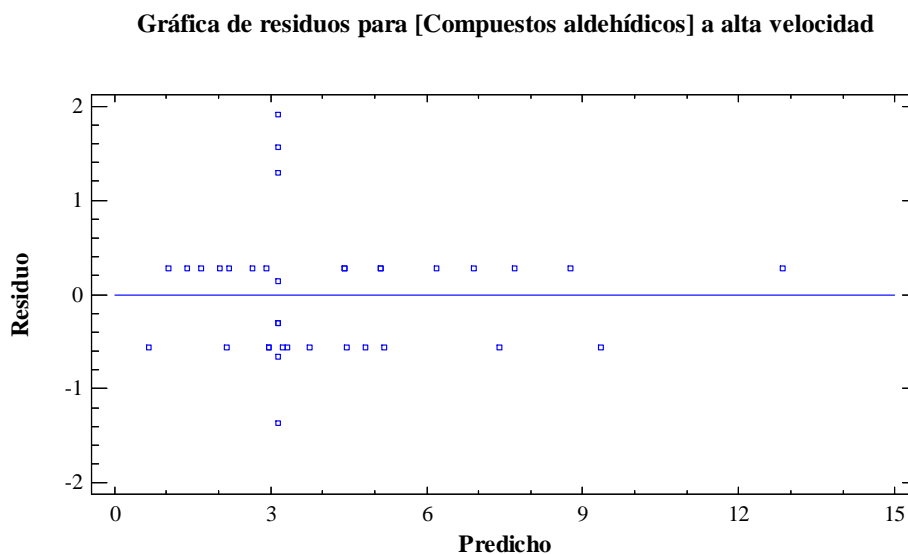
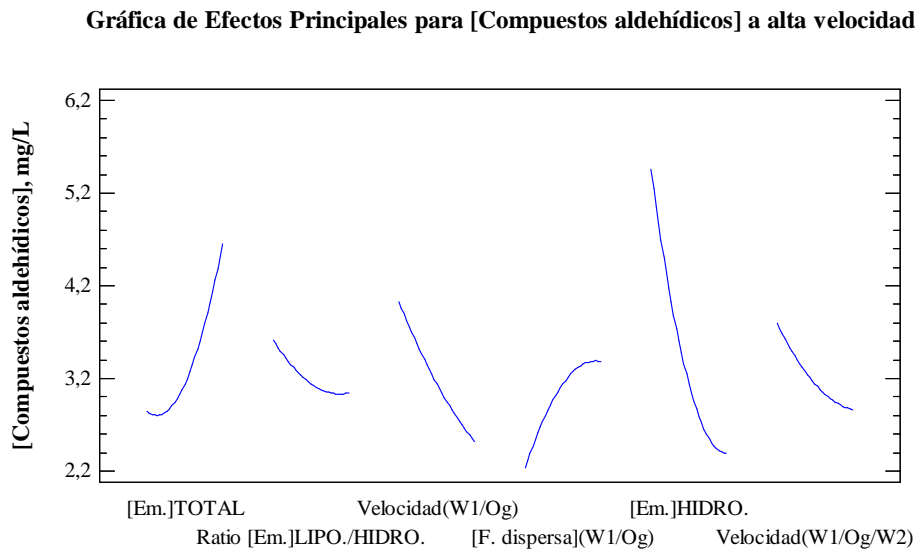


Tabla 51. Análisis de la varianza (ANOVA) para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor p^*
[Em.] _{TOTAL}	6.60298	1	6.60298	4.81	0.0644
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.}	0.663552	1	0.663552	0.48	0.5094
Velocidad _(W1/Og)	4.5421	1	4.5421	3.31	0.1118
[F. dispersa] _(W1/Og)	2.65421	1	2.65421	1.93	0.2071
[Em.] _{HIDRO.}	18.7027	1	18.7027	13.62	0.0078
Velocidad _(W1/Og/W2)	1.73166	1	1.73166	1.26	0.2986
[Em.] _{TOTAL} ²	11.8479	1	11.8479	8.63	0.0218
[Em.] _{TOTAL} *Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.}	1.37828	1	1.37828	1.00	0.3498
[Em.] _{TOTAL} *Velocidad _(W1/Og)	0.082944	1	0.082944	0.06	0.8129
[Em.] _{TOTAL} *[F. dispersa] _(W1/Og)	12.5604	1	12.5604	9.14	0.0193
[Em.] _{TOTAL} *[Em.] _{HIDRO.}	7.85215	1	7.85215	5.72	0.0481
[Em.] _{TOTAL} *Velocidad _(W1/Og/W2)	25.3009	1	25.3009	18.42	0.0036
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} ²	1.12475	1	1.12475	0.82	0.3956
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} *Velocidad _(W1/Og)	2.24122	1	2.24122	1.63	0.2422
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} *[F. dispersa] _(W1/Og)	7.91578	1	7.91578	5.76	0.0474
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} *[Em.] _{HIDRO.}	7.19044	1	7.19044	5.23	0.0560
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} *Velocidad _(W1/Og/W2)	0.331336	1	0.331336	0.24	0.6384
Velocidad _(W1/Og) ²	0.557392	1	0.557392	0.41	0.5444
Velocidad _(W1/Og) *[F. dispersa] _(W1/Og)	12.4151	1	12.4151	9.04	0.0198
Velocidad _(W1/Og) *[Em.] _{HIDRO.}	1.17831	1	1.17831	0.86	0.3852
Velocidad _(W1/Og) *Velocidad _(W1/Og/W2)	2.39592	1	2.39592	1.74	0.2281
[F. dispersa] _(W1/Og) ²	3.55422	1	3.55422	2.59	0.1517
[F. dispersa] _(W1/Og) *[Em.] _{HIDRO.}	13.1085	1	13.1085	9.54	0.0176
[F. dispersa] _(W1/Og) *Velocidad _(W1/Og/W2)	10.0394	1	10.0394	7.31	0.0305
[Em.] _{HIDRO.} ²	19.7559	1	19.7559	14.38	0.0068
[Em.] _{HIDRO.} *Velocidad _(W1/Og/W2)	3.54757	1	3.54757	2.58	0.1521
Velocidad _(W1/Og/W2) ²	1.12325	1	1.12325	0.82	0.3959
Falta de ajuste	5.77207	1	5.77207	4.20	<i>0.0795</i>
Error puro	9.6152	7	1.3736		
Total (corr.)	241.725	35			

* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

Figura 149. Gráfica de efectos principales para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.



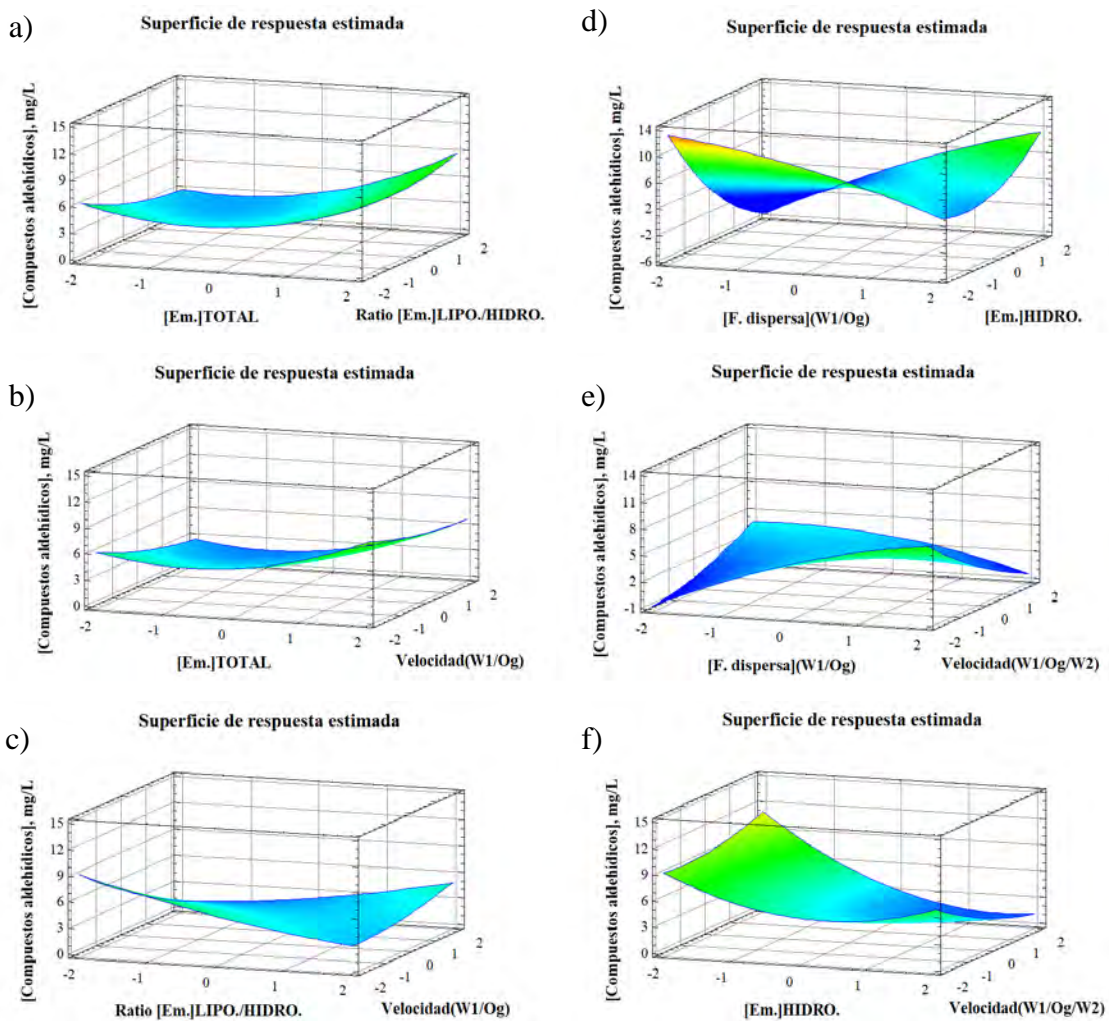
El efecto de la concentración total de emulgente en la emulsión W_1/Og sobre la oxidación lipídica secundaria es el mismo que se explicó anteriormente al analizar la oxidación primaria. Sin embargo, a diferencia de aquélla, en la oxidación secundaria la fracción de fase dispersa (W_1/Og) en la emulsión múltiple no fue una variable estadísticamente significativa, si bien es cierto que muchas de sus interacciones con las otras variables independientes (velocidades de homogenización de la emulsión primaria y secundaria, concentración de emulgente hidrofílico en W_2 y ratio emulgente hidrofóbico:emulgente hidrofílico) sí que fueron importantes.

En relación a la concentración de emulgente hidrofílico en W_2 sucede el efecto contrario al observado para la concentración total de emulgente en la emulsión primaria: la Figura 149 revela que una concentración de emulgente en W_2 más alta da lugar a una menor cantidad de productos secundarios de la oxidación. Una posible justificación para ello podría encontrarse en la buena capacidad de empaquetamiento del Tween 20 gracias a su tamaño relativamente pequeño: el Tween 20 puede actuar como barrera física en la interfase de la emulsión dificultando la difusión de diversos compuestos como el oxígeno molecular, los radicales libres o los prooxidantes (metales) hacia la interfase, evitando su interacción con los lípidos y, por tanto, los procesos oxidativos (Donnelly et al., 1998; Villiere et al., 2005). Además, su rápida adsorción interfacial, también debida a su bajo peso molecular, contribuye al aumento del espesor y la

viscosidad de la interfase y puede afectar a la oxidación lipídica secundaria (Oppermann et al., 2018).

La Figura 150 muestra las superficies de respuesta ajustadas de la concentración de compuestos aldehídicos para cada par de variables independientes; en cada gráfico, el resto de variables se encontraron en su valor medio.

Figura 150. Superficie de respuesta estimada para la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.



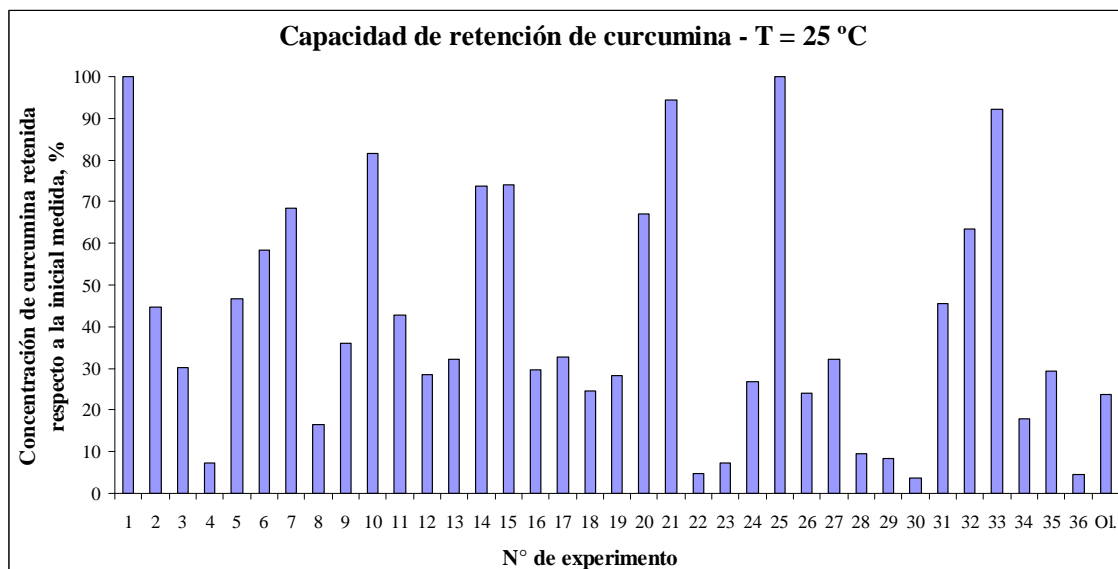
Una vez establecido el modelo matemático que permite ajustar la concentración de compuestos aldehídicos de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas mediante homogenización a alta velocidad, 31 días después de su elaboración, en función de las variables independientes consideradas y de sus correspondientes interacciones, se halló la formulación y condiciones de operación óptimas para minimizar esa concentración.

En efecto, en relación a la emulsión primaria W_1/Og , estableciendo una concentración total de emulgente del 6.1 % p/p, una ratio emulgente hidrofóbico:emulgente hidrofílico del 73 % p/p y una velocidad de homogenización de 21000 rpm; y con respecto a la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$, fijando una fracción de fase dispersa (W_1/Og) del 2.14 % p/p, una concentración de emulgente hidrofílico en W_2 del 13.0 % p/p y una velocidad de homogenización de 7000 rpm, se podría llegar a alcanzar una concentración de productos secundarios de la oxidación mínima.

Comparando estos resultados con los obtenidos para la emulsión Og/W preparada mediante homogenización a alta velocidad óptima, se puede concluir que la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$ proporcionó una mayor protección frente a la oxidación lipídica tanto primaria como secundaria: en efecto, la emulsión $W_1/Og/W_2$ redujo el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos en un 28.92 % y el de compuestos aldehídicos 16.5 veces.

4.4.4. Efecto de las variables de operación sobre la capacidad de retención de curcumina

Figura 151. Capacidad de retención de curcumina de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad 30 días después de su elaboración.



Para estudiar el impacto de las variables independientes consideradas sobre la capacidad de retención de curcumina, se analizaron sus concentraciones en el oleogel de partida y en los sistemas emulsificados $W_1/Og/W_2$ preparados a alta velocidad, mediante espectroscopía de fluorescencia los días 1, 8, 15, 22 y 30 después de su elaboración. La Figura 151 representa los porcentajes de curcumina retenida el día 30 con respecto a la concentración inicialmente medida; el resto hasta el 100 % representa los porcentajes de curcumina degradada como consecuencia del propio proceso de elaboración.

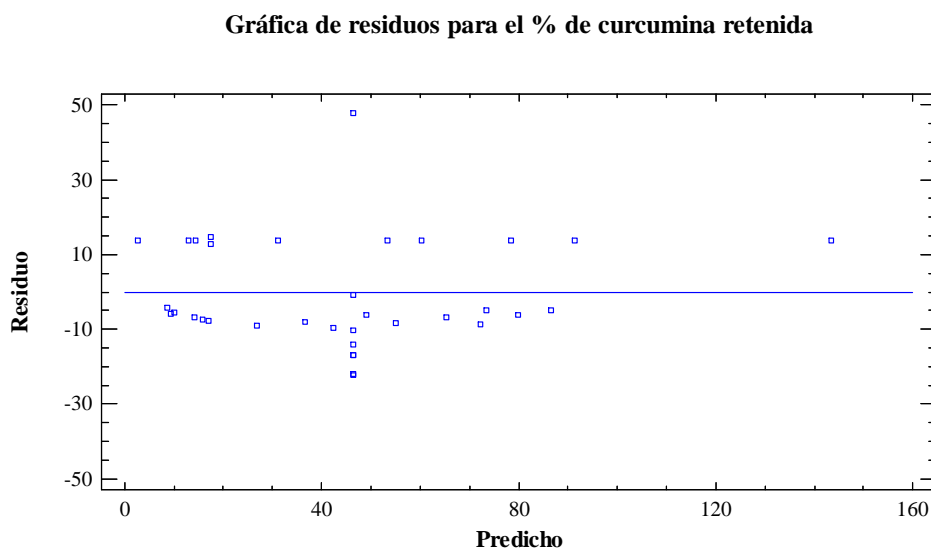
A continuación, se presenta el modelo cuadrático ajustado para las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas mediante homogenización a alta velocidad, 30 días después de su elaboración, en función de las variables independientes consideradas y de sus interacciones correspondientes.

$$\begin{aligned} \% \text{ de curcumina retenida} = & 46.3201 - 4.912*[Em.]_{TOTAL} + 18.9618*Ratio \\ & [Em.]_{LIPO./HIDRO.} - 9.52425*Velocidad_{(W1/Og)} + 11.4577*[F. dispersa]_{(W1/Og)} + \\ & 28.125*Velocidad_{(W1/Og/W2)} - 10.7726*[Em.]_{TOTAL}^2 - 3.02219*[Em.]_{TOTAL}*[F. \\ & dispersa]_{(W1/Og)} - 8.15419*[Em.]_{TOTAL}*[Em.]_{HIDRO.} - 1.42568*Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.}^2 + \\ & 28.7216*Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.}*Velocidad_{(W1/Og)} - 9.04794*Ratio \\ & [Em.]_{LIPO./HIDRO.}*[Em.]_{HIDRO.} - 6.43669*Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.}*Velocidad_{(W1/Og/W2)} + \\ & 6.50282*Velocidad_{(W1/Og)}^2 + 4.37094*Velocidad_{(W1/Og)}*[F. dispersa]_{(W1/Og)} - \\ & 4.95231*Velocidad_{(W1/Og)}*[Em.]_{HIDRO.} + 25.0479*Velocidad_{(W1/Og)}*Velocidad_{(W1/Og/W2)} - \\ & 2.25418*[F. dispersa]_{(W1/Og)}^2 - 8.12306*[F. dispersa]_{(W1/Og)}*[Em.]_{HIDRO.} + 4.79894*[F. \\ & dispersa]_{(W1/Og)}*Velocidad_{(W1/Og/W2)} - 7.22668*[Em.]_{HIDRO.}^2 - \\ & 11.2078*[Em.]_{HIDRO.}*Velocidad_{(W1/Og/W2)} + 10.2387*Velocidad_{(W1/Og/W2)}^2 \quad \text{Ec. [51]} \end{aligned}$$

El valor p del primer modelo obtenido al considerar todas las variables independientes y sus correspondientes interacciones resultó ser superior a 0.05, indicando que no existe una relación significativa entre las variables dependiente e independientes. Eliminando secuencialmente aquellas variables estadísticamente menos significativas ($[Em.]_{HIDRO.}$, $Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.}$, $[F. dispersa]_{(W1/Og)}$, $[Em.]_{TOTAL}*Velocidad_{(W1/Og)}$, $[Em.]_{TOTAL}*Ratio [Em.]_{LIPO./HIDRO.}$ y $[Em.]_{TOTAL}*Velocidad_{(W1/Og/W2)}$), se pudo simplificar el modelo y se llegó a obtener uno

adecuado (Ec. 51). El nuevo modelo matemático así obtenido, con un p_{MOD} de 0.0336, presentó un R^2 del 82.09 % y un valor p_{LOF} de 0.3001 (Tabla 52) que, siendo mayor de 0.05, puede decirse que sí que es apropiado para ajustar los datos observados con un nivel de significancia del 5 %. Asimismo, la ausencia de un patrón definido en la gráfica de los residuos contra los valores ajustados o predichos (Figura 152) confirma la idoneidad del modelo propuesto.

Figura 152. Gráfica de residuos para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.



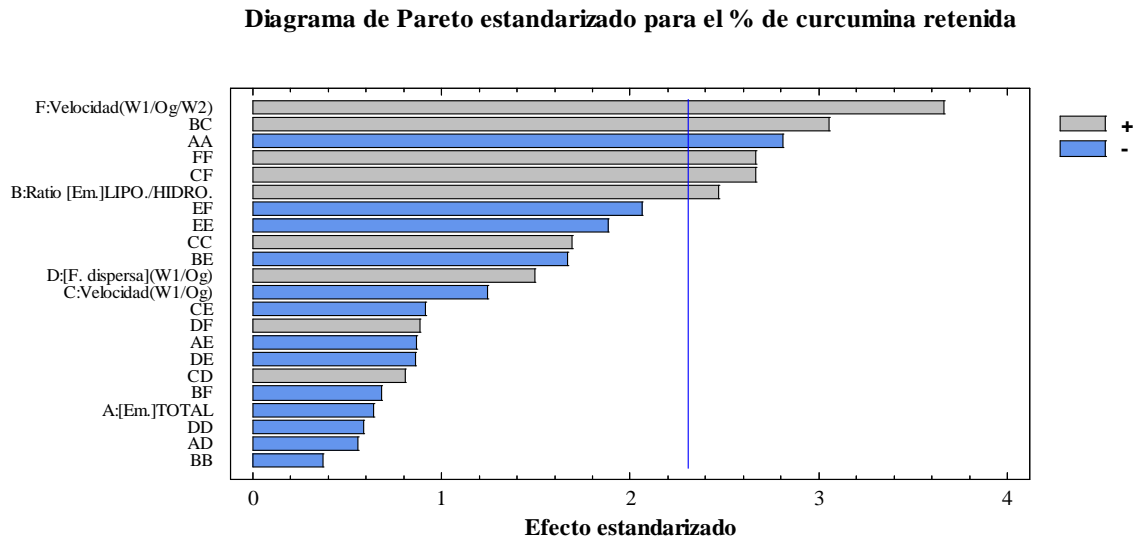
El análisis de la varianza (ANOVA) de los valores observados (Tabla 52) ha permitido determinar el valor p para cada una de las variables independientes y de sus interacciones. Así, la ratio emulgente hidrofóbico:emulgente hidrofílico en la emulsión W_1/Og ejerció un efecto estadísticamente significativo en orden lineal, mientras que la concentración total de emulgente en la emulsión primaria lo hizo en orden cuadrático; asimismo, la velocidad de homogenización de la emulsión múltiple también afectó significativamente a la capacidad de retención de curcumina tanto en su término lineal como cuadrático. Para terminar, las interacciones $Ratio [Em.]_{LIPD./HIDRO.} * Velocidad_{(W_1/Og)}$ y $Velocidad_{(W_1/Og)} * Velocidad_{(W_1/Og/W_2)}$ también fueron significativas. Todos estos factores estadísticamente significativos también pueden verse en el diagrama de Pareto estandarizado (Figura 153), con indicación de si la variable considerada ejerce un efecto positivo o negativo sobre la variable respuesta.

Tabla 52. Análisis de la varianza (ANOVA) para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones $W_1/Og/W_2$.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor p^*
[Em.] _{TOTAL}	193.022	1	193.022	0.41	0.5400
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.}	2876.38	1	2876.38	6.11	0.0386
Velocidad _(W1/Og)	725.691	1	725.691	1.54	0.2497
[F. dispersa] _(W1/Og)	1050.24	1	1050.24	2.23	0.1737
Velocidad _(W1/Og/W2)	6328.12	1	6328.12	13.43	0.0064
[Em.] _{TOTAL} ²	3713.53	1	3713.53	7.88	0.0229
[Em.] _{TOTAL} *[F. dispersa] _(W1/Og)	146.138	1	146.138	0.31	0.5928
[Em.] _{TOTAL} *[Em.] _{HIDRO.}	354.617	1	354.617	0.75	0.4109
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} ²	65.0418	1	65.0418	0.14	0.7198
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} *Velocidad _(W1/Og)	4399.62	1	4399.62	9.34	0.0157
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} *[Em.] _{HIDRO.}	1309.84	1	1309.84	2.78	0.1340
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} *Velocidad _(W1/Og/W2)	220.965	1	220.965	0.47	0.5128
Velocidad _(W1/Og) ²	1353.17	1	1353.17	2.87	0.1285
Velocidad _(W1/Og) *[F. dispersa] _(W1/Og)	305.682	1	305.682	0.65	0.4438
Velocidad _(W1/Og) *[Em.] _{HIDRO.}	392.406	1	392.406	0.83	0.3881
Velocidad _(W1/Og) *Velocidad _(W1/Og/W2)	3346.13	1	3346.13	7.10	0.0286
[F. dispersa] _(W1/Og) ²	162.602	1	162.602	0.35	0.5731
[F. dispersa] _(W1/Og) *[Em.] _{HIDRO.}	351.915	1	351.915	0.75	0.4126
[F. dispersa] _(W1/Og) *Velocidad _(W1/Og/W2)	368.477	1	368.477	0.78	0.4023
[Em.] _{HIDRO.} ²	1671.2	1	1671.2	3.55	0.0964
[Em.] _{HIDRO.} *Velocidad _(W1/Og/W2)	2009.84	1	2009.84	4.27	0.0727
Velocidad _(W1/Og/W2) ²	3354.59	1	3354.59	7.12	0.0284
Falta de ajuste	3450.69	5	690.137	1.47	<i>0.3001</i>
Error puro	3768.4	8	471.05		
Total (corr.)	40315.0	35			

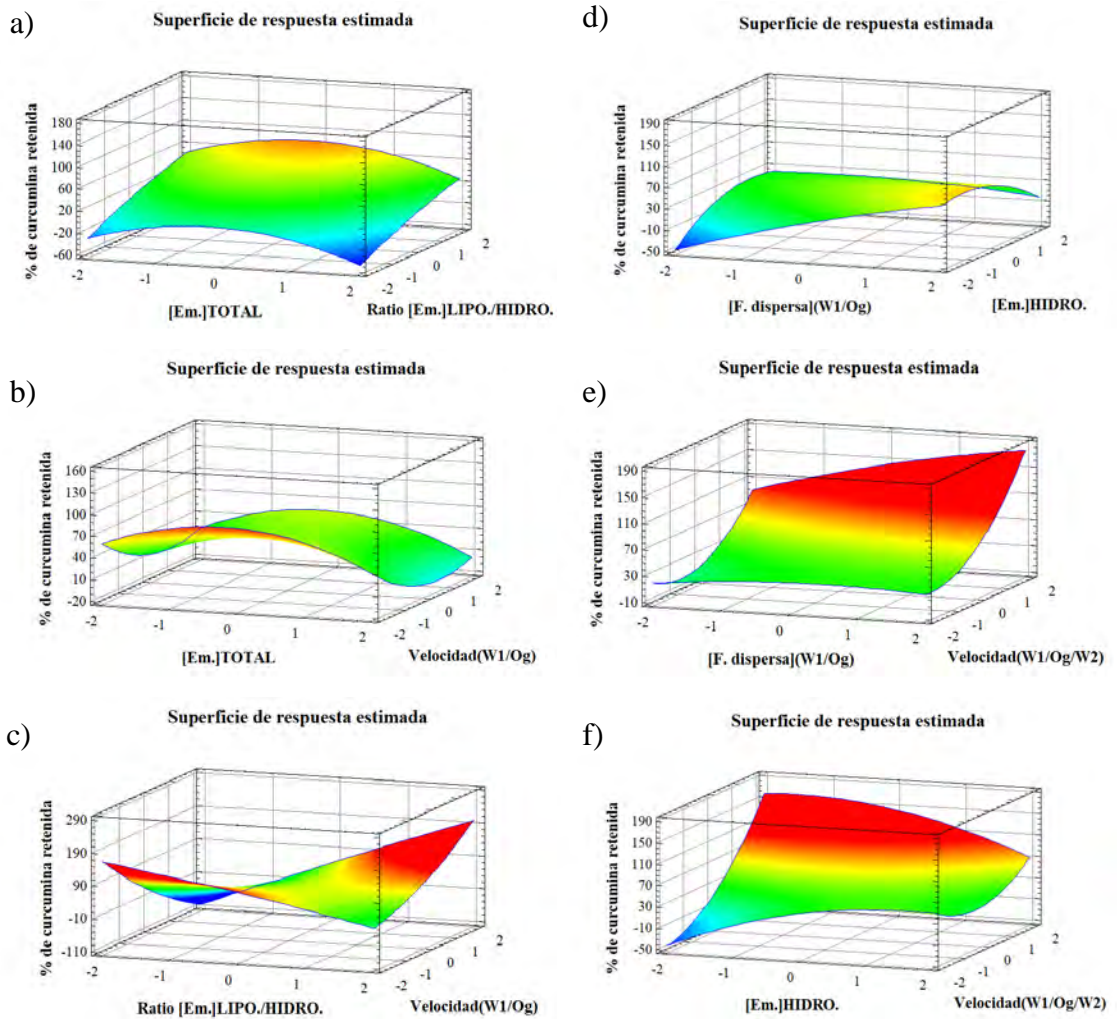
* Los valores en **negrita** señalan las variables independientes que afectaron significativamente a la variable respuesta ($p < 0.05$); el valor en *cursiva* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

Figura 153. Diagrama de Pareto estandarizado para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.



Una vez establecido el modelo matemático que permite ajustar el porcentaje de curcumina retenida en las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas mediante homogenización a alta velocidad, 30 días después de su elaboración, en función de las variables independientes consideradas y de sus correspondientes interacciones, se halló la formulación y condiciones de operación óptimas para minimizar ese porcentaje. En efecto, en relación a la emulsión primaria W_1/Og , estableciendo una concentración total de emulgente del 11.3 % p/p, una ratio emulgente hidrofóbico:emulgente hidrofílico del 89.4 % p/p y una velocidad de homogenización de 21000 rpm; y con respecto a la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$, fijando una fracción de fase dispersa (W_1/Og) del 12.3 % p/p, una concentración de emulgente hidrofílico en W_2 del 5.0 % p/p y una velocidad de homogenización de 6400 rpm, se podría llegar a alcanzar una capacidad de retención de curcumina máxima. La Figura 154 muestra las superficies de respuesta ajustadas del porcentaje de curcumina retenida para cada par de variables independientes; en cada gráfico, el resto de variables se encontraron en su valor medio.

Figura 154. Superficie de respuesta estimada para la capacidad de retención de curcumina de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas a alta velocidad.



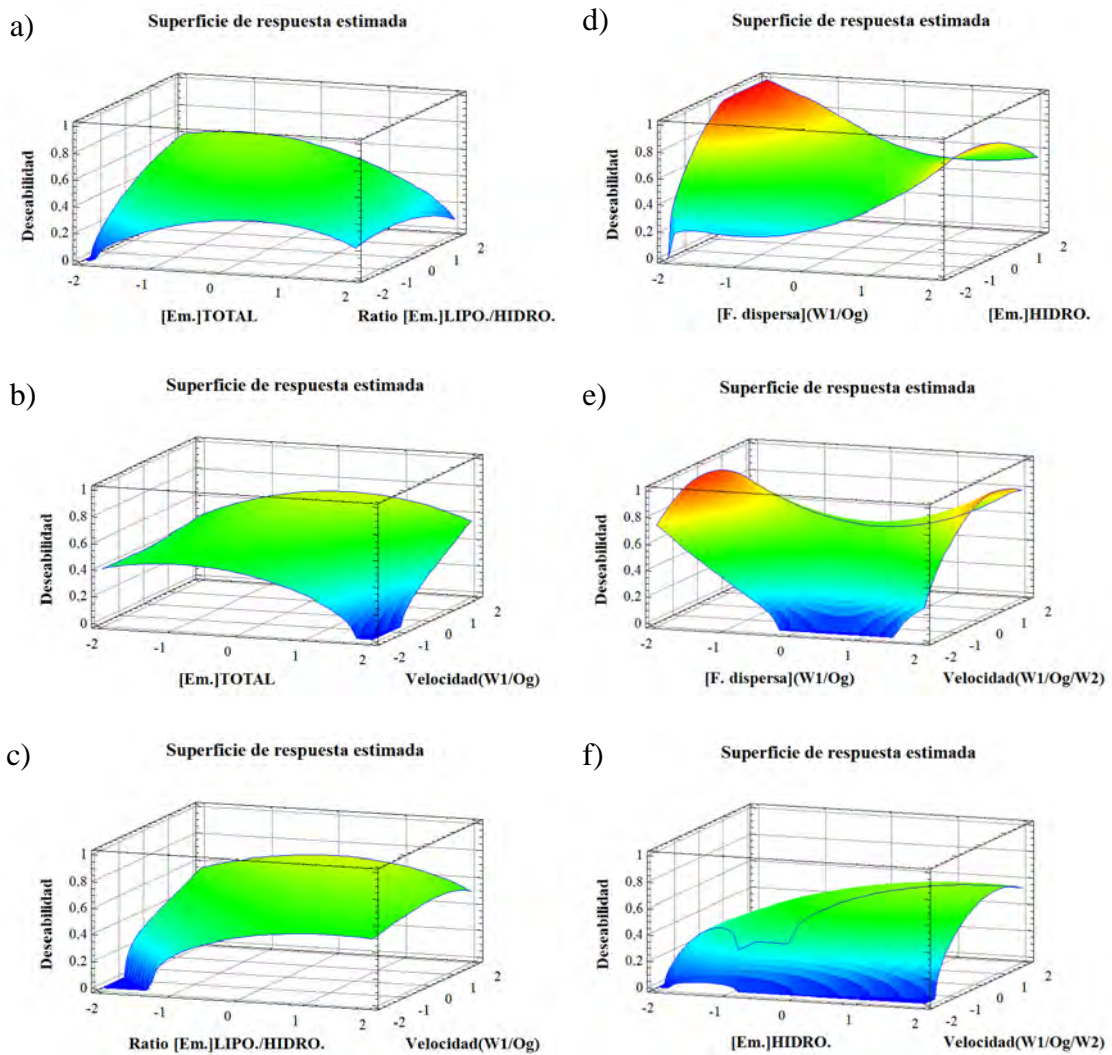
4.4.5. Optimización multivariable de la composición y las condiciones de operación del sistema emulsificado

En los apartados previos se optimizaron las variables independientes consideradas en las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas mediante homogenización a alta velocidad, 30 días después de su elaboración, para cada variable respuesta de forma individual: para minimizar el diámetro volumétrico o diámetro medio de De Brouckere y la oxidación lipídica (primaria y secundaria) y para maximizar la capacidad de retención de curcumina. Naturalmente, los conjuntos de condiciones óptimas obtenidos fueron distintos en cada variable estudiada. Por tanto, no es posible alcanzar un único conjunto de condiciones para el que todas las respuestas estudiadas, simultáneamente, se encuentren en su valor óptimo y, para hacerlo, se recurre a la metodología de superficie multi-respuesta, que proporciona un óptimo global del sistema dentro de la ventana operativa del diseño.

En primer lugar, se ha considerado optimizar las condiciones para estabilizar fisicoquímicamente la emulsión $W_1/Og/W_2$ preparada mediante homogenización a alta velocidad o, lo que es lo mismo, para minimizar el tamaño medio de gota y la oxidación lipídica primaria y secundaria de forma conjunta (objetivo de optimización 1). En base al razonamiento expuesto en el apartado 4.1.4. acerca de la secuencialidad del proceso de oxidación y siguiendo el mismo criterio que en capítulos anteriores, se ha mantenido la ponderación para las distintas variables respuesta: 5.0 para la oxidación lipídica primaria, 2.0 para la oxidación secundaria y 4.0 para el diámetro volumétrico. Bajo estas premisas, la composición y condiciones de operación óptimas del sistema emulsificado a alta velocidad son: en relación a la emulsión primaria W_1/Og , un 8.0 % p/p de emulgente total, 83.0 % p/p la ratio emulgente hidrofóbico:emulgente hidrofílico y 17800 rpm de velocidad de homogenización; con respecto a la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$, un 0.21 % p/p de fracción de fase dispersa (W_1/Og), un 8.2 % p/p de emulgente hidrofílico en W_2 y 5800 rpm de velocidad de homogenización. Según la predicción de los modelos matemáticos ajustados, en estas condiciones operativas se obtendría un tamaño medio de gota y una concentración de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos mínimas. La deseabilidad global alcanzada con este conjunto de

condiciones óptimas es de 1.0. La Figura 155 representa la deseabilidad global ajustada de esta primera función objetivo para cada par de variables independientes; en cada gráfico, el resto de variables se encontraron en su valor medio.

Figura 155. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada del primer objetivo de optimización en las emulsiones $W_1/Og/W_2$ homogenizadas a alta velocidad.



Si, por el contrario, lo que se quiere es minimizar conjuntamente el tamaño medio de gota y la oxidación lipídica primaria y secundaria y, a su vez, maximizar la capacidad de retención de curcumina de la emulsión $W_1/Og/W_2$ homogenizada a alta velocidad, varía el objetivo de optimización (objetivo de optimización 2) y, por tanto, conduce a condiciones óptimas diferentes: en relación a la emulsión primaria W_1/Og , un 8.1 % p/p de concentración total de emulgente, 89.8 % p/p de ratio emulgente

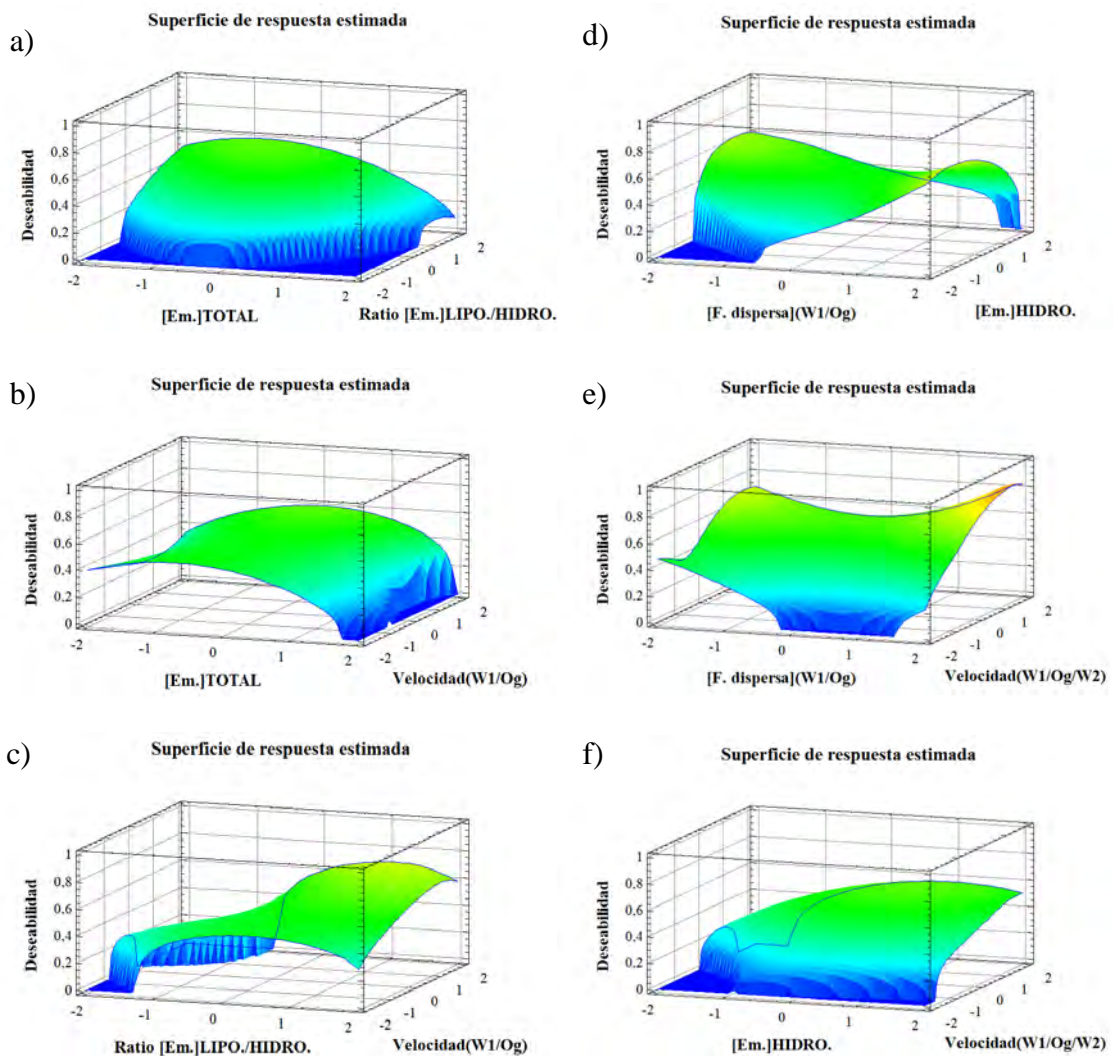
hidrofóbico:emulgente hidrofílico y 19600 rpm de velocidad de homogenización; y con respecto a la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$, un 5.1 % p/p de fracción de fase dispersa (W_1/Og), un 9.6 % p/p de emulgente hidrofílico en W_2 y 6400 rpm de velocidad de homogenización. Esta formulación y condiciones de operación de la emulsión permitirían obtener un tamaño medio de gota, una concentración de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos mínimas y una capacidad de retención de curcumina máxima, alcanzando una deseabilidad global de 1.0. Para este segundo objetivo de optimización, se mantuvieron los pesos asignados a cada respuesta en capítulos anteriores: 4.0 para el diámetro volumétrico, 5.0 para la oxidación lipídica primaria, 2.0 para la oxidación secundaria y 3.0 para la capacidad de retención de curcumina. La Figura 156 representa la deseabilidad global ajustada para este segundo objetivo de optimización en función de cada par de variables independientes; en cada gráfico, el resto de variables se encontraron en su valor medio.

A modo de resumen y para concluir con este apartado, la Tabla 53 recoge los conjuntos de condiciones óptimas para los dos objetivos de optimización definidos en las emulsiones $W_1/Og/W_2$ homogenizadas a alta velocidad, 30 días después de su elaboración.

Tabla 53. Conjunto de condiciones óptimas para los dos objetivos de optimización de las emulsiones $W_1/Og/W_2$.

Variable independiente	Objetivo de optimización 1	Objetivo de optimización 2
Emulsión primaria W_1/Og		
[Em.] _{TOTAL} , % p/p	8.0	8.1
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} , % p/p	83.0	89.8
Velocidad _(W_1/Og) , rpm	17800	19600
Emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$		
[F. dispersa] _(W_1/Og) , % p/p	0.21	5.1
[Em.] _{HIDRO.} , % p/p	8.2	9.6
Velocidad _($W_1/Og/W_2$) , rpm	5800	6400
Deseabilidad global	1.0	1.0

Figura 156. Superficie de respuesta estimada para la deseabilidad global ajustada del segundo objetivo de optimización en las emulsiones $W_1/Og/W_2$ homogenizadas a alta velocidad.

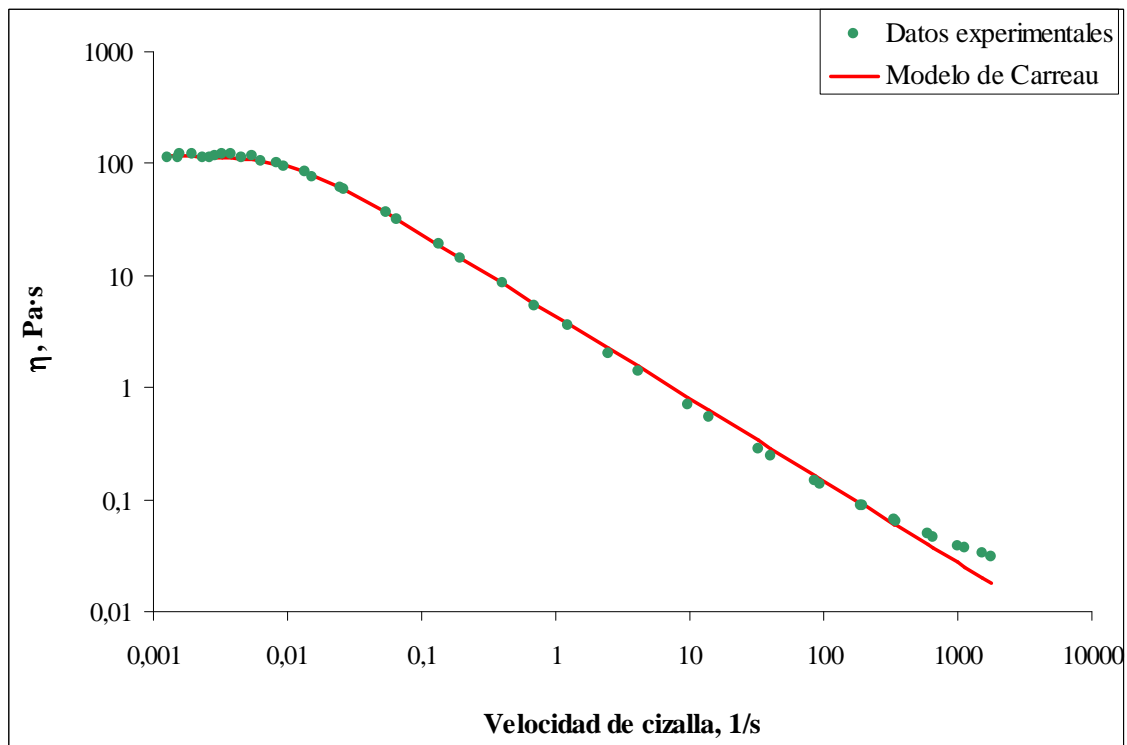


4.4.6. Estudio reológico de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima

Una vez obtenida la formulación y condiciones de operación óptimas del sistema de liberación basado en emulsiones $W_1/Og/W_2$ rico en PUFAs ω -3 y curcumina (en relación a la emulsión primaria W_1/Og , un 8.8 % p/p de concentración total de emulgente, 77.5 % p/p de ratio emulgente hidrofóbico:emulgente hidrofílico y 21000 rpm de velocidad de homogenización; y con respecto a la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$,

un 5.1 % p/p de fracción de fase dispersa (W_1/Og), un 13.0 % p/p de emulgente hidrofílico en W_2 y 5800 rpm de velocidad de homogenización), se estudió su comportamiento reológico a temperatura constante (25 °C), y más concretamente, la curva de viscosidad y los módulos viscoelásticos en función de la frecuencia –para determinar la zona viscoelástica lineal, previamente se realizó un barrido de esfuerzos. La Figura 157 muestra, en escala doblemente logarítmica, la viscosidad de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima para distintas velocidades de cizalla comprendidas en el intervalo de 0.001124 s^{-1} a 1511 s^{-1} .

Figura 157. Curva de viscosidad de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima a 25 °C.



Al igual que sucedió en los sistemas de liberación anteriores, la curva de viscosidad obtenida para la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima representa un comportamiento pseudoplástico, es decir, su viscosidad disminuye de 123.0 Pa·s a 0.03139 Pa·s al aumentar la velocidad de cizalla en el intervalo antes indicado, fenómeno que habitualmente está relacionado con una reorientación de las gotículas del sistema en la dirección del flujo. De igual forma que en la emulsión Og/W óptima, la curva de viscosidad presenta una pequeña meseta newtoniana –de viscosidad constante– para velocidades de cizalla muy bajas, cercanas al reposo, y para velocidades de agitación

más altas, la viscosidad va disminuyendo siguiendo una evolución como la que se muestra en la Figura 157. Y es que, en efecto, la mayoría de las emulsiones concentradas presentan un comportamiento no newtoniano y viscoelástico (Bengoechea-Ruiz, 2006).

Aplicando el *modelo de Carreau* (Ec. 46) a la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima y considerando una viscosidad inicial, η_0 , igual a 117.0 Pa·s y una viscosidad límite, η_∞ , igual a 0 Pa·s, se obtuvieron los siguientes parámetros: $\lambda = 89.355 \text{ s}^2$ y $n = 0.266$. El valor de n obtenido, muy por debajo de la unidad y bastante similar al del oleogel óptimo, vuelve a poner de manifiesto un marcado comportamiento pseudoplástico característico de sistemas estructurados. A partir de esos valores de los parámetros, se ha representado el *modelo de Carreau* en la Figura 157. De acuerdo con la mencionada figura, se observa un buen grado de ajuste entre los datos experimentales y el modelo matemático y unos valores de viscosidad intermedios entre los del oleogel óptimo y los de la emulsión Og/W óptima que encuentran su justificación en toda una serie de parámetros estructurales como son: la concentración de fase dispersa, el tamaño y la distribución de tamaños de gota, las interacciones interparticulares y la viscosidad de las fases continua y dispersa (Barnes, 1989; McClements, 2015).

Por un lado, la viscosidad de una emulsión aumenta con la concentración de fase dispersa: existe una concentración crítica a partir de la cual las gotas están altamente empaquetadas, de manera que debido a la proximidad entre las gotas, entran en juego una serie de interacciones interparticulares que determinan la dependencia de la viscosidad con la concentración de fase dispersa.

Por otro, el tamaño de gota también afecta a la reología de una emulsión: en el caso de emulsiones concentradas, la naturaleza y la intensidad de las interacciones interparticulares dependen de éste. De forma general, el área interfacial disponible para las interacciones entre gotas es mayor al disminuir su tamaño, por lo que existe una tendencia generalizada a aumentar, tanto la viscosidad como las propiedades viscoelásticas de las emulsiones, al disminuir el tamaño de gota, como consecuencia de un aumento de las interacciones entre éstas (Sánchez et al., 2000).

Pero, en general, las propiedades reológicas que más influyen sobre las propiedades de las emulsiones son las relativas a la fase continua. De hecho, en muchos

casos, la viscosidad de la emulsión es directamente proporcional a la viscosidad de la fase continua. Sin embargo, la inmovilización de flóculos de la fase dispersa o la adsorción de una cantidad significativa de emulgente en la interfase es suficiente para alterar la viscosidad efectiva de la fase continua.

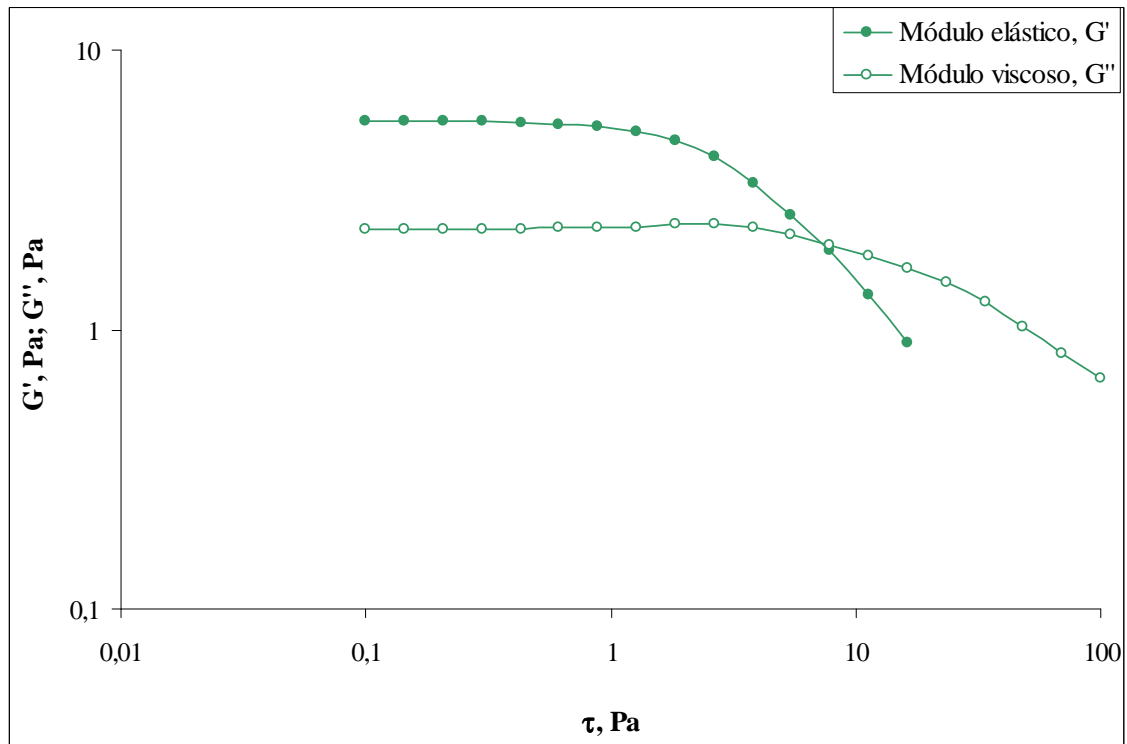
Por tanto, de acuerdo a todo lo anterior, la menor viscosidad de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima con respecto a la emulsión Og/W óptima encuentra su justificación en base al mayor tamaño de gota y a la menor concentración de estabilizante de la primera con respecto a la segunda.

Para analizar la viscoelasticidad de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima, comportamiento que está relacionado con su respuesta temporal y con la estructura interna del sistema, se realizaron medidas oscilatorias de pequeña amplitud y se calcularon los módulos viscoelásticos G' y G'' al ir variando la frecuencia de oscilación (espectro dinámico).

Estos ensayos se realizaron en la zona de comportamiento lineal, donde el esfuerzo y la deformación son proporcionales (región elástica del espectro mecánico) y, por tanto, los módulos viscoelásticos no dependen del esfuerzo aplicado (Lim & Ahn, 2013). Así pues, como fase previa fue necesario determinar esta zona viscoelástica lineal y, para ello, se realizaron medidas oscilatorias a una frecuencia constante de 1 Hz (6.283 rad/s) y se variaron las amplitudes de esfuerzo entre 0.100 Pa y 100 Pa (también llamado barrido de esfuerzos). En esta zona lineal es donde se cumplen las ecuaciones del apartado 3.2.4.7. y se pueden definir adecuadamente ambos módulos viscoelásticos. La Figura 158 representa, en escala doblemente logarítmica, la gráfica de barrido de esfuerzos obtenida con la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima para detectar la región lineal.

En la Figura 158 se observa que, a esfuerzos pequeños, por debajo de 1 Pa, ambos módulos son más o menos constantes, lo que quiere decir que el esfuerzo y la deformación son proporcionales (ya que estos módulos corresponden al cociente de ambos multiplicado por una función del desfase). También es interesante destacar que los valores de sus respectivos módulos, tanto el elástico como el viscoso, ambos medidos en la región lineal, son ligeramente diferentes entre sí, y que la extensión de la región viscoelástica lineal no tiene por qué estar relacionada con los valores absolutos de dichos módulos.

Figura 158. Barrido de esfuerzos de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima a 25 °C.

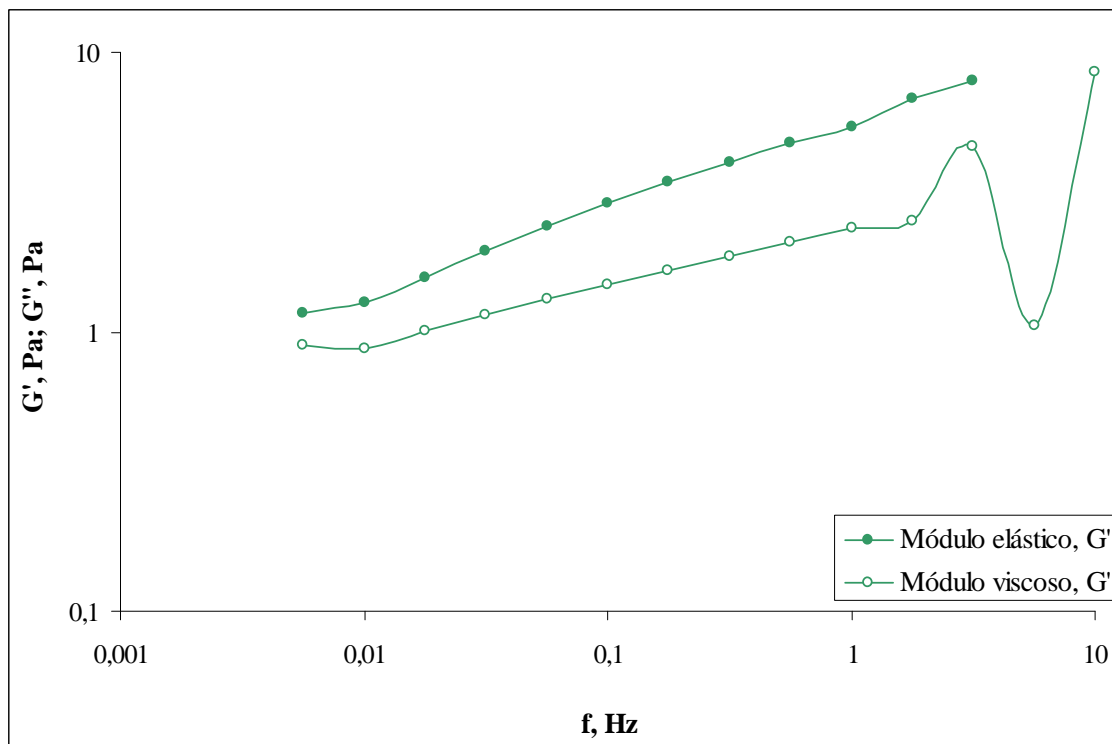


Una vez seleccionada una determinada amplitud del esfuerzo dentro de la región lineal (en este caso, 1 Pa), se mantuvo ese esfuerzo constante y se realizó un barrido de frecuencias de 0.01 Hz a 10.00 Hz, obteniendo el llamado espectro dinámico, esto es, la representación gráfica de las funciones viscoelásticas G' y G'' en función de la frecuencia de oscilación (Figura 159).

El espectro obtenido en la Figura 159 muestra un espectro mecánico característico de emulsiones altamente floculadas, en el que el módulo de almacenamiento, G' , se encuentra siempre por encima del módulo de pérdida, G'' , en todo el intervalo de frecuencias estudiado, siendo ambos módulos menores que los correspondientes del oleogel y la emulsión Og/W óptima. Este comportamiento es representativo de un carácter predominantemente elástico. Normalmente, es posible distinguir en este espectro tres zonas características: (i) una zona pseudo-terminal a bajas frecuencias, que muestra una tendencia al cruce de los dos módulos viscoelásticos; (ii) una zona intermedia, en la que G' se mantiene prácticamente constante y en la que G'' presenta un mínimo; y (iii), por último, el principio de una zona de transición a altas frecuencias. Esta zona, en la que aparece un mínimo en la evolución del módulo de

pérdidas, acompañado de una zona de pendiente nula o ligeramente positiva del módulo de almacenamiento, se conoce como zona “plateau” y se relaciona con un comportamiento de tipo gel. Esta respuesta es propia de emulsiones en las que se desarrolla un entramado elástico debido a un proceso de floculación extensiva de las gotas de fase dispersa (Dickinson, 1989; Gallegos & Franco, 1999; Franco et al., 2000).

Figura 159. Espectro dinámico de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima a 25 °C.

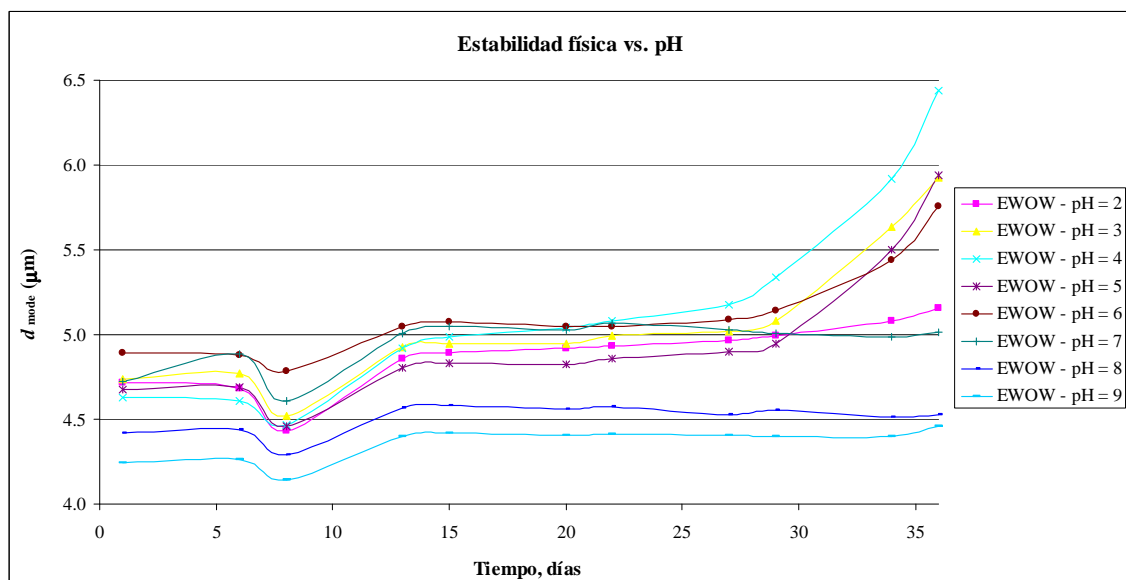


4.4.7. Estudios de estabilidad de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima con el pH, la fuerza iónica y la temperatura

Como ya se ha mencionado anteriormente, el pH, la concentración de electrolitos y la temperatura, son algunos de los factores que pueden contribuir a la desestabilización física de una emulsión, ya sea simple o múltiple (Lee et al., 2004; Yang et al., 2021). Con objeto de estudiar la estabilidad física de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima preparada mediante homogenización a alta velocidad (en relación a la emulsión primaria W_1/Og , un 8.8 % p/p de concentración total de emulgente, 77.5 % p/p de ratio

emulgente hidrofóbico:emulgente hidrofílico y 21000 rpm de velocidad de homogenización; y con respecto a la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$, un 5.1 % p/p de fracción de fase dispersa (W_1/Og), un 13.0 % p/p de emulgente hidrofílico en W_2 y 5800 rpm de velocidad de homogenización) en función del pH y la fuerza iónica, estos parámetros se ajustaron en el intervalo de pH de 2 a 9 y de fuerza iónica de 0 a 1000 mM, y se analizó la evolución de la moda de la distribución de tamaños, d_{mode} , durante un total de 36 días. Los resultados se muestran en las Figuras 160 y 161, respectivamente.

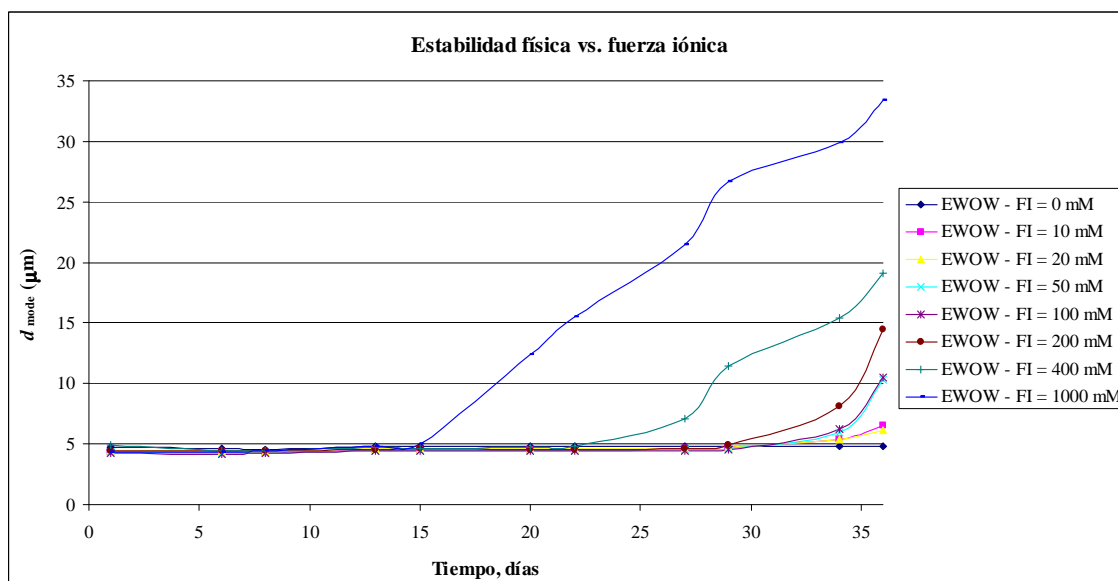
Figura 160. Evolución temporal de la moda de la distribución de tamaños de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima a distintos pH (entre 2 y 9).



De acuerdo con la Figura 160, la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima preparada mediante homogenización a alta velocidad permaneció más o menos estable durante los primeros 27 días, independientemente del pH de la emulsión. Durante ese tiempo, la moda de tamaños estuvo comprendida entre 4.2 y 5.2 μm y todas las emulsiones presentaron comportamientos similares; no fue hasta el día 29 cuando se comienza a observar comportamientos diferentes y las primeras muestras de desestabilización física. De forma análoga a lo encontrado en el estudio de la emulsión Og/W óptima en función del pH, las emulsiones $W_1/Og/W_2$ con un pH de 2, 8, 9, y en este caso también pH 7, no mostraron una variación apreciable en su d_{mode} durante los 36 días estudiados; las emulsiones con pH comprendidos entre 3 y 6 experimentaron un aumento del d_{mode}

de entre un 13.1 % (pH = 6) y un 24.4 % (pH = 4). Por tanto, puede concluirse que el comportamiento de ambos tipos de sistemas de liberación frente al pH es bastante parecido: son más estables a pH muy ácidos o ligeramente básicos y, en el rango de pH donde son menos estables (entre 3 y 6), la emulsión Og/W comienza a desestabilizarse un poco más tarde.

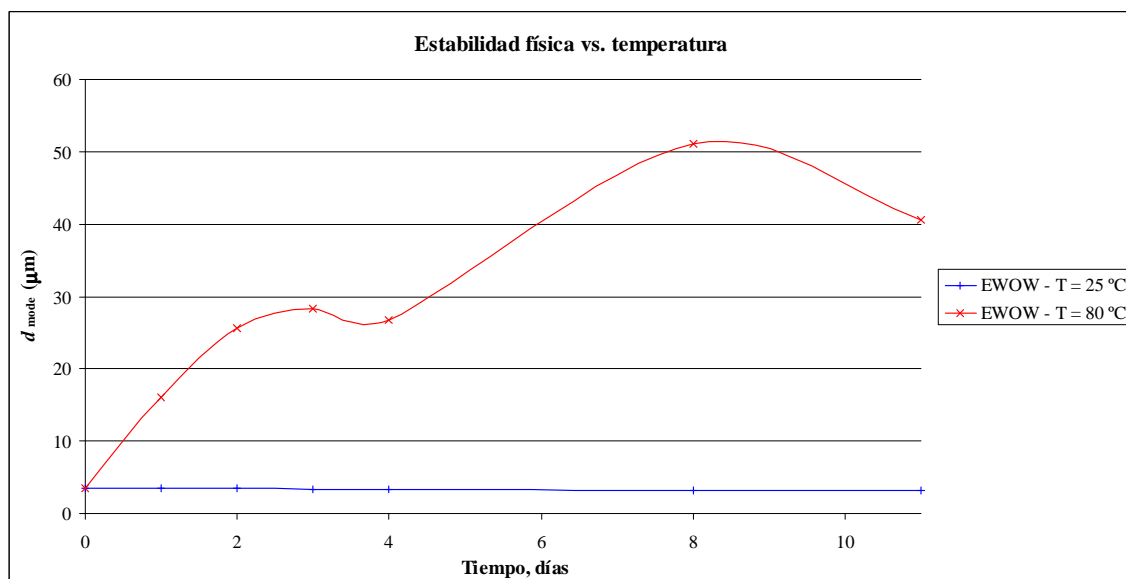
Figura 161. Evolución temporal de la moda de la distribución de tamaños de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima a diferentes concentraciones de electrolitos (de 0 a 1000 mM).



Con respecto a la fuerza iónica, cabe esperar que su influencia resulte mucho más decisiva sobre la estabilidad física de la emulsión $W_1/Og/W_2$ que el pH, puesto que la concentración de electrolitos en la fase acuosa externa afecta a la presión osmótica y, como ya se vio en la introducción, un desequilibrio en la presión osmótica de las fases acuosas interna y externa es uno de los mecanismos de desestabilización típicos de una emulsión múltiple. En vista de la Figura 161, todos los sistemas $W_1/Og/W_2$ fueron estables durante, al menos, 15 días, independientemente de la concentración de electrolitos. Sin embargo, a partir del día 15, las emulsiones $W_1/Og/W_2$ se van desestabilizando en función del contenido salino: cuanto mayor es la concentración de electrolitos de la emulsión, antes comienza su desestabilización física, proceso que puede verse reflejado en el aumento del d_{mode} con el tiempo. Así, la emulsión $W_1/Og/W_2$ con 1000 mM de NaCl comienza su desestabilización el día 15 y el día 36 alcanza un

d_{mode} de 33.423 μm (6.65 veces mayor que el del día 15), la emulsión $W_1/Og/W_2$ con 400 mM de NaCl empieza su desestabilización el día 22 y el día 36 alcanza un d_{mode} de 19.067 μm (3.96 veces mayor que el del día 22), etc. Solamente las emulsiones con un contenido salino inferior a 20 mM pueden considerarse relativamente estables a los 36 días de su elaboración, experimentando un aumento de su d_{mode} durante esos 36 días inferior al 50 %. Por tanto, queda confirmado que la fuerza iónica ejerce una influencia mucho mayor que el pH sobre la estabilidad física de los sistemas de liberación basados en emulsiones probablemente debida al desequilibrio en la presión osmótica de las fases acuosas interna y externa, y que la adición de electrolitos a la emulsión $W_1/Og/W_2$ es perjudicial para su estabilidad física, de acuerdo también con los resultados de Yang et al. (2021).

Figura 162. Evolución temporal de la moda de la distribución de tamaños de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima a dos temperaturas de almacenamiento diferentes (25 y 80 °C).



Finalmente, la Figura 162 representa la evolución de la moda de la distribución de tamaños, d_{mode} , de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima preparada mediante homogenización a alta velocidad, durante un total de 11 días, a dos temperaturas de almacenamiento diferentes: 25 y 80 °C. Según la Figura 162, la emulsión $W_1/Og/W_2$ almacenada a 25 °C mantiene una moda de tamaños prácticamente constante durante los 11 días de estudio ($d_{\text{mode}} = 3.360 \pm 0.150 \mu\text{m}$), mientras que la emulsión $W_1/Og/W_2$ almacenada a 80 °C presentó un aumento de su d_{mode} en tan solo 1 día a esa temperatura

de 12.451 μm , llegando a alcanzar las 40.593 μm a los 11 días a 80 °C (11.3 veces mayor). Por tanto, como ya también se dijo en el estudio de las emulsiones Og/W, la temperatura de almacenamiento es un parámetro fundamental para la estabilidad física de un sistema emulsificado: un aumento en la temperatura de almacenamiento reduce la viscosidad del sistema y favorece la movilidad de las gotas de fase dispersa, acelerando los mecanismos de desestabilización física.

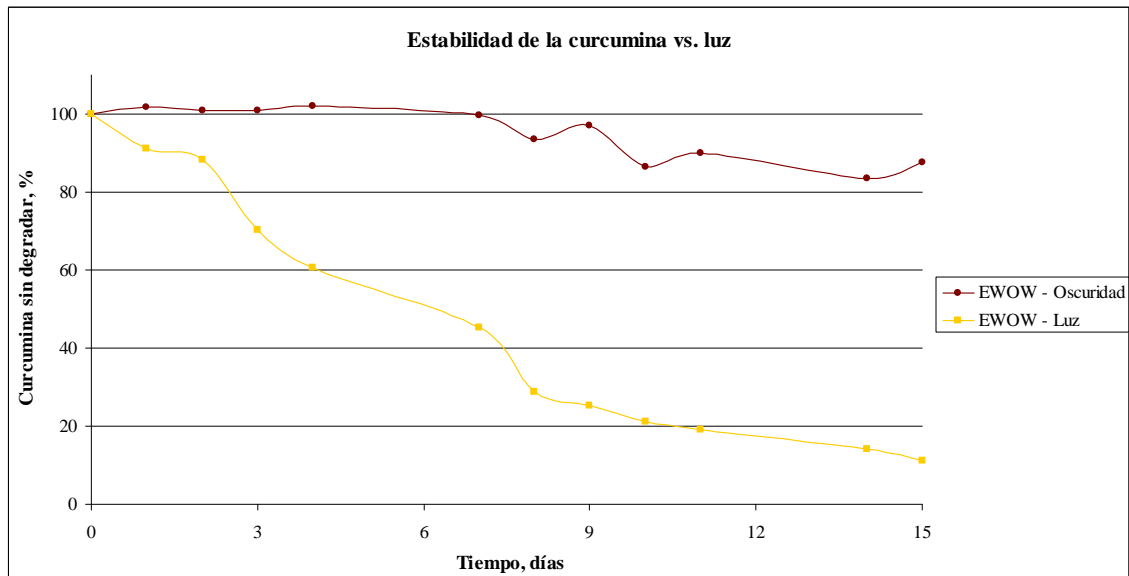
4.4.8. Estudios de estabilidad de la curcumina encapsulada con la luz y la temperatura

Al igual que ya se hizo en el caso de la emulsión Og/W, además de estudiar la estabilidad de la emulsión $W_1/\text{Og}/W_2$ óptima con el pH, la fuerza iónica o la temperatura, aspecto, sin duda, de gran importancia en el diseño y desarrollo de un sistema de liberación rico en PUFAs ω -3 y curcumina, también se debe tomar en consideración y analizar la estabilidad de los compuestos bioactivos encapsulados en este tipo de sistemas, muchos de ellos altamente sensibles a multitud de condiciones ambientales que pueden llegar a alterarlos y/o degradarlos. Por ello, en este apartado se estudia el efecto de la luz y la temperatura de almacenamiento sobre la estabilidad de la curcumina incorporada en la emulsión $W_1/\text{Og}/W_2$ óptima con el tiempo.

Primeramente, con objeto de estudiar la capacidad de la emulsión $W_1/\text{Og}/W_2$ óptima preparada mediante homogenización a alta velocidad (en relación a la emulsión primaria W_1/Og , un 8.8 % p/p de concentración total de emulgente, 77.5 % p/p de ratio emulgente hidrofóbico:emulgente hidrofílico y 21000 rpm de velocidad de homogenización; y con respecto a la emulsión múltiple $W_1/\text{Og}/W_2$, un 5.1 % p/p de fracción de fase dispersa (W_1/Og), un 13.0 % p/p de emulgente hidrofílico en W_2 y 5800 rpm de velocidad de homogenización) para proteger la curcumina incorporada de la degradación fotoquímica, se midieron las concentraciones de curcumina presentes tanto en una muestra almacenada en oscuridad, en condiciones de temperatura controladas y sin filtraciones de luz ambiental, como en otra muestra de la misma emulsión irradiada con dos lámparas halógenas de 18 W cada una de ellas, en las

mismas condiciones anteriores, a lo largo del tiempo (durante un total de 15 días) y, a partir de estas medidas, se calcularon los porcentajes de retención de curcumina y se compararon los resultados. Los valores se muestran en la Figura 163.

Figura 163. Porcentaje de curcumina encapsulada en la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima con el tiempo en presencia y en ausencia de luz.

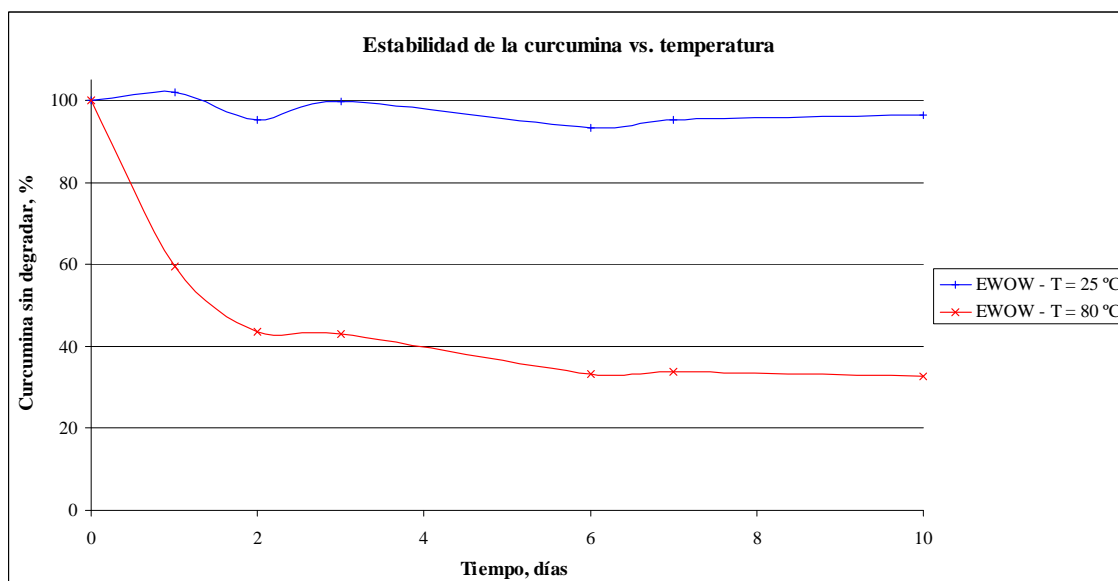


Según se desprende de la Figura 163, la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima almacenada en ausencia de luz es capaz de retener la mayor parte de la curcumina encapsulada, perdiendo tan solo el 12.24 % de la curcumina inicial. Sin embargo, la emulsión $W_1/Og/W_2$ en presencia de luz experimenta una pérdida de curcumina muy importante de forma que, a los 15 días de su elaboración, solamente queda el 11.22 % de la curcumina inicial. Por tanto, queda claro que la exposición a la luz visible degrada la curcumina incorporada en la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima y, por tanto, es uno de los factores determinantes para aumentar el porcentaje de retención de curcumina en el sistema.

Comparando estos datos con los obtenidos para la emulsión Og/W óptima, los resultados son más o menos parecidos, si bien es cierto que la emulsión múltiple parece proteger algo mejor la curcumina encapsulada en presencia de luz (un 81.3 % más) mientras que, en ausencia de luz, la emulsión simple parece proporcionar una protección mayor (un porcentaje de retención de curcumina del 100 % frente al 87.76 % de la emulsión múltiple). Sin embargo, con respecto al sistema oleogelificado sí que se

aprecian diferencias más importantes, especialmente cuando han sido expuestos a la luz. En ese caso, el porcentaje de retención de curcumina en el oleogel óptimo fue 3.9 veces superior a la curcumina retenida en la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima y 7.0 veces mayor a la retenida en la emulsión Og/W óptima. Por tanto, se concluye que el sistema oleogelificado, en presencia de luz, es capaz de retener un mayor porcentaje de curcumina que los sistemas emulsificados.

Figura 164. Porcentaje de curcumina encapsulada en la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima con el tiempo a dos temperaturas de almacenamiento diferentes (25 y 80 °C).



Por otro lado, también se ha comentado con anterioridad que la temperatura de almacenamiento de una emulsión es otro de los factores que puede afectar a la estabilidad de la curcumina encapsulada. Para estudiar la influencia de la temperatura de almacenamiento sobre el porcentaje de curcumina retenida en el sistema $W_1/Og/W_2$ óptimo, éste se preparó y se almacenó tanto a temperatura ambiente (25 °C) como a alta temperatura (80 °C) durante 10 días y se midieron las concentraciones de curcumina presentes en cada uno de ellos con el tiempo. Los resultados se muestran en la Figura 164.

Como puede apreciarse en la Figura 164, la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima almacenada a 25 °C es capaz de retener la práctica totalidad de la curcumina encapsulada, perdiendo únicamente el 3.61 % de la curcumina inicial. Sin embargo, la emulsión $W_1/Og/W_2$ almacenada a 80 °C experimenta una pérdida de curcumina

bastante más importante de forma que, a los 10 días de su elaboración, solamente queda el 32.78 % de la curcumina inicial. Además, de forma análoga a lo que ocurría en el caso de la emulsión Og/W a 80 °C, prácticamente el 60 % de la curcumina se degrada durante los 2 primeros días de almacenamiento a 80 °C y, en los 8 días restantes, sólo se pierde el 10.78 % hasta alcanzar un porcentaje de retención de curcumina más o menos constante. Por tanto, estos datos permiten volver a afirmar que la cantidad de curcumina restante tras 10 días de almacenamiento disminuye a medida que aumenta la temperatura de almacenamiento de las emulsiones $W_1/Og/W_2$ y, por consiguiente, es aconsejable almacenar las emulsiones $W_1/Og/W_2$ cargadas con curcumina a temperaturas más bajas para aumentar la estabilidad fisicoquímica del compuesto.

Comparando estos valores con los obtenidos para la emulsión Og/W óptima, los resultados son muy parecidos, si bien es cierto que la emulsión múltiple parece proteger algo mejor la curcumina encapsulada, tanto a 25 como a 80 °C. Sin embargo, con respecto al sistema oleogelificado sí que se aprecian diferencias más importantes. A una temperatura de almacenamiento de 80 °C, el porcentaje de curcumina retenida en el oleogel óptimo fue un 62.1 % superior a la retenida en la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima y un 114.2 % mayor a la retenida en la emulsión Og/W óptima. Por tanto, el sistema oleogelificado es capaz de retener un mayor porcentaje de curcumina que los sistemas emulsificados. A este respecto, Kharat et al. (2017) también informan de la mayor estabilidad de la curcumina disuelta en TCM con el tiempo con respecto a la curcumina encapsulada en un sistema emulsionado. Todo ello parece indicar que el ambiente molecular (aceite, agua, etc.) tiene un impacto importante sobre la estabilidad química de la curcumina y sugiere que la degradación de la curcumina en las emulsiones O/W probablemente ocurre en la superficie de las gotas de aceite en lugar de en su interior.

4.4.9. Conclusiones

En este cuarto capítulo se ha estudiado la influencia de la composición –en relación a la emulsión primaria W_1/Og , la concentración total de emulgente y la ratio emulgente hidrofóbico:emulgente hidrofílico; y con respecto a la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$, la concentración total de oleogel en el sistema de liberación que determina

la fracción de fase dispersa (W_1/Og) y la concentración de emulgente hidrofílico en W_2 – y las condiciones de operación –la velocidad de homogenización tanto de la emulsión primaria como de la secundaria– del sistema emulsificado $W_1/Og/W_2$ rico en PUFAs ω -3 y curcumina sobre su estabilidad física (tamaño de partícula) y oxidativa (tanto primaria como secundaria), así como sobre su capacidad para proteger y estabilizar en el tiempo curcumina encapsulada.

De forma general, las curvas de distribución de tamaños de gota típicas para las emulsiones $W_1/Og/W_2$ preparadas mediante homogenización a alta velocidad suelen presentar entre tres y cuatro picos, si bien es cierto que en ocasiones los picos 2 y 3 pueden encontrarse más o menos solapados dependiendo de la emulsión de que se trate y que el pico 4 puede o no aparecer en función del grado de envejecimiento de la emulsión. El segundo y tercer pico corresponden ambos a las gotas de fase dispersa de la emulsión múltiple, constituida mayoritariamente por gotas de tamaños entre 4.5 y 5.5 μm y presentando una estabilidad física prolongada en el tiempo. Asimismo, el grado de oxidación (tanto primaria como secundaria) del sistema oleogelificado sin emulsionar fue mucho mayor que emulsionado en una emulsión $W_1/Og/W_2$.

La Tabla 54 recoge de forma resumida las variables que resultaron estadísticamente significativas sobre cada variable respuesta considerada: en color verde las que ejercieron un efecto positivo y en rojo las que ejercieron un efecto negativo.

Las condiciones óptimas para minimizar conjuntamente el tamaño de partícula y la oxidación lipídica primaria y secundaria y, a su vez, maximizar la capacidad de retención de curcumina de la emulsión $W_1/Og/W_2$ homogenizada a alta velocidad de cizalla son: en relación a la emulsión primaria W_1/Og , un 8.1 % p/p de concentración total de emulgente, 89.8 % p/p de ratio emulgente hidrofóbico:emulgente hidrofílico y 19600 rpm de velocidad de homogenización; y con respecto a la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$, un 5.1 % p/p de concentración total de oleogel que determina la fracción de fase dispersa (W_1/Og), un 9.6 % p/p de emulgente hidrofílico en W_2 y 6400 rpm de velocidad de homogenización.

Tabla 54. Variables estadísticamente significativas sobre cada variable respuesta considerada en la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$.

Fuente	$d_{14,31}$, μm	Aumento [H. lipídicos], %	[Compuestos aldehídicos], mg/L	Curcumina sin degradar, %
[Em.] _{TOTAL}				
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.}	X			X
Velocidad _(W1/Og)	X			
[F. dispersa] _(W1/Og)	X			
[Em.] _{HIDRO.}	X		X	
Velocidad _(W1/Og/W2)				X
[Em.] _{TOTAL} ²		X	X	X
[Em.] _{TOTAL} *Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.}	X			
[Em.] _{TOTAL} *Velocidad _(W1/Og)				
[Em.] _{TOTAL} *[F. dispersa] _(W1/Og)	X		X	
[Em.] _{TOTAL} *[Em.] _{HIDRO.}			X	
[Em.] _{TOTAL} *Velocidad _(W1/Og/W2)			X	
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} ²	X			
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} *Velocidad _(W1/Og)	X			X
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} *[F. dispersa] _(W1/Og)	X		X	
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} *[Em.] _{HIDRO.}				
Ratio [Em.] _{LIPO./HIDRO.} *Velocidad _(W1/Og/W2)	X			
Velocidad _(W1/Og) ²				
Velocidad _(W1/Og) *[F. dispersa] _(W1/Og)	X		X	
Velocidad _(W1/Og) *[Em.] _{HIDRO.}	X			
Velocidad _(W1/Og) *Velocidad _(W1/Og/W2)				X
[F. dispersa] _(W1/Og) ²	X	X		
[F. dispersa] _(W1/Og) *[Em.] _{HIDRO.}	X		X	
[F. dispersa] _(W1/Og) *Velocidad _(W1/Og/W2)			X	
[Em.] _{HIDRO.} ²	X		X	
[Em.] _{HIDRO.} *Velocidad _(W1/Og/W2)				
Velocidad _(W1/Og/W2) ²	X			X

La curva de viscosidad obtenida para la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima representa un comportamiento pseudoplástico, siendo éste el comportamiento típico de los materiales estructurados, con una viscosidad intermedia entre la del oleogel y la de la emulsión Og/W óptima. Además, el espectro mecánico obtenido muestra que el módulo de almacenamiento, G' , se encuentra siempre por encima del módulo de pérdida, G'' , en todo el intervalo de frecuencias estudiado, siendo esta respuesta propia de emulsiones en las que se desarrolla un entramado elástico debido a un proceso de floculación extensiva de las gotas de fase dispersa.

En relación a la estabilidad de la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptima frente a distintas condiciones ambientales que podrían afectarle, esta emulsión fue estable a pH muy ácidos o ligeramente básicos, con un contenido salino inferior a 20 mM y a bajas temperaturas de almacenamiento.

Para terminar, en el caso de la emulsión $W_1/Og/W_2$ sometida a estímulo fotolítico, la concentración de curcumina disminuye significativamente con el tiempo de forma que, dos semanas después de su preparación, la cantidad presente en la emulsión $W_1/Og/W_2$ es de tan solo un 11.22 % de la curcumina inicial. Por su parte, en el caso de la emulsión almacenada a alta temperatura (80 °C), una semana después solamente contiene el 32.78 % de la curcumina inicialmente añadida.

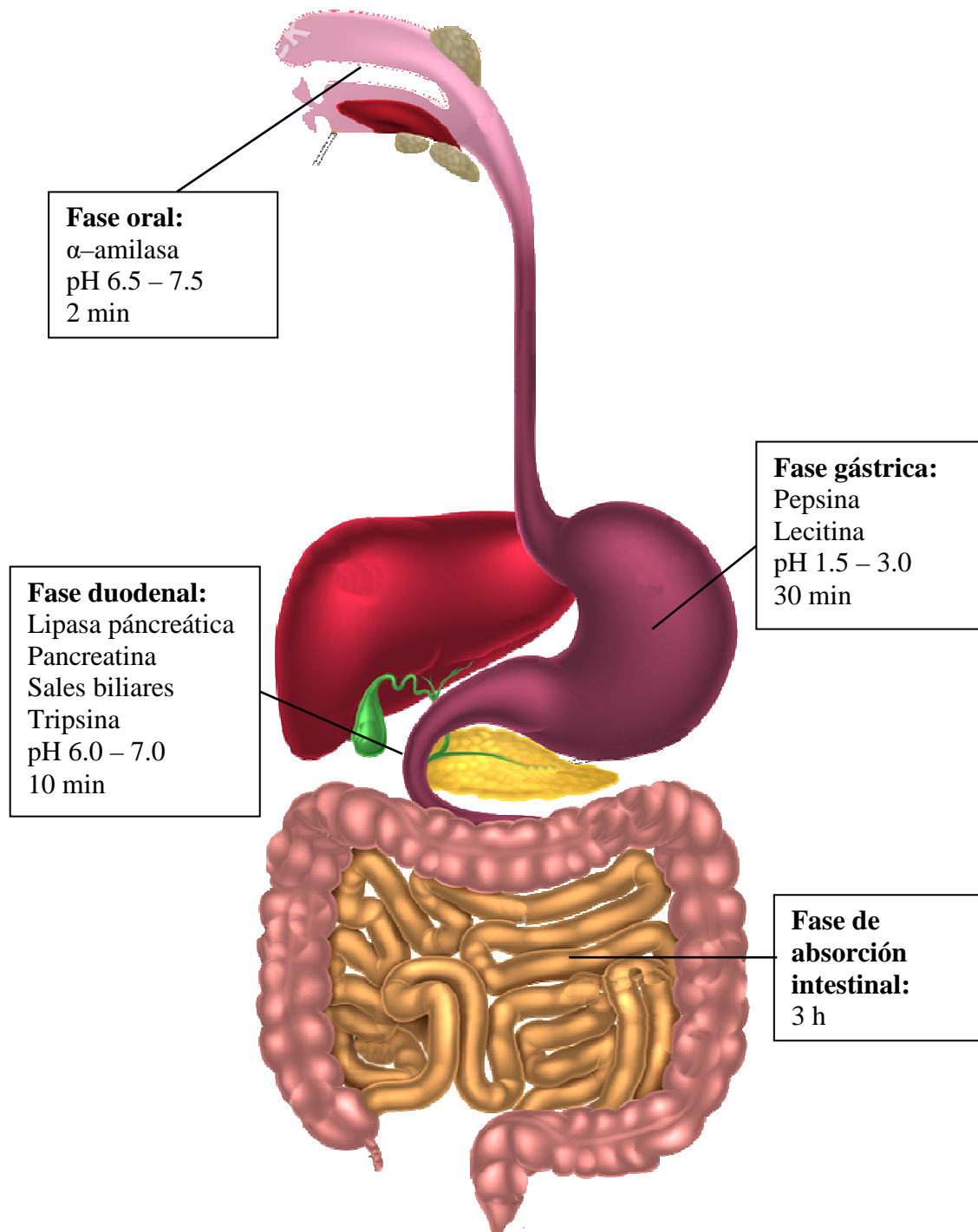
4.5. La bioaccesibilidad y biodisponibilidad como variables de diseño en el desarrollo de sistemas de liberación ricos en PUFAs ω -3 y curcumina

Según se comentó en la introducción de esta Tesis Doctoral, el consumidor demanda cada vez más de alimentos que, además de su valor nutritivo, ofrezcan un efecto beneficioso sobre el organismo y reduzcan el riesgo de padecer determinadas enfermedades (colesterol, obesidad, celiaquía, diabetes, etc.). Este efecto beneficioso depende no sólo de su contenido en compuestos bioactivos –en este caso, PUFAs ω -3 y curcumina–, sino de los cambios que estos experimentan durante el proceso digestivo y que repercuten en su bioaccesibilidad y biodisponibilidad. Por lo tanto, bioaccesibilidad y biodisponibilidad son conceptos que muchas veces pasan desapercibidos pero que son fundamentales y deberían tenerse en cuenta como variables de diseño en el desarrollo de sistemas de liberación ricos en ingredientes bioactivos.

El primer paso para que un compuesto biológicamente activo o funcional esté biodisponible es su liberación del sistema o la matriz alimentaria que lo contiene y su conversión en una forma química que pueda unirse e introducirse en las células del intestino o incluso atravesarlas, esto es, que sea bioaccesible. El concepto biodisponibilidad, por su parte, se refiere a la cantidad o proporción de compuesto biológicamente activo que absorbe nuestro organismo de los alimentos y pasa al torrente sanguíneo (Aggett, 2010; Hurrell & Egli, 2010). Los compuestos bioactivos se hacen biodisponibles mediante los procesos de masticación y digestión enzimática inicial del alimento en la boca, su combinación con ácidos y otras enzimas en los jugos gástricos del estómago y, finalmente, su liberación en el intestino delgado, el principal lugar de absorción de los nutrientes. Una vez aquí, la bilis junto con otras enzimas procedentes de los jugos pancreáticos y los jugos intestinales siguen descomponiendo la matriz del alimento. Por tanto, durante todo ese tránsito digestivo, los compuestos funcionales –muchos de ellos altamente sensibles– se encuentran expuestos a diferentes condiciones más o menos agresivas: distintos tipos de enzimas, tiempos de residencia y pH, tal como se muestra en la Figura 165 (Hur et al., 2011). Sin duda, todas estas

condiciones van a afectar a la estabilidad de los compuestos bioactivos vehiculizados que pueden llegar a alterarse o incluso degradarse parcial o totalmente antes de alcanzar

Figura 165. Condiciones químico-enzimáticas y tiempos de residencia en las diferentes etapas de la digestión.



el intestino delgado y, por ende, antes de ser absorbidos y utilizados por el organismo; en ese caso, su ingesta resultaría completamente inútil y nunca llegarían a ejercer actividad biológica alguna (Holst & Williamson, 2008). Por este motivo, en este quinto capítulo se analiza la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de la curcumina incorporada en los distintos sistemas de liberación óptimos aquí desarrollados para la protección y el transporte conjunto de PUFAs ω -3 y curcumina (oleogel vs. emulsión simple Og/W vs. emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$).

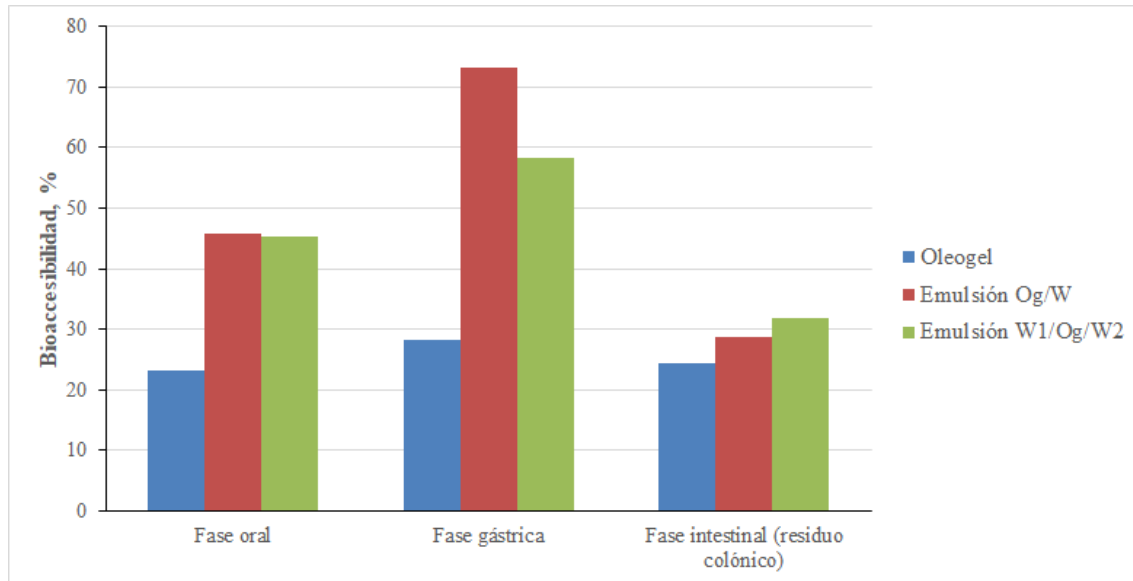
Para poder comparar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de la curcumina en los diferentes sistemas de liberación óptimos, todos los ensayos se realizaron suministrando una misma dosis inicial de curcumina: 1.527 mg. Por tanto, la cantidad de muestra –oleogel (6.018 g), emulsión simple Og/W (12.251 g) o emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$ (25.000 g)– suministrada en cada ensayo se calculó en base al porcentaje de curcumina contenido en ese sistema de liberación, de forma que siempre se proporcionase la misma cantidad inicial de curcumina al simulador (ver apartado 3.2.5.2.). Después de cada ensayo, se midió la concentración de curcumina al finalizar las fases oral, gástrica e intestinal (residuo colónico), así como en muestras de permeado de la fase de absorción intestinal obtenidas cada 30 min durante un total de 3 h, mediante espectroscopía de fluorescencia. A partir de estas concentraciones y de los volúmenes implicados en cada fase, se pudo calcular la cantidad de curcumina presente en cada etapa de la digestión y, más tarde, su bioaccesibilidad en boca, estómago e intestino grueso, y su biodisponibilidad tras la digestión *in vitro*, de acuerdo con las ecuaciones:

$$\% \text{ Bioaccesibilidad} = \frac{m_{Curc. fase X}}{m_{Curc. inicial}} \cdot 100 \quad \text{Ec. [52]}$$

$$\% \text{ Biodisponibilidad} = \frac{m_{Curc. permeado}}{m_{Curc. inicial}} \cdot 100 \quad \text{Ec. [53]}$$

La Figura 166 representa comparativamente los porcentajes de bioaccesibilidad de la curcumina vehiculizada en los distintos sistemas de liberación óptimos en las fases oral, gástrica e intestinal (residuo colónico). Estos porcentajes fueron bastante parecidos entre los sistemas emulsionados (Og/W y $W_1/Og/W_2$) y significativamente diferentes entre ellos y el sistema oleogelificado.

Figura 166. Bioaccesibilidad de la curcumina vehiculizada en los distintos sistemas de liberación óptimos en las fases oral, gástrica e intestinal (residuo colónico).



De acuerdo con la Figura 166, se observa que el porcentaje de bioaccesibilidad de la curcumina vehiculizada en el oleogel, tanto en la fase oral como en la gástrica, fue el más bajo de todos los sistemas de liberación estudiados (23.1 y 28.4 %, respectivamente). En cambio, la curcumina incorporada en la emulsión Og/W fue la más bioaccesible en ambas fases, siendo el doble de bioaccesible que la vehiculizada en el oleogel en la fase oral y 2.5 veces más en la fase gástrica. Finalmente, la curcumina encapsulada en la emulsión $W_1/Og/W_2$ presentó un porcentaje de bioaccesibilidad muy similar al de la emulsión Og/W en la fase oral (45.3 % en la emulsión múltiple y 45.9 % en la emulsión simple) y ligeramente inferior al de la emulsión Og/W en la fase gástrica (58.3 % frente a 73.3 %). Por otra parte, también se pone de manifiesto que, independientemente del sistema de liberación óptimo utilizado, el porcentaje de curcumina bioaccesible aumentó desde la fase oral a la fase gástrica en un porcentaje de entre un 22.8 % en el caso del oleogel y un 59.9 % en el caso de la emulsión Og/W. Este aumento en el porcentaje de curcumina bioaccesible al pasar de la fase oral a la fase gástrica revela su estabilidad frente a las condiciones químico-enzimáticas del estómago, esto es, frente a la acción de proteasas (pepsina) y condiciones ácidas (pH 1.5 – 3.0), como ya se indicó en el apartado 1.2.3. de esta Tesis Doctoral. Para finalizar, señalar que el porcentaje de curcumina bioaccesible tras el intestino delgado (residuo colónico) sí que fue muy similar en los diferentes sistemas de liberación

óptimos utilizados, variando entre el 24.5 % del oleogel y el 32.0 % de la emulsión $W_1/Og/W_2$.

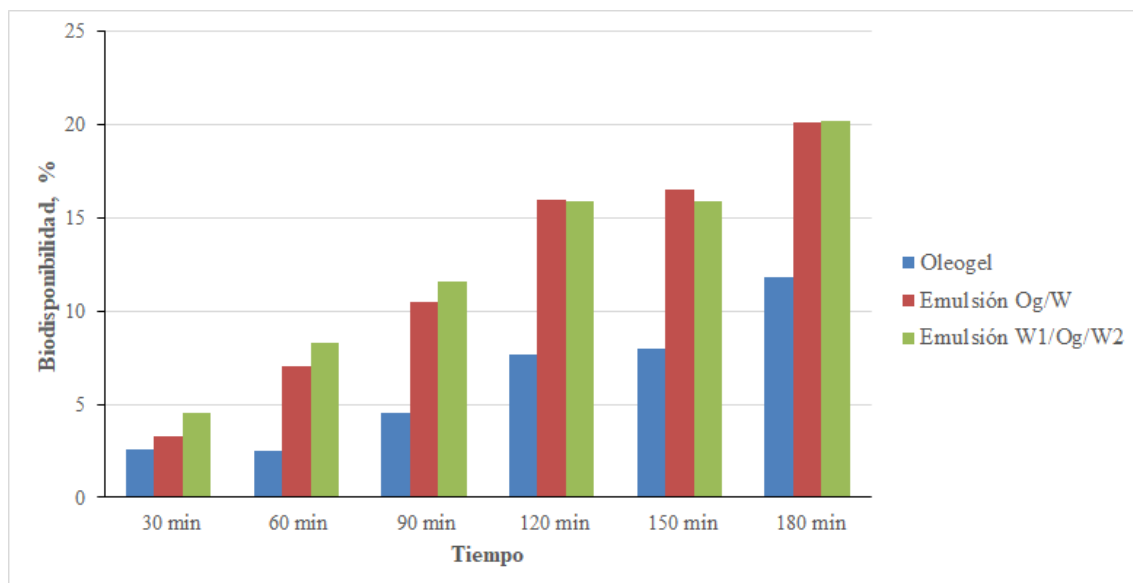
Uno de los principales factores que resulta más determinante sobre la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos es su solubilidad/dispersabilidad en medios acuosos que, en el caso de la curcumina, es bastante limitada (11 ng/mL) (Zhang & McClements, 2016). Así pues, para que la molécula de curcumina sea bioaccesible, ésta tiene que dispersarse y solubilizarse en los fluidos intestinales, de naturaleza acuosa, y para eso debe estar en íntimo contacto con ellos. En el caso del oleogel, su baja bioaccesibilidad responde a la propia naturaleza lipofílica del sistema –que hace que el grado de mezcla con los fluidos intestinales no sea demasiado bueno– y al atrapamiento físico de la curcumina dentro de la estructura tridimensional y semisólida del oleogel –que limita su movilidad dentro de la matriz. Sin embargo, en el caso de los sistemas emulsionados Og/W y $W_1/Og/W_2$, la naturaleza acuosa de la fase continua, la enorme superficie de contacto entre el oleogel y el agua y la presencia de emulgente hidrofílico capaz de formar estructuras coloidales (normalmente, micelas) en cuyo interior se pueden incorporar principios activos lipofílicos, favorece la solubilización de la curcumina en los fluidos intestinales y, por tanto, el aumento de su bioaccesibilidad (Yao et al., 2014; Araiza-Calahorra et al., 2018). En base a lo anterior, el mayor porcentaje de bioaccesibilidad de la curcumina vehiculizada en la emulsión Og/W podría encontrar su explicación en el tamaño medio de gota, que para este tipo de emulsión fue de 8.424 μm ($d_{\text{mode}} = 3.248 \mu\text{m}$) mientras que para la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$ fue de 27.521 μm ($d_{\text{mode}} = 4.826 \mu\text{m}$). Así, un tamaño medio de gota más pequeño implica una superficie de contacto entre el oleogel y el agua mayor que, como se ha dicho, favorece la solubilización de la curcumina. Este mismo efecto ya fue observado por Pinheiro et al. (2013), quienes informaron de un importante aumento (de casi 10 veces) en el porcentaje de bioaccesibilidad de la curcumina incorporada en nanoemulsiones estabilizadas con Tween 20 con respecto al porcentaje de bioaccesibilidad en nanoemulsiones estabilizadas con bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB). Este porcentaje de bioaccesibilidad en las nanoemulsiones estabilizadas con Tween 20 significativamente mayor se asoció al

tamaño medio de gota menor (entre 100 y 310 nm) en comparación con el tamaño

medio de gota de las nanoemulsiones estabilizadas con DTAB (entre 80 y 890 nm).

Por su parte, la Figura 167 representa comparativamente los porcentajes de biodisponibilidad de la curcumina vehiculizada en los distintos sistemas de liberación óptimos a diferentes tiempos (entre 30 y 180 min).

Figura 167. Biodisponibilidad de la curcumina vehiculizada en los distintos sistemas de liberación óptimos a diferentes tiempos.

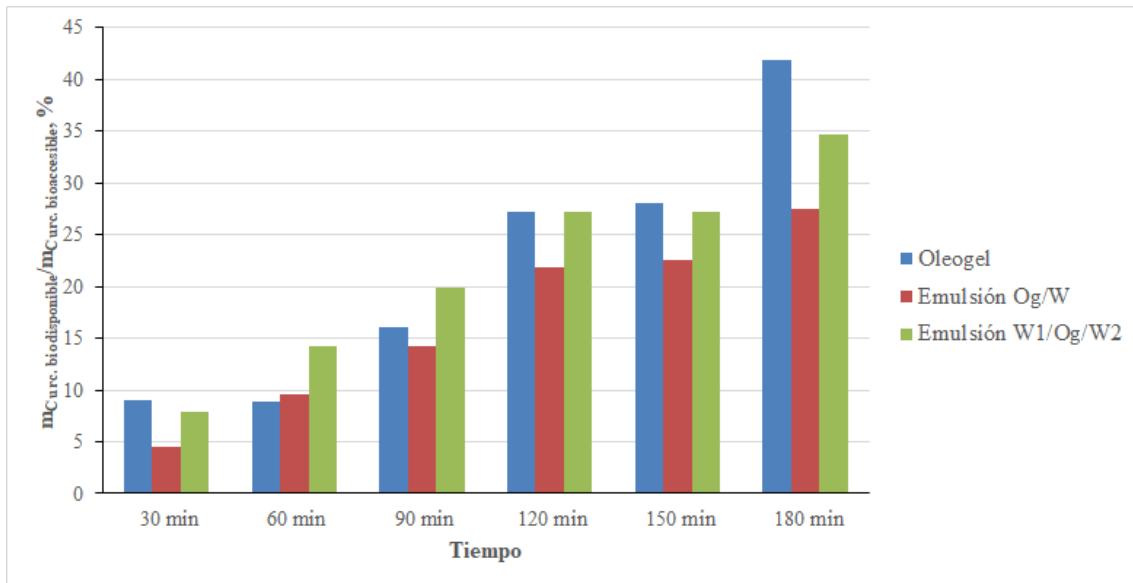


En base a la Figura 167, se observa cómo el porcentaje de biodisponibilidad de la curcumina vehiculizada en el oleogel fue el más bajo de todos los sistemas de liberación estudiados, independientemente del tiempo considerado, si bien es cierto que dicho porcentaje fue aumentando desde el 2.6 % (30 min) hasta el 11.9 % (180 min). Además, la velocidad de absorción de curcumina también fue algo más lenta, especialmente durante la primera hora. Sin embargo, la curcumina encapsulada en los

sistemas emulsionados Og/W y $W_1/Og/W_2$ presentó un porcentaje de biodisponibilidad a los 180 min muy similar (en torno al 20.2 %) y bastante superior al del oleogel (1.7 veces mayor). Si se comparan ambos sistemas emulsificados, durante los primeros 90 min de fase de absorción intestinal, la emulsión $W_1/Og/W_2$ alcanzó porcentajes de curcumina biodisponible ligeramente superiores (entre 1.1 y 1.3 puntos porcentuales) a los de la emulsión Og/W; en cambio, entre los 120 y los 180 min, los porcentajes de biodisponibilidad fueron muy parecidos. Este hecho se traduce en que la curcumina encapsulada en la emulsión múltiple se absorbe más rápidamente que la vehiculizada en la emulsión simple, cuya mayor absorción se produce a tiempos más prolongados. Esto podría estar relacionado con la mayor o menor estabilidad física de ambos sistemas de liberación en condiciones fisiológicas y es que, en efecto, una emulsión múltiple cuenta con muchos más mecanismos de rotura (hinchamiento, vaciamiento, etc.) que una emulsión simple debido al necesario equilibrio entre la presión osmótica de las fases acuosas interna y externa. Así pues, la composición de los fluidos intestinales (recuerde que los fluidos intestinales están compuestos por una gran cantidad de electrolitos) contribuye a aumentar la presión osmótica de la fase acuosa externa de la emulsión múltiple, dando lugar a un desequilibrio entre las presiones osmóticas de las fases acuosas interna y externa y, por consiguiente, acelerando la desestabilización física de la emulsión $W_1/Og/W_2$ y la liberación de la fase dispersa en ella contenida con respecto a la emulsión Og/W. Este hecho permite explicar esa diferencia observada entre el porcentaje de biodisponibilidad de la curcumina vehiculizada en ambas emulsiones con el tiempo.

Finalmente, la Figura 168 representa comparativamente la ratio entre la cantidad de curcumina biodisponible y la bioaccesible en la fase gástrica en los distintos sistemas de liberación óptimos a diferentes tiempos (entre 30 y 180 min). Esta figura, por tanto, nos da una idea sobre la eficiencia de cada sistema de liberación estudiado para hacer bioaccesible la curcumina en él incorporada y que ésta, a su vez, también sea biodisponible.

Figura 168. Ratio entre la cantidad de curcumina biodisponible y la bioaccesible en la fase gástrica en los distintos sistemas de liberación óptimos a diferentes tiempos.



De acuerdo con la Figura 168, el sistema oleogelificado ha resultado ser el sistema de liberación óptimo más eficiente, estando biodisponible el 41.8 % de la curcumina bioaccesible a los 180 min. La eficiencia de la emulsión $W_1/Og/W_2$ (34.7 %) fue la que siguió a la del oleogel, si bien en algunos momentos (60, 90 y 120 min) llegó a ser incluso superior. Finalmente, la emulsión Og/W resultó ser el sistema de liberación menos eficiente, independientemente del tiempo considerado (27.5 % a los 180 min).

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES

Como resultado del trabajo de investigación que se describe en esta Memoria, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. El aceite de pescado sin gelificar experimenta más oxidación lipídica primaria a largo plazo que gelificado y, por tanto, el proceso de oleogelificación es una estrategia adecuada para reducir la oxidación lipídica primaria en porcentajes comprendidos entre un 25.9 y un 90.0 %. En cambio, con respecto a la oxidación lipídica secundaria, la oleogelificación no siempre supone una buena estrategia para reducir la concentración de productos secundarios de la oxidación a largo plazo.
2. El comportamiento oxidativo primario a corto y a largo plazo de los oleogeles en condiciones ambientales (23 °C) y aceleradas (40 °C) es completamente diferente: los primeros días, la concentración de hidroperóxidos de los oleogeles a 40 °C es entre 1.01 y 2.16 veces superior a la de los oleogeles a 23 °C; en cambio, a tiempos más prolongados, sucede justo lo contrario. En el caso de la oxidación lipídica secundaria, se produce un mismo comportamiento en la concentración de compuestos aldehídicos, independientemente del tiempo transcurrido desde su elaboración: la concentración de las muestras a 40 °C es siempre mayor que a 23 °C, tanto a corto como a largo plazo, aunque a corto plazo las diferencias son mucho menores.
3. La oleogelificación también supone una posible estrategia para aumentar la capacidad de retención de curcumina del aceite de pescado enriquecido con PUFAs ω -3 sin gelificar e, incluso, llegar casi a duplicarla.
4. La concentración de curcumina y la temperatura de preparación del oleogel son variables críticas para minimizar conjuntamente la oxidación lipídica primaria y secundaria de los oleogeles almacenados a 23 °C y, a su vez, maximizar la capacidad de retención de curcumina. Para alcanzar ese objetivo, las condiciones óptimas son: 7.0 % p/p de agente gelificante, 0.05 % p/p de curcumina y 66.0 °C de temperatura de elaboración del oleogel, obteniendo una concentración de hidroperóxidos lipídicos y compuestos

aldehídicos de 3389.6 y 445.9 mg/L, respectivamente, y una capacidad de retención de curcumina durante el proceso de elaboración del 71.8 %.

5. El método de homogenización a alta presión no es adecuado para producir emulsiones W/Og físicamente estables, pudiendo llegar a romper el oleogel de la fase continua y, por tanto, dando lugar a emulsiones con mayores tamaños medios de gota.
6. La emulsificación de un oleogel para la obtención de emulsiones W/Og, independientemente del método de homogenización utilizado, reduce significativamente la oxidación lipídica primaria (en porcentajes superiores al 119.2 %) y secundaria (entre 1.45 y 2.19 veces).
7. El proceso de emulsificación del oleogel no ejerce ningún efecto sobre la estabilidad de la curcumina vehiculizada y las emulsiones W/Og presentan porcentajes de retención de curcumina superiores a los del oleogel de partida (60.52 % en la emulsión y 48.14 % en el oleogel).
8. La concentración de fase dispersa es la variable más importante para minimizar simultáneamente el tamaño de partícula y la oxidación lipídica primaria y secundaria y, a su vez, maximizar la capacidad de retención de curcumina de la emulsión W/Og homogenizada a alta velocidad de cizalla. Para alcanzar ese objetivo, las condiciones óptimas son: 38.37 % p/p de fase dispersa, 7.35 % p/p de PGPR y 12600 rpm de velocidad de cizalla, obteniendo un tamaño medio de gota de 6.379 μm , una concentración de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos de 3646.9 y 349.2 mg/L, respectivamente, y una capacidad de retención de curcumina del 91.9 %.
9. Las emulsiones Og/W preparadas mediante homogenización a alta presión son físicamente más estables que las homogenizadas a alta velocidad, puesto que el método de homogenización a alta presión proporciona gotas de menor tamaño que el método de homogenización a alta velocidad de cizalla.
10. Las emulsiones Og/W a alta velocidad son más inestables a la oxidación, presentando porcentajes de aumento de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos muy superiores a los de las emulsiones Og/W a alta

presión (6.95 % vs. 0.36 % de aumento de primarios y 20.45 % vs. - 99.58 % de aumento de secundarios).

11. Al igual que en las emulsiones W/Og, el proceso de emulsificación no ejerce ningún efecto sobre la estabilidad de la curcumina vehiculizada en los sistemas Og/W y, en determinadas condiciones óptimas, se puede llegar a alcanzar una capacidad de retención de curcumina del 100 %.
12. La fracción de fase dispersa es la variable más importante para minimizar conjuntamente el tamaño de partícula y la oxidación lipídica primaria y secundaria y, a su vez, maximizar la capacidad de retención de curcumina de la emulsión Og/W homogenizada a alta velocidad de cizalla. Para alcanzar ese objetivo, las variables de operación óptimas son: 13.9 % p/p de fase dispersa, 5.0 % p/p de Tween 20, 0.48 % p/p de XG y 12000 rpm de velocidad de homogenización, obteniendo un porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos y compuestos aldehídicos del 47.7 y 173.0 %, respectivamente, y una capacidad de retención de curcumina del 100 %.
13. Las emulsiones $W_1/Og/W_2$ obtenidas muestran estabilidades físicas similares a las de las emulsiones Og/W a alta velocidad, a pesar de estar constituidas fundamentalmente por gotas de tamaños mayores (entre 4.5 y 5.5 μm) que las emulsiones simples, que presentan un mayor número de gotas con tamaños comprendidos entre 2.0 y 3.0 μm .
14. Las emulsiones $W_1/Og/W_2$ ofrecen una mayor protección del oleogel frente a la oxidación lipídica primaria y secundaria que las emulsiones Og/W a alta velocidad de cizalla, reduciendo el porcentaje de aumento de hidroperóxidos lipídicos en un 28.9 % y el de compuestos aldehídicos 16.5 veces.
15. Las emulsiones $W_1/Og/W_2$ también pueden llegar a alcanzar, en determinadas condiciones óptimas, una capacidad de retención de curcumina del 100 %.
16. La concentración total de emulgente en la primaria y de Tween 20 en la múltiple son variables clave para minimizar simultáneamente el tamaño de partícula y la oxidación lipídica primaria y secundaria y, a su vez, maximizar la capacidad de retención de curcumina de la emulsión

$W_1/Og/W_2$ homogenizada a alta velocidad de cizalla. Para alcanzar ese objetivo, las condiciones óptimas son: en relación a la emulsión primaria W_1/Og , un 8.1 % p/p de concentración total de emulgente, 89.8 % p/p de ratio PGPR:Tween 20 y 19600 rpm de velocidad de homogenización; y con respecto a la emulsión múltiple $W_1/Og/W_2$, un 5.1 % p/p de concentración total de oleogel que determina la fracción de fase dispersa (W_1/Og), un 9.6 % p/p de Tween 20 en W_2 y 6400 rpm de velocidad de homogenización.

17. Las curvas de viscosidad del oleogel, la emulsión Og/W y la emulsión $W_1/Og/W_2$ óptimos representan un comportamiento pseudoplástico, siendo típico de los materiales estructurados. Asimismo, los tres sistemas anteriores presentan un módulo G' siempre mayor que el módulo G'' , comportamiento representativo de un carácter predominantemente elástico.
18. Los sistemas emulsionados óptimos (Og/W y $W_1/Og/W_2$) son estables a pH muy ácidos o ligeramente básicos (2, 8 y 9), con un contenido salino que depende del tipo de emulsión (entre 100 y 400 mM en la emulsión simple e inferior a 20 mM en el caso de la emulsión múltiple) y a bajas temperaturas de almacenamiento. Asimismo, el oleogel es el que proporciona un mayor grado de protección de la curcumina incorporada, siendo más efectivo frente a estímulos fotolíticos que frente a temperaturas elevadas: en comparación con el sistema de liberación menos efectivo –la emulsión Og/W –, es capaz de proteger 6.77 y 2.14 veces más, respectivamente.
19. El sistema oleogelificado es el más eficiente de todos, estando biodisponible el 41.8 % de la curcumina bioaccesible a los 180 min, aunque la curcumina incorporada en el oleogel es la menos bioaccesible y biodisponible. Por otra parte, los sistemas Og/W y $W_1/Og/W_2$ presentan un porcentaje de biodisponibilidad final de curcumina en torno al 20.2 % y 1.7 veces superior al del oleogel, si bien es cierto que la curcumina de la emulsión $W_1/Og/W_2$ se absorbe más rápidamente que la vehiculizada en la emulsión Og/W .
20. No existe un sistema de liberación mejor que otro: cada uno de ellos se comporta de forma diferente y, en función del objetivo perseguido, puede resultar más o menos adecuada la elección de un sistema u otro.

CHAPTER V
CONCLUSIONS

As a result of the research work described in this Report, the following conclusions have been reached:

1. Ungelled fish oil undergoes more long-term primary lipid oxidation than gelled fish oil and, therefore, the oleogelation process is a suitable strategy to reduce primary lipid oxidation by percentages between 25.9 and 90.0 %. In contrast, for secondary lipid oxidation, oleogelation is not always a good strategy to reduce the concentration of secondary oxidation products in the long term.
2. The short and long-term primary oxidative behavior of oleogels under ambient (23 °C) and accelerated (40 °C) conditions is completely different: the first days, the hydroperoxide concentration of oleogels at 40 °C is between 1.01 and 2.16 times higher than that of oleogels at 23 °C. In contrast, at longer times, the opposite happens. In the case of secondary lipid oxidation, the same behavior occurs in the concentration of aldehyde compounds, independently of the time elapsed since their preparation: the concentration of the samples at 40 °C is always greater than at 23 °C, both in the short and in the long-term, although in the short-term the differences are much smaller.
3. Oleogelation is also a possible strategy to increase the curcumin retention capacity of fish oil enriched with ungelled ω -3 PUFAs and even almost double it.
4. Curcumin concentration and oleogel preparation temperature are critical variables to jointly minimize primary and secondary lipid oxidation of oleogels stored at 23 °C and, in turn, maximize curcumin retention capacity. To achieve this objective, the optimal conditions are: 7.0 wt.% of gelling agent, 0.05 wt.% of curcumin, and 66.0 °C of oleogel production temperature, obtaining a concentration of lipid hydroperoxides and aldehyde compounds of 3389.6 and 445.9 mg/L, respectively, and a curcumin retention capacity during the production process of 71.8 %.
5. The high-pressure homogenization method is not suitable for producing physically stable W/Og emulsions, which may break the oleogel of the

continuous phase and, therefore, give rise to emulsions with larger average droplet sizes.

6. The emulsification of an oleogel to obtain W/Og emulsions, independently of the homogenization method used, significantly reduces primary (in percentages higher than 119.2 %) and secondary (between 1.45 and 2.19 times) lipid oxidation.
7. The oleogel emulsification process has a negligible effect on the stability of the transported curcumin and the W/Og emulsions show higher curcumin retention percentages than the starting oleogel (60.52 % in the emulsion and 48.14 % in the oleogel).
8. The dispersed phase concentration is the most important variable to simultaneously minimize the particle size and the primary and secondary lipid oxidation and, additionally, maximize the curcumin retention capacity of the high-shear rate homogenized W/Og emulsion. To achieve this objective, the optimal conditions are: 38.37 wt.% of dispersed phase, 7.35 wt.% of PGPR, and 12600 rpm of homogenization rate, obtaining an average droplet size of 6.379 μm , a concentration of lipid hydroperoxides and aldehyde compounds of 3646.9 and 349.2 mg/L, respectively, and a curcumin retention capacity of 91.9 %.
9. The Og/W emulsions prepared by high-pressure homogenization method are physically more stable than those homogenized at high-shear rate since the high-pressure homogenization method provides much smaller droplets than the high-shear rate homogenization method.
10. The high-shear rate homogenized Og/W emulsions are more unstable to oxidation, showing percentages of increase in lipid hydroperoxides and aldehyde compounds much higher than those of high-pressure homogenized Og/W emulsions (6.95 % vs. 0.36 % increase of primary and 20.45 % vs. -99.58 % increase of secondary).
11. As in W/Og emulsions, the emulsification process does not affect the stability of the curcumin carried in Og/W systems and, under certain optimal conditions, a curcumin retention capacity of 100 % can be achieved.

12. The dispersed phase fraction is the most important variable to jointly minimize the particle size and the primary and secondary lipid oxidation and, in turn, maximize the curcumin retention capacity of the high-shear rate homogenized Og/W emulsion. To achieve this objective, the optimal operating variables are: 13.9 wt.% of dispersed phase, 5.0 wt.% of Tween 20, 0.48 wt.% of XG, and 12000 rpm of homogenization rate, obtaining a percentage increase of lipid hydroperoxides and aldehyde compounds of 47.7 and 173.0 %, respectively, and a curcumin retention capacity of 100 %.
13. The $W_1/Og/W_2$ emulsions obtained show physical stabilities similar to those of the Og/W emulsions at high-shear rate, despite being consisting of larger-size droplets (between 4.5 and 5.5 μm) than simple emulsions, that in contrast present a greater number of droplets with sizes between 2.0 and 3.0 μm .
14. The $W_1/Og/W_2$ emulsions offer greater oleogel protection against primary and secondary lipid oxidation than Og/W emulsions at high-shear rates, reducing the percentage of increase in lipid hydroperoxides by 28.9 % and aldehyde compounds by 16.5 times.
15. The $W_1/Og/W_2$ emulsions can also achieve, under certain optimal conditions, a curcumin retention capacity of 100 %.
16. The total concentration of emulsifier in the primary emulsion and of Tween 20 in the multiple emulsion are key variables to simultaneously minimize the particle size and the primary and secondary lipid oxidation and, in turn, maximize the curcumin retention capacity of the $W_1/Og/W_2$ emulsion homogenized at high-shear rate. To achieve this objective, the optimal conditions are: for the W_1/Og primary emulsion, 8.1 wt.% of total emulsifier concentration, 89.8 wt.% of PGPR:Tween 20 ratio, and 19600 rpm of homogenization rate; and concerning the $W_1/Og/W_2$ multiple emulsion, 5.1 wt.% of total oleogel concentration that determines the fraction of dispersed phase (W_1/Og), 9.6 wt.% of Tween 20 in W_2 , and 6400 rpm of homogenization rate.

17. The viscosity curves of the optimal oleogel, Og/W emulsion, and $W_1/Og/W_2$ emulsion represent a shear-thinning or pseudoplastic behavior, being typical of structured materials. Likewise, the three previous systems present a modulus G' always greater than the modulus G'' , a behavior representative of a predominantly elastic character.
18. Optimal emulsified systems (Og/W and $W_1/Og/W_2$) are stable at very acidic or slightly basic pH (2, 8, and 9), with saline content depending on the type of emulsion (between 100 and 400 mM in the simple emulsion and less than 20 mM in the case of the multiple emulsion) and at low storage temperatures. In addition, the oleogel is the one that provides the highest degree of protection of the incorporated curcumin, being more effective against photolytic stimuli than against high temperatures: compared to the least effective delivery system –the Og/W emulsion–, it is capable of protecting 6.77 and 2.14 times more, respectively.
19. The oleogelified system is the most efficient of all, with 41.8 % of the bioaccessible curcumin being bioavailable after 180 min, although the curcumin incorporated in the oleogel is the least bioaccessible and bioavailable. On the other hand, the Og/W and $W_1/Og/W_2$ systems present a final bioavailability percentage of curcumin around 20.2 % and 1.7 times higher than that of the oleogel, although it is true that the curcumin in the $W_1/Og/W_2$ emulsion is absorbed faster than the curcumin carried in the Og/W emulsion.
20. There is no better delivery system than another: each of them behaves differently and, depending on the objective pursued, the choice of one system or another may be more or less appropriate.

ANEXOS

Anexo 1

```
clear all

% n: número de muestras realizadas para cada ensayo
n231=16;
n232=16;
n401=16;
n402=16;

% CÁLCULO DE OXIDACIÓN PRIMARIA A T = 23 °C
% Se leen los datos experimentales tomados a partir de la hoja Excel
[ndata231,text231,alldata231]=xlsread('C:\Users\Jose Antonio\Dropbox\Beca
FPU\Tesis\Resultados\OLEOGELES\Ensayo de estabilidad OLEOGELES -
MOD','Estabilidad 23°C','aj14:ay14');
clear ndata231 alldata231
xexp231=xlsread('C:\Users\Jose Antonio\Dropbox\Beca
FPU\Tesis\Resultados\OLEOGELES\Ensayo de estabilidad OLEOGELES -
MOD','Estabilidad 23°C','ai15:ai23');
yexp231=xlsread('C:\Users\Jose Antonio\Dropbox\Beca
FPU\Tesis\Resultados\OLEOGELES\Ensayo de estabilidad OLEOGELES -
MOD','Estabilidad 23°C','aj15:ay23');
% Se crean valores de abscisas, igualmente espaciados
xq231=(xexp231(1,1):0.01:xexp231(end,1));
xqt231=xq231';
% Se calculan los valores de ordenadas mediante un ajuste "pchip" para los
% puntos anteriormente tomados
for i=1:n231
    yqt231(:,i)=interp(xexp231(:,1),yexp231(:,i),xqt231(:,1),'pchip');
end
% Se calcula el área bajo las curvas halladas mediante el ajuste "pchip"
% utilizando el método de los trapecios
for i=1:n231
    z231(i)=trapz(xqt231,yqt231(:,i));
end
% Se escriben las áreas resultantes en la hoja Excel
xlswrite('C:\Users\Jose Antonio\Dropbox\Beca
FPU\Tesis\Resultados\OLEOGELES\Ensayo de estabilidad OLEOGELES -
MOD',z231,'Estabilidad 23°C','aj26:ay26');
% Se grafican los datos experimentales tomados a partir de la hoja Excel y
% los datos ajustados mediante la "pchip"
figure
plot(xexp231(:,1),yexp231(:,1),'xc')
hold on
plot(xexp231(:,1),yexp231(:,2),'db')
plot(xexp231(:,1),yexp231(:,3),'*m')
plot(xexp231(:,1),yexp231(:,4),'ok')
plot(xexp231(:,1),yexp231(:,5),'+g')
plot(xexp231(:,1),yexp231(:,6),'pb')
plot(xexp231(:,1),yexp231(:,7),'hc')
plot(xexp231(:,1),yexp231(:,8),'dc')
plot(xexp231(:,1),yexp231(:,9),'sm')
plot(xexp231(:,1),yexp231(:,10),'^y')
plot(xexp231(:,1),yexp231(:,11),'sg')
plot(xexp231(:,1),yexp231(:,12),'^y')
```

```
plot(xexp231(:,1),yexp231(:,13),'xc')
plot(xexp231(:,1),yexp231(:,14),'*r')
plot(xexp231(:,1),yexp231(:,15),'or')
plot(xexp231(:,1),yexp231(:,16),'+r')
plot(xqt231(:,1),yqt231(:,1),'-c')
plot(xqt231(:,1),yqt231(:,2),'-b')
plot(xqt231(:,1),yqt231(:,3),'-m')
plot(xqt231(:,1),yqt231(:,4),'-k')
plot(xqt231(:,1),yqt231(:,5),'-g')
plot(xqt231(:,1),yqt231(:,6),'-b')
plot(xqt231(:,1),yqt231(:,7),'-c')
plot(xqt231(:,1),yqt231(:,8),'-c')
plot(xqt231(:,1),yqt231(:,9),'-m')
plot(xqt231(:,1),yqt231(:,10),'-y')
plot(xqt231(:,1),yqt231(:,11),'-g')
plot(xqt231(:,1),yqt231(:,12),'-y')
plot(xqt231(:,1),yqt231(:,13),'-c')
plot(xqt231(:,1),yqt231(:,14),'-r')
plot(xqt231(:,1),yqt231(:,15),'-r')
plot(xqt231(:,1),yqt231(:,16),'-r')
axis([0 36 0 10000]);
title('Primary Lipid Oxidation Measurement (PV Method) - T = 23
°C','FontSize',12,'FontWeight','bold');
xlabel('Time, days','FontSize',10);
ylabel('Lipid Hydroperoxides, mg/L','FontSize',10);
legend(text231);

% CÁLCULO DE OXIDACIÓN SECUNDARIA A T = 23 °C
% Se leen los datos experimentales tomados a partir de la hoja Excel
[ndata232,text232,alldata232]=xlsread('C:\Users\Jose Antonio\Dropbox\Beca
FPU\Tesis\Resultados\OLEOGELES\Ensayo de estabilidad OLEOGELES -
MOD','Estabilidad 23°C','aj34:ay34');
clear ndata232 alldata232
xexp232=xlsread('C:\Users\Jose Antonio\Dropbox\Beca
FPU\Tesis\Resultados\OLEOGELES\Ensayo de estabilidad OLEOGELES -
MOD','Estabilidad 23°C','ai35:ai43');
yexp232=xlsread('C:\Users\Jose Antonio\Dropbox\Beca
FPU\Tesis\Resultados\OLEOGELES\Ensayo de estabilidad OLEOGELES -
MOD','Estabilidad 23°C','aj35:ay43');
% Se crean valores de abscisas, igualmente espaciados
xq232=(xexp232(1,1):0.01:xexp232(end,1));
xqt232=xq232';
% Se calculan los valores de ordenadas mediante un ajuste "pchip" para los
% puntos anteriormente tomados
for i=1:n232
    yqt232(:,i)=interp(xexp232(:,1),yexp232(:,i),xqt232(:,1),'pchip');
end
% Se calcula el área bajo las curvas halladas mediante el ajuste "pchip"
% utilizando el método de los trapecios
for i=1:n232
    z232(i)=trapz(xqt232,yqt232(:,i));
end
% Se escriben las áreas resultantes en la hoja Excel
xlswrite('C:\Users\Jose Antonio\Dropbox\Beca
FPU\Tesis\Resultados\OLEOGELES\Ensayo de estabilidad OLEOGELES -
MOD',z232,'Estabilidad 23°C','aj46:ay46');
% Se grafican los datos experimentales tomados a partir de la hoja Excel y
% los datos ajustados mediante la "pchip"
figure
```

```
plot(xexp232(:,1),yexp232(:,1),'xc')
hold on
plot(xexp232(:,1),yexp232(:,2),'db')
plot(xexp232(:,1),yexp232(:,3),'*m')
plot(xexp232(:,1),yexp232(:,4),'ok')
plot(xexp232(:,1),yexp232(:,5),'+g')
plot(xexp232(:,1),yexp232(:,6),'pb')
plot(xexp232(:,1),yexp232(:,7),'hc')
plot(xexp232(:,1),yexp232(:,8),'dc')
plot(xexp232(:,1),yexp232(:,9),'sm')
plot(xexp232(:,1),yexp232(:,10),'^y')
plot(xexp232(:,1),yexp232(:,11),'sg')
plot(xexp232(:,1),yexp232(:,12),'^y')
plot(xexp232(:,1),yexp232(:,13),'xc')
plot(xexp232(:,1),yexp232(:,14),'*r')
plot(xexp232(:,1),yexp232(:,15),'or')
plot(xexp232(:,1),yexp232(:,16),'+r')
plot(xqt232(:,1),yqt232(:,1),'-c')
plot(xqt232(:,1),yqt232(:,2),'-b')
plot(xqt232(:,1),yqt232(:,3),'-m')
plot(xqt232(:,1),yqt232(:,4),'-k')
plot(xqt232(:,1),yqt232(:,5),'-g')
plot(xqt232(:,1),yqt232(:,6),'-b')
plot(xqt232(:,1),yqt232(:,7),'-c')
plot(xqt232(:,1),yqt232(:,8),'-c')
plot(xqt232(:,1),yqt232(:,9),'-m')
plot(xqt232(:,1),yqt232(:,10),'-y')
plot(xqt232(:,1),yqt232(:,11),'-g')
plot(xqt232(:,1),yqt232(:,12),'-y')
plot(xqt232(:,1),yqt232(:,13),'-c')
plot(xqt232(:,1),yqt232(:,14),'-r')
plot(xqt232(:,1),yqt232(:,15),'-r')
plot(xqt232(:,1),yqt232(:,16),'-r')
axis([0 36 0 600]);
title('Secondary Lipid Oxidation Measurement (p-AnV Method) - T = 23
°C','FontSize',12,'FontWeight','bold');
xlabel('Time, days','FontSize',10);
ylabel('Secondary Lipid Oxidation Products, mg/L','FontSize',10);
legend(text232);

% CÁLCULO DE OXIDACIÓN PRIMARIA A T = 40 °C
% Se leen los datos experimentales tomados a partir de la hoja Excel
[ndata401,text401,alldata401]=xlsread('C:\Users\Jose Antonio\Dropbox\Beca
FPU\Tesis\Resultados\OLEOGELES\Ensayo de estabilidad OLEOGELES -
MOD','Estabilidad 40°C','aj14:ay14');
clear ndata401 alldata401
xexp401=xlsread('C:\Users\Jose Antonio\Dropbox\Beca
FPU\Tesis\Resultados\OLEOGELES\Ensayo de estabilidad OLEOGELES -
MOD','Estabilidad 40°C','ai15:ai23');
yexp401=xlsread('C:\Users\Jose Antonio\Dropbox\Beca
FPU\Tesis\Resultados\OLEOGELES\Ensayo de estabilidad OLEOGELES -
MOD','Estabilidad 40°C','aj15:ay23');
% Se crean valores de abscisas, igualmente espaciados
xq401=(xexp401(1,1):0.01:xexp401(end,1));
xqt401=xq401';
% Se calculan los valores de ordenadas mediante un ajuste "pchip" para los
% puntos anteriormente tomados
for i=1:n401
    yqt401(:,i)=interp(xexp401(:,1),yexp401(:,i),xqt401(:,1),'pchip');
```

```
end
% Se calcula el área bajo las curvas halladas mediante el ajuste "pchip"
% utilizando el método de los trapecios
for i=1:n401
    z401(i)=trapz(xqt401,yqt401(:,i));
end
% Se escriben las áreas resultantes en la hoja Excel
xlswrite('C:\Users\Jose Antonio\Dropbox\Beca
FPU\Tesis\Resultados\OLEOGELES\Ensayo de estabilidad OLEOGELES -
MOD',z401,'Estabilidad 40°C','aj26:ay26');
% Se grafican los datos experimentales tomados a partir de la hoja Excel y
% los datos ajustados mediante la "pchip"
figure
plot(xexp401(:,1),yexp401(:,1),'xc')
hold on
plot(xexp401(:,1),yexp401(:,2),'db')
plot(xexp401(:,1),yexp401(:,3),'*m')
plot(xexp401(:,1),yexp401(:,4),'ok')
plot(xexp401(:,1),yexp401(:,5),'+g')
plot(xexp401(:,1),yexp401(:,6),'pb')
plot(xexp401(:,1),yexp401(:,7),'hc')
plot(xexp401(:,1),yexp401(:,8),'dc')
plot(xexp401(:,1),yexp401(:,9),'sm')
plot(xexp401(:,1),yexp401(:,10),'^y')
plot(xexp401(:,1),yexp401(:,11),'sg')
plot(xexp401(:,1),yexp401(:,12),'^y')
plot(xexp401(:,1),yexp401(:,13),'xc')
plot(xexp401(:,1),yexp401(:,14),'*r')
plot(xexp401(:,1),yexp401(:,15),'or')
plot(xexp401(:,1),yexp401(:,16),'+r')
plot(xqt401(:,1),yqt401(:,1),'-c')
plot(xqt401(:,1),yqt401(:,2),'-b')
plot(xqt401(:,1),yqt401(:,3),'-m')
plot(xqt401(:,1),yqt401(:,4),'-k')
plot(xqt401(:,1),yqt401(:,5),'-g')
plot(xqt401(:,1),yqt401(:,6),'-b')
plot(xqt401(:,1),yqt401(:,7),'-c')
plot(xqt401(:,1),yqt401(:,8),'-c')
plot(xqt401(:,1),yqt401(:,9),'-m')
plot(xqt401(:,1),yqt401(:,10),'-y')
plot(xqt401(:,1),yqt401(:,11),'-g')
plot(xqt401(:,1),yqt401(:,12),'-y')
plot(xqt401(:,1),yqt401(:,13),'-c')
plot(xqt401(:,1),yqt401(:,14),'-r')
plot(xqt401(:,1),yqt401(:,15),'-r')
plot(xqt401(:,1),yqt401(:,16),'-r')
axis([0 36 0 10000]);
title('Primary Lipid Oxidation Measurement (PV Method) - T = 40
°C','FontSize',12,'FontWeight','bold');
xlabel('Time, days','FontSize',10);
ylabel('Lipid Hydroperoxides, mg/L','FontSize',10);
legend(text401);

% CÁLCULO DE OXIDACIÓN SECUNDARIA A T = 40 °C
% Se leen los datos experimentales tomados a partir de la hoja Excel
[ndata402,text402,alldata402]=xlsread('C:\Users\Jose Antonio\Dropbox\Beca
FPU\Tesis\Resultados\OLEOGELES\Ensayo de estabilidad OLEOGELES -
MOD','Estabilidad 40°C','aj34:ay34');
clear ndata402 alldata402
```

```
xexp402=xlsread('C:\Users\Jose Antonio\Dropbox\Beca
FPU\Tesis\Resultados\OLEOGELES\Ensayo de estabilidad OLEOGELES -
MOD','Estabilidad 40°C','ai35:ai43');
yexp402=xlsread('C:\Users\Jose Antonio\Dropbox\Beca
FPU\Tesis\Resultados\OLEOGELES\Ensayo de estabilidad OLEOGELES -
MOD','Estabilidad 40°C','aj35:ay43');
% Se crean valores de abscisas, igualmente espaciados
xq402=(xexp402(1,1):0.01:xexp402(end,1));
xqt402=xq402';
% Se calculan los valores de ordenadas mediante un ajuste "pchip" para los
% puntos anteriormente tomados
for i=1:n402
    yqt402(:,i)=interp(xexp402(:,1),yexp402(:,i),xqt402(:,1),'pchip');
end
% Se calcula el área bajo las curvas halladas mediante el ajuste "pchip"
% utilizando el método de los trapecios
for i=1:n402
    z402(i)=trapz(xqt402,yqt402(:,i));
end
% Se escriben las áreas resultantes en la hoja Excel
xlswrite('C:\Users\Jose Antonio\Dropbox\Beca
FPU\Tesis\Resultados\OLEOGELES\Ensayo de estabilidad OLEOGELES -
MOD',z402,'Estabilidad 40°C','aj46:ay46');
% Se grafican los datos experimentales tomados a partir de la hoja Excel y
% los datos ajustados mediante la "pchip"
figure
plot(xexp402(:,1),yexp402(:,1),'xc')
hold on
plot(xexp402(:,1),yexp402(:,2),'db')
plot(xexp402(:,1),yexp402(:,3),'*m')
plot(xexp402(:,1),yexp402(:,4),'ok')
plot(xexp402(:,1),yexp402(:,5),'+g')
plot(xexp402(:,1),yexp402(:,6),'pb')
plot(xexp402(:,1),yexp402(:,7),'hc')
plot(xexp402(:,1),yexp402(:,8),'dc')
plot(xexp402(:,1),yexp402(:,9),'sm')
plot(xexp402(:,1),yexp402(:,10),'^y')
plot(xexp402(:,1),yexp402(:,11),'sg')
plot(xexp402(:,1),yexp402(:,12),'^y')
plot(xexp402(:,1),yexp402(:,13),'xc')
plot(xexp402(:,1),yexp402(:,14),'*r')
plot(xexp402(:,1),yexp402(:,15),'or')
plot(xexp402(:,1),yexp402(:,16),'+r')
plot(xqt402(:,1),yqt402(:,1),'-c')
plot(xqt402(:,1),yqt402(:,2),'-b')
plot(xqt402(:,1),yqt402(:,3),'-m')
plot(xqt402(:,1),yqt402(:,4),'-k')
plot(xqt402(:,1),yqt402(:,5),'-g')
plot(xqt402(:,1),yqt402(:,6),'-b')
plot(xqt402(:,1),yqt402(:,7),'-c')
plot(xqt402(:,1),yqt402(:,8),'-c')
plot(xqt402(:,1),yqt402(:,9),'-m')
plot(xqt402(:,1),yqt402(:,10),'-y')
plot(xqt402(:,1),yqt402(:,11),'-g')
plot(xqt402(:,1),yqt402(:,12),'-y')
plot(xqt402(:,1),yqt402(:,13),'-c')
plot(xqt402(:,1),yqt402(:,14),'-r')
plot(xqt402(:,1),yqt402(:,15),'-r')
plot(xqt402(:,1),yqt402(:,16),'-r')
```

```
axis([0 36 0 600]);  
title('Secondary Lipid Oxidation Measurement (p-AnV Method) - T = 40  
°C', 'FontSize',12,'FontWeight','bold');  
xlabel('Time, days', 'FontSize',10);  
ylabel('Secondary Lipid Oxidation Products, mg/L', 'FontSize',10);  
legend(text402);
```

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, P., Arroyo-Manzanares, N., Rivas-Montoya, E., Ochando-Pulido, J.M., Guillamon, E., García-Campaña, A.M., Martínez-Ferez, A., **2018**. Effects of different vehiculization strategies for the allium derivative propyl propane thiosulfonate during dynamic simulation of the pig gastrointestinal tract. *Can. J. Anim. Sci.* 99, 244–253. <https://doi.org/10.1139/cjas-2018-0063>
- Abd-Allah, G.A., El-Bakry, K.A., Bahnasawy, M.H., El-Khodary, E.-S.R., **2016**. Protective effects of curcumin and ginger on liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Int. J. Pharmacol.* 12, 361–369. <https://doi.org/10.3923/ijp.2016.361.369>
- Abdolahi, M., Jafarieh, A., Sarraf, P., Sedighiyan, M., Yousefi, A., Tafakhori, A., Abdollahi, H., Salehinia, F., Djalali, M., **2019**. The neuromodulatory effects of ω -3 fatty acids and nano-curcumin on the COX-2/iNOS network in migraines: A clinical trial study from gene expression to clinical symptoms. *Endocr. Metab. Immune Disord. – Drug Targets* 19, 874–884. <https://doi.org/10.2174/1871530319666190212170140>
- Abdolahi, M., Sarraf, P., Javanbakht, M.H., Honarvar, N.M., Hatami, M., Soveyd, N., Tafakhori, A., Sedighiyan, M., Djalali, M., Jafarieh, A., Masoudian, Y., Djalali, M., **2018**. A novel combination of ω -3 fatty acids and nano-curcumin modulates interleukin-6 gene expression and high

- sensitivity C-reactive protein serum levels in patients with migraine: A randomized clinical trial study. *CNS Neurol. Disord. – Drug Targets* 17, 430–438. <https://doi.org/10.2174/1871527317666180625101643>
- Abdolahi, M., Tafakhori, A., Togha, M., Okhovat, A.A., Siassi, F., Eshraghian, M.R., Sedighyan, M., Djalali, M., Mohammadzadeh Honarvar, N., Djalali, M., **2017**. The synergistic effects of ω -3 fatty acids and nano-curcumin supplementation on tumor necrosis factor (TNF)- α gene expression and serum level in migraine patients. *Immunogenetics* 69, 371–378. <https://doi.org/10.1007/s00251-017-0992-8>
 - Aditya, N.P., Aditya, S., Yang, H.-J., Kim, H.W., Park, S.O., Ko, S., **2015a**. Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion. *Food Chem.* 173, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.131>
 - Aditya, N.P., Aditya, S., Yang, H.-J., Kim, H.W., Park, S.O., Lee, J., Ko, S., **2015b**. Curcumin and catechin co-loaded water-in-oil-in-water emulsion and its beverage application. *J. Funct. Foods* 15, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.013>
 - Aggarwal, B.B., Kumar, A., Bharti, A.C., **2003**. Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 23, 363–398.
 - Aggarwal, B.B., Shishodia, S., **2004**. Suppression of the nuclear factor- κ B activation pathway by spice-derived phytochemicals: Reasoning for seasoning. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1030, 434–441. <https://doi.org/10.1196/annals.1329.054>
 - Aggett, P.J., **2010**. Population reference intakes and micronutrient bioavailability: A european perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 1433S–1437S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.28674C>
 - Agoub, A.A., Smith, A.M., Giannouli, P., Richardson, R.K., Morris, E.R., **2007**. “Melt-in-the-mouth” gels from mixtures of xanthan and konjac glucomannan under acidic conditions: A rheological and calorimetric study

of the mechanism of synergistic gelation. *Carbohydr. Polym.* 69, 713–724. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.02.014>

- Ahmad, M.Z., Ahmad, J., Zafar, S., Warsi, M.H., Abdel-Wahab, B.A., Akhter, S., Alam, M.A., **2019**. Omega-3 fatty acids as adjunctive therapeutics: Prospective of nanoparticles in its formulation development. *Ther. Deliv.* 11, 851–868. <https://doi.org/10.4155/tde-2019-0072>
- Ahmed, K., Li, Y., McClements, D.J., Xiao, H., **2012**. Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. *Food Chem.* 132, 799–807. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.039>
- Ahsan, M.J., Khalilullah, H., Yasmin, S., Jadav, S.S., Govindasamy, J., **2013**. Synthesis, characterisation, and in vitro anticancer activity of curcumin analogues bearing pyrazole/pyrimidine ring targeting EGFR tyrosine kinase [WWW Document]. *BioMed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2013/239354>
- Ak, T., Gülçin, İ., **2008**. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem. Biol. Interact.* 174, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.003>
- Alasalvar, C., Shahidi, F., Quantick, P., **2002**. Food and health applications of marine nutraceuticals: A review, in: Alasalvar, C., Taylor, T. (Eds.), *Seafoods – Quality, technology and nutraceutical applications*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 175–204. https://doi.org/10.1007/978-3-662-09836-3_15
- Albadalejo, J.G., Castillo, D.S. del, Vallespí, R.M.C., Díaz, J.L.L., Osoro, I.A., Bertolini, J.E., **2015**. Curcumina y curcuminoides: Química, estudios estructurales y propiedades biológicas. *An. Real Acad. Nac. Farm.* 4, 278–310.
- Albarrán Castro, N., **2011**. Procesos de migración de contaminantes asociados a coloides en un almacenamiento geológico de residuos radiactivos (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

- Albert, C.M., Hennekens, C.H., O'Donnell, C.J., Ajani, U.A., Carey, V.J., Willett, W.C., Ruskin, J.N., Manson, J.E., **1998**. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA* 279, 23–28. <https://doi.org/10.1001/jama.279.1.23>
- Alejandro, M., Astiasarán, I., Ansorena, D., Barbut, S., **2019**. Using canola oil hydrogels and organogels to reduce saturated animal fat in meat batters. *Food Res. Int.* 122, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.056>
- Ali, I., Haque, A., Saleem, K., **2014**. Separation and identification of curcuminoids in turmeric powder by HPLC using phenyl column. *Anal. Methods* 6, 2526–2536. <https://doi.org/10.1039/C3AY41987H>
- Alisi, I.O., Uzairu, A., Abechi, S.E., Idris, S.O., **2018**. Evaluation of the antioxidant properties of curcumin derivatives by genetic function algorithm. *J. Adv. Res.* 12, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.03.003>
- Altenburg, J.D., Bieberich, A.A., Terry, C., Harvey, K.A., VanHorn, J.F., Xu, Z., Jo Davissou, V., Siddiqui, R.A., **2011**. A synergistic antiproliferation effect of curcumin and docosahexaenoic acid in SK-BR-3 breast cancer cells: Unique signaling not explained by the effects of either compound alone. *BMC Cancer* 11, 149. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-149>
- Álvarez, C., Iriart, C.H., Candal, R.J., Herrera, M.L., **2010**. Stability of emulsions formulated with high concentrations of sodium caseinate and trehalose. *Food Res. Int.* 43, 1482–1493. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.008>
- Ambrosone, L., Cinelli, G., Mosca, M., Ceglie, A., **2006**. Susceptibility of water-emulsified extra virgin olive oils to oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83, 165–170. <https://doi.org/10.1007/s11746-006-1190-2>
- American Oil Chemists' Society, **1998**. AOCS Official Method Cd 18-90 – p-Anisidine value. Sampling and analysis of commercial fats and oils, in: Official methods and recommended practices of the AOCS. *AOCS Press*, Champaign, pp. 1–2.

- American Oil Chemists' Society, **1997**. AOCS Official Method Cd 12b-92 – Oil stability index (OSI). Sampling and analysis of commercial fats and oils, in: Official methods and recommended practices of the AOCS. *AOCS Press*, Champaign, pp. 1–5.
- Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Newman, R.A., Aggarwal, B.B., **2007**. Bioavailability of curcumin: Problems and promises. *Mol. Pharm.* 4, 807–818. <https://doi.org/10.1021/mp700113r>
- Anand, P., Sundaram, C., Jhurani, S., Kunnumakkara, A.B., Aggarwal, B.B., **2008**. Curcumin and cancer: An “old-age” disease with an “age-old” solution. *Cancer Lett.* 267, 133–164. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.025>
- Anarakdim, K., Gutiérrez, G., Cambiella, Á., Senhadji-Kebiche, O., Matos, M., **2020**. The effect of emulsifiers on the emulsion stability and extraction efficiency of Cr(VI) using emulsion liquid membranes (ELMs) formulated with a green solvent. *Membranes* 10, 76. <https://doi.org/10.3390/membranes10040076>
- Araiza-Calahorra, A., Akhtar, M., Sarkar, A., **2018**. Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: From encapsulation to bioaccessibility. *Trends Food Sci. Technol.* 71, 155–169. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.009>
- Aranberri, I., Binks, B.P., Clint, J.H., Fletcher, P.D.I., **2006**. Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensioactivos. *Rev. Iberoam. Polímeros* 7, 211–231.
- Arezzini, B., Ferrali, M., Ferrari, E., Grandi, R., Monti, S., Saladini, M., **2004**. Glycosyl-curcuminoids as potential new chelating agents in iron overload chelation therapy. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2004, 646–652. <https://doi.org/10.1002/ejic.200300463>
- Artiga-Artigas, M., Lanjari-Pérez, Y., Martín-Belloso, O., **2018**. Curcumin-loaded nanoemulsions stability as affected by the nature and

- concentration of surfactant. *Food Chem.* 266, 466–474. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.043>
- Arun, N., Nalini, N., **2002**. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. *Plant Foods Hum. Nutr.* 57, 41–52. <https://doi.org/10.1023/A:1013106527829>
 - Ashkar, A., Laufer, S., Rosen-Kligvasser, J., Lesmes, U., Davidovich-Pinhas, M., **2019**. Impact of different oil gelators and oleogelation mechanisms on digestive lipolysis of canola oil oleogels. *Food Hydrocoll.* 97, 105218. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105218>
 - Asnaashari, M., Farahmandfar, R., Kenari, R.E., **2017**. Influence of light and temperature on lipid oxidation and colour changes of corn oil including curcumin. Presented at the 118th The IIER International Conference, Dubai.
 - Azuma, G., Kimura, N., Hosokawa, M., Miyashita, K., **2009**. Effect of droplet size on the oxidative stability of soybean oil TAG and fish oil TAG in oil-in-water emulsion. *J. Oleo Sci.* 58, 329–338. <https://doi.org/10.5650/jos.58.329>
 - Baglole, K.N., Boland, P.G., Wagner, B.D., **2005**. Fluorescence enhancement of curcumin upon inclusion into parent and modified cyclodextrins. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 173, 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2005.04.002>
 - Bai, J., Ren, Y., Li, Y., Fan, M., Qian, H., Wang, L., Wu, G., Zhang, H., Qi, X., Xu, M., Rao, Z., **2019**. Physiological functionalities and mechanisms of β -glucans. *Trends Food Sci. Technol.* 88, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.023>
 - Bai, L., Huan, S., Gu, J., McClements, D.J., **2016**. Fabrication of oil-in-water nanoemulsions by dual-channel microfluidization using natural emulsifiers: Saponins, phospholipids, proteins, and polysaccharides. *Food Hydrocoll.* 61, 703–711. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.035>
 - Bai, L., Huan, S., Li, Z., McClements, D.J., **2017**. Comparison of emulsifying properties of food-grade polysaccharides in oil-in-water

emulsions: Gum arabic, beet pectin, and corn fiber gum. *Food Hydrocoll.* 66, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.019>

- Balasubramanian, K., **2006**. Molecular orbital basis for yellow curry spice curcumin's prevention of Alzheimer's disease. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3512–3520. <https://doi.org/10.1021/jf0603533>
- Balcaen, M., Vermeir, L., Van der Meeren, P., **2017**. Influence of protein type on polyglycerol polyricinoleate replacement in W/O/W (water-in-oil-in-water) double emulsions for food applications. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 535, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.09.034>
- Bang, H.O., Dyerberg, J., Sinclair, H.M., **1980**. The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *Am. J. Clin. Nutr.* 33, 2657–2661. <https://doi.org/10.1093/ajcn/33.12.2657>
- Banks, W., Muir, D.D., **1988**. Stability of alcohol-containing emulsions, in: Dickinson, E., Stainsby, G. (Eds.), *Advances in food emulsions and foams. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., UK*, pp. 257–283.
- Barden, L., Decker, E.A., **2016**. Lipid oxidation in low-moisture food: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 2467–2482. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.848833>
- Barnés, C.M., Prox, D., Christison-Lagay, E.A., Le, H.D., Short, S., Cassiola, F., Panigrahy, D., Chaponis, D., Butterfield, C., Nehra, D., Fallon, E.M., Kieran, M., Folkman, J., Puder, M., **2012**. Inhibition of neuroblastoma cell proliferation with omega-3 fatty acids and treatment of a murine model of human neuroblastoma using a diet enriched with omega-3 fatty acids in combination with sunitinib. *Pediatr. Res.* 71, 168–178. <https://doi.org/10.1038/pr.2011.28>
- Barnes, H.A., **1989**. An introduction to rheology. Rheology series. *Elsevier*, Amsterdam.
- Beckermann, B., Beneke, M., Seitz, I., **1990**. Comparative bioavailability of eicosapentaenoic acid and docasahexaenoic acid from triglycerides, free

- fatty acids and ethyl esters in volunteers. *Arzneimittelforschung*. 40, 700–704.
- Bemer, H.L., Limbaugh, M., Cramer, E.D., Harper, W.J., Maleky, F., **2016**. Vegetable organogels incorporation in cream cheese products. *Food Res. Int.* 85, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.016>
 - Bengoechea-Ruiz, C., **2006**. Estudio reológico de emulsiones alimentarias estabilizadas con proteínas vegetales (Tesis Doctoral). Universidad de Sevilla, Sevilla.
 - Benichou, A., Aserin, A., Garti, N., **2007**. W/O/W double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide complexes. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 294, 20–32. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.07.056>
 - Benichou, A., Aserin, A., Garti, N., **2004**. Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Adv. Colloid Interface Sci.* 108–109, 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.013>
 - Berton-Carabin, C.C., Ropers, M.-H., Genot, C., **2014**. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Involvement of the interfacial layer. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13, 945–977. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12097>
 - Bhullar, K.S., Jha, A., Youssef, D., Rupasinghe, H.P.V., **2013**. Curcumin and its carbocyclic analogs: Structure-activity in relation to antioxidant and selected biological properties. *Molecules* 18, 5389–5404. <https://doi.org/10.3390/molecules18055389>
 - Bisht, S., Feldmann, G., Soni, S., Ravi, R., Karikar, C., Maitra, A., Maitra, A., **2007**. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (“nanocurcumin”): A novel strategy for human cancer therapy. *J. Nanobiotechnology* 5, 3. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-5-3>
 - Boga, C., Delpivo, C., Ballarin, B., Morigi, M., Galli, S., Micheletti, G., Tozzi, S., **2013**. Investigation on the dyeing power of some organic natural compounds for a green approach to hair dyeing. *Dyes Pigments* 97, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2012.11.020>

- Bonattini, V.H., Paula, L.A., Jesus, N.A. de, Tavares, D.C., Nicolella, H.D., Magalhães, L.G., Molina, E.F., **2020**. One-step formation of polyurea gel as a multifunctional approach for biological and environmental applications. *Polym. Int.* 69, 476–484. <https://doi.org/10.1002/pi.5978>
- Bonnet, M., Cansell, M., Berkaoui, A., Ropers, M.H., Anton, M., Leal-Calderon, F., **2009**. Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. *Food Hydrocoll.* 23, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.11.016>
- Bonnet, M., Cansell, M., Placin, F., Monteil, J., Anton, M., Leal-Calderon, F., **2010**. Influence of the oil globule fraction on the release rate profiles from multiple W/O/W emulsions. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 78, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.02.010>
- Bot, A., Adel, R. den, Roijers, E.C., **2008**. Fibrils of γ -oryzanol + β -sitosterol in edible oil organogels. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85, 1127–1134. <https://doi.org/10.1007/s11746-008-1298-7>
- Bou, R., Cofrades, S., Jiménez-Colmenero, F., **2014**. Physicochemical properties and riboflavin encapsulation in double emulsions with different lipid sources. *LWT – Food Sci. Technol.* 59, 621–628. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.044>
- Box, G.E.P., Behnken, D.W., **1960**. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* 2, 455–475. <https://doi.org/10.1080/00401706.1960.10489912>
- Box, G.E.P., Wilson, K.B., **1951**. On the experimental attainment of optimum condition. *J. R. Stat. Soc., Series B* 13, 1–49.
- Bozbulut, R., Sanlier, N., **2019**. Promising effects of β -glucans on glyceamic control in diabetes. *Trends Food Sci. Technol.* 83, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.018>
- Brenna, J.T., Salem Jr., N., Sinclair, A.J., Cunnane, S.C., **2009**. α -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated

- fatty acids in humans. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 80, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2009.01.004>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A.R., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C.N., Souchon, I., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Recio, I., **2019**. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat. Protoc.* 14, 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
 - Brückner, M., Bade, M., Kunz, B., **2007**. Investigations into the stabilization of a volatile aroma compound using a combined emulsification and spray drying process. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 137–146. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0518-3>
 - Budilarto, E.S., Kamal-Eldin, A., **2015**. The supramolecular chemistry of lipid oxidation and antioxidation in bulk oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117, 1095–1137. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400200>
 - Bukhari, S.N.A., Hussain, F., Thu, H.E., Hussain, Z., **2019**. Synergistic effects of combined therapy of curcumin and Fructus Ligustri Lucidi for treatment of osteoporosis: Cellular and molecular evidence of enhanced bone formation. *J. Integr. Med.* 17, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2018.08.003>
 - Bukhari, S.N.A., Jantan, I.B., Jasamai, M., Ahmad, W., Amjad, M.W.B., **2013**. Synthesis and biological evaluation of curcumin analogues. *J. Med. Sci. Faisalabad* 13, 501–513. <https://doi.org/10.3923/jms.2013.501.513>
 - Burr, M.L., Gilbert, J.F., Holliday, R.M., Elwood, P.C., Fehily, A.M., Rogers, S., Sweetnam, P.M., Deadman, N.M., **1989**. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: Diet and

reinfarction trial (DART). *The Lancet*, originally published as Volume 2, Issue 8666 334, 757–761. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)90828-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(89)90828-3)

- Buscemi, S., Corleo, D., Di Pace, F., Petroni, M.L., Satriano, A., Marchesini, G., **2018**. The effect of lutein on eye and extra-eye health. *Nutrients* 10, 1321. <https://doi.org/10.3390/nu10091321>
- Cai, X., Du, X., Zhu, G., Cao, C., **2020**. Induction effect of NaCl on the formation and stability of emulsions stabilized by carboxymethyl starch/xanthan gum combinations. *Food Hydrocoll.* 105, 105776. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105776>
- Calder, P.C., Yaqoob, P., **2009**. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. *BioFactors* 35, 266–272. <https://doi.org/10.1002/biof.42>
- Callender, S.P., Mathews, J.A., Kobernyk, K., Wettig, S.D., **2017**. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. *Int. J. Pharm.* 526, 425–442. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.005>
- Calligaris, S., Alongi, M., Lucci, P., Anese, M., **2020**. Effect of different oleogelators on lipolysis and curcuminoid bioaccessibility upon in vitro digestion of sunflower oil oleogels. *Food Chem.* 314, 126146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126146>
- Calva-Estrada, S.J., **2015**. Caracterización, actividad antioxidante y estabilidad de una emulsión O/W de carotenoides totales empleando jugo de zarzamora con fase continua (Tesis de Maestría). Universidad Veracruzana, Xalapa.
- Cao, Y., Dickinson, E., Wedlock, D.J., **1990**. Creaming and flocculation in emulsions containing polysaccharide. *Food Hydrocoll.* 4, 185–195. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80151-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80151-3)
- Carrero, J.J., Martín-Bautista, E., Baró, L., Fonollá, J., Jiménez, J., Boza, J.J., López-Huertas, E., **2005**. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Nutr. Hosp.* 20, 63–69.

- Carrillo-Navas, H., Cruz-Olivares, J., Varela-Guerrero, V., Alamilla-Beltrán, L., Vernon-Carter, E.J., Pérez-Alonso, C., **2012**. Rheological properties of a double emulsion nutraceutical system incorporating chia essential oil and ascorbic acid stabilized by carbohydrate polymer-protein blends. *Carbohydr. Polym.* 87, 1231–1235. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.005>
- Caygill, C.P.J., Charlett, A., Hill, M.J., **1996**. Fat, fish, fish oil and cancer. *Br. J. Cancer* 74, 159–164. <https://doi.org/10.1038/bjc.1996.332>
- Ceballos, M.R., Brailovsky, V., Bierbrauer, K.L., Cuffini, S.L., Beltramo, D.M., Bianco, I.D., **2014**. Effect of ethylcellulose on the structure and stability of non-aqueous oil based propylene glycol emulsions. *Food Res. Int.* 62, 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.040>
- Cederholm, T., **2017**. Fish consumption and omega-3 fatty acid supplementation for prevention or treatment of cognitive decline, dementia or Alzheimer’s disease in older adults – Any news? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 20, 104–109. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000350>
- Chakdar, H., Pabbi, S., **2017**. Chapter 9 – Algal pigments for human health and cosmeceuticals, in: Rastogi, R.P., Madamwar, D., Pandey, A. (Eds.), *Algal green chemistry*. Elsevier, Amsterdam, pp. 171–188. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63784-0.00009-6>
- Chanamai, R., McClements, D.J., **2000**. Dependence of creaming and rheology of monodisperse oil-in-water emulsions on droplet size and concentration. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 172, 79–86. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00551-3](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00551-3)
- Chandran, B., Goel, A., **2012**. A randomized, pilot study to assess the efficacy and safety of curcumin in patients with active rheumatoid arthritis. *Phytother. Res.* 26, 1719–1725. <https://doi.org/10.1002/ptr.4639>

- Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S., Ashokkumar, M., **2012**. Ultrasonics in food processing. *Ultrason. Sonochem.* 19, 975–983. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.01.010>
- Chang, H.W., Tan, T.B., Tan, P.Y., Abas, F., Lai, O.M., Wang, Y., Wang, Y., Nehdi, I.A., Tan, C.P., **2018**. Physical properties and stability evaluation of fish oil-in-water emulsions stabilized using thiol-modified β -lactoglobulin fibrils-chitosan complex. *Food Res. Int.* 105, 482–491. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.034>
- Chang, Y., McClements, D.J., **2016**. Characterization of mucin-lipid droplet interactions: Influence on potential fate of fish oil-in-water emulsions under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocoll.* 56, 425–433. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.12.034>
- Chang, Y., McClements, D.J., **2015**. Interfacial deposition of an anionic polysaccharide (fucoidan) on protein-coated lipid droplets: Impact on the stability of fish oil-in-water emulsions. *Food Hydrocoll.* 51, 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.014>
- Chatterjee, S., Judeh, Z.M.A., **2017**. Impact of the type of emulsifier on the physicochemical characteristics of the prepared fish oil-loaded microcapsules. *J. Microencapsul.* 34, 366–382. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1341561>
- Chávez-Páez, M., Quezada, C.M., Ibarra-Bracamontes, L., González-Ochoa, H.O., Arauz-Lara, J.L., **2012**. Coalescence in double emulsions. *Langmuir* 28, 5934–5939. <https://doi.org/10.1021/la205144g>
- Chen, B., McClements, D.J., Decker, E.A., **2010**. Role of continuous phase anionic polysaccharides on the oxidative stability of menhaden oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3779–3784. <https://doi.org/10.1021/jf9037166>
- Chen, B., Rao, J., Ding, Y., McClements, D.J., Decker, E.A., **2016**. Lipid oxidation in base algae oil and water-in-algae oil emulsion: Impact of

- natural antioxidants and emulsifiers. *Food Res. Int.* 85, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.038>
- Chen, J., Stavro, P.M., Thompson, L.U., **2002**. Dietary flaxseed inhibits human breast cancer growth and metastasis and downregulates expression of insulin-like growth factor and epidermal growth factor receptor. *Nutr. Cancer* 43, 187–192. https://doi.org/10.1207/S15327914NC432_9
 - Chen, X., Li, W., Zhao, Q., Selomulya, C., Zhu, X., Xiong, H., **2016**. Physical and oxidative stabilities of O/W emulsions formed with rice dreg protein hydrolysate: Effect of xanthan gum rheology. *Food Bioprocess Technol.* 9, 1380–1390. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1727-9>
 - Chen, Y.Q., Edwards, I.J., Kridel, S.J., Thornburg, T., Berquin, I.M., **2007**. Dietary fat-gene interactions in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 535–551. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9075-x>
 - Cheng, C.-J., Chu, L.-Y., Xie, R., **2006**. Preparation of highly monodisperse W/O emulsions with hydrophobically modified SPG membranes. *J. Colloid Interface Sci.* 300, 375–382. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.03.056>
 - Cheng, J.-H., Hu, Y.-N., Luo, Z.-G., Chen, W., Chen, H.-M., Peng, X.-C., **2017**. Preparation and properties of octenyl succinate β -cyclodextrin and its application as an emulsion stabilizer. *Food Chem.* 218, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.019>
 - Chityala, P.K., Khouryieh, H., Williams, K., Conte, E., **2016**. Effect of xanthan/enzyme-modified guar gum mixtures on the stability of whey protein isolate stabilized fish oil-in-water emulsions. *Food Chem.* 212, 332–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.187>
 - Chivero, P., Gohtani, S., Yoshii, H., Nakamura, A., **2015**. Effect of xanthan and guar gums on the formation and stability of soy soluble polysaccharide oil-in-water emulsions. *Food Res. Int.* 70, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.025>

- Cho, Y.-H., Decker, E.A., McClements, D.J., **2010**. Formation of protein-rich coatings around lipid droplets using the electrostatic deposition method. *Langmuir* 26, 7937–7945. <https://doi.org/10.1021/la904823b>
- Choe, E., Min, D.B., **2006**. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46, 1–22. <https://doi.org/10.1080/10408390500455474>
- Choi, S.J., Decker, E.A., McClements, D.J., **2009**. Impact of iron encapsulation within the interior aqueous phase of water-in-oil-in-water emulsions on lipid oxidation. *Food Chem.* 116, 271–276. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.045>
- Chuacharoen, T., Prasongsuk, S., Sabliov, C.M., **2019**. Effect of surfactant concentrations on physicochemical properties and functionality of curcumin nanoemulsions under conditions relevant to commercial utilization. *Molecules* 24, 2744. <https://doi.org/10.3390/molecules24152744>
- Chuengsamarn, S., Rattanamongkolgul, S., Phonrat, B., Tungtrongchitr, R., Jirawatnotai, S., **2014**. Reduction of atherogenic risk in patients with type 2 diabetes by curcuminoid extract: A randomized controlled trial. *J. Nutr. Biochem.* 25, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.09.013>
- Co, E.D., Marangoni, A.G., **2012**. Organogels: An alternative edible oil-structuring method. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 89, 749–780. <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2049-3>
- Cofrades, S., Antoniou, I., Solas, M.T., Herrero, A.M., Jiménez-Colmenero, F., **2013**. Preparation and impact of multiple (water-in-oil-in-water) emulsions in meat systems. *Food Chem.* 141, 338–346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.097>
- Cofrades, S., Bou, R., Flaiz, L., Garcimartín, A., Benedí, J., Mateos, R., Sánchez-Muniz, F.J., Olivero-David, R., Jiménez-Colmenero, F., **2017**. Bioaccessibility of hydroxytyrosol and n-3 fatty acids as affected by the delivery system: Simple, double and gelled double emulsions. *J. Food Sci. Technol.* 54, 1785–1793. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2604-x>

- Cole, G.M., Ma, Q.-L., Frautschy, S.A., **2009**. Omega-3 fatty acids and dementia. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 81, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2009.05.015>
- Colussi, G., Catena, C., Novello, M., Bertin, N., Sechi, L.A., **2017**. Impact of omega-3 polyunsaturated fatty acids on vascular function and blood pressure: Relevance for cardiovascular outcomes. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 27, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2016.07.011>
- Comunian, T.A., Boillon, M.R.G., Thomazini, M., Nogueira, M.S., de, C., Favaro-Trindade, C.S., **2016**. Protection of echium oil by microencapsulation with phenolic compounds. *Food Res. Int.* 88, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.008>
- Comunian, T.A., Ravanfar, R., de, C., Dando, R., Favaro-Trindade, C.S., Abbaspourrad, A., **2017**. Improving oxidative stability of echium oil emulsions fabricated by Microfluidics: Effect of ionic gelation and phenolic compounds. *Food Chem.* 233, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.085>
- Costa, M., Freiría-Gándara, J., Losada-Barreiro, S., Paiva-Martins, F., Bravo-Díaz, C., **2020**. Effects of droplet size on the interfacial concentrations of antioxidants in fish and olive oil-in-water emulsions and nanoemulsions and on their oxidative stability. *J. Colloid Interface Sci.* 562, 352–362. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.12.011>
- Costa-Rodrigues, J., Pinho, O., Monteiro, P.R.R., **2018**. Can lycopene be considered an effective protection against cardiovascular disease? *Food Chem.* 245, 1148–1153. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.055>
- Coupland, J.N., McClements, D.J., **1996**. Lipid oxidation in food emulsions. *Trends Food Sci. Technol.* 7, 83–91. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(96\)81302-1](https://doi.org/10.1016/0924-2244(96)81302-1)
- Cournarie, F., Savelli, M.-P., Rosilio, V., Bretez, F., Vauthier, C., Grossiord, J.-L., Seiller, M., **2004**. Insulin-loaded W/O/W multiple emulsions: Comparison of the performances of systems prepared with

medium-chain-triglycerides and fish oil. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 477–482. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.03.024>

- Crapiste, G.H., Bredan, M.I.V., Carelli, A.A., **1999**. Oxidation of sunflower oil during storage. *JAOCS J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 1437–1443. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0181-5>
- Cui, L., Fan, J., Sun, Y., Zhu, Z., Yi, J., **2018**. The prooxidant activity of salts on the lipid oxidation of lecithin-stabilized oil-in-water emulsions. *Food Chem.* 252, 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.094>
- Cui, M., Mao, L., Lu, Y., Yuan, F., Gao, Y., **2019**. Effect of monoglyceride content on the solubility and chemical stability of β -carotene in organogels. *LWT* 106, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.042>
- Culebras, J.M., García de Lorenzo, A., González-Gross, M., **2004**. Alimentos funcionales. *Nutr. Hosp.* 19, 1–1.
- Cunnane, S.C., Plourde, M., Pifferi, F., Bégin, M., Féart, C., Barberger-Gateau, P., **2009**. Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Prog. Lipid Res.* 48, 239–256. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.04.001>
- da Silveira, T.F.F., Cajaíba, L.M., Valentin, L., Baréa, B., Villeneuve, P., Castro, I.A., **2020**. Effect of sinapic acid ester derivatives on the oxidative stability of omega-3 fatty acids rich oil-in-water emulsions. *Food Chem.* 309, 125586. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125586>
- Davidson, M., Bulkow, L.R., Gellin, B.G., **1993**. Cardiac mortality in Alaska's indigenous and non-native residents. *Int. J. Epidemiol.* 22, 62–71. <https://doi.org/10.1093/ije/22.1.62>
- Day, L., Xu, M., Hoobin, P., Burgar, I., Augustin, M.A., **2007**. Characterisation of fish oil emulsions stabilised by sodium caseinate. *Food Chem.* 105, 469–479. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.013>
- de Aguiar Pastore Silva, J., Emilia de Souza Fabre, M., Waitzberg, D.L., **2015**. Omega-3 supplements for patients in chemotherapy and/or

- radiotherapy: A systematic review. *Clin. Nutr.* 34, 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2014.11.005>
- de Piano, A., Masquio, D.C.L., Dâmaso, A.R., **2019**. Chapter 8 – The effects of soy products and isoflavones in metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease, in: Watson, R.R., Preedy, V.R. (Eds.), *Bioactive food as dietary interventions for diabetes* (Second edition). *Academic Press*, pp. 121–136. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813822-9.00008-4>
 - Decker, E.A., Alamed, J., Castro, I.A., **2010**. Interaction between polar components and the degree of unsaturation of fatty acids on the oxidative stability of emulsions. *JAOCS J. Am. Oil Chem. Soc.* 87, 771–780. <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1556-3>
 - Demetriades, K., Coupland, J.N., McClements, D.J., **1997**. Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl. *J. Food Sci.* 62, 342–347. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb03997.x>
 - Derringer, G., Suich, R., **1980**. Simultaneous optimization of several response variables. *J. Qual. Technol.* 12, 214–219. <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>
 - Desrumaux, A., Marcand, J., **2002**. Formation of sunflower oil emulsions stabilized by whey proteins with high-pressure homogenization (up to 350 MPa): Effect of pressure on emulsion characteristics. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 263–269. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00565.x>
 - Dey, T.K., Banerjee, P., Chatterjee, R., Dhar, P., **2018**. Designing of ω -3 PUFA enriched biocompatible nanoemulsion with sesame protein isolate as a natural surfactant: Focus on enhanced shelf-life stability and biocompatibility. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 538, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.10.066>
 - Dhar, G., Chakravarty, D., Hazra, J., Dhar, J., Poddar, A., Pal, M., Chakrabarti, P., Surolia, A., Bhattacharyya, B., **2015**. Actin-curcumin

interaction: Insights into the mechanism of actin polymerization inhibition. *Biochemistry* 54, 1132–1143. <https://doi.org/10.1021/bi5014408>

- Díaz-Ocampo, R., **2014**. Caracterización fisicoquímica y reológica de la pulpa de borjón (*Borjoa patinoi* Cuatrec.) y productos alimentarios derivados (Tesis Doctoral). Universidad Internacional de Andalucía.
- Dichwalkar, T., Patel, S., Bapat, S., Pancholi, P., Jasani, N., Desai, B., Yellepeddi, V.K., Sehdev, V., **2017**. Omega-3 fatty acid grafted PAMAM-paclitaxel conjugate exhibits enhanced anticancer activity in upper gastrointestinal cancer cells. *Macromol. Biosci.* 17, 1600457. <https://doi.org/10.1002/mabi.201600457>
- Dickinson, E., **2013**. Stabilising emulsion-based colloidal structures with mixed food ingredients. *J. Sci. Food Agric.* 93, 710–721. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6013>
- Dickinson, E., **2011**. Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophys.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11483-010-9188-6>
- Dickinson, E., **1992**. An introduction to food colloids. *University Press*, Oxford.
- Dickinson, E., **1989**. Food colloids – An overview. *Colloids Surf.* 42, 191–204. [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(89\)80086-1](https://doi.org/10.1016/0166-6622(89)80086-1)
- Dickinson, E., **1988**. Chapter 4 – The structure and stability of emulsions, in: Blanshard, J.M.V., Mitchell, J.R. (Eds.), Food structure. *Woodhead Publishing*, pp. 41–57. <https://doi.org/10.1533/9781845698348.41>
- Dickinson, E., **1982**. Colloids in food. *Elsevier Applied Science*, London.
- Dickinson, E., Casanova, H., **1999**. A thermoreversible emulsion gel based on sodium caseinate. *Food Hydrocoll.* 13, 285–289. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(99\)00010-7](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(99)00010-7)
- Dickinson, E., Flint, F.O., Hunt, J.A., **1989**. Bridging flocculation in binary protein stabilized emulsions. *Food Hydrocoll.* 3, 389–397. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(89\)80013-X](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(89)80013-X)

- Dickinson, E., Stainsby, G., **1982**. Colloids in food. *Elsevier Applied Science*, London.
- Dickinson, E., Yamamoto, Y., **1996**. Viscoelastic properties of heat-set whey protein-stabilized emulsion gels with added lecithin. *J. Food Sci.* 61, 811–816. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb12208.x>
- Ding, M., Zhang, T., Zhang, H., Tao, N., Wang, X., Zhong, J., **2020**. Gelatin molecular structures affect behaviors of fish oil-loaded traditional and Pickering emulsions. *Food Chem.* 309, 125642. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125642>
- Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B., Roberfroid, M.B., **1999**. Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. *Br. J. Nutr.* 81, S1–S27. <https://doi.org/10.1017/S0007114599000471>
- Djordjevic, D., Kim, H.-J., McClements, D.J., Decker, E.A., **2004a**. Physical stability of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions at pH 3: Potential ω -3 fatty acid delivery systems (Part A). *J. Food Sci.* 69, C351–C355. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10696.x>
- Djordjevic, D., McClements, D.J., Decker, E.A., **2004b**. Oxidative stability of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions at pH 3: Potential ω -3 fatty acid delivery systems (Part B). *J. Food Sci.* 69, C356–C362. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10697.x>
- Doan, C.D., Patel, A.R., Tavernier, I., Clercq, N.D., Raemdonck, K.V., Walle, D.V. de, Delbaere, C., Dewettinck, K., **2016**. The feasibility of wax-based oleogel as a potential co-structurant with palm oil in low-saturated fat confectionery fillings. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118, 1903–1914. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500172>
- Dohare, P., Garg, P., Jain, V., Nath, C., Ray, M., **2008**. Dose dependence and therapeutic window for the neuroprotective effects of curcumin in thromboembolic model of rat. *Behav. Brain Res.* 193, 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.06.012>

- Donnelly, J.L., Decker, E.A., McClements, D.J., **1998**. Iron-catalyzed oxidation of menhaden oil as affected by emulsifiers. *J. Food Sci.* 63, 997–1000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15841.x>
- Draper, N.R., **1985**. Small composite designs. *Technometrics* 27, 173–180. <https://doi.org/10.1080/00401706.1985.10488034>
- Draper, N.R., Lin, D.K.J., **1990**. Small response-surface designs. *Technometrics* 32, 187–194. <https://doi.org/10.1080/00401706.1990.10484634>
- Dridi, W., Essafi, W., Gargouri, M., Leal-Calderon, F., Cansell, M., **2016**. Influence of formulation on the oxidative stability of water-in-oil emulsions. *Food Chem.* 202, 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.145>
- Drusch, S., Schwarz, K., **2006**. Microencapsulation properties of two different types of n-octenylsuccinate-derivatised starch. *Eur. Food Res. Technol.* 222, 155–164. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0020-3>
- Dulbecco, P., Savarino, V., **2013**. Therapeutic potential of curcumin in digestive diseases. *World J. Gastroenterol.* 19, 9256–9270. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i48.9256>
- Duque-Estrada, P., School, E., Goot, A.J. van der, Berton-Carabin, C.C., **2019**. Double emulsions for iron encapsulation: Is a high concentration of lipophilic emulsifier ideal for physical and chemical stability? *J. Sci. Food Agric.* 99, 4540–4549. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9691>
- Duru, K.C., Kovaleva, E.G., Danilova, I.G., van der Bijl, P., Belousova, A.V., **2018**. The potential beneficial role of isoflavones in type 2 diabetes mellitus. *Nutr. Res.* 59, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.06.005>
- Dyerberg, J., Madsen, P., Møller, J.M., Aardestrup, I., Schmidt, E.B., **2010**. Bioavailability of marine n-3 fatty acid formulations. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 83, 137–141. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2010.06.007>

- Edris, A., Bergstahl, B., **2001**. Encapsulation of orange oil in a spray dried double emulsion. *Nahr. – Food* 45, 133–137. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20010401\)45:2<133::AID-FOOD133>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20010401)45:2<133::AID-FOOD133>3.0.CO;2-C)
- Edris, A.E., Kalemba, D., Adamiec, J., Piotkowski, M., **2016**. Microencapsulation of *Nigella sativa* oleoresin by spray drying for food and nutraceutical applications. *Food Chem.* 204, 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.143>
- Egan, M.E., Pearson, M., Weiner, S.A., Rajendran, V., Rubin, D., Glöckner-Pagel, J., Canny, S., Du, K., Lukacs, G.L., Caplan, M.J., **2004**. Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science* 304, 600–602. <https://doi.org/10.1126/science.1093941>
- Ejtahed, H.-S., Angoorani, P., Soroush, A.-R., Atlasi, R., Hasani-Ranjbar, S., Mortazavian, A.M., Larijani, B., **2019**. Probiotics supplementation for the obesity management: A systematic review of animal studies and clinical trials. *J. Funct. Foods* 52, 228–242. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.039>
- Elagizi, A., Lavie, C.J., Marshall, K., DiNicolantonio, J.J., O’Keefe, J.H., Milani, R.V., **2018**. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular health: A comprehensive review. *Prog. Cardiovasc. Dis., Dietary Prevention of Cardiovascular Diseases* 61, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2018.03.006>
- El-Moselhy, M.A., Taye, A., Sharkawi, S.S., El-Sisi, S.F.I., Ahmed, A.F., **2011**. The antihyperglycemic effect of curcumin in high fat diet fed rats. Role of TNF- α and free fatty acids. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1129–1140. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.02.004>
- Eltweri, A.M., Thomas, A.L., Metcalfe, M., Calder, P.C., Dennison, A.R., Bowrey, D.J., **2017**. Potential applications of fish oils rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids in the management of gastrointestinal cancer. *Clin. Nutr.* 36, 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.01.007>

- Epstein, J., Sanderson, I.R., MacDonald, T.T., **2010**. Curcumin as a therapeutic agent: The evidence from in vitro, animal and human studies. *Br. J. Nutr.* 103, 1545–1557. <https://doi.org/10.1017/S0007114509993667>
- Erdmann, M.E., Lautenschlaeger, R., Zeeb, B., Gibis, M., Weiss, J., **2017**. Effect of differently sized O/W emulsions loaded with rosemary extract on lipid oxidation in cooked emulsion-type sausages rich in n-3 fatty acids. *LWT – Food Sci. Technol.* 79, 496–502. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.022>
- Esatbeyoglu, T., Huebbe, P., Ernst, I.M.A., Chin, D., Wagner, A.E., Rimbach, G., **2012**. Curcumin – From molecule to biological function. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 5308–5332. <https://doi.org/10.1002/anie.201107724>
- Esatbeyoglu, T., Ulbrich, K., Rehberg, C., Rohn, S., Rimbach, G., **2015**. Thermal stability, antioxidant, and anti-inflammatory activity of curcumin and its degradation product 4-vinyl guaiacol. *Food Funct.* 6, 887–893. <https://doi.org/10.1039/C4FO00790E>
- Eshghi, N., Asnaashari, M., Khodaparast, M.H.H., Hosseini, F., **2014**. Evaluating the potential of natural curcumin for oxidative stability of soybean oil. *Nat. Prod. Res.* 28, 1375–1378. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.901319>
- Esperón-Rojas, A.A., Baeza-Jiménez, R., García, H.S., **2020**. Preparation of curcumin-carrying nanoemulsions using mono- and diacylglycerides enzymatically structured with bioactive fatty acids. *Biocatal. Biotransformation* 38, 93–103. <https://doi.org/10.1080/10242422.2019.1646254>
- Esposito, E., Ravani, L., Mariani, P., Huang, N., Boldrini, P., Drechsler, M., Valacchi, G., Cortesi, R., Puglia, C., **2014**. Effect of nanostructured lipid vehicles on percutaneous absorption of curcumin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Theme Issue: Dermal and Transdermal Drug Delivery 86, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.12.011>

- Esposito, E., Ravani, L., Mariani, P., Puglia, C., Mazzitelli, S., Huang, N., Cortesi, R., Nastruzzi, C., **2016**. Gelified reverse micellar dispersions as percutaneous formulations. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, Drug Delivery Research in Italy 32, 270–282. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.06.007>
- Fadda, A.A., Badria, F.A., El-Attar, K.M., **2010**. Synthesis and evaluation of curcumin analogues as cytotoxic agents. *Med. Chem. Res.* 19, 413–430. <https://doi.org/10.1007/s00044-009-9199-3>
- Falkeborg, M., Guo, Z., **2015**. Dodecanyl succinylated alginate (DSA) as a novel dual-function emulsifier for improved fish oil-in-water emulsions. *Food Hydrocoll.* 46, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.011>
- Fang, X., Fang, L., Gou, S., Cheng, L., **2013**. Design and synthesis of dimethylaminomethyl-substituted curcumin derivatives/analogues: Potent antitumor and antioxidant activity, improved stability and aqueous solubility compared with curcumin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 1297–1301. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.12.098>
- Faridi-Esfanjani, A., Mahdi-Jafari, S., Assadpour, E., **2017**. Preparation of a multiple emulsion based on pectin-whey protein complex for encapsulation of saffron extract nanodroplets. *Food Chem.* 221, 1962–1969. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.149>
- Farquharson, J., Jamieson, E.C., Abbasi, K.A., Patrick, W.J., Logan, R.W., Cockburn, F., **1995**. Effect of diet on the fatty acid composition of the major phospholipids of infant cerebral cortex. *Arch. Dis. Child.* 72, 198–203. <https://doi.org/10.1136/adc.72.3.198>
- Fayaz, G., Goli, S.A.H., Kadivar, M., Valoppi, F., Barba, L., Calligaris, S., Nicoli, M.C., **2017**. Potential application of pomegranate seed oil oleogels based on monoglycerides, beeswax and propolis wax as partial substitutes of palm oil in functional chocolate spread. *LWT* 86, 523–529. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.036>
- Fechner, A., Knoth, A., Scherze, I., Muschiolik, G., **2007**. Stability and release properties of double-emulsions stabilised by caseinate-dextran

conjugates. *Food Hydrocoll., Food Colloids* 2006 21, 943–952. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.10.021>

- Fellows, P., **1988**. Food processing technology: Principles and practice, Ellis Horwood series in food science and technology. VCH, Weinheim.
- Feng, J., Cai, H., Wang, H., Li, C., Liu, S., **2018**. Improved oxidative stability of fish oil emulsion by grafted ovalbumin-catechin conjugates. *Food Chem.* 241, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.055>
- Fernández-Espín, V., **2018**. Técnicas instrumentales y computacionales para la caracterización de sistemas de macromoléculas y nanopartículas: Implementación y aplicaciones (Tesis Doctoral). Universidad de Murcia, Facultad de Química.
- Fernández-Arteaga, A., **2006**. Preparación, caracterización y estabilidad de emulsiones y microemulsiones O/W (Tesis Doctoral). Universidad de Granada, Granada.
- Ferrer-González, B.M., García-Martínez, I., Totosa, A., **2019**. Textural properties, sensory acceptance and fatty acid profile of cooked meat batters employing pumpkin seed paste or soybean oil oleogel as fat replacers. *Grasas Aceites* 70, 320. <https://doi.org/10.3989/gya.1055182>
- Fiala, M., **2015**. Curcumin and omega-3 fatty acids enhance NK cell-induced apoptosis of pancreatic cancer cells but curcumin inhibits interferon- γ production: Benefits of omega-3 with curcumin against cancer. *Molecules* 20, 3020–3026. <https://doi.org/10.3390/molecules20023020>
- Fiala, M., Halder, R., Almasi, A., Sagong, B., Leung, J., Jewett, A., **2015**. Curcuminoids and ω -3 fatty acids with anti-oxidants potentiate cytotoxicity of natural killer cells against pancreatic ductal adenocarcinoma cells and inhibit interferon- γ production. *Front. Physiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00129>
- Figoni, P.I., Shoemaker, C.F., **1983**. Characterization of time dependent flow properties of mayonnaise under steady shear. *J. Texture Stud.* 14, 431–442. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1983.tb00360.x>

- Finocchiaro, C., Segre, O., Fadda, M., Monge, T., Scigliano, M., Schena, M., Tinivella, M., Tiozzo, E., Catalano, M.G., Pugliese, M., Fortunati, N., Aragno, M., Muzio, G., Maggiora, M., Oraldi, M., Canuto, R.A., **2012**. Effect of n-3 fatty acids on patients with advanced lung cancer: A double-blind, placebo-controlled study. *Br. J. Nutr.* 108, 327–333. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005551>
- Firtın, B., Yenipazar, H., Saygün, A., Şahin-Yeşilçubuk, N., **2020**. Encapsulation of chia seed oil with curcumin and investigation of release behaviour & antioxidant properties of microcapsules during in vitro digestion studies. *LWT* 134, 109947. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109947>
- Flaiz, L., Freire, M., Cofrades, S., Mateos, R., Weiss, J., Jiménez-Colmenero, F., Bou, R., **2016**. Comparison of simple, double and gelled double emulsions as hydroxytyrosol and n-3 fatty acid delivery systems. *Food Chem.* 213, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.005>
- Flower, G., Fritz, H., Balneaves, L.G., Verma, S., Skidmore, B., Fernandes, R., Kennedy, D., Cooley, K., Wong, R., Sagar, S., Fergusson, D., Seely, D., **2013**. Flax and breast cancer: A systematic review. *Integr. Cancer Ther.* 13, 181–192. <https://doi.org/10.1177/1534735413502076>
- Fomuso, L.B., Corredig, M., Akoh, C.C., **2002**. Effect of emulsifier on oxidation properties of fish oil-based structured lipid emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2957–2961. <https://doi.org/10.1021/jf011229g>
- Franco, D., Martins, A.J., López-Pedrouso, M., Cerqueira, M.A., Purriños, L., Pastrana, L.M., Vicente, A.A., Zapata, C., Lorenzo, J.M., **2020**. Evaluation of linseed oil oleogels to partially replace pork backfat in fermented sausages. *J. Sci. Food Agric.* 100, 218–224. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10025>
- Franco, J.M., Partal, P., Rquez, D.R.-M., Conde, B., Gallegos, C., **2000**. Influence of pH and protei thermal treatment on the rheology of pea

protein-stabilized oil-in-water emulsions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77, 975–984. <https://doi.org/10.1007/s11746-000-0154-x>

- Frankel, E.N., **2005**. Lipid oxidation, 2nd edition. *Oily Press*.
- Freire, M., Bou, R., Cofrades, S., Jiménez-Colmenero, F., **2017**. Technological characteristics of cold-set gelled double emulsion enriched with n-3 fatty acids: Effect of hydroxytyrosol addition and chilling storage. *Food Res. Int.* 100, 298–305. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.047>
- Freire-Rodríguez, M.J., **2018**. Desarrollo de emulsiones dobles y emulsiones dobles gelificadas como análogos de grasa y su aplicación en productos cárnicos funcionales (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Freiría-Gándara, M.J., **2018**. Estrategias para la optimización de la eficacia antioxidante en emulsiones alimentarias enriquecidas con omega-3 (Tesis Doctoral). Universidad de Vigo, Vigo.
- Friberg, S., Larsson, K., Sjoblom, J., **2003**. Food emulsions. *CRC Press*.
- Gadad, B.S., Subramanya, P.K., Pullabhatla, S., Shantharam, I.S., Rao, K.S., **2012**. Curcumin-glucoside, a novel synthetic derivative of curcumin, inhibits α -synuclein oligomer formation: Relevance to Parkinson's disease. *Curr. Pharm. Des.* 18, 76–84. <https://doi.org/10.2174/138161212798919093>
- Gallegos, C., Franco, J.M., **1999**. Rheology of food emulsions, in: Siginer, D.A., De Kee, D., Chhabra, R.P. (Eds.), Rheology Series, Advances in the flow and rheology of non-Newtonian fluids. *Elsevier*, pp. 87–118. [https://doi.org/10.1016/S0169-3107\(99\)80028-8](https://doi.org/10.1016/S0169-3107(99)80028-8)
- Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K.M., Gomez-Cabrera, M.C., Vina, J., Borras, C., **2015**. Properties of resveratrol: In vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans [WWW Document]. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 837042. <https://doi.org/10.1155/2015/837042>

- Gandolfo, F.G., Bot, A., Flöter, E., **2004**. Structuring of edible oils by long-chain FA, fatty alcohols, and their mixtures. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s11746-004-0851-5>
- García-Andrade, M., Gallegos-Infante, J.A., González-Laredo, R.F., **2019**. Organogeles como mejoradores del perfil lipídico en matrices cárnicas y lácteas. *CienciaUAT* 14, 121–132. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v14i1.1129>
- García-Moreno, P.J., Guadix, A., Guadix, E.M., Jacobsen, C., **2016**. Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized with fish protein hydrolysates. *Food Chem.* 203, 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.073>
- García-Moreno, P.J., Jacobsen, C., Marcatili, P., Gregersen, S., Overgaard, M.T., Andersen, M.L., Sørensen, A.-D.M., Hansen, E.B., **2020**. Emulsifying peptides from potato protein predicted by bioinformatics: Stabilization of fish oil-in-water emulsions. *Food Hydrocoll.* 101, 105529. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105529>
- Gardi, N., **1997**. Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. *LWT – Food Sci. Technol.* 30, 222–235. <https://doi.org/10.1006/fstl.1996.0176>
- Gardi, N., Aserin, A., **1996**. Double emulsions stabilized by macromolecular surfactants. *Adv. Colloid Interface Sci.* 65, 37–69. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(95\)00289-8](https://doi.org/10.1016/0001-8686(95)00289-8)
- Gerster, H., **1998**. Can adults adequately convert α -linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 68, 159–173.
- Ghelichi, S., Sørensen, A.-D.M., García-Moreno, P.J., Hajfathalian, M., Jacobsen, C., **2017**. Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions fortified with enzymatic hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) roe. *Food Chem.* 237, 1048–1057. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.048>

- Giacoppo, S., Galuppo, M., Montaut, S., Iori, R., Rollin, P., Bramanti, P., Mazzon, E., **2015**. An overview on neuroprotective effects of isothiocyanates for the treatment of neurodegenerative diseases. *Fitoterapia* 106, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.08.001>
- Gil Hernández, Á., Sánchez de Medina Contreras, F., Ruiz López, M., Camarero González, E., Álvarez Hernández, J., **2005**. Tratado de Nutrición, 1ª ed. Ed. *Acción Médica*, Madrid.
- Gioxari, A., Kaliora, A.C., Marantidou, F., Panagiotakos, D.P., **2018**. Intake of ω -3 polyunsaturated fatty acids in patients with rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition* 45, 114-124.e4. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.06.023>
- GISSI-HF investigators, **2008**. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet* 372, 1223–1230. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61239-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61239-8)
- Godoy, V., Martínez-Férez, A., Martín-Lara, M.Á., Vellido-Pérez, J.A., Calero, M., Blázquez, G., **2020**. Microplastics as vectors of chromium and lead during dynamic simulation of the human gastrointestinal tract. *Sustainability* 12, 4792. <https://doi.org/10.3390/su12114792>
- Gohtani, S., Sirendi, M., Yamamoto, N., Kajikawa, K., Yamano, Y., **1999**. Effect of droplet size on oxidation of docosahexaenoic acid in emulsion system. *J. Dispers. Sci. Technol.* 20, 1319–1325. <https://doi.org/10.1080/01932699908943855>
- Gómez-Estaca, J., Pintado, T., Jiménez-Colmenero, F., Cofrades, S., **2020**. The effect of household storage and cooking practices on quality attributes of pork burgers formulated with PUFA- and curcumin-loaded oleogels as healthy fat substitutes. *LWT* 119, 108909. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108909>
- Gómez-Estaca, J., Herrero, A.M., Herranz, B., Álvarez, M.D., Jiménez-Colmenero, F., Cofrades, S., **2019a**. Characterization of ethyl

- cellulose and beeswax oleogels and their suitability as fat replacers in healthier lipid pâtés development. *Food Hydrocoll.* 87, 960–969. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.029>
- Gómez-Estaca, J., Pintado, T., Jiménez-Colmenero, F., Cofrades, S., **2019b**. Assessment of a healthy oil combination structured in ethyl cellulose and beeswax oleogels as animal fat replacers in low-fat, PUFA-enriched pork burgers. *Food Bioprocess Technol.* 12, 1068–1081. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02281-3>
 - Gómez-Mascaraque, L.G., López-Rubio, A., **2016**. Protein-based emulsion electrosprayed micro- and submicroparticles for the encapsulation and stabilization of thermosensitive hydrophobic bioactives. *J. Colloid Interface Sci.* 465, 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.11.061>
 - Gong, C., Wu, Q., Wang, Y., Zhang, D., Luo, F., Zhao, X., Wei, Y., Qian, Z., **2013**. A biodegradable hydrogel system containing curcumin encapsulated in micelles for cutaneous wound healing. *Biomaterials* 34, 6377–6387. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.005>
 - González-Ortega, L.A., Acosta-Osorio, A.A., Grube-Pagola, P., Palmeros-Exsome, C., Cano-Sarmiento, C., García-Varela, R., García, H.S., **2020**. Anti-inflammatory activity of curcumin in gel carriers on mice with atrial edema. *J. Oleo Sci.* 69, 123–131. <https://doi.org/10.5650/jos.ess19212>
 - Gordon, O.N., Luis, P.B., Sintim, H.O., Schneider, C., **2015**. Unraveling curcumin degradation: Autoxidation proceeds through spiroepoxide and vinyl ether intermediates en route to the main bicyclopentadione. *J. Biol. Chem.* 290, 4817–4828. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.618785>
 - Gordon, O.N., Schneider, C., **2012**. Vanillin and ferulic acid: Not the major degradation products of curcumin. *Trends Mol. Med.* 18, 361–363. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.04.011>
 - Goyal, A., Sharma, V., Sihag, M.K., Tomar, S.K., Arora, S., Sabikhi, L., Singh, A.K., **2015**. Development and physico-chemical characterization of microencapsulated flaxseed oil powder: A functional ingredient for omega-3

fortification. *Powder Technol.* 286, 527–537.
<https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.08.050>

- Granato, D., Barba, F.J., Bursac Kovačević, D., Lorenzo, J.M., Cruz, A.G., Putnik, P., **2020**. Functional foods: Product development, technological trends, efficacy testing, and safety. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 11, 93–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>
- Gravelle, A.J., Barbut, S., Marangoni, A.G., **2012**. Ethylcellulose oleogels: Manufacturing considerations and effects of oil oxidation. *Food Res. Int.* 48, 578–583. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.020>
- Gryniewicz, G., Ślifirski, P., **2012**. Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status. *Acta Biochim. Pol.* 59, 201–212. https://doi.org/10.18388/abp.2012_2139
- Gulotta, A., Saberi, A.H., Nicoli, M.C., McClements, D.J., **2014**. Nanoemulsion-based delivery systems for polyunsaturated (ω -3) oils: Formation using a spontaneous emulsification method. *J. Agric. Food Chem.* 62, 1720–1725. <https://doi.org/10.1021/jf4054808>
- Gülseren, İ., Guri, A., Corredig, M., **2014**. Effect of interfacial composition on uptake of curcumin-piperine mixtures in oil in water emulsions by caco-2 cells. *Food Funct.* 5, 1218–1223. <https://doi.org/10.1039/C3FO60554J>
- Gumus, C.E., Decker, E.A., McClements, D.J., **2017**. Formation and stability of ω -3 oil emulsion-based delivery systems using plant proteins as emulsifiers: Lentil, pea, and faba bean proteins. *Food Biophys.* 12, 186–197. <https://doi.org/10.1007/s11483-017-9475-6>
- Gunning, P.A., Hennock, M.S.R., Howe, A.M., Mackie, A.R., Richmond, P., Robins, M.M., **1986**. Stability of oil-in-water emulsions. The effect of dispersed phase and polysaccharide on creaming. *Colloids Surf.* 20, 65–80. [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(86\)80228-1](https://doi.org/10.1016/0166-6622(86)80228-1)
- Gupta, S.C., Patchva, S., Koh, W., Aggarwal, B.B., **2012**. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological

- activities. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 39, 283–299. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05648.x>
- Gylling, H., Plat, J., Turley, S., Ginsberg, H.N., Ellegård, L., Jessup, W., Jones, P.J., Lütjohann, D., Maerz, W., Masana, L., Silbernagel, G., Staels, B., Borén, J., Catapano, A.L., De Backer, G., Deanfield, J., Descamps, O.S., Kovanen, P.T., Riccardi, G., Tokgözoğlu, L., Chapman, M.J., **2014**. Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 232, 346–360. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.11.043>
 - Hamad, A., Suriyarak, S., Devahastin, S., Borompichaichartkul, C., **2020**. A novel approach to develop spray-dried encapsulated curcumin powder from oil-in-water emulsions stabilized by combined surfactants and chitosan. *J. Food Sci.* 85, 3874–3884. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15488>
 - Hang, T.T.T., Molee, W., Khempaka, S., Paraksa, N., **2018**. Supplementation with curcuminoids and tuna oil influenced skin yellowness, carcass composition, oxidation status, and meat fatty acids of slow-growing chickens. *Poult. Sci.* 97, 901–909. <https://doi.org/10.3382/ps/pex385>
 - Harimurti, N., Nasikin, M., Mulia, K., **2021**. Water-in-oil-in-water nanoemulsions containing temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) and red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) extracts. *Molecules* 26, 196. <https://doi.org/10.3390/molecules26010196>
 - Harris, W.S., Pottala, J.V., Sands, S.A., Jones, P.G., **2007**. Comparison of the effects of fish and fish-oil capsules on the n-3 fatty acid content of blood cells and plasma phospholipids. *Am. J. Clin. Nutr.* 86, 1621–1625. <https://doi.org/10.1093/ajcn/86.5.1621>
 - Hasan, M., Belhaj, N., Benachour, H., Barberi-Heyob, M., Kahn, C.J.F., Jabbari, E., Linder, M., Arab-Tehrany, E., **2014**. Liposome encapsulation of curcumin: Physico-chemical characterizations and effects on MCF7 cancer

- cell proliferation. *Int. J. Pharm.* 461, 519–528. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.007>
- Hashim, A.F., Hamed, S.F., Abdel Hamid, H.A., Abd-Elsalam, K.A., Golonka, I., Musiał, W., El-Sherbiny, I.M., **2019**. Antioxidant and antibacterial activities of omega-3 rich oils/curcumin nanoemulsions loaded in chitosan and alginate-based microbeads. *Int. J. Biol. Macromol.* 140, 682–696. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.085>
 - Heger, M., Golen, R.F. van, Broekgaarden, M., Michel, M.C., **2014**. The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. *Pharmacol. Rev.* 66, 222–307. <https://doi.org/10.1124/pr.110.004044>
 - Heinzelmann, K., Franke, K., **1999**. Using freezing and drying techniques of emulsions for the microencapsulation of fish oil to improve oxidation stability. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 12, 223–229. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(98\)00077-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(98)00077-0)
 - Hemar, Y., Cheng, L.J., Oliver, C.M., Sanguansri, L., Augustin, M., **2010**. Encapsulation of resveratrol using water-in-oil-in-water double emulsions. *Food Biophys.* 5, 120–127. <https://doi.org/10.1007/s11483-010-9152-5>
 - Hermund, D.B., Karadağ, A., Andersen, U., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H.G., Alasalvar, C., Jacobsen, C., **2016**. Oxidative stability of granola bars enriched with multilayered fish oil emulsion in the presence of novel brown seaweed based antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 64, 8359–8368. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03454>
 - Hibbeln, J.R., **1998**. Fish consumption and major depression. *The Lancet* 351, 1213. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)79168-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)79168-6)
 - Hibbert, D.J., Howe, A.M., Mackie, A.R., Purdy, P.W., Robins, M.M., **1987**. , in: Dickinson, E. (Ed.), Food emulsions and foams. *Royal Society of Chemistry*, London, p. 219.
 - Hishikawa, N., Takahashi, Y., Amakusa, Y., Tanno, Y., Tuji, Y., Niwa, H., Murakami, N., Krishna, U.K., **2012**. Effects of turmeric on Alzheimer's

disease with behavioral and psychological symptoms of dementia. *Ayu* 33, 499–504. <https://doi.org/10.4103/0974-8520.110524>

- Holder, G.M., Plummer, J.L., Ryan, A.J., **1978**. The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* 8, 761–768. <https://doi.org/10.3109/00498257809069589>
- Holst, B., Williamson, G., **2008**. Nutrients and phytochemicals: From bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Curr. Opin. Biotechnol., Food biotechnology/Plant biotechnology* 19, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.03.003>
- Horn, A.F., Nielsen, N.S., Andersen, U., Søggaard, L.H., Horsewell, A., Jacobsen, C., **2011**. Oxidative stability of 70 % fish oil-in-water emulsions: Impact of emulsifiers and pH. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, 1243–1257. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100070>
- Horn, A.F., Nielsen, N.S., Jensen, L.S., Horsewell, A., Jacobsen, C., **2012**. The choice of homogenisation equipment affects lipid oxidation in emulsions. *Food Chem.* 134, 803–810. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.184>
- Hu, F.B., Bronner, L., Willett, W.C., Stampfer, M.J., Rexrode, K.M., Albert, C.M., Hunter, D., Manson, J.E., **2002**. Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. *JAMA* 287, 1815–1821. <https://doi.org/10.1001/jama.287.14.1815>
- Huang, G., Xu, Z., Huang, Y., Duan, X., Gong, W., Zhang, Y., Fan, J., He, F., **2013**. Curcumin protects against collagen-induced arthritis via suppression of BAFF production. *J. Clin. Immunol.* 33, 550–557. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9839-0>
- Huang, Q., Chen, J., Liu, C., Wang, C., Shen, C., Chen, Y., Li, Q., **2017**. Curcumin and its two analogues improve oxidative stability of fish oil under long-term storage. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 119, 1600105. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600105>

- Huang, Q.-M., Wang, S.-W., Li, Q., Pan, W., Deng, P.-X., Zhou, H., Pan, Z.-Q., **2012**. Synthesis and characterization of curcumin bridged porphyrins as photosensitizers. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao* *Chemical J. Chin. Univ.* 33, 732–737. <https://doi.org/10.3969/j.issn.0251-0790.2012.04.016>
- Hughes, N.E., Marangoni, A.G., Wright, A.J., Rogers, M.A., Rush, J.W.E., **2009**. Potential food applications of edible oil organogels. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 470–480. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.06.002>
- Hunter, R.J., **1989**. Foundations of colloid science. *University Press*, New York.
- Hunter, R.J., **1987**. Foundations of colloid science. *Clarendon Press*, Oxford [Oxfordshire].
- Hur, S.J., Lim, B.O., Decker, E.A., McClements, D.J., **2011**. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chem.* 125, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.036>
- Hurrell, R., Egli, I., **2010**. Iron bioavailability and dietary reference values. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 1461S-1467S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.28674F>
- Hwang, H.-S., Fhaner, M., Winkler-Moser, J.K., Liu, S.X., **2018**. Oxidation of fish oil oleogels formed by natural waxes in comparison with bulk oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 120, 1700378. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700378>
- Hwang, H.-S., Kim, S., Evans, K.O., Koga, C., Lee, Y., **2015**. Morphology and networks of sunflower wax crystals in soybean oil organogel. *Food Struct.* 5, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2015.04.002>
- Hwang, H.-S., Kim, S., Singh, M., Winkler-Moser, J.K., Liu, S.X., **2012**. Organogel formation of soybean oil with waxes. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 89, 639–647. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1953-2>

- Imai, H., Maeda, T., Shima, M., Adachi, S., **2008**. Oxidation of methyl linoleate in oil-in-water micro- and nanoemulsion systems. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85, 809–815. <https://doi.org/10.1007/s11746-008-1257-3>
- Ireson, C., Orr, S., Jones, D.J., Verschoyle, R., Lim, C.K., Luo, J.L., Howells, L., Plummer, S., Jukes, R., Williams, M., Steward, W.P., Gescher, A., **2001**. Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer Res.* 61, 1058–1064.
- Jackson, K.G., Bateman, P.A., Yaqoob, P., Williams, C.M., **2009**. Impact of saturated, polyunsaturated and monounsaturated fatty acid-rich micelles on lipoprotein synthesis and secretion in caco-2 cells. *Lipids* 44, 1081–1089. <https://doi.org/10.1007/s11745-009-3366-7>
- Jafari, S.M., He, Y., Bhandari, B., **2007**. Optimization of nano-emulsions production by microfluidization. *Eur. Food Res. Technol.* 225, 733–741. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0476-9>
- Jagannathan, R., Abraham, P.M., Poddar, P., **2012**. Temperature-dependent spectroscopic evidences of curcumin in aqueous medium: A mechanistic study of its solubility and stability. *J. Phys. Chem. B* 116, 14533–14540. <https://doi.org/10.1021/jp3050516>
- Jakopin, Ž., **2014**. Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) inhibitors: A rational approach toward inhibition of NOD signaling pathway. *J. Med. Chem.* 57, 6897–6918. <https://doi.org/10.1021/jm401841p>
- Jamshidi, A., Antequera, T., Solomando, J.C., Perez-Palacios, T., **2020**. Microencapsulation of oil and protein hydrolysate from fish within a high-pressure homogenized double emulsion. *J. Food Sci. Technol.* 57, 60–69. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04029-5>
- Jamshidi, A., Shabanpour, B., Pourashouri, P., Raeisi, M., **2019**. Optimization of encapsulation of fish protein hydrolysate and fish oil in W1/O/W2 double emulsion: Evaluation of sensory quality of fortified

yogurt. *J. Food Process. Preserv.* 43, 14063.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.14063>

- Jayachandran, M., Chen, J., Chung, S.S.M., Xu, B., **2018**. A critical review on the impacts of β -glucans on gut microbiota and human health. *J. Nutr. Biochem.* 61, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.06.010>
- Jayaprakasha, G.K., Jagan Mohan Rao, L., Sakariah, K.K., **2005**. Chemistry and biological activities of *C. longa*. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 533–548. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.08.006>
- Jeengar, M.K., Rompicharla, S.V.K., Shrivastava, S., Chella, N., Shastri, N.R., Naidu, V.G.M., Sistla, R., **2016**. Emu oil based nano-emulgel for topical delivery of curcumin. *Int. J. Pharm.* 506, 222–236. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.04.052>
- Jeyakumari, A., Janarthanan, G., Chouksey, M.K., Venkateshwarlu, G., **2016**. Effect of fish oil encapsulates incorporation on the physico-chemical and sensory properties of cookies. *J. Food Sci. Technol.* 53, 856–863. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1981-2>
- Ji, H., Tang, J., Li, M., Ren, J., Zheng, N., Wu, L., **2016**. Curcumin-loaded solid lipid nanoparticles with Brij 78 and TPGS improved in vivo oral bioavailability and in situ intestinal absorption of curcumin. *Drug Deliv.* 23, 459–470. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.918677>
- Jiao, J., Burgess, D.J., **2003**. Rheology and stability of water-in-oil-in-water multiple emulsions containing Span 83 and Tween 80. *AAPS PharmSci* 5, 62–73. <https://doi.org/10.1208/ps050107>
- Jiao, J., Rhodes, D.G., Burgess, D.J., **2002**. Multiple emulsion stability: Pressure balance and interfacial film strength. *J. Colloid Interface Sci.* 250, 444–450. <https://doi.org/10.1006/jcis.2002.8365>
- Jimenez, S.A., Gaidarova, S., Saitta, B., Sandorfi, N., Herrich, D.J., Rosenbloom, J.C., Kucich, U., Abrams, W.R., Rosenbloom, J., **2001**. Role of protein kinase C- δ in the regulation of collagen gene expression in

- scleroderma fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 108, 1395–1403.
<https://doi.org/10.1172/JCI200112347>
- Jiménez-Colmenero, F., **2013**. Multiple emulsions, bioactive compounds and functional foods. *Nutr. Hosp.* 28, 1413–1421.
<https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.5.6673>
 - Jiménez-Martín, E., Antequera, R., Gharsallaoui, A., Ruiz, C., Pérez-Palacios, T., **2016**. Fatty acid composition in double and multilayered microcapsules of ω -3 as affected by storage conditions and type of emulsions. *Food Chem.* 194, 476–486.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.046>
 - Jiménez-Martín, E., Gharsallaoui, A., Pérez-Palacios, T., Ruiz, C., Antequera, R., **2015**. Volatile compounds and physicochemical characteristics during storage of microcapsules from different fish oil emulsions. *Food Bioprod. Process.* 96, 52–64.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.07.005>
 - Jo, Y.-J., Kwon, Y.-J., Min, S.-G., Choi, M.-J., **2015**. Effect of NaCl concentration on the emulsifying properties of myofibrilla protein in the soybean oil and fish oil emulsion. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 35, 315–321. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.3.315>
 - John, V.D., Kuttan, G., Krishnankutty, K., **2002**. Anti-tumour studies of metal chelates of synthetic curcuminoids. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 21, 219–224.
 - Jones, P.J., Senanayake, V.K., Pu, S., Jenkins, D.J., Connelly, P.W., Lamarche, B., Couture, P., Charest, A., Baril-Gravel, L., West, S.G., Liu, X., Fleming, J.A., McCrea, C.E., Kris-Etherton, P.M., **2014**. DHA-enriched high-oleic acid canola oil improves lipid profile and lowers predicted cardiovascular disease risk in the canola oil multicenter randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 100, 88–97.
<https://doi.org/10.3945/ajcn.113.081133>

- Julio, L.M., Copado, C.N., Diehl, B.W.K., Ixtaina, V.Y., Tomás, M.C., **2018**. Chia bilayer emulsions with modified sunflower lecithins and chitosan as delivery systems of omega-3 fatty acids. *LWT – Food Sci. Technol.* 89, 581–590. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.044>
- Julio, L.M., Ixtaina, V.Y., Fernández, M.A., Sánchez, R.M.T., Wagner, J.R., Nolasco, S.M., Tomás, M.C., **2015**. Chia seed oil-in-water emulsions as potential delivery systems of ω -3 fatty acids. *J. Food Eng.* 162, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.04.005>
- Kabalnov, A.S., Shchukin, E.D., **1992**. Ostwald ripening theory: Applications to fluorocarbon emulsion stability. *Adv. Colloid Interface Sci.* 38, 69–97. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(92\)80043-W](https://doi.org/10.1016/0001-8686(92)80043-W)
- Kaminaga, Y., Nagatsu, A., Akiyama, T., Sugimoto, N., Yamazaki, T., Maitani, T., Mizukami, H., **2003**. Production of unnatural glucosides of curcumin with drastically enhanced water solubility by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *FEBS Lett.* 555, 311–316. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01265-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01265-1)
- Kang, J.X., Leaf, A., **1996**. The cardiac antiarrhythmic effects of polyunsaturated fatty acid. *Lipids* 31, S41–S44. <https://doi.org/10.1007/BF02637049>
- Kanner, J., **2007**. Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 1094–1101. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600303>
- Kanouni, M., Rosano, H.L., Naouli, N., **2002**. Preparation of a stable double emulsion (W1/O/W2): Role of the interfacial films on the stability of the system. *Adv. Colloid Interface Sci.* 99, 229–254. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(02\)00079-9](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(02)00079-9)
- Karadağ, A., Hermund, D.B., Jensen, L.H.S., Andersen, U., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H.G., Alasalvar, C., Jacobsen, C., **2017**. Oxidative stability and microstructure of 5 % fish-oil-enriched granola bars added natural

antioxidants derived from brown alga *Fucus vesiculosus*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 119, 1500578. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500578>

- Kargar, M., **2014**. Emulsion design for protection of chemically sensitive bioactive ingredients (Doctor of Philosophy). University of Birmingham, Birmingham.
- Karthik, P., Anandharamakrishnan, C., **2016**. Enhancing omega-3 fatty acids nanoemulsion stability and in-vitro digestibility through emulsifiers. *J. Food Eng.* 187, 92–105. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.05.003>
- Kassaian, N., Feizi, A., Aminorroaya, A., Amini, M., **2019**. Probiotic and synbiotic supplementation could improve metabolic syndrome in prediabetic adults: A randomized controlled trial. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 13, 2991–2996. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.07.016>
- Kato, I., Akhmedkhanov, A., Koenig, K., Toniolo, P.G., Shore, R.E., Riboli, E., **1997**. Prospective study of diet and female colorectal cancer: The New York university women's health study. *Nutr. Cancer* 28, 276–281. <https://doi.org/10.1080/01635589709514588>
- Kazemi, A., Noorbala, A.A., Azam, K., Djafarian, K., **2019**. Effect of prebiotic and probiotic supplementation on circulating pro-inflammatory cytokines and urinary cortisol levels in patients with major depressive disorder: A double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial. *J. Funct. Foods* 52, 596–602. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.11.041>
- Kentish, S., Wooster, T.J., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R., Simons, L., **2008**. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.07.005>
- Khan, M.A., El-Khatib, R., Rainsford, K.D., Whitehouse, M.W., **2012**. Synthesis and anti-inflammatory properties of some aromatic and heterocyclic aromatic curcuminoids. *Bioorganic Chem.* 40, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2011.11.004>

- Kharat, M., Du, Z., Zhang, G., McClements, D.J., **2017**. Physical and chemical stability of curcumin in aqueous solutions and emulsions: Impact of pH, temperature, and molecular environment. *J. Agric. Food Chem.* 65, 1525–1532. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04815>
- Kharat, M., Skrzynski, M., Decker, E.A., McClements, D.J., **2020**. Enhancement of chemical stability of curcumin-enriched oil-in-water emulsions: Impact of antioxidant type and concentration. *Food Chem.* 320, 126653. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126653>
- Kharat, M., Zhang, G., McClements, D.J., **2018**. Stability of curcumin in oil-in-water emulsions: Impact of emulsifier type and concentration on chemical degradation. *Food Res. Int.* 111, 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.021>
- Khayat, S., Fanaei, H., Kheirkhah, M., Moghadam, Z.B., Kasaeian, A., Javadimehr, M., **2015**. Curcumin attenuates severity of premenstrual syndrome symptoms: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Complement. Ther. Med.* 23, 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2015.04.001>
- Khopde, S.M., Priyadarsini, K.I., Palit, D.K., Mukherjee, T., **2000**. Effect of solvent on the excited-state photophysical properties of curcumin. *Photochem. Photobiol.* 72, 625–631. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)072<0625:EOSOTE>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)072<0625:EOSOTE>2.0.CO;2)
- Khor, Y.P., Koh, S.P., Long, K., Long, S., Ahmad, S.Z.S., Tan, C.P., **2014**. A comparative study of the physicochemical properties of a virgin coconut oil emulsion and commercial food supplement emulsions. *Molecules* 19, 9187–9202. <https://doi.org/10.3390/molecules19079187>
- Khouryieh, H., Puli, G., Williams, K., Aramouni, F., **2015**. Effects of xanthan-locust bean gum mixtures on the physicochemical properties and oxidative stability of whey protein stabilised oil-in-water emulsions. *Food Chem.* 167, 340–348. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.009>

- Kim, J.K., **2015**. An update on the potential health benefits of carotenes. *EXCLI J.* 15, 1–4. <https://doi.org/10.17179/excli2015-664>
- Kim, J.K., Park, S.U., **2016**. Current results on the potential health benefits of lutein. *EXCLI J.* 15, 308–314. <https://doi.org/10.17179/excli2016-278>
- Kiokias, S., Dimakou, C., Oreopoulou, V., **2007**. Effect of heat treatment and droplet size on the oxidative stability of whey protein emulsions. *Food Chem.* 105, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.053>
- Kiyama, R., **2016**. Biological effects induced by estrogenic activity of lignans. *Trends Food Sci. Technol.* 54, 186–196. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.06.007>
- Klinkesorn, U., Geraldine, P.-L., **2012**. Effect of temperature on lipid oxidation kinetics of tuna oil two-layers emulsion during storage. *Ital. J. Food Sci.* 24, 22–25.
- Kosegarten-Conde, C.E., Jiménez-Munguía, M.T., **2012**. Factores principales que intervienen en la estabilidad de una emulsión doble. *Temas Sel. Ing. Aliment.* 6, 1–18.
- Kotha, R.R., Luthria, D.L., **2019**. Curcumin: Biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. *Molecules* 24, 2930. <https://doi.org/10.3390/molecules24162930>
- Kowalska, M., Zbikowska, A., Wozniak, M., Kucharczyk, K., **2017**. Long-term stability of emulsion based on rose oil. *J. Dispers. Sci. Technol.* 38, 1563–1569. <https://doi.org/10.1080/01932691.2016.1262777>
- Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S., Appel, L.J., **2002**. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 106, 2747–2757. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000038493.65177.94>
- Krstonošić, V., Dokić, L., Nikolić, I., Milanović, M., **2015**. Influence of xanthan gum on oil-in-water emulsion characteristics stabilized by OSA starch. *Food Hydrocoll.* 45, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.024>

- Kukizaki, M., Goto, M., **2007**. Preparation and evaluation of uniformly sized solid lipid microcapsules using membrane emulsification. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 293, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.07.011>
- Kumavat, S.D., Chaudhari, Y.S., Borole, P., Mishra, P., Shenghani, K., Duvvuri, P., **2013**. Degradation studies of curcumin. *Int. J. Pharm. Rev. Res.* 3, 50–55.
- Kuršvietienė, L., Stanevičienė, I., Mongirdienė, A., Bernatoniene, J., **2016**. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina (Mex.)* 52, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.medic.2016.03.003>
- Laidlaw, M., Cockerline, C.A., Rowe, W.J., **2014**. A randomized clinical trial to determine the efficacy of manufacturers' recommended doses of omega-3 fatty acids from different sources in facilitating cardiovascular disease risk reduction. *Lipids Health Dis.* 13, 99. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-99>
- Lakhani, P., Patil, A., Taskar, P., Ashour, E., Majumdar, S., **2018**. Curcumin-loaded Nanostructured Lipid Carriers for ocular drug delivery: Design optimization and characterization. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 47, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.07.010>
- Lamazhapova, G.P., Syngeeva, E.V., Kozlova, T.S., Zhamsaranova, S.D., **2017**. Development of liposomal form of polyunsaturated fatty acid concentrate: Ways of using in production of functional foods. *Vopr. Pitan.* 86, 76–84.
- Landy, P., Courthaudon, J.-L., Dubois, C., Voilley, A., **1996**. Effect of interface in model food emulsions on the volatility of aroma compounds. *J. Agric. Food Chem.* 44, 526–530. <https://doi.org/10.1021/jf950279g>
- Lapasin, R., Pricl, S., **1995**. Rheology of industrial polysaccharides: Theory and applications. *Springer US*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2185-3>

- Larsson, K., Cavonius, L., Alminger, M., Undeland, I., **2012**. Oxidation of cod liver oil during gastrointestinal in vitro digestion. *J. Agric. Food Chem.* 60, 7556–7564. <https://doi.org/10.1021/jf301444x>
- Larsson, S.C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., Wolk, A., **2004**. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: A review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 935–945. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.6.935>
- Lee, J.-S., Kim, J.-W., Han, S.-H., Chang, I.-S., Kang, H.-H., Lee, O.-S., Oh, S.-G., Suh, K.-D., **2004**. The stabilization of L-ascorbic acid in aqueous solution and water-in-oil-in-water double emulsion by controlling pH and electrolyte concentration. *Int. J. Cosmet. Sci.* 26, 217–217. https://doi.org/10.1111/j.0142-5463.2004.00223_1.x
- Lee, M.C., Jiang, X., Brenna, J.T., Abbaspourrad, A., **2018**. Oleogel-structured composite for the stabilization of ω -3 fatty acids in fish oil. *Food Funct.* 9, 5598–5606. <https://doi.org/10.1039/C8FO01446A>
- Lee, M.C., Tan, C., Abbaspourrad, A., **2019**. Combination of internal structuring and external coating in an oleogel-based delivery system for fish oil stabilization. *Food Chem.* 277, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.112>
- Lee, S., Hernandez, P., Djordjevic, D., Faraji, H., Hollender, R., Faustman, C., Decker, E.A., **2006**. Effect of antioxidants and cooking on stability of n-3 fatty acids in fortified meat products. *J. Food Sci.* 71, C233–C238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb15623.x>
- Lerdchai, K., Kitsongsermthorn, J., Ratanavaraporn, J., Kanokpanont, S., Damrongsakkul, S., **2016**. Thai silk fibroin/gelatin sponges for the dual controlled release of curcumin and docosahexaenoic acid for anticancer treatment. *J. Pharm. Sci.* 105, 221–230. <https://doi.org/10.1002/jps.24701>
- Lestari, M.L.A.D., Indrayanto, G., **2014**. Curcumin. *Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol.* 39, 113–204. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800173-8.00003-9>

- Let, M.B., Jacobsen, C., Meyer, A.S., **2007**. Lipid oxidation in milk, yoghurt, and salad dressing enriched with neat fish oil or pre-emulsified fish oil. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7802–7809. <https://doi.org/10.1021/jf070830x>
- Li, J., Cheng, Y., Tatsumi, E., Saito, M., Yin, L., **2014**. The use of W/O/W controlled-release coagulants to improve the quality of bittern-solidified tofu. *Food Hydrocoll.* 35, 627–635. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.002>
- Li, J., Pedersen, J.N., Anankanbil, S., Guo, Z., **2018**. Enhanced fish oil-in-water emulsions enabled by rapeseed lecithins obtained under different processing conditions. *Food Chem.* 264, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.053>
- Li, L., Wan, W., Cheng, W., Liu, G., Han, L., **2019**. Oxidatively stable curcumin-loaded oleogels structured by β -sitosterol and lecithin: Physical characteristics and release behaviour in vitro. *Int. J. Food Sci. Technol.* 54, 2502–2510. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14208>
- Li, P., McClements, D.J., Decker, E.A., **2020**. Application of flow cytometry as novel technology in studying the effect of droplet size on lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 68, 567–573. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04956>
- Li, S., Li, X., Shpigelman, A., Lorenzo, J.M., Montesano, D., Barba, F.J., **2017**. Direct and indirect measurements of enhanced phenolic bioavailability from litchi pericarp procyanidins by *Lactobacillus casei*-01. *Food Funct.* 8, 2760–2770. <https://doi.org/10.1039/C7FO00749C>
- Li, S., Xiao, J., Chen, L., Hu, C., Chen, P., Xie, B., Sun, Z., **2012**. Identification of A-series oligomeric procyanidins from pericarp of *Litchi chinensis* by FT-ICR-MS and LC-MS. *Food Chem.* 135, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.039>
- Lim, J., Jeong, S., Oh, I.K., Lee, S., **2017**. Evaluation of soybean oil-carnauba wax oleogels as an alternative to high saturated fat frying

- media for instant fried noodles. *LWT* 84, 788–794. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.054>
- Lim, S., Ahn, K.H., **2013**. Rheological properties of oil paints and their flow instabilities in blade coating. *Rheol. Acta* 52, 643–659. <https://doi.org/10.1007/s00397-013-0717-3>
 - Lin, R., Chen, X., Li, W., Han, Y., Liu, P., Pi, R., **2008**. Exposure to metal ions regulates mRNA levels of APP and BACE1 in PC12 cells: Blockage by curcumin. *Neurosci. Lett.* 440, 344–347. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.05.070>
 - Lips, A., Campbell, I.J., Pelan, E.G., **1991**. Aggregation mechanisms in food colloids and the role of biopolymers, in: Dickinson, E. (Ed.), Food polymers, gels and colloids. *Woodhead Publishing*, pp. 1–21. <https://doi.org/10.1533/9781845698331.1>
 - Liu, F., Zhu, Z., Ma, C., Luo, X., Bai, L., Decker, E.A., Gao, Y., McClements, D.J., **2016**. Fabrication of concentrated fish oil emulsions using dual-channel microfluidization: Impact of droplet concentration on physical properties and lipid oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 64, 9532–9541. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04413>
 - Liu, G.-Q., Wan, W.-B., **2016**. Effects of structurants on structure and loading capacity of ternary organogels. *Huanan Ligong Daxue Xuebao Journal South China Univ. Technol. Nat. Sci.* 44, 143–150. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-565X.2016.10.021>
 - Liu, J., Liu, W., Salt, L.J., Ridout, M.J., Ding, Y., Wilde, P.J., **2019**. Fish oil emulsions stabilized with caseinate glycosylated by dextran: Physicochemical stability and gastrointestinal fate. *J. Agric. Food Chem.* 67, 452–462. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04190>
 - Liu, N., Lu, Y., Zhang, Y., Gao, Y., Mao, L., **2020**. Surfactant addition to modify the structures of ethylcellulose oleogels for higher solubility and stability of curcumin. *Int. J. Biol. Macromol.* 165, 2286–2294. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.115>

- Liu, S.X., Singh, M., Wayman, A.E., Hwang, H.-S., Fhaner, M., **2015**. Reduction of omega-3 oil oxidation in stable emulsion of caseinate-omega-3 oil-oat beta-glucan. *LWT – Food Sci. Technol.* 62, 1083–1090. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.012>
- Lobato-Calleros, C., Sosa-Pérez, A., Rodríguez-Tafoya, J., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Alonso, C., Vernon-Carter, E.J., **2008**. Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from W1/O/W2 emulsions and skim milk. *LWT – Food Sci. Technol.* 41, 1847–1856. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.01.006>
- Long, Z., Zhao, Q., Liu, T., Kuang, W., Xu, J., Zhao, M., **2013**. Influence of xanthan gum on physical characteristics of sodium caseinate solutions and emulsions. *Food Hydrocoll.* 32, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.12.017>
- López-Biedma, A., Sánchez-Quesada, C., Delgado-Rodríguez, M., Gaforio, J.J., **2016**. The biological activities of natural lignans from olives and virgin olive oils: A review. *J. Funct. Foods* 26, 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.07.005>
- Ma, D., Huang, Q., Wu, Y., Chen, J., Lu, X., McClements, D.J., Wang, Y., **2020**. Encapsulation of emulsions by a novel delivery system of fluid core-hard shell biopolymer particles to retard lipid oxidation. *Food Funct.* 11, 5788–5798. <https://doi.org/10.1039/D0FO00725K>
- Ma, P., Zeng, Q., Tai, K., He, X., Yao, Y., Hong, X., Yuan, F., **2018**. Development of stable curcumin nanoemulsions: Effects of emulsifier type and surfactant-to-oil ratios. *J. Food Sci. Technol.* 55, 3485–3497. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3273-0>
- Ma, P., Zeng, Q., Tai, K., He, X., Yao, Y., Hong, X., Yuan, F., **2017**. Preparation of curcumin-loaded emulsion using high pressure homogenization: Impact of oil phase and concentration on physicochemical stability. *LWT – Food Sci. Technol.* 84, 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.074>

- MacChia, A., Grancelli, H., Varini, S., Nul, D., Laffaye, N., Mariani, J., Ferrante, D., Badra, R., Figal, J., Ramos, S., Tognoni, G., Doval, H.C., **2013**. Omega-3 fatty acids for the prevention of recurrent symptomatic atrial fibrillation: Results of the forward (randomized trial to assess efficacy of pufa for the maintenance of sinus rhythm in persistent atrial fibrillation) trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 61, 463–468. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.11.021>
- MacLean, C.H., Mojica, W.A., Morton, S.C., Pencharz, J., Garland, R.H., Tu, W., Newberry, S.J., Jungvig, L.K., Grossman, J., Khanna, P., Rhodes, S., Shekelle, P., **2004**. Effects of omega-3 fatty acids on lipids and glycemic control in type II diabetes and the metabolic syndrome and on inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis, renal disease, systemic lupus erythematosus, and osteoporosis (Summary). *AHRQ evidence report summaries*. Agency for Healthcare Research and Quality (US).
- MacLean, C.H., Newberry, S.J., Mojica, W.A., Khanna, P., Issa, A.M., Suttorp, M.J., Lim, Y.-W., Traina, S.B., Hilton, L., Garland, R., Morton, S.C., **2006**. Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: A systematic review. *JAMA* 295, 403–415. <https://doi.org/10.1001/jama.295.4.403>
- Macosko, C.W., **1994**. Rheology: Principles, measurements, and applications. *VCH*, New York.
- Maheshwari, R.K., Singh, A.K., Gaddipati, J., Srimal, R.C., **2006**. Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sci., Natureceuticals (Natural Products), Nutraceuticals, Herbal Botanicals, and Psychoactives: Drug Discovery and Drug-Drug Interactions* 78, 2081–2087. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.007>
- Mangolim, C.S., Moriwaki, C., Nogueira, A.C., Sato, F., Baesso, M.L., Neto, A.M., Matioli, G., **2014**. Curcumin- β -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. *Food Chem.* 153, 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.067>

- Marangoni, A.G., Garti, N., **2011**. Chapter 1 – An overview of the past, present, and future of organogels, in: Marangoni, A.G., Garti, N. (Eds.), Edible oleogels. *AOCS Press*, pp. 1–17. <https://doi.org/10.1016/B978-0-9830791-1-8.50004-8>
- Márquez, A.L., Medrano, A., Panizzolo, L.A., Wagner, J.R., **2010**. Effect of calcium salts and surfactant concentration on the stability of water-in-oil (W/O) emulsions prepared with polyglycerol polyricinoleate. *J. Colloid Interface Sci.* 341, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.09.020>
- Márquez, A.L., Palazolo, G.G., Wagner, J.R., **2007**. Water-in-oil (W/O) and double (W/O/W) emulsions prepared with Spans: Microstructure, stability, and rheology. *Colloid Polym. Sci.* 285, 1119–1128. <https://doi.org/10.1007/s00396-007-1663-3>
- Márquez, A.L., Wagner, J.R., **2010**. Rheology of double (W/O/W) emulsions prepared with soybean milk and fortified with calcium. *J. Texture Stud.* 41, 651–671. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2010.00247.x>
- Martins, A.J., Cerqueira, M.A., Cunha, R.L., Vicente, A.A., **2017**. Fortified beeswax oleogels: Effect of β -carotene on the gel structure and oxidative stability. *Food Funct.* 8, 4241–4250. <https://doi.org/10.1039/C7FO00953D>
- Martins, A.J., Lorenzo, J.M., Franco, D., Pateiro, M., Domínguez, R., Munekata, P.E.S., Pastrana, L.M., Vicente, A.A., Cunha, R.L., Cerqueira, M.A., **2020**. Characterization of enriched meat-based pâté manufactured with oleogels as fat substitutes. *Gels* 6, 17. <https://doi.org/10.3390/gels6020017>
- Martins, J.G., **2009**. EPA but not DHA appears to be responsible for the efficacy of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation in depression: Evidence from a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Am. Coll. Nutr.* 28, 525–542. <https://doi.org/10.1080/07315724.2009.10719785>
- Matos, M., Gutiérrez, G., Martínez-Rey, L., Iglesias, O., Pazos, C., **2018**. Encapsulation of resveratrol using food-grade concentrated double

- emulsions: Emulsion characterization and rheological behaviour. *J. Food Eng.* 226, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.01.007>
- Matsumura, Y., Kang, I.-J., Sakamoto, H., Motoki, M., Mori, T., **1993**. Filler effects of oil droplets on the viscoelastic properties of emulsion gels. *Food Hydrocoll.* 7, 227–240. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80174-4](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80174-4)
 - Mazza, G., **1998**. Functional foods: Biochemical and processing aspects. *CRC Press*.
 - McClements, D.J., **2015**. Food emulsions: Principles, practices, and techniques, Third edition. *CRC Press*.
 - McClements, D.J., **2010**. Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 1, 241–269. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100722>
 - McClements, D.J., **2007**. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 611–649. <https://doi.org/10.1080/10408390701289292>
 - McClements, D.J., **2004**. Protein-stabilized emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 9, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.09.003>
 - McClements, D.J., Decker, E.A., **2000**. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *J. Food Sci.* 65, 1270–1282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10596.x>
 - McClements, D.J., Decker, E.A., Park, Y., Weiss, J., **2009**. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49, 577–606. <https://doi.org/10.1080/10408390902841529>
 - McClements, D.J., Decker, E.A., Weiss, J., **2007**. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *J. Food Sci.* 72, R109–R124. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x>

- McClements, D.J., Dickinson, E., **1996**. Advances in food colloids. *Springer US*.
- McClements, D.J., Weiss, J., **2005**. Lipid emulsions, in: Bailey's industrial oil and fat products. *American Cancer Society*. <https://doi.org/10.1002/047167849X.bio019>
- Mei, L., Decker, E.A., McClements, D.J., **1998**. Evidence of iron association with emulsion droplets and its impact on lipid oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 46, 5072–5077. <https://doi.org/10.1021/jf9806661>
- Melik, D.H., Folger, H.S., **1988**. Fundamentals of colloidal stability in quiescent media, in: Encyclopedia of emulsion technology. *Marcel Dekker*, New York.
- Mesa, M.D., Ramírez Tortosa, M. del C., Aguilera García, C.M., Ramírez Boscá, A., Gil Hernández, Á., **2000**. Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los cucuminoides. *Ars. Pharm.* 41, 307–321. <http://hdl.handle.net/10481/35289>
- Miller, J.C., **1993**. Estadística para química analítica, 2^a ed. Ed. *Addison Wesley Iberoamericana*, Argentina.
- Milobedzka, J., Kostanecki, V., Lampe, V., **1910**. Structure of curcumin. *Ber Dtsch Chem Ges* 43, 2163–2170.
- Min, D.B., Boff, J.M., **2002**. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 1, 58–72. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2002.tb00007.x>
- Mirza, M., Volz, C., Karlstetter, M., Langiu, M., Somogyi, A., Ruonala, M.O., Tamm, E.R., Jägle, H., Langmann, T., **2013**. Progressive retinal degeneration and glial activation in the CLN6nclf mouse model of neuronal ceroid lipofuscinosis: A beneficial effect of DHA and curcumin supplementation. *PLOS ONE* 8, e75963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075963>

- Mita, T., Yamada, K., Matsumoto, S., Yonezawa, D., **1973**. Dispersion state of protein-stabilized emulsions: Dependence of globule size and size distribution upon pH in concentrated oil-in-water systems. *J. Texture Stud.* 4, 41–52. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1973.tb00653.x>
- Mitsiogianni, M., Amery, T., Franco, R., Zoumpourlis, V., Pappa, A., Panayiotidis, M.I., **2018**. From chemo-prevention to epigenetic regulation: The role of isothiocyanates in skin cancer prevention. *Pharmacol. Ther.* 190, 187–201. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.06.001>
- Mocellin, M.C., Camargo, C. de Q., Fabre, M.E. de S., Trindade, E.B.S. de M., **2017**. Fish oil effects on quality of life, body weight and free fat mass change in gastrointestinal cancer patients undergoing chemotherapy: A triple blind, randomized clinical trial. *J. Funct. Foods* 31, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.01.041>
- Moghaddam, S.J., Barta, P., Mirabolfathinejad, S.G., Ammar-Aouchiche, Z., Garza, N.T., Vo, T.T., Newman, R.A., Aggarwal, B.B., Evans, C.M., Tuvim, M.J., Lotan, R., Dickey, B.F., **2009**. Curcumin inhibits COPD-like airway inflammation and lung cancer progression in mice. *Carcinogenesis* 30, 1949–1956. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp229>
- Moghtadaei, M., Soltanizadeh, N., Goli, S.A.H., **2018**. Production of sesame oil oleogels based on beeswax and application as partial substitutes of animal fat in beef burger. *Food Res. Int.* 108, 368–377. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.051>
- Montgomery, D.C., **2001**. Design and analysis of experiments, 5th ed. Ed. *John Wiley & Sons*, New York.
- Mori, T.A., Burke, V., Puddey, I.B., Watts, G.F., O’Neal, D.N., Best, J.D., Beilin, L.J., **2000**. Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 1085–1094. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.5.1085>

- Moriwaki, Y., Okuda, C., Yamamoto, A., Ka, T., Tsutsumi, Z., Takahashi, S., Yamamoto, T., Kitadate, K., Wakame, K., **2011**. Effects of Oligonol[®], an oligomerized polyphenol formulated from lychee fruit, on serum concentration and urinary excretion of uric acid. *J. Funct. Foods* 3, 13–16. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.11.002>
- Moustafine, R.I., Bukhovets, A.V., Sitenkov, A.Y., Kemenova, V.A., Rombaut, P., Van den Mooter, G., **2013**. Eudragit E PO as a complementary material for designing oral drug delivery systems with controlled release properties: Comparative evaluation of new interpolyelectrolyte complexes with Countercharged Eudragit L100 copolymers. *Mol. Pharm.* 10, 2630–2641. <https://doi.org/10.1021/mp4000635>
- Mozaffarian, D., Benjamin, E., Go, A., Arnett, D., Blaha, Cushman Mary, Das Sandeep R., de Ferranti Sarah, Després Jean-Pierre, Fullerton Heather J., Howard Virginia J., Huffman Mark D., Isasi Carmen R., Jiménez Monik C., Judd Suzanne E., Kissela Brett M., Lichtman Judith H., Lisabeth Lynda D., Liu Simin, Mackey Rachel H., Magid David J., McGuire Darren K., Mohler Emile R., Moy Claudia S., Muntner Paul, Mussolino Michael E., Nasir Khurram, Neumar Robert W., Nichol Graham, Palaniappan Latha, Pandey Dilip K., Reeves Mathew J., Rodriguez Carlos J., Rosamond Wayne, Sorlie Paul D., Stein Joel, Towfighi Amytis, Turan Tanya N., Virani Salim S., Woo Daniel, Yeh Robert W., Turner Melanie B., **2016**. Executive summary: Heart disease and stroke statistics – 2016 update. *Circulation* 133, 447–454. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000366>
- Mozaffarian, D., Lemaitre, R.N., King, I.B., Song, X., Huang, H., Sacks, F.M., Rimm, E.B., Wang, M., Siscovick, D.S., **2013**. Plasma phospholipid long-chain ω -3 fatty acids and total and cause-specific mortality in older adults: A cohort study. *Ann. Intern. Med.* 158, 515. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-158-7-201304020-00003>
- Mozaffarian, D., Lemaitre, R.N., King, I.B., Song, X., Spiegelman, D., Sacks, F.M., Rimm, E.B., Siscovick, D.S., **2011**. Circulating long-chain ω -3 fatty acids and incidence of congestive heart failure in older adults: The

- cardiovascular health study: A cohort study. *Ann. Intern. Med.* 155, 160. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-155-3-201108020-00006>
- Mozaffarian, D., Wu, J.H.Y., **2011**. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: Effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J. Am. Coll. Cardiol.* 58, 2047–2067. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.06.063>
 - Mulder, H., Walstra, P., **1974**. The milk fat globule: Emulsion science as applied to milk products and comparable foods. *Commonwealth Agricultural Bureaux*, Wageningen.
 - Müller, R.H., Harden, D., Keck, C.M., **2012**. Development of industrially feasible concentrated 30 % and 40 % nanoemulsions for intravenous drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 38, 420–430. <https://doi.org/10.3109/03639045.2011.608681>
 - Murdan, S., Gregoriadis, G., Florence, A.T., **1999**. Novel sorbitan monostearate organogels. *J. Pharm. Sci.* 88, 608–614. <https://doi.org/10.1021/js980342r>
 - Murugan, P., Pari, L., **2007**. Influence of tetrahydrocurcumin on hepatic and renal functional markers and protein levels in experimental type 2 diabetic rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 101, 241–245. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00109.x>
 - Muschiolik, G., **2007**. Multiple emulsions for food use. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 12, 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.07.006>
 - Muschiolik, G., Dickinson, E., **2017**. Double emulsions relevant to food systems: Preparation, stability and applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16, 532–555. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12261>
 - Nabavi, S.F., Daglia, M., Moghaddam, A.H., Habtemariam, S., Nabavi, S.M., **2014**. Curcumin and liver disease: From chemistry to medicine. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13, 62–77. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12047>

- Nakaya, K., Ushio, H., Matsukawa, S., Shimizu, M., Ohshima, T., **2005**. Effects of droplet size on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Lipids* 40, 501–507. <https://doi.org/10.1007/s11745-005-1410-4>
- Nejadmansouri, M., Hosseini, S.M.H., Niakosari, M., Yousefi, G.H., Golmakani, M.T., **2016**. Physicochemical properties and oxidative stability of fish oil nanoemulsions as affected by hydrophilic lipophilic balance, surfactant to oil ratio and storage temperature. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 506, 821–832. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.07.075>
- Nelson, K.M., Dahlin, J.L., Bisson, J., Graham, J., Pauli, G.F., Walters, M.A., **2017**. The essential medicinal chemistry of curcumin. *J. Med. Chem.* 60, 1620–1637. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00975>
- Nemets, H., Nemets, B., Apter, A., Bracha, Z., Belmaker, R.H., **2006**. Omega-3 treatment of childhood depression: A controlled, double-blind pilot study. *Am. J. Psychiatry* 163, 1098–1100. <https://doi.org/10.1176/ajp.2006.163.6.1098>
- Neves, M.A., Wang, Z., Kobayashi, I., Nakajima, M., **2017**. Assessment of oxidative stability in fish oil-in-water emulsions: Effect of emulsification process, droplet size and storage temperature. *J. Food Process Eng.* 40, e12316. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12316>
- Newberry, S.J., Chung, M., Booth, M., Maglione, M.A., Tang, A.M., O'Hanlon, C.E., Wang, D.D., Okunogbe, A., Huang, C., Motala, A., Trimmer, M., Dudley, W., Shanman, R., Coker, T.R., Shekelle, P.G., **2016**. Omega-3 fatty acids and maternal and child health: An updated systematic review. *Evid. Report/Technology Assess.* 224, 1–826. <https://doi.org/10.23970/ahrqepcerta224>
- Ng, Z.Y., Wong, J.-Y., Panneerselvam, J., Madheswaran, T., Kumar, P., Pillay, V., Hsu, A., Hansbro, N., Bebawy, M., Wark, P., Hansbro, P., Dua, K., Chellappan, D.K., **2018**. Assessing the potential of liposomes loaded with curcumin as a therapeutic intervention in asthma. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 172, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.027>

- Nieto Gómez, C.I., **2017**. Nuevos derivados curcuminoides: Síntesis, propiedades físico-químicas y actividad biológica (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de Educación a Distancia (España). Escuela Internacional de Doctorado. Programa de Doctorado en Ciencias.
- Niknam, S.M., Escudero, I., Benito, J.M., **2020**. Formulation and preparation of water-in-oil-in-water emulsions loaded with a phenolic-rich inner aqueous phase by application of high energy emulsification methods. *Foods* 9, 1411. <https://doi.org/10.3390/foods9101411>
- Norveel-Semb, T., **2012**. Analytical methods for determination of the oxidative status in oils (Master Thesis).
- Nouredin, S.A., El-Shishtawy, R.M., Al-Footy, K.O., **2019**. Curcumin analogues and their hybrid molecules as multifunctional drugs. *Eur. J. Med. Chem.* 182, 111631. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111631>
- Nuchi, C.D., Hernandez, P., McClements, D.J., Decker, E.A., **2002**. Ability of lipid hydroperoxides to partition into surfactant micelles and alter lipid oxidation rates in emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5445–5449. <https://doi.org/10.1021/jf020095j>
- Núñez Solano, A.A., Cerecero Aguirre, P., Sánchez Vargas, L.O., Robles Navarro, J.B., Bermeo Escalona, J.R., **2020**. Efecto antimicrobiano de curcumina sobre *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. *Nova Sci.* 12, 00014. <https://doi.org/10.21640/ns.v12i25.2474>
- O’Connell, T.D., Block, R.C., Huang, S.P., Shearer, G.C., **2017**. ω 3-Polyunsaturated fatty acids for heart failure: Effects of dose on efficacy and novel signaling through free fatty acid receptor 4. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 103, 74–92. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.12.003>
- O’Dwyer, O’Beirne, Ní, E., Hennessy, A.A., O’Kennedy, **2013**. Formation, rheology and susceptibility to lipid oxidation of multiple emulsions (O/W/O) in table spreads containing omega-3 rich oils. *LWT – Food Sci. Technol.* 51, 484–491. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.12.008>

- O'Dwyer, S.P., O'Beirne, D., Eidhin, D.N., O'Kennedy, B.T., **2013a**. Effects of sodium caseinate concentration and storage conditions on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Food Chem.* 138, 1145–1152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.138>
- O'Dwyer, S.P., O'Beirne, D., Ní, E., Hannon, J.A., O'Kennedy, B.T., **2013b**. Oxidative stability of tuna fat spreads (O/W/O emulsions) using conventional lipid oxidation methods, SPME-GC/MS and sensory analysis. *Eur. Food Res. Technol.* 237, 385–398. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2001-2>
- O'Dwyer, S.P., O'Beirne, D., Ní, E., O'Kennedy, B.T., **2012**. Effects of green tea extract and α -tocopherol on the lipid oxidation rate of omega-3 oils, incorporated into table spreads, prepared using multiple emulsion technology. *J. Food Sci.* 77, N58–N65. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02980.x>
- Oh, I., Lee, J., Lee, H.G., Lee, S., **2019**. Feasibility of hydroxypropyl methylcellulose oleogel as an animal fat replacer for meat patties. *Food Res. Int.* 122, 566–572. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.012>
- Ojeda-Serna, I.E., Rocha-Guzmán, N.E., Gallegos-Infante, J.A., Cháirez-Ramírez, M.H., Rosas-Flores, W., Pérez-Martínez, J.D., Moreno-Jiménez, M.R., González-Laredo, R.F., **2019**. Water-in-oil organogel based emulsions as a tool for increasing bioaccessibility and cell permeability of poorly water-soluble nutraceuticals. *Food Res. Int.* 120, 415–424. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.011>
- Okesola, B.O., Vieira, V.M.P., Cornwell, D.J., Whitelaw, N.K., Smith, D.K., **2015**. 1,3:2,4-Dibenzylidene-D-sorbitol (DBS) and its derivatives-efficient, versatile and industrially-relevant low-molecular-weight gelators with over 100 years of history and a bright future. *Soft Matter* 11, 4768–4787. <https://doi.org/10.1039/C5SM00845J>
- Okuro, P.K., Martins, A.J., Vicente, A.A., Cunha, R.L., **2020**. Perspective on oleogelator mixtures, structure design and behaviour towards

- digestibility of oleogels. *Curr. Opin. Food Sci.* 35, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.01.001>
- Oliver, C.M., Augustin, M.A., Sanguansri, L., **2009**. Maillard-based casein-carbohydrate microcapsules for the delivery of fish oil: Emulsion stability during in vitro digestion. *Aust. J. Dairy Technol.* 64, 80–83.
 - Onyango, A.N., **2012**. Small reactive carbonyl compounds as tissue lipid oxidation products and the mechanisms of their formation thereby. *Chem. Phys. Lipids* 165, 777–786. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2012.09.004>
 - Oppermann, A.K.L., Noppers, J.M.E., Stieger, M., Scholten, E., **2018**. Effect of outer water phase composition on oil droplet size and yield of (W1/O/W2) double emulsions. *Food Res. Int.* 107, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.021>
 - Osullivan, C.M., Davidovich-Pinhas, M., Wright, A.J., Barbut, S., Marangoni, A.G., **2017**. Ethylcellulose oleogels for lipophilic bioactive delivery-effect of oleogelation on: In vitro bioaccessibility and stability of beta-carotene. *Food Funct.* 8, 1438–1451. <https://doi.org/10.1039/c6fo01805j>
 - Owens, C., Griffin, K., Khouryieh, H., Williams, K., **2018**. Creaming and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized by whey protein-xanthan-locust bean complexes: Impact of pH. *Food Chem.* 239, 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.096>
 - Pal, A., Sung, B., Bhanu Prasad, B.A., Schuber, P.T., Prasad, S., Aggarwal, B.B., Bornmann, W.G., **2014**. Curcumin glucuronides: Assessing the proliferative activity against human cell lines. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 435–439. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.11.006>
 - Pal, R., **2011**. Rheology of simple and multiple emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 16, 41–60. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2010.10.001>

- Pan, M.-H., Huang, T.-M., Lin, J.-K., **1999**. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab. Dispos.* 27, 486–494.
- Pan, Y., Xie, Q.-T., Zhu, J., Li, X.-M., Meng, R., Zhang, B., Chen, H.-Q., Jin, Z.-Y., **2019**. Study on the fabrication and in vitro digestion behavior of curcumin-loaded emulsions stabilized by succinylated whey protein hydrolysates. *Food Chem.* 287, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.047>
- Panagiotou, T., Fisher, R., **2012**. Improving product quality with entrapped stable emulsions: From theory to industrial application. *Challenges* 3, 84–113. <https://doi.org/10.3390/challe3020084>
- Pande, G., Akoh, C.C., **2016**. Enzymatic synthesis of tyrosol-based phenolipids: Characterization and effect of alkyl chain unsaturation on the antioxidant activities in bulk oil and oil-in-water emulsion. *JAOCS J. Am. Oil Chem. Soc.* 93, 329–337. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2775-4>
- Pandolfe, W.D., **1995**. Effect of premix condition, surfactant concentration, and oil level on the formation of oil-in-water emulsions by homogenization. *J. Dispers. Sci. Technol.* 16, 633–650. <https://doi.org/10.1080/01932699508943710>
- Pandolsook, S., Kupongsak, S., **2019**. Storage stability of bleached rice bran wax organogels and water-in-oil emulsions. *J. Food Meas. Charact.* 13, 431–443. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9957-3>
- Pannu, N., Bhatnagar, A., **2019**. Resveratrol: From enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomed. Pharmacother.* 109, 2237–2251. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.075>
- Pari, L., Murugan, P., **2007**. Tetrahydrocurcumin prevents brain lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Med. Food* 10, 323–329. <https://doi.org/10.1089/jmf.2006.058>

- Park, C., Bemer, H.L., Maleky, F., **2018**. Oxidative stability of rice bran wax oleogels and an oleogel cream cheese product. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 95, 1267–1275. <https://doi.org/10.1002/aocs.12095>
- Park, C., Maleky, F., **2020**. A critical review of the last 10 years of oleogels in food. *Front. Sustain. Food Syst.* 4, 139. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00139>
- Park, C., Moon, D.-O., Choi, I.-W., Choi, B.T., Nam, T.-J., Rhu, C.-H., Kwon, T.K., Lee, W.H., Kim, G.-Y., Choi, Y.H., **2007**. Curcumin induces apoptosis and inhibits prostaglandin E2 production in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 20, 365–372. <https://doi.org/10.3892/ijmm.20.3.365>
- Park, S., Lee, S.-Y., **2015**. Significant enhancement of curcumin photoluminescence by a photosensitizing organogel: An optical sensor for pyrrole detection. *Sens. Actuators B Chem.* 220, 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.05.078>
- Parthasarathy, S., Siah Ying, T., Manickam, S., **2013**. Generation and optimization of palm oil-based oil-in-water (O/W) submicron-emulsions and encapsulation of curcumin using a Liquid Whistle Hydrodynamic Cavitation Reactor (LWHCR). *Ind. Eng. Chem. Res.* 52, 11829–11837. <https://doi.org/10.1021/ie4008858>
- Patel, A.R., Dewettinck, K., **2016**. Edible oil structuring: An overview and recent updates. *Food Funct.* 7, 20–29. <https://doi.org/10.1039/C5FO01006C>
- Patel, A.R., Dewettinck, K., **2015**. Comparative evaluation of structured oil systems: Shellac oleogel, HPMC oleogel, and HIPE gel. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117, 1772–1781. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400553>
- Patel, A.R., Schatteman, D., De, V., Lesaffer, A., Dewettinck, K., **2013**. Preparation and rheological characterization of shellac oleogels and oleogel-based emulsions. *J. Colloid Interface Sci.* 411, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.08.039>

- Patel, Ashok R., Schatteman, D., Lesaffer, A., Dewettinck, K., **2013**. A foam-templated approach for fabricating organogels using a water-soluble polymer. *RSC Adv.* 3, 22900–22903. <https://doi.org/10.1039/C3RA44763D>
- Pawlik, A., Cox, P.W., Norton, I.T., **2010**. Food grade duplex emulsions designed and stabilised with different osmotic pressures. *J. Colloid Interface Sci.* 352, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.08.049>
- Pedrazzoli, P., Cereda, E., Cappello, S., Colombo, S., Klersy, C., Imarisio, I., Turri, A., Caraccia, M., Verlicchi, A., Benazzo, M., Corbella, F., Caccialanza, R., **2017**. Nutritional counseling with or without systematic use of oral nutritional supplements in head and neck cancer patients undergoing radiotherapy. *J. Clin. Oncol.* 35, 10098–10098. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.10098
- Pehlivanoglu, H., Demirci, M., Toker, O.S., Konar, N., Karasu, S., Sagdic, O., **2018**. Oleogels, a promising structured oil for decreasing saturated fatty acid concentrations: Production and food-based applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58, 1330–1341. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1256866>
- Pehlivanoglu, H., Ozulku, G., Yildirim, R.M., Demirci, M., Toker, O.S., Sagdic, O., **2018**. Investigating the usage of unsaturated fatty acid-rich and low-calorie oleogels as a shortening mimetics in cake. *J. Food Process. Preserv.* 42, e13621. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13621>
- Peng, S., Li, Z., Zou, L., Liu, W., Liu, C., McClements, D.J., **2018a**. Enhancement of curcumin bioavailability by encapsulation in sophorolipid-coated nanoparticles: An in vitro and in vivo study. *J. Agric. Food Chem.* 66, 1488–1497. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05478>
- Peng, S., Li, Z., Zou, L., Liu, W., Liu, C., McClements, D.J., **2018b**. Improving curcumin solubility and bioavailability by encapsulation in saponin-coated curcumin nanoparticles prepared using a simple pH-driven loading method. *Food Funct.* 9, 1829–1839. <https://doi.org/10.1039/c7fo01814b>

- Peng, S., Zou, L., Liu, W., Liu, C., McClements, D.J., **2018c**. Fabrication and characterization of curcumin-loaded liposomes formed from sunflower lecithin: Impact of composition and environmental stress. *J. Agric. Food Chem.* 66, 12421–12430. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04136>
- Peram, M.R., Jalalpure, S.S., Joshi, S.A., Palkar, M.B., Diwan, P.V., **2017**. Single robust RP-HPLC analytical method for quantification of curcuminoids in commercial turmeric products, Ayurvedic medicines, and nanovesicular systems. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 40, 487–498. <https://doi.org/10.1080/10826076.2017.1329742>
- Peredo-Luna, H.A., Jiménez-Munguía, M.T., **2012**. Mecanismos de estabilidad y métodos de estabilización de emulsiones múltiples. *Temas Sel. Ing. Aliment.* 6, 122–130.
- Perneti, M., van Malssen, K., Kalnin, D., Flöter, E., **2007a**. Structuring edible oil with lecithin and sorbitan tri-stearate. *Food Hydrocoll., Food Colloids* 2006 21, 855–861. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.10.023>
- Perneti, M., van Malssen, K.F., Flöter, E., Bot, A., **2007b**. Structuring of edible oils by alternatives to crystalline fat. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 12, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.07.002>
- Pernin, A., Bosc, V., Soto, P., Roux, E.L., Maillard, M.-N., **2019**. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions rich in omega-3: Effect of aqueous phase viscosity, emulsifiers, and antioxidants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 121, 1800462. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800462>
- Phan, T.T., Harwell, J.H., Sabatini, D.A., **2010**. Effects of triglyceride molecular structure on optimum formulation of surfactant-oil-water systems. *J. Surfactants Deterg.* 13, 189–194. <https://doi.org/10.1007/s11743-009-1155-1>
- Phipps, L.W., **1985**. The high pressure dairy homogenizer. National Institute for Research in Dairying.

- Phipps, L.W., **1983**. Effects of fat concentration on the homogenization of cream. *J. Dairy Res.* 50, 91–96. <https://doi.org/10.1017/S0022029900032556>
- Pimentel-González, D.J., Campos-Montiel, R.G., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R., Vernon-Carter, E.J., **2009**. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Res. Int.* 42, 292–297. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.002>
- Pinel, A., Morio-Liondore, B., Capel, F., **2014**. n-3 polyunsaturated fatty acids modulate metabolism of insulin-sensitive tissues: Implication for the prevention of type 2 diabetes. *J. Physiol. Biochem.* 70, 647–658. <https://doi.org/10.1007/s13105-013-0303-2>
- Pinheiro, A.C., Lad, M., Silva, H.D., Coimbra, M.A., Boland, M., Vicente, A.A., **2013**. Unravelling the behaviour of curcumin nanoemulsions during in vitro digestion: Effect of the surface charge. *Soft Matter* 9, 3147–3154. <https://doi.org/10.1039/C3SM27527B>
- Pintado, T., Cofrades, S., **2020**. Quality characteristics of healthy dry fermented sausages formulated with a mixture of olive and chia oil structured in oleogel or emulsion gel as animal fat replacer. *Foods* 9, 830. <https://doi.org/10.3390/foods9060830>
- Plackett, R.L., Burman, J.P., **1946**. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 33, 305–325. <https://doi.org/10.1093/biomet/33.4.305>
- Plat, J., Baumgartner, S., Vanmierlo, T., Lütjohann, D., Calkins, K.L., Burrin, D.G., Guthrie, G., Thijs, C., Te Velde, A.A., Vreugdenhil, A.C.E., Sverdlov, R., Garssen, J., Wouters, K., Trautwein, E.A., Wolfs, T.G., van Gorp, C., Mulder, M.T., Rixsen, N.P., Groen, A.K., Mensink, R.P., **2019**. Plant-based sterols and stanols in health & disease: “Consequences of human development in a plant-based environment?” *Prog. Lipid Res.* 74, 87–102. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.02.003>

- Prasad, S., Gupta, S.C., Tyagi, A.K., Aggarwal, B.B., **2014a**. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. *Biotechnol. Adv.*, From Plants to Pharmacy Shelf: Recent Trends in Leads Finding and Bioproduction 32, 1053–1064. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.004>
- Prasad, S., Tyagi, A.K., Aggarwal, B.B., **2014b**. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: The golden pigment from golden spice. *Cancer Res. Treat. Off. J. Korean Cancer Assoc.* 46, 2–18. <https://doi.org/10.4143/crt.2014.46.1.2>
- Prasad, Y.S., Saritha, B., Tamizhanban, A., Lalitha, K., Kabilan, S., Maheswari, C.U., Sridharan, V., Nagarajan, S., **2018**. Enzymatic synthesis and self-assembly of glycolipids: Robust self-healing and wound closure performance of assembled soft materials. *RSC Adv.* 8, 37136–37145. <https://doi.org/10.1039/C8RA07703G>
- Prener, A., Storm, H.H., Nielsen, N.H., **1996**. Cancer of the male genital tract in circumpolar inuit. *Acta Oncol.* 35, 589–593. <https://doi.org/10.3109/02841869609096991>
- Priyadarsini, K.I., **2014**. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. *Molecules* 19, 20091–20112. <https://doi.org/10.3390/molecules191220091>
- PubChem-969516, n.d. PubChem Compound Database; CID=969516. National Center for Biotechnology Information [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/969516> (accessed 5.12.20).
- Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J., Ramirez-Tortosa, C., Ramirez-Tortosa, Mc., **2016**. Curcumin and health. *Molecules* 21, 264. <https://doi.org/10.3390/molecules21030264>
- Puri, B.K., Counsell, S.J., Richardson, A.J., Horrobin, D.F., **2002**. Eicosapentaenoic acid in treatment-resistant depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 59, 91–92.

- Qi, X.-M., Zhao, X.-L., Guo, Y.-L., **2017**. Coalescence and separation of fish oil droplets in oil-in-water emulsions under direct-current fields. *Mod. Food Sci. Technol.* 33, 185–190. <https://doi.org/10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.1.029>
- Qin, Y., **2018**. Chapter 9 – Health benefits of bioactive seaweed substances, in: Qin, Y. (Ed.), Bioactive seaweeds for food applications. *Academic Press*, pp. 179–200. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813312-5.00009-1>
- Quan, T.H., Benjakul, S., **2019**. Duck egg albumen hydrolysate-epigallocatechin gallate conjugates: Antioxidant, emulsifying properties and their use in fish oil emulsion. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 579, 123711. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123711>
- Rahalkar, R.R., **1992**. Viscoelastic properties of oil-water emulsions, in: Rao, M.A., Steffe, J.F. (Eds.), Viscoelastic properties of foods. *Elsevier Applied Science*, London, pp. 317–354.
- Raikos, V., Duthie, G., Ranawana, V., **2017**. Comparing the efficiency of different food-grade emulsifiers to form and stabilise orange oil-in-water beverage emulsions: Influence of emulsifier concentration and storage time. *Int. J. Food Sci. Technol.* 52, 348–358. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13286>
- Ramírez-Carrasco, P., Paredes-Toledo, J., Romero-Hasler, P., Soto-Bustamante, E., Díaz-Calderón, P., Robert, P., Giménez, B., **2020**. Effect of adding curcumin on the properties of linseed oil organogels used as fat replacers in pâtés. *Antioxidants* 9, 735. <https://doi.org/10.3390/antiox9080735>
- Ramírez-Tortosa, M.C., Mesa, M.D., Aguilera, M.C., Quiles, J.L., Baró, L., Ramírez-Tortosa, C.L., Martínez-Victoria, E., Gil, A., **1999**. Oral administration of a turmeric extract inhibits LDL oxidation and has hypocholesterolemic effects in rabbits with experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 147, 371–378. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(99\)00207-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(99)00207-5)

- Ratanajajaroen, P., Watthanaphanit, A., Tamura, H., Tokura, S., Rujiravanit, R., **2012**. Release characteristic and stability of curcumin incorporated in β -chitin non-woven fibrous sheet using Tween 20 as an emulsifier. *Eur. Polym. J.* 48, 512–523. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2011.11.020>
- Rauf, A., Imran, M., Orhan, I.E., Bawazeer, S., **2018**. Health perspectives of a bioactive compound curcumin: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 74, 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.01.016>
- Raviadaran, R., Chandran, D., Shin, L.H., Manickam, S., **2018**. Optimization of palm oil in water nano-emulsion with curcumin using microfluidizer and response surface methodology. *LWT* 96, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.022>
- Ravindran, J., Prasad, S., Aggarwal, B.B., **2009**. Curcumin and cancer cells: How many ways can curry kill tumor cells selectively? *AAPS J.* 11, 495–510. <https://doi.org/10.1208/s12248-009-9128-x>
- Ravindranath, V., Chandrasekhara, N., **1980**. Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology* 16, 259–265. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(80\)90122-5](https://doi.org/10.1016/0300-483X(80)90122-5)
- Raymundo, A., Franco, J.M., Empis, J., Sousa, I., **2002**. Optimization of the composition of low-fat oil-in-water emulsions stabilized by white lupin protein. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79, 783–790. <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0559-6>
- Reddy, A.Ch.P., Lokesh, B.R., **1994**. Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Mol. Cell. Biochem.* 137, 1–8. <https://doi.org/10.1007/BF00926033>
- Rezazadeh, L., Gargari, B.P., Jafarabadi, M.A., Alipour, B., **2019**. Effects of probiotic yogurt on glycemic indexes and endothelial dysfunction markers in patients with metabolic syndrome. *Nutrition* 62, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.12.011>

- Rice, S.M., Hickie, I.B., Yung, A.R., Mackinnon, A., Berk, M., Davey, C., Hermens, D.F., Hetrick, S.E., Parker, A.G., Schäfer, M.R., McGorry, P.D., Amminger, G.P., **2016**. Youth depression alleviation: The fish oil youth depression study (YoDA-F): A randomized, double-blind, placebo-controlled treatment trial. *Early Interv. Psychiatry* 10, 290–299. <https://doi.org/10.1111/eip.12166>
- Rivas-Montoya, E., **2014**. Desarrollo de un prototipo simulador del tracto gastrointestinal mediante reactores químicos automatizados (Tesis Doctoral). Universidad de Málaga, Málaga.
- Rivas-Montoya, E., Ochando-Pulido, J.M., López-Romero, J.M., Martínez-Ferez, A., **2016**. Application of a novel gastrointestinal tract simulator system based on a membrane bioreactor (SimuGIT) to study the stomach tolerance and effective delivery enhancement of nanoencapsulated macelignan. *Chem. Eng. Sci.* 140, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.10.006>
- Rivera-Mancía, S., Trujillo, J., Chaverri, J.P., **2018**. Utility of curcumin for the treatment of diabetes mellitus: Evidence from preclinical and clinical studies. *J. Nutr. Intermed. Metab.* 14, 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.jnim.2018.05.001>
- Robin, O., Blanchot, V., Vuilleumard, J.C., Paquin, P., **1992**. Microfluidization of dairy model emulsions. I. Preparation of emulsions and influence of processing and formulation on the size distribution of milk fat globules. *Le Lait* 72, 511–531. <https://doi.org/10.1051/lait:1992637>
- Rodríguez-Concepción, M., Avalos, J., Bonet, M.L., Boronat, A., Gómez-Gómez, L., Hornero-Méndez, D., Limón, M.C., Meléndez-Martínez, A.J., Olmedilla-Alonso, B., Palou, A., Ribot, J., Rodrigo, M.J., Zacarias, L., Zhu, C., **2018**. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Prog. Lipid Res.* 70, 62–93. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.004>

- Rogers, M.A., **2009**. Novel structuring strategies for unsaturated fats – Meeting the zero-trans, zero-saturated fat challenge: A review. *Food Res. Int.* 42, 747–753. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.024>
- Rogers, M.A., Strober, T., Bot, A., Toro-Vazquez, J.F., Stortz, T., Marangoni, A.G., **2014**. Edible oleogels in molecular gastronomy. *Int. J. Gastron. Food Sci.* 2, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2014.05.001>
- Romero-García, A., **2009**. Estudio reológico y microestructural de emulsiones y geles de concentrados proteícos de cangrejo (Tesis Doctoral). Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Roshan, H., Ghaedi, E., Rahmani, J., Barati, M., Najafi, M., Karimzadeh, M., Nikpayam, O., **2019**. Effects of probiotics and synbiotic supplementation on antioxidant status: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Clin. Nutr. ESPEN* 30, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2019.02.003>
- Ruxton, C.H.S., Reed, S.C., Simpson, J.A., Millington, K.J., **2007**. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: A review of the evidence. *J. Hum. Nutr. Diet.* 20, 275–285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-277X.2007.00770.x>
- Ruxton, C.H.S., Reed, S.C., Simpson, M.J.A., Millington, K.J., **2004**. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: A review of the evidence. *J. Hum. Nutr. Diet.* 17, 449–459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-277X.2004.00552.x>
- Ryan, J.L., Heckler, C.E., Ling, M., Katz, A., Williams, J.P., Pentland, A.P., Morrow, G.R., **2013**. Curcumin for radiation dermatitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of thirty breast cancer patients. *Radiat. Res.* 180, 34–43. <https://doi.org/10.1667/RR3255.1>
- Saeidinia, A., Keihanian, F., Butler, A.E., Bagheri, R.K., Atkin, S.L., Sahebkar, A., **2018**. Curcumin in heart failure: A choice for complementary therapy? *Pharmacol. Res.* 131, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.03.009>

- Saeidy, S., Keramat, J., Nasirpour, A., **2014**. Microencapsulation of calcium using water-in-oil-in-water double emulsion method. *J. Dispers. Sci. Technol.* 35, 370–379. <https://doi.org/10.1080/01932691.2013.788453>
- Sagalowicz, L., Leser, M.E., **2010**. Delivery systems for liquid food products. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 15, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.12.003>
- Sahebkar, A., **2014**. Are curcuminoids effective C-reactive protein-lowering agents in clinical practice? Evidence from a meta-analysis. *Phytother. Res.* 28, 633–642. <https://doi.org/10.1002/ptr.5045>
- Saito, M., **2007**. Role of FOSHU (Food for Specified Health Uses) for healthier life. *Yakugaku Zasshi* 127, 407–416. <https://doi.org/10.1248/yakushi.127.407>
- Salami, M., Kouchaki, E., Asemi, Z., Tamtaji, O.R., **2019**. How probiotic bacteria influence the motor and mental behaviors as well as immunological and oxidative biomarkers in multiple sclerosis? A double blind clinical trial. *J. Funct. Foods* 52, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.023>
- Salehi, B., Stojanović-Radić, Z., Matejić, J., Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N.V., Martins, N., Sharifi-Rad, J., **2019**. The therapeutic potential of curcumin: A review of clinical trials. *Eur. J. Med. Chem.* 163, 527–545. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.12.016>
- Salminen, H., Helgason, T., Kristinsson, B., Kristbergsson, K., Weiss, J., **2013a**. Formation of solid shell nanoparticles with liquid ω -3 fatty acid core. *Food Chem.* 141, 2934–2943. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.120>
- Salminen, H., Herrmann, K., Weiss, J., **2013b**. Oil-in-water emulsions as a delivery system for n-3 fatty acids in meat products. *Meat Sci.* 93, 659–667. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.035>
- Sánchez, M.C., Berjano Núñez, M., Guerrero Conejo, A.F., Gallegos Montes, C., **2000**. Evolución de las propiedades reológicas de emulsiones

aceite vegetal-en-agua durante el proceso de emulsificación y almacenamiento. *Grasas y aceites* 51, 230–236.

- Sánchez, R., Franco, J.M., Delgado, M.A., Valencia, C., Gallegos, C., **2011**. Rheology of oleogels based on sorbitan and glyceryl monostearates and vegetable oils for lubricating applications. *Grasas Aceites* 62, 328–336. <https://doi.org/10.3989/gya.113410>
- Sanidad, K.Z., Sukamtoh, E., Xiao, H., McClements, D.J., Zhang, G., **2019**. Curcumin: Recent advances in the development of strategies to improve oral bioavailability. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 10, 597–617. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121738>
- Sapei, L., Naqvi, M.A., Rousseau, D., **2012**. Stability and release properties of double emulsions for food applications. *Food Hydrocoll.* 27, 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.10.008>
- Sarkar, A., Kamaruddin, H., Bentley, A., Wang, S., **2016**. Emulsion stabilization by tomato seed protein isolate: Influence of pH, ionic strength and thermal treatment. *Food Hydrocoll.* 57, 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.014>
- Saw, C.L.L., Huang, Y., Kong, A.-N., **2010**. Synergistic anti-inflammatory effects of low doses of curcumin in combination with polyunsaturated fatty acids: docosahexaenoic acid or eicosapentaenoic acid. *Biochem. Pharmacol.* 79, 421–430. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.08.030>
- Sawalha, H., Venema, P., Bot, A., Flöter, E., van der Linden, E., **2011**. The influence of concentration and temperature on the formation of γ -oryzanol + β -sitosterol tubules in edible oil organogels. *Food Biophys.* 6, 20–25. <https://doi.org/10.1007/s11483-010-9169-9>
- Schaink, H.M., van Malssen, K.F., **2007**. Shear modulus of sintered ‘house of cards’-like assemblies of crystals. *Langmuir* 23, 12682–12686. <https://doi.org/10.1021/la701914m>
- Schmidts, T., Dobler, D., Nissing, C., Runkel, F., **2009**. Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. *J.*

Colloid Interface Sci. 338, 184–192.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.06.033>

- Schneider, C., Gordon, O.N., Edwards, R.L., Luis, P.B., **2015**. Degradation of curcumin: From mechanism to biological implications. *J. Agric. Food Chem.* 63, 7606–7614. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00244>
- Scholz, P., Keck, C.M., **2015**. Nanoemulsions produced by rotor-stator high speed stirring. *Int. J. Pharm., Particulate Systems in Nanomedicine* 482, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.040>
- Schuch, A., Wrenger, J., Schuchmann, H.P., **2014**. Production of W/O/W double emulsions. Part II: Influence of emulsification device on release of water by coalescence. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 461, 344–351. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.11.044>
- Schwab, U., Lauritzen, L., Tholstrup, T., Haldorsson, T.I., Riserus, U., Uusitupa, M., Becker, W., **2014**. Effect of the amount and type of dietary fat on cardiometabolic risk factors and risk of developing type-2 diabetes, cardiovascular disease, and cancer: A systematic review. *Food Nutr. Res.* 58, 25145. <https://doi.org/10.3402/fnr.v58.25145>
- Serini, S., Cassano, R., Corsetto, P.A., Rizzo, A.M., Calviello, G., Trombino, S., **2018**. Omega-3 PUFA loaded in resveratrol-based solid lipid nanoparticles: Physicochemical properties and antineoplastic activities in human colorectal cancer cells in vitro. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 586. <https://doi.org/10.3390/ijms19020586>
- Shah, L., Gattacceca, F., Amiji, M.M., **2014**. CNS delivery and pharmacokinetic evaluations of DALDA analgesic peptide analog administered in nano-sized oil-in-water emulsion formulation. *Pharm. Res.* 31, 1315–1324. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1252-8>
- Shahidi, F., **2006**. Nutraceutical and specialty lipids and their co-products. *CRC Press*.

- Shahidi, F., Ambigaipalan, P., **2018**. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefits. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 9, 345–381. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317-095850>
- Shahidi, F., Miraliakbari, H., **2004**. Omega-3 (n-3) fatty acids in health and disease: Part 1 – Cardiovascular disease and cancer. *J. Med. Food* 7, 387–401. <https://doi.org/10.1089/jmf.2004.7.387>
- Shahidi, F., Zhong, Y., **2010**. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem. Soc. Rev.* 39, 4067–4079. <https://doi.org/10.1039/B922183M>
- Shahparast, Y., Eskandani, M., Rajaei, A., Khosroushahi, A.Y., **2019**. Preparation, physicochemical characterization and oxidative stability of omega-3 fish oil/ α -tocopherol-co-loaded nanostructured lipidic carriers. *Adv. Pharm. Bull.* 9, 393–400. <https://doi.org/10.15171/apb.2019.046>
- Shanmugam, M.K., Rane, G., Kanchi, M.M., Arfuso, F., Chinnathambi, A., Zayed, M.E., Alharbi, S.A., Tan, B.K.H., Kumar, A.P., Sethi, G., **2015**. The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment. *Molecules* 20, 2728–2769. <https://doi.org/10.3390/molecules20022728>
- Shantha, N.C., Decker, E.A., **1994**. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *J. AOAC Int.* 77, 421–424. <https://doi.org/10.1093/jaoac/77.2.421>
- Sharma, N., Kaur, G., Khatkar, S.K., **2021**. Optimization of emulsification conditions for designing ultrasound assisted curcumin loaded nanoemulsion: Characterization, antioxidant assay and release kinetics. *LWT* 141, 110962. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110962>
- Sharma, R.A., Gescher, A.J., Steward, W.P., **2005**. Curcumin: The story so far. *Eur. J. Cancer, Cancer Chemoprevention – An Update on a Novel and Exciting Field of Oncology* 41, 1955–1968. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.05.009>
- Sharma, R.A., McLelland, H.R., Hill, K.A., Ireson, C.R., Euden, S.A., Manson, M.M., Pirmohamed, M., Marnett, L.J., Gescher, A.J., Steward,

- W.P., **2001**. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 1894–1900.
- Shen, L., Ji, H.-F., **2012**. The pharmacology of curcumin: Is it the degradation products? *Trends Mol. Med.* 18, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.01.004>
 - Shen, P., Zhang, R., McClements, D.J., Park, Y., **2019**. Nanoemulsion-based delivery systems for testing nutraceutical efficacy using *Caenorhabditis elegans*: Demonstration of curcumin bioaccumulation and body-fat reduction. *Food Res. Int.* 120, 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.036>
 - Shi, M.-J., Wang, F., Jiang, H., Qian, W.-W., Xie, Y.-Y., Wei, X.-Y., Zhou, T., **2020**. Effect of enzymatic degraded polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* on the physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. *Food Chem.* 322, 126774. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126774>
 - Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T., **1992**. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 40, 945–948. <https://doi.org/10.1021/jf00018a005>
 - Shingel, K.I., Faure, M.-P., Azoulay, L., Roberge, C., Deckelbaum, R.J., **2008**. Solid emulsion gel as a vehicle for delivery of polyunsaturated fatty acids: Implications for tissue repair, dermal angiogenesis and wound healing. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2, 383–393. <https://doi.org/10.1002/term.101>
 - Shoaib, M., Shehzad, A., Omar, M., Rakha, A., Raza, H., Sharif, H.R., Shakeel, A., Ansari, A., Niazi, S., **2016**. Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydr. Polym.* 147, 444–454. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.020>

- Si, H., Cheong, L.-Z., Huang, J., Wang, X., Zhang, H., **2016**. Physical properties of soybean oleogels and oil migration evaluation in model praline system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 93, 1075–1084. <https://doi.org/10.1007/s11746-016-2846-1>
- Siddiqui, N.A., **2015**. Evaluation of thermo sensitivity of curcumin and quantification of ferulic acid and vanillin as degradation products by a validated HPTLC method. *Pak. J. Pharm. Sci.* 28, 299–305.
- Siddiqui, R.A., Harvey, K.A., Walker, C., Altenburg, J., Xu, Z., Terry, C., Camarillo, I., Jones-Hall, Y., Mariash, C., **2013**. Characterization of synergistic anti-cancer effects of docosahexaenoic acid and curcumin on DMBA-induced mammary tumorigenesis in mice. *BMC Cancer* 13, 418. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-418>
- Silva, W., Torres-Gatica, M.F., Oyarzun-Ampuero, F., Silva-Weiss, A., Robert, P., Cofrades, S., Giménez, B., **2018**. Double emulsions as potential fat replacers with gallic acid and quercetin nanoemulsions in the aqueous phases. *Food Chem.* 253, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.128>
- Simopoulos, A.P., **2002**. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* 56, 365–379. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00253-6](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00253-6)
- Siscovick, D.S., Barringer, T.A., Fretts, A.M., Wu, J.H.Y., Lichtenstein, A.H., Costello Rebecca B., Kris-Etherton Penny M., Jacobson Terry A., Engler Mary B., Alger Heather M., Appel Lawrence J., Mozaffarian Dariush, **2017**. Omega-3 polyunsaturated fatty acid (fish oil) supplementation and the prevention of clinical cardiovascular disease. *Circulation* 135, e867–e884. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000482>
- Sisko, A.W., **1958**. The flow of lubricating greases. *Ind. Eng. Chem.* 50, 1789–1792. <https://doi.org/10.1021/ie50588a042>

- Sivapratha, S., Sarkar, P., **2018**. Oxidative stability and effect of stress factors on flaxseed oil-in-water emulsions stabilized by sodium caseinate-sodium alginate-chitosan interfacial membrane. *Chem. Papers* 72, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11696-017-0252-2>
- Slavova-Kazakova, A.K., Angelova, S.E., Veprintsev, T.L., Denev, P., Fabbri, D., Dettori, M.A., Kratchanova, M., Naumov, V.V., Trofimov, A.V., Vasil'ev, R.F., Delogu, G., Kancheva, V.D., **2015**. Antioxidant potential of curcumin-related compounds studied by chemiluminescence kinetics, chain-breaking efficiencies, scavenging activity (ORAC) and DFT calculations. *Beilstein J. Org. Chem.* 11, 1398–1411. <https://doi.org/10.3762/bjoc.11.151>
- So, W.W., Liu, W.N., Leung, K.N., **2015**. Omega-3 polyunsaturated fatty acids trigger cell cycle arrest and induce apoptosis in human neuroblastoma LA-N-1 cells. *Nutrients* 7, 6956–6973. <https://doi.org/10.3390/nu7085319>
- Soveyd, N., Abdolahi, M., Djalali, M., Hatami, M., Tafakhori, A., Sarraf, P., Honarvar, N.M., **2017**. The combined effects of ω -3 fatty acids and nano-curcumin supplementation on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene expression and serum levels in migraine patients. *CNS Neurol. Disord. – Drug Targets* 16, 1120–1126. <https://doi.org/10.2174/1871527317666171213154749>
- Sowbhagya, H.B., Smitha, S., Sampathu, S.R., Krishnamurthy, N., Bhattacharya, S., **2005**. Stability of water-soluble turmeric colourant in an extruded food product during storage. *J. Food Eng.* 67, 367–371. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.003>
- Sreejayan, Rao, M.N.A., **1994**. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 1013–1016. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1994.tb03258.x>
- Sriprabhom, J., Luangpituksa, P., Wongkongkatap, J., Pongtharangkul, T., Suphantharika, M., **2019**. Influence of pH and ionic strength on the physical and rheological properties and stability of whey protein stabilized O/W

- emulsions containing xanthan gum. *J. Food Eng.* 242, 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.08.031>
- Steigerwalt, R., Nebbioso, M., Appendino, G., Belcaro, G., Ciammaichella, G., Cornelli, U., Luzzi, R., Togni, S., Dugall, M., Cesarone, M.R., Ippolito, E., Errichi, B.M., Ledda, A., Hosoi, M., Corsi, M., **2012**. Meriva[®], a lecithinized curcumin delivery system, in diabetic microangiopathy and retinopathy. *Panminerva Med.* 54, 11–16.
 - Su, J., Flanagan, J., Hemar, Y., Singh, H., **2006**. Synergistic effects of polyglycerol ester of polyricinoleic acid and sodium caseinate on the stabilisation of water-oil-water emulsions. *Food Hydrocoll.*, 7th International Hydrocolloids Conference 20, 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.03.010>
 - Sugasini, D., Lokesh, B.R., **2017**. Curcumin and linseed oil co-delivered in phospholipid nanoemulsions enhances the levels of docosahexaenoic acid in serum and tissue lipids of rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 119, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.03.007>
 - Sumeri, I., Arike, L., Adamberg, K., Paalme, T., **2008**. Single bioreactor gastrointestinal tract simulator for study of survival of probiotic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 317–324. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1553-8>
 - Sun, C., Gunasekaran, S., **2009**. Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum. *Food Hydrocoll.* 23, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.12.006>
 - Sun, C., Gunasekaran, S., Richards, M.P., **2007**. Effect of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocoll.* 21, 555–564. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.06.003>

- Sun, J., Zhao, Y., Hu, J., **2013**. Curcumin inhibits imiquimod-induced psoriasis-like inflammation by inhibiting IL-1beta and IL-6 production in mice. *PLoS ONE* 8, e67078. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067078>
- Sun, Y., Liu, W., Zhang, H., Li, H., Liu, J., Zhang, F., Jiang, T., Jiang, S., **2017**. Curcumin prevents osteoarthritis by inhibiting the activation of inflammasome NLRP3. *J. Interferon Cytokine Res.* 37, 449–455. <https://doi.org/10.1089/jir.2017.0069>
- Suresh, S., Yadav, V.R., Suresh, A., **2006**. Health benefits and therapeutic applications of curcumin. *Clin. Res. Regul. Aff.* 23, 191–210. <https://doi.org/10.1080/10601330601079810>
- Surh, J., Vladisavljević, G.T., Mun, S., McClements, D.J., **2007**. Preparation and characterization of water/oil and water/oil/water emulsions containing biopolymer-gelled water droplets. *J. Agric. Food Chem.* 55, 175–184. <https://doi.org/10.1021/jf061637q>
- Suskind, D.L., Wahbeh, G., Burpee, T., Cohen, M., Christie, D., Weber, W., **2013**. Tolerability of curcumin in pediatric inflammatory bowel disease: A forced-dose titration study. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 56, 277–279. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318276977d>
- Swamy, M.V., Citineni, B., Patlolla, J.M.R., Mohammed, A., Zhang, Y., Rao, C.V., **2008**. Prevention and treatment of pancreatic cancer by curcumin in combination with omega-3 fatty acids. *Nutr. Cancer* 60, 81–89. <https://doi.org/10.1080/01635580802416703>
- Tadros, T.F., **2013**. Emulsion formation, stability, and rheology, in: Emulsion formation and stability. *John Wiley & Sons, Ltd*, pp. 1–75. <https://doi.org/10.1002/9783527647941.ch1>
- Taherian, A.R., Britten, M., Sabik, H., Fustier, P., **2011**. Ability of whey protein isolate and/or fish gelatin to inhibit physical separation and lipid oxidation in fish oil-in-water beverage emulsion. *Food Hydrocoll.* 25, 868–878. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.08.007>

- Taherian, A.R., Fustier, P., Ramaswamy, H.S., **2007**. Effects of added weighting agent and xanthan gum on stability and rheological properties of beverage cloud emulsions formulated using modified starch. *J. Food Process Eng.* 30, 204–224. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2007.00109.x>
- Takezaki, T., Inoue, M., Kataoka, H., Ikeda, S., Yoshida, M., Ohashi, Y., Tajima, K., Tominaga, S., **2003**. Diet and lung cancer risk from a 14-year population-based prospective study in Japan: With special reference to fish consumption. *Nutr. Cancer* 45, 160–167. https://doi.org/10.1207/S15327914NC4502_04
- Tan, Y., Deng, X., Liu, T., Yang, B., Zhao, M., Zhao, Q., **2017**. Influence of NaCl on the oil/water interfacial and emulsifying properties of walnut protein-xanthan gum. *Food Hydrocoll.* 72, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.031>
- Tang, X.-Y., Wang, Z.-M., Meng, H.-C., Lin, J.-W., Guo, X.-M., Zhang, T., Chen, H.-L., Lei, C.-Y., Yu, S.-J., **2021**. Robust W/O/W emulsion stabilized by genipin-cross-linked sugar beet pectin-bovine serum albumin nanoparticles: Co-encapsulation of betanin and curcumin. *J. Agric. Food Chem.* 69, 1318–1328. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05212>
- Tangsuphoom, N., Coupland, J.N., **2008**. Effect of pH and ionic strength on the physicochemical properties of coconut milk emulsions. *J. Food Sci.* 73, e274–e280. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00819.x>
- Tanthapanichakoon, W., Sowasod, N., Charinpanitkul, T., **2007**. Development of nanoencapsulated curcumin in chitosan for cosmetic use via evaporation of O/W/O emulsion. *Ceram. Trans.* 198, 185–192.
- Tapal, A., Tiku, P.K., **2012**. Complexation of curcumin with soy protein isolate and its implications on solubility and stability of curcumin. *Food Chem.* 130, 960–965. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.025>
- Tatar, F., Tunç, M.T., Dervisoglu, M., Cekmecelioglu, D., Kahyaoglu, T., **2014**. Evaluation of hemicellulose as a coating material with gum arabic for

- food microencapsulation. *Food Res. Int.* 57, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.022>
- Taylor, P., **1995**. Ostwald ripening in emulsions. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 99, 175–185. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(95\)03161-6](https://doi.org/10.1016/0927-7757(95)03161-6)
 - Taylor, R.A., Leonard, M.C., **2011**. Curcumin for inflammatory bowel disease: A review of human studies. *Altern. Med. Rev.* 16, 152–156.
 - Terry, P., Lichtenstein, P., Feychting, M., Ahlbom, A., Wolk, A., **2001**. Fatty fish consumption and risk of prostate cancer. *The Lancet* 357, 1764–1766. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04889-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04889-3)
 - Thota, R.N., Acharya, S.H., Abbott, K.A., Garg, M.L., **2016**. Curcumin and long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids for prevention of type 2 diabetes (COP-D): Study protocol for a randomised controlled trial. *Trials* 17, 565. <https://doi.org/10.1186/s13063-016-1702-9>
 - Tian, M., Han, J., Ye, A., Liu, W., Xu, X., Yao, Y., Li, K., Kong, Y., Wei, F., Zhou, W., **2019**. Structural characterization and biological fate of lactoferrin-loaded liposomes during simulated infant digestion. *J. Sci. Food Agric.* 99, 2677–2684. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9435>
 - Tønnesen, H.H., Karlsen, J., **1985**. Studies on curcumin and curcuminoids – VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Z. Für Lebensm.-Unters.-Forsch.* 180, 402–404. <https://doi.org/10.1007/BF01027775>
 - Tønnesen, H.H., Másson, M., Loftsson, T., **2002**. Studies of curcumin and curcuminoids – XXVII. Cyclodextrin complexation: Solubility, chemical and photochemical stability. *Int. J. Pharm.* 244, 127–135. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00323-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00323-X)
 - Topcu-Tarladacalisir, Y., Akpolat, M., Uz, Y.H., Kizilay, G., Sapmaz-Metin, M., Cerkezkayabekir, A., Omurlu, I.K., **2013**. Effects of curcumin on apoptosis and oxidoinflammatory regulation in a rat model of acetic acid-induced colitis: The roles of c-Jun N-Terminal Kinase and p38

- mitogen-activated protein kinase. *J. Med. Food* 16, 296–305. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.2550>
- Tornberg, E., **1980**. Functional characteristics of protein stabilized emulsions: Emulsifying behavior of proteins in a sonifier. *J. Food Sci.* 45, 1662–1668. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb07585.x>
 - Traka, M.H., **2016**. Chapter 9 – Health benefits of glucosinolates, in: Kopriva, S. (Ed.), Advances in botanical research, glucosinolates. *Academic Press*, pp. 247–279. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.06.004>
 - Tsitouras, P.D., Gucciardo, F., Salbe, A.D., Heward, C., Harman, S.M., **2008**. High omega-3 fat intake improves insulin sensitivity and reduces CRP and IL-6, but does not affect other endocrine axes in healthy older adults. *Horm. Metab. Res.* 40, 199–205. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1046759>
 - Tsubosaka, M., Kihara, S., Hayashi, S., Nagata, J., Kuwahara, T., Fujita, M., Kikuchi, K., Takashima, Y., Kamenaga, T., Kuroda, Y., Takeuchi, K., Fukuda, K., Takayama, K., Hashimoto, S., Matsumoto, T., Niikura, T., Tabata, Y., Kuroda, R., **2020**. Gelatin hydrogels with eicosapentaenoic acid can prevent osteoarthritis progression in vivo in a mouse model. *J. Orthop. Res.* 38, 2157–2169. <https://doi.org/10.1002/jor.24688>
 - Uauy, R., Valenzuela, A., **2000**. Marine oils: The health benefits of n-3 fatty acids. *Nutrition* 16, 680–684. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(00\)00326-9](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(00)00326-9)
 - Ukil, A., Maity, S., Karmakar, S., Datta, N., Vedasiromoni, J.R., Das, P.K., **2003**. Curcumin, the major component of food flavour turmeric, reduces mucosal injury in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *Br. J. Pharmacol.* 139, 209–218. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705241>
 - Uluata, S., McClements, D.J., Decker, E.A., **2015**. Physical stability, autoxidation, and photosensitized oxidation of ω -3 oils in nanoemulsions prepared with natural and synthetic surfactants. *J. Agric. Food Chem.* 63, 9333–9340. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03572>

- Vajragupta, O., Boonchoong, P., Morris, G.M., Olson, A.J., **2005**. Active site binding modes of curcumin in HIV-1 protease and integrase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 3364–3368. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.05.032>
- Vanmierlo, T., Bogie, J.F.J., Mailleux, J., Vanmol, J., Lütjohann, D., Mulder, M., Hendriks, J.J.A., **2015**. Plant sterols: Friend or foe in CNS disorders? *Prog. Lipid Res.* 58, 26–39. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.01.003>
- Viana, V.R., Silva, M.B.F., Azero, E.G., Silva, K.G.H., Andrade, C.T., **2018**. Assessing the stabilizing effect of xanthan gum on vitamin D-enriched pecan oil in oil-in-water emulsions. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 555, 646–652. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.07.052>
- Vigato, A.A., Querobino, S.M., de Faria, N.C., Candido, A.C.B.B., Magalhães, L.G., Cereda, C.M.S., Tófoli, G.R., Campos, E.V.R., Machado, I.P., Fraceto, L.F., de Sairre, M.I., de Araujo, D.R., **2019**. Physico-chemical characterization and biopharmaceutical evaluation of lipid-poloxamer-based organogels for curcumin skin delivery. *Front. Pharmacol.* 10, 1006. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01006>
- Vilar-González, S., Bloomfield, D., Noble, M., **2017**. Could omega-3 supplements play a role in the prevention of neurocognitive impairment in cancer patients? *Clin. Oncol.* 29, e48. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2016.09.013>
- Villiere, A., Viau, M., Bronnec, I., Moreau, N., Genot, C., **2005**. Oxidative stability of bovine serum albumin- and sodium caseinate-stabilized emulsions depends on metal availability. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1514–1520. <https://doi.org/10.1021/jf0486951>
- Vintiloiu, A., Leroux, J.-C., **2008**. Organogels and their use in drug delivery – A review. *J. Controlled Release* 125, 179–192. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.09.014>

- Vogel, H., Pelletier, J., **1815**. Curcumin – Biological and medicinal properties. *J. Pharmacol.* 2, 50.
- Voortman, T., Van Den Hooven, E.H., Braun, K.V.E., Van Den Broek, M., Bramer, W.M., Chowdhury, R., Franco, O.H., **2015**. Effects of polyunsaturated fatty acid intake and status during pregnancy, lactation, and early childhood on cardiometabolic health: A systematic review. *Prog. Lipid Res.* 59, 67–87. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.05.001>
- Wahlström, B., Blennow, G., **1978**. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol. Toxicol.* (Copenh.) 43, 86–92. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1978.tb02240.x>
- Wakil, A., Mir, M., Mellor, D.D., Mellor, S.F., Atkin, S.L., **2010**. The bioavailability of eicosapentaenoic acid from reconstituted triglyceride fish oil is higher than that obtained from the triglyceride and monoglyceride forms. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 19, 499–505.
- Walker, R.M., Gumus, C.E., Decker, E.A., McClements, D.J., **2017**. Improvements in the formation and stability of fish oil-in-water nanoemulsions using carrier oils: MCT, thyme oil, & lemon oil. *J. Food Eng.* 211, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.05.004>
- Walstra, P., **1996**. Disperse systems: Basic considerations, in: Fennema, O.R. (Ed.), Food chemistry: A laboratory manual. *Marcel Dekker*, New York, pp. 783–847.
- Wang, L., Folsom, A.R., Zheng, Z.-J., Pankow, J.S., Eckfeldt, J.H., **2003**. Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 91–98. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.1.91>
- Wang, X., Jiang, Y., Wang, Y.-W., Huang, M.-T., Ho, C.-T., Huang, Q., **2008**. Enhancing anti-inflammation activity of curcumin through O/W nanoemulsions. *Food Chem.* 108, 419–424. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.086>

- Wang, Y., Lu, Z., Lv, F., Bie, X., **2009**. Study on microencapsulation of curcumin pigments by spray drying. *Eur. Food Res. Technol.* 229, 391–396. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1064-6>
- Wang, Y.-J., Pan, M.-H., Cheng, A.-L., Lin, L.-I., Ho, Y.-S., Hsieh, C.-Y., Lin, J.-K., **1997**. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15, 1867–1876. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(96\)02024-9](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(96)02024-9)
- Wang, Y.-J., Thomas, P., Zhong, J.-H., Bi, F.-F., Kosaraju, S., Pollard, A., Fenech, M., Zhou, X.-F., **2009**. Consumption of grape seed extract prevents amyloid- β deposition and attenuates inflammation in brain of an Alzheimer's disease mouse. *Neurotox. Res.* 15, 3–14. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9000-x>
- Waraho, T., McClements, D.J., Decker, E.A., **2011**. Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends Food Sci. Technol.* 22, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.003>
- Weiss, J., Scherze, I., Muschiolik, G., **2005**. Polysaccharide gel with multiple emulsion. *Food Hydrocoll., Food Colloids 2004 (Harrogate)* 19, 605–615. <https://doi.org/10.1016/j.foohyd.2004.10.023>
- Werner, K., Küllenberg de Gaudry, D., Taylor, L.A., Keck, T., Unger, C., Hopt, U.T., Massing, U., **2017**. Dietary supplementation with n-3-fatty acids in patients with pancreatic cancer and cachexia: Marine phospholipids versus fish oil – A randomized controlled double-blind trial. *Lipids Health Dis.* 16, 104. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0495-5>
- Willett, S.A., Akoh, C.C., **2019**. Encapsulation of menhaden oil structured lipid oleogels in alginate microparticles. *LWT* 116, 108566. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108566>
- Witkin, J.M., Li, X., **2013**. Curcumin, an active constituent of the ancient medicinal herb *Curcuma longa* L.: Some uses and the establishment and biological basis of medical efficacy. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 12, 487–497. <https://doi.org/10.2174/1871527311312040007>

- Wolf, F., Hecht, L., Schuchmann, H.P., Hardy, E.H., Guthausen, G., **2009**. Preparation of W1/O/W2 emulsions and droplet size distribution measurements by pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance (PFG-NMR) technique. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111, 730–742. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800272>
- Wolfer, T.L., Acevedo, N.C., Prusa, K.J., Sebranek, J.G., Tarté, R., **2018**. Replacement of pork fat in frankfurter-type sausages by soybean oil oleogels structured with rice bran wax. *Meat Sci.* 145, 352–362. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.07.012>
- Wright, A.J., Marangoni, A.G., **2007**. Time, temperature, and concentration dependence of ricinelaic acid-canola oil organogelation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84, 3–9. <https://doi.org/10.1007/s11746-006-1012-6>
- Wu, A., Noble, E.E., Tyagi, E., Ying, Z., Zhuang, Y., Gomez-Pinilla, F., **2015**. Curcumin boosts DHA in the brain: Implications for the prevention of anxiety disorders. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 951–961. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.12.005>
- Wu, X.-D., Liu, M.-M., Liang, X., Hu, N., Huang, W., **2018**. Effects of perioperative supplementation with pro-/synbiotics on clinical outcomes in surgical patients: A meta-analysis with trial sequential analysis of randomized controlled trials. *Clin. Nutr.* 37, 505–515. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.10.015>
- Wu, Y., Wang, X., **2017**. Binding, stability, and antioxidant activity of curcumin with self-assembled casein-dextran conjugate micelles. *Int. J. Food Prop.* 20, 3295–3307. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1286505>
- Xu, D., Zhang, J., Cao, Y., Wang, J., Xiao, J., **2016**. Influence of microcrystalline cellulose on the microrheological property and freeze-thaw stability of soybean protein hydrolysate stabilized curcumin emulsion. *LWT – Food Sci. Technol.* 66, 590–597. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.002>

- Xu, X., Liu, W., Luo, L., Liu, C., McClements, D.J., **2017**. Influence of anionic polysaccharides on the physical and oxidative stability of hydrolyzed rice glutelin emulsions: Impact of polysaccharide type and pH. *Food Hydrocoll.* 72, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.018>
- Xu, X., Sun, Q., McClements, D.J., **2020**. Effects of anionic polysaccharides on the digestion of fish oil-in-water emulsions stabilized by hydrolyzed rice glutelin. *Food Res. Int.* 127, 108768. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108768>
- Xu, X.-Y., Meng, X., Li, S., Gan, R.-Y., Li, Y., Li, H.-B., **2018**. Bioactivity, health benefits, and related molecular mechanisms of curcumin: Current progress, challenges, and perspectives. *Nutrients* 10, 1553. <https://doi.org/10.3390/nu10101553>
- Yang, F., Lim, G.P., Begum, A.N., Ubeda, O.J., Simmons, M.R., Ambegaokar, S.S., Chen, P., Kaye, R., Glabe, C.G., Frautschi, S.A., Cole, G.M., **2005**. Curcumin inhibits formation of amyloid β oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem.* 280, 5892–5901. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404751200>
- Yang, J., Gu, Z., Cheng, L., Li, Z., Li, C., Hong, Y., **2021**. Effect of temperature, pH, and ionic strength on the structure and physical stability of double emulsions prepared with starch. *LWT* 141, 111086. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111086>
- Yang, J., Zhu, S., Lin, G., Song, C., He, Z., **2017**. Vitamin D enhances omega-3 polyunsaturated fatty acids-induced apoptosis in breast cancer cells. *Cell Biol. Int.* 41, 890–897. <https://doi.org/10.1002/cbin.10806>
- Yao, M., Xiao, H., McClements, D.J., **2014**. Delivery of lipophilic bioactives: Assembly, disassembly, and reassembly of lipid nanoparticles. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 5, 53–81. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-072913-100350>

- Yesiltas, B., García-Moreno, P.J., Sørensen, A.-D.M., Akoh, C.C., Jacobsen, C., **2019**. Physical and oxidative stability of high fat fish oil-in-water emulsions stabilized with sodium caseinate and phosphatidylcholine as emulsifiers. *Food Chem.* 276, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.172>
- Yesiltas, B., García-Moreno, P.J., Sørensen, A.-D.M., Jacobsen, C., **2017**. Physical and oxidative stability of high fat fish oil-in-water emulsions stabilized with combinations of sodium caseinate and sodium alginate. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 119, 1600484. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600484>
- Yesiltas, B., García-Moreno, P.J., Sørensen, A.-D.M., Soria Caindec, A.M., Hyldig, G., Anankanbil, S., Guo, Z., Jacobsen, C., **2021**. Enrichment of mayonnaise with a high fat fish oil-in-water emulsion stabilized with modified DATEM C14 enhances oxidative stability. *Food Chem.* 341, 128141. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128141>
- Yeung, A.W.K., Mocan, A., Atanasov, A.G., **2018**. Let food be thy medicine and medicine be thy food: A bibliometric analysis of the most cited papers focusing on nutraceuticals and functional foods. *Food Chem.* 269, 455–465. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.139>
- Yildirim, M., Sumnu, G., Sahin, S., **2017**. The effects of emulsifier type, phase ratio, and homogenization methods on stability of the double emulsion. *J. Dispers. Sci. Technol.* 38, 807–814. <https://doi.org/10.1080/01932691.2016.1201768>
- Yildirim, M., Sumnu, G., Sahin, S., **2016**. Rheology, particle-size distribution, and stability of low-fat mayonnaise produced via double emulsions. *Food Sci. Biotechnol.* 25, 1613–1618. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0248-7>
- Yılmaz, E., Ögütçü, M., **2015**. Oleogels as spreadable fat and butter alternatives: Sensory description and consumer perception. *RSC Adv.* 5, 50259–50267. <https://doi.org/10.1039/C5RA06689A>

- Yoder, S.C., Lancaster, S.M., Hullar, M.A.J., Lampe, J.W., **2015**. Chapter 7 – Gut microbial metabolism of plant lignans: Influence on human health, in: Tuohy, K., Del Rio, D. (Eds.), Diet-microbe interactions in the gut. *Academic Press*, pp. 103–117. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407825-3.00007-1>
- Yu, H., Huang, Q., **2012**. Improving the oral bioavailability of curcumin using novel organogel-based nanoemulsions. *J. Agric. Food Chem.* 60, 5373–5379. <https://doi.org/10.1021/jf300609p>
- Yu, H., Shi, K., Liu, D., Huang, Q., **2012**. Development of a food-grade organogel with high bioaccessibility and loading of curcuminoids. *Food Chem.* 131, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.027>
- Yu, J., Liu, L., Zhang, Y., Wei, J., Yang, F., **2017**. Effects of omega-3 fatty acids on patients undergoing surgery for gastrointestinal malignancy: A systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 17, 271. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3248-y>
- Yuan, Y., Gao, Y., Zhao, J., Mao, L., **2008**. Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Res. Int.* 41, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.09.006>
- Zaibunnisa, A.H., Norashikin, S., Mamot, S., Osman, H., **2009**. Stability of curcumin in turmeric oleoresin- β -cyclodextrin inclusion complex during storage. *Malays. J. Anal. Sci.* 13, 165–169.
- Zapata, A.M.O., Rodríguez-Barona, S., Gómez, G.I.G., **2015**. Rheological characterization and stability study of an emulsion made with a dairy by-product enriched with omega-3 fatty acids. *Braz. J. Food Technol.* 18, 23–30. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.2014>
- Zhang, R., McClements, D.J., **2016**. Enhancing nutraceutical bioavailability by controlling the composition and structure of gastrointestinal contents: Emulsion-based delivery and excipient systems. *Food Struct.* 10, 21–36. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2016.07.006>

- Zhang, T., Ding, M., Zhang, H., Tao, N., Wang, X., Zhong, J., **2020**. Fish oil-loaded emulsions stabilized by synergetic or competitive adsorption of gelatin and surfactants on oil/water interfaces. *Food Chem.* 308, 125597. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125597>
- Zheng, H.J., Guo, J., Jia, Q., Huang, Y.S., Huang, W.-J., Zhang, W., Zhang, F., Liu, W.J., Wang, Y., **2019**. The effect of probiotic and synbiotic supplementation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in diabetic patients: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol. Res.* 142, 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.02.016>
- Zheng, J.-S., Hu, X.-J., Zhao, Y.-M., Yang, J., Li, D., **2013**. Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: Meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. *BMJ* 347, f3706. <https://doi.org/10.1136/bmj.f3706>
- Zhu, X., Chen, J., Hu, Y., Zhang, N., Fu, Y., Chen, X., **2021**. Tuning complexation of carboxymethyl cellulose/cationic chitosan to stabilize Pickering emulsion for curcumin encapsulation. *Food Hydrocoll.* 110, 106–135. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106135>
- Zou, L., Liu, W., Liu, C., Xiao, H., McClements, D.J., **2015**. Utilizing food matrix effects to enhance nutraceutical bioavailability: Increase of curcumin bioaccessibility using excipient emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 63, 2052–2062. <https://doi.org/10.1021/jf506149f>
- Zou, L., Zheng, B., Zhang, R., Zhang, Z., Liu, W., Liu, C., Zhang, G., Xiao, H., McClements, D.J., **2016**. Influence of lipid phase composition of excipient emulsions on curcumin solubility, stability, and bioaccessibility. *Food Biophys.* 11, 213–225. <https://doi.org/10.1007/s11483-016-9432-9>