



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y PROPIEDADES
EMULSIFICANTES DE PECTINA DE CÁSCARA DE CACAO
(*Theobroma cacao* L.) Y SU COMPLEJACIÓN CON
HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE LACTOSUERO EN LA
ESTABILIZACIÓN DE EMULSIONES ACEITE-EN-AGUA**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA
DANIEL TRUJILLO RAMÍREZ**

CoDirección

Dr. E. Jaime Vernon Carter
Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros

Asesor

Dr. Jose de Jesus Alvarez Ramirez

Ciudad de México. Noviembre, 2018



El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, con referencia 001466.

Ciudad de México, México a 30 de noviembre de 2018

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la unidad Iztapalapa
aprobó la tesis

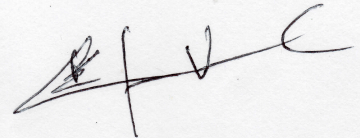
**CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS Y PROPIEDADES EMULSIFICANTES
DE PECTINA DE CÁSCARA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) Y SU
COMPLEJACIÓN CON HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE LACTOSUERO EN
LA ESTABILIZACIÓN DE EMULSIONES ACEITE-EN-AGUA**

Que presentó

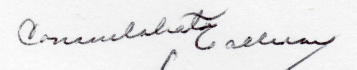
Daniel Trujillo Ramírez

Comité tutorial

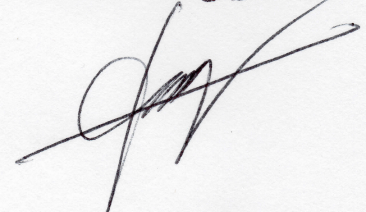
Codirector: Dr. E. Jaime Vernon Carter
Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa



Codirectora: Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros
Universidad Autónoma Chapingo

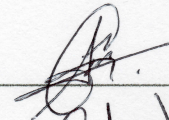


Asesor: Dr. Jose de Jesus Alvarez Ramirez
Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa

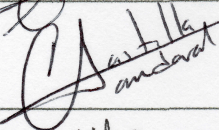


Jurado

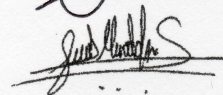
Presidente: Dra. Angélica Román Guerrero
Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa



Secretario: Dra. Ofelia Sandoval Castilla
Universidad Autónoma Chapingo



Vocal: Dra. Ana Guadalupe Estrada Fernández
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo



Vocal: Dr. Juan Carlos Cuevas Bernardino
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y
Diseño del Estado de Jalisco- Sureste



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada de doctorado y por el financiamiento parcial a través del proyecto de Ciencia Básica No. 236500 y 410175.

A la Universidad Autónoma Metropolitana–Unidad Iztapalapa, institución que me brindó la oportunidad de culminar mis estudios de doctorado. Así como a la Universidad Autónoma Chapingo por las facilidades otorgadas durante la fase experimental.

Al Dr. E. Jaime Vernon Carter mis más sinceros agradecimientos y admiración por su dirección, e instructor del conocimiento aquí plasmado, así como su paciencia y valiosos consejos que me permitieron alcanzar los objetivos de esta tesis y poder culminar con mis estudios de doctorado.

A la Dra. Consuelo Lobato Calleros, por sus aportaciones académicas y personales durante mi formación profesional, le estaré siempre agradecido por haber permitido formar parte de su equipo de investigación, así como la confianza y amistad brindada durante mi paso durante la maestría y el doctorado.

A la Dra. Angélica Román Guerrero por sus acertadas observaciones y aportaciones en este trabajo de investigación, también le agradezco su confianza, paciencia y amistad durante esta etapa de mi formación.

Al Dr. Jose de Jesus Alvarez Ramirez por las facilidades otorgadas en la realización de esta investigación.

A los miembros del jurado, Dra. Ofelia Sandoval Castilla, Dr. Juan Carlos Cuevas Bernardino y Dra. Ana Guadalupe Estrada Fernández por su valiosa colaboración en la revisión de la tesis.

A mis compañeros del Laboratorio de Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Chapingo, por hacer más amena mi estancia durante mis estudios de posgrado. Así como también a mis compañeros, Isabel y Daniel del W-107 de la UAM-I por su amistad y facilidades otorgadas en algunas técnicas y en la utilización de los equipos de laboratorio.

Gracias

Con toda mi dedicación, esfuerzo y amor a mis padres:

Gregorio Trujillo García y Reyna Ramírez Martínez.

Sé que no existen las palabras para agradecer una vida de lucha, sacrificio y esfuerzo constante que han hecho por nosotros, deseo que sepan que este logro, es logro suyo, que mi esfuerzo y dedicación está inspirado en ustedes.

A mis hermanos Luis Ángel, Dulce del Carmen y Marisol por alentarme a continuar adelante y nunca claudicar. Ustedes me han enseñado que con el trabajo y la perseverancia se encuentra el éxito. Su ejemplo es mi motivación para ser una mejor persona.

Por los momentos felices que hemos pasado con Vannia y los que faltan...

A mi querida abuelita Micaela, siempre te recordaré, estas en mi mente y mi corazón.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
Introducción	1
1. Marco teórico	3
1.1. Emulsiones.....	4
1.1.1. Clasificación de las emulsiones de acuerdo a la fase dispersa.....	4
1.1.2. Clasificación de las emulsiones de acuerdo al tamaño de gota.....	4
1.1.3. Nanoemulsiones.....	4
1.1.4. Procesos que influyen en la formación de nanoemulsiones.....	5
1.1.4.1. Mecanismo de emulsificación.....	5
1.1.4.2. Composición de la gota.....	6
1.1.4.3. Distribución del tamaño de gota.....	6
1.1.4.4. Carga de las gotas.....	7
1.1.4.5. Interacciones coloidales.....	7
1.1.5. Mecanismos de desestabilización en emulsiones.....	8
1.1.5.1. Separación gravitacional.....	8
1.1.5.2. Flocculación.....	9
1.1.5.3. Coalescencia.....	9
1.1.5.4. Maduración de Ostwald.....	9
1.1.6. Propiedades interfaciales de los agentes emulsificantes.....	9
1.2. Pectinas.....	11
1.2.1. Características estructurales.....	11
1.2.2. Fuentes de pectina.....	12
1.2.3. Métodos de extracción de pectina.....	13
1.2.3.1. Métodos convencionales.....	13
1.2.3.2. Métodos no convencionales.....	13
1.2.4. Clasificación de las pectinas.....	14

1.2.5.	Factores que influyen en las propiedades emulsificantes/estabilizantes.....	15
1.2.5.1.	Proteína y ácido ferúlico.....	15
1.2.5.2.	Los grupos acetilo y metilo.....	17
1.2.5.3.	El peso molecular, las cadenas laterales y las interacciones electrostáticas.....	18
1.2.5.4.	Los procedimientos de extracción.....	19
1.2.6.	Pectina de cáscara de cacao.....	20
1.2.7.	Emulsiones estabilizadas con pectinas.....	21
1.3.	Proteínas.....	22
1.3.1.	Proteínas del lactosuero.....	22
1.3.2.	Hidrolizados de proteína de lactosuero.....	23
1.4.	Sistemas emulsionantes mixtos de proteína-polisacárido.....	25
1.4.1.	Factores que influyen en la formación de complejos proteínas/polisacáridos.....	26
1.4.1.1.	Influencia del pH y la fuerza iónica sobre la formación de complejos solubles.....	27
1.4.1.2.	Influencia de la relación proteína-polisacárido.....	28
1.4.1.3.	Comportamiento interfacial de proteína-polisacárido.....	28
1.4.2.	Emulsiones hechas con sistemas mixtos de proteína-polisacárido.....	29
2.	Justificación.....	31
3.	Hipótesis.....	33
4.	Objetivos.....	35
4.1.	General.....	36
4.2.	Específicos.....	36
5.	Materiales y métodos.....	37
5.1.	Materiales y reactivos químicos.....	38
5.2.	Extracción y purificación de la pectina de cáscara de cacao.....	38
5.3.	Caracterización fisicoquímica de la pectina de cáscara de cacao.....	39
5.3.1.	Determinación del grado de esterificación (GE), amidación (GAmd) y acetilación (GAc).....	39
5.3.2.	Porcentaje grupos metoxilo.....	41
5.3.3.	Determinación de ácido galacturónico.....	41
5.3.4.	Determinación del contenido de proteína.....	41
5.3.5.	Viscosidad intrínseca $[\eta]$ y estimación del peso molecular viscosimétrico medio...	42

5.4.	Preparación de complejos solubles.....	43
5.5.	Viscosidad aparente.....	44
5.6.	Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier.....	44
5.7.	Tensión interfacial dinámica.....	44
5.8.	Preparación y caracterización de emulsiones.....	45
5.8.1.	Preparación.....	45
5.8.2.	Caracterización de las emulsiones.....	45
5.8.2.1.	Diámetro superficial medio.....	45
5.8.2.2.	Índice de cremado.....	45
5.8.2.3.	Potencial zeta.....	46
5.8.2.4.	Viscosidad aparente.....	46
5.9.	Análisis estadístico.....	46
6.	Resultados y discusión.....	47
6.1.	Características fisicoquímicas de la pectina de cáscara de cacao.....	48
6.2.	Viscosidad intrínseca y estimación del peso molecular viscosimétrico.....	51
6.3.	Potencial zeta de dispersiones stock y formación de complejos solubles.....	52
6.4.	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier.....	55
6.5.	Tensión interfacial dinámica.....	57
6.6.	Formación y estabilización de emulsiones aceite-en-agua.....	62
7.	Conclusiones.....	66
8.	Referencias bibliográficas.....	68
9.	Anexos.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Esquema representativo de los dispositivos de emulsificación de alta energía. A) Homogeneizadores de válvulas de alta presión; B) Microfluidizadores y C) Ultrasonidos.....	6
Figura 2.- Representación esquemática de los mecanismos de inestabilidad de emulsiones.....	8
Figura 3.- Diagrama esquemático de la estructura de la pectina. Homogalacturonano (HG); Ramnogalacturonano-I (RG-I); Ramnogalacturonano-II (RG-II); Xilogalacturonano (XG) y Apiogalacturonano (APG).....	12
Figura 4.- Esquema representativo del comportamiento de la mezcla proteína–polisacárido...	25
Figura 5.- Representación esquemática hipotética de la estructura química de la pectina de cáscara de cacao.....	50
Figura 6.- Viscosidad reducida <i>versus</i> concentración de PCC, dispersadas en soluciones acuosas de 100 mM de NaCl. La línea continua muestra una relación lineal entre la viscosidad reducida y la concentración de PCC.....	51
Figura 7.- Variación del potencial- ζ como función del pH de dispersiones de HPS (\blacktriangle) y PCC (\blacksquare).....	52
Figura 8.- Evolución del potencial- ζ y diámetro hidrodinámico como función de la relación en peso entre HPS y PCC ($R_{\text{HPS-PCC}}$) a pH 3.25 y temperatura de 25 °C.....	54
Figura 9.- Espectro FT-IR de PCC (—), HPS (—) y $\text{CS}_{\text{HPS-PCC}}$ (—).....	55
Figura 10.- Representación esquemática de un modelo hipotético de la estructura del $\text{CS}_{\text{HPS-PC}}$.	57
Figura 11.- Dinámica adsorción de la tensión interfacial en la interfaz aceite de canola/agua de PCC (\blacksquare) y $\text{CS}_{\text{HPS-PCC}}$ (\bullet) al 1.0 % p/p.	58
Figura 12.- A) Dependencia de la presión superficial (π) en función de la raíz cuadrada del tiempo ($\theta^{1/2}$). La línea sólida continua representa la pendiente lineal de las curvas donde la adsorción está controlada por k_{diff} . B) gráfica de $\ln(\pi_{10800} - \pi_{\theta}) / (\pi_{10800} - \pi_0)$ <i>versus</i> θ . Las líneas sólidas continuas describen la primera pendiente que corresponde con la constante cinética de primer orden de adsorción/penetración (k_{pen}), mientras que la segunda pendiente corresponde con la constante cinética de primer orden de reordenamiento estructural (k_{rea}). Para PCC (\square) y $\text{CS}_{\text{HPS-PCC}}$ (\circ) en la interfaz aceite/agua a concentración del 1.0 % p/p...	60

Figura 13. -Variación del diámetro superficial medio ($d_{3,2}$) de las gotas de aceite durante 28 días de almacenamiento a 4 ± 1 °C. E _{PCC} (■) y E _{HPS-PCC} (■) al 1.0 % p / p.....	63
Figura 14. -Representación esquemática de un modelo hipotético del mecanismo de estabilización de la PCC (A) y el CS _{HPS-PCC} (B) en emulsiones aceite-en-agua.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Características fisicoquímicas de la pectina extraída de la cáscara del cacao (PCC)...	48
Tabla 2.- Parámetros de las dinámicas de adsorción de los biopolímeros bajo estudio en la interfaz aceite/agua.....	62

RESUMEN

Se extrajo pectina de los desechos de la cáscara de cacao (PCC) utilizando ácido cítrico (1:25 g/mL), teniendo un grado de metilesterificación de 83.22 %, grado de acetilación de 10.20 % y contenido de proteína de 3.68 %. Se formaron y estabilizaron emulsiones de aceite de canola-en-agua (O/W) utilizando PCC (E_{PCC}) y exhibieron un diámetro superficial medio inicial ($d_{3,2}$) de 113.60 nm, que aumentó a 162.0 nm durante 28 días de almacenamiento. Con la finalidad de mejorar las actividades superficiales y emulsificantes se decidió obtener complejos solubles mediante complejación electrostática de PCC con hidrolizado de proteína de lactosuero (HPS), en una relación en peso de 5:1 y pH de 3.25 ($CS_{HPS-PCC}$). Se estudiaron las dinámicas de adsorción en la interfaz aceite de canola/agua de PCC y $CS_{HPS-PCC}$ y a partir de estos datos se determinaron las constantes de velocidad de difusión (k_{diff}), penetración (k_{pen}) y reordenamiento (k_{rea}). $CS_{HPS-PCC}$ a diferencia de PCC disminuyó la tensión interfacial más rápido y exhibió valores mayores de k_{diff} y k_{pen} , como consecuencia $CS_{HPS-PCC}$ produjo emulsiones O/W con $d_{3,2} < 90$ nm, que no sufrieron cambios significativos en el tamaño de gota de aceite durante el almacenamiento, finalmente la viscosidad aparente de la dispersión acuosa de $CS_{HPS-PCC}$ fue mucho menor que la dispersión de PCC y el potencial- ζ de $E_{HPS-PCC}$ fue menos negativo que E_{PCC} . Por lo tanto, se concluyó que la mayor estabilidad de $E_{HPS-PCC}$ se debe principalmente a la repulsión estérica originada por la adsorción de las capas del complejo soluble alrededor de las gotas de aceite.

ABSTRACT

Pectin was extracted from cacao pod husks (PCC) waste using citric acid (1:25 g/mL), having a methylesterification degree of 83.22 %, acetylation degree of 10.20 % and protein content of 3.68 %. Canola oil-in-water (O/W) emulsions were formed and stabilized using PCC (E_{PCC}), and exhibited an initial area-volume mean diameter ($d_{3,2}$) of 113.60 nm, which increased until 162.0 nm after during 28 days of storage. In order to improve the superficial and emulsifying activities, it was decided to obtain soluble complexes by electrostatic complexation of PCC with whey protein hydrolyzate (HPS) in a weight relationship of 5: 1 and pH 3.25 (CS_{HPS-PCC}). The adsorption dynamics at the canola oil/water interface of PCC and CS_{HPS-PCC}, from these data, diffusion (k_{diff}), penetration (k_{pen}) and rearrangement (k_{rea}) rate constants were determined. CS_{HPS-PCC}, unlike PCC, decreased the interfacial tension faster and showed greater values of k_{diff} and k_{pen} , consequently CS_{HPS-PCC} yielded O/W emulsions with $d_{3,2} < 90$ nm, which did not suffer significant changes in oil droplet size during storage, finally the apparent viscosity of CS_{HPS-PCC} aqueous dispersion was much lower than that in PCC dispersion and the zeta potential of E_{HPS-PCC} was lower than that in E_{PCC}. Therefore, it was concluded that the greater stability of E_{HPS-PCC} was mainly due to steric repulsion originated by the soluble complex adsorption of layers around the oil droplets.

INTRODUCCIÓN

La pectina es un heteropolisacárido compuesta de tres formas poliméricas: homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano I (RG-I) y galacturonano sustituidos (GS). El HG, está constituida principalmente de ácido D-galacturónico y puede estar metilesterificado en la posición C-6 y/o acetyl-esterificado en las posiciones O-2 y/o O-3, dependiendo de las especies vegetales (Hua *et al.*, 2015; Alba *et al.*, 2015; Karnik *et al.*, 2016). La pectina es un ingrediente multifuncional, utilizado como agente espesante, gelificante y estabilizante con aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Burapapdh *et al.*, 2010; Munarin *et al.*, 2012; Guerra-Rosas *et al.*, 2017). Sin embargo, hoy en día, la producción de pectinas comerciales, se limita a aquellas obtenidas a partir de cáscaras de limón y pulpa de manzana (Putnik *et al.*, 2017), por lo tanto, se deben explorar nuevas fuentes de obtención de pectinas a partir de frutos nacionales o bien de desechos agroindustriales, los cuales se encuentran disponibles en grandes cantidades y deben de ser examinados para detectar la producción y aprovechamiento potencial de pectinas para su uso en la industria alimentaria.

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo importante en varios países tropicales y subtropicales, los granos de este fruto son el ingrediente principal de la industria chocolatera. Sin embargo, después de la extracción del grano, las cáscaras (que representan aproximadamente el 52–76 % del peso del fruto) son desechadas (Vriesmann *et al.*, 2012). De acuerdo a Barazarte *et al.* (2008), por cada tonelada de grano seco de cacao producido, 10 toneladas de cáscaras en base húmeda son generadas. Considerando que la Organización Internacional del Cacao (ICCO, por sus siglas en inglés) estimó una producción de 4,031 millones de toneladas de grano seco de cacao para el periodo 2015/2016 (ICCO, 2017), para dicho periodo se habrán generado 40,310 millones de toneladas de cáscaras de cacao, representando un serio problema ambiental e inóculo de enfermedades para el cultivo. Por esta razón en los últimos años la cáscara de cacao ha sido utilizada como materia prima para la obtención de pectinas y su extracción utilizando ácido cítrico, rinde en mayores rendimientos y mejores propiedades fisicoquímicas en comparación de aquellas en las que se utiliza ácido nítrico y ácido clorhídrico (Vriesmann *et al.*, 2012; Chan y Choo, 2013), sin embargo, hasta el momento sólo se han evaluado sus propiedades gelificantes y existe poca evidencia de sus propiedades emulsificantes (Vriesmann y Petkowicz, 2013; Yapó y Koffi, 2013).

Recientemente, se ha informado que las pectinas cítricas (Schmidt *et al.*, 2015), de remolacha azucarera (Chen *et al.*, 2016b) y de tejocote (Cuevas-Bernardino *et al.*, 2016), han

mostrado capacidad de formar y estabilizar gotas de aceite. Esta funcionalidad se debe a sus grupos funcionales *in situ*, tales como: el peso molecular (PM), la viscosidad, el contenido de proteína, el ácido ferúlico, el grado de acetilación (GAc) y de metilesterificación (GE) (Funami *et al.*, 2007; Kyomugasho *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016a; Chen *et al.*, 2016b). No obstante, esta funcionalidad de las pectinas se puede potencializar, introduciendo nuevos grupos funcionales, a través de métodos físicos, químicos o enzimáticos, alterando su estructura molecular (Liang *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018).

Por otra parte, Adjonu *et al.* (2014a) han informado que los hidrolizados de proteína de lactosuero (HPS) forman nanoemulsiones con diámetro medio de gota de 287.9–192.5 nm, debido a que poseen buena difusividad interfacial y capacidad emulsificante, atribuido probablemente a su bajo peso molecular (≤ 10 kDa) (Korhonen y Pihlanto, 2006), pero numerosas evidencias muestran que HPS no puede proporcionar la rigidez interfacial requerida para estabilizar emulsiones en almacenamiento a largo plazo (Agboola *et al.*, 1998; Piorkowski y McClements, 2013).

Hoy en día, el sistema proteína y polisacárido es ampliamente usado en la industria alimentaria y dependiendo de las propiedades coloidales del sistema, la mezcla de estas moléculas puede conducir a la formación de complejos solubles (CS) e insolubles (CI) (Turgeon *et al.*, 2007; Dickinson, 2011). Los CS, se pueden formar en condiciones especiales de pH, fuerza iónica, densidad de carga y relación en peso entre ambos biopolímeros (Ye, 2008; Dickinson, 2011; Schmitt y Turgeon, 2011) y estos se han utilizado como fase dispersa para la formación y estabilización de emulsiones alimentarias, debido a que exhiben alta actividad superficial, aumentan la viscosidad del medio de dispersión y forman capas interfaciales gruesas en la interfaz (Jones y McClements, 2010; Rodríguez-Patino y Pilosof, 2011; Hernández-Marín *et al.*, 2013; Salminen y Weiss, 2014).

En consecuencia, surge un enfoque en la identificación y caracterización de emulsificantes naturales que tengan el potencial para reducir la tensión superficial e interfacial, facilitar la ruptura de las gotas en la homogeneización y la capacidad de estabilizar gotas pequeñas durante y después del proceso de homogeneización (McClements y Rao, 2011; Adjonu *et al.*, 2014a; Ozturk *et al.*, 2014; Komaiko *et al.*, 2016) y que además, puedan utilizarse con éxito en matrices alimentarias (Dickinson, 2009; Turgeon y Laneville, 2009; Schmitt y Turgeon, 2011). Por ello, el objetivo principal de esta investigación fue caracterizar la pectina extraídas de la cáscara de cacao (PCC) y evaluar sus propiedades emulsificantes/estabilizantes en emulsiones grado alimenticio y determinar si se mejoran estas propiedades mediante la complejación electrostática con HPS.



Capítulo 1

MARCO TEÓRICO

1.1.- Emulsiones

Las emulsiones, son dispersiones termodinámicamente inestables de dos líquidos inmiscibles, generalmente de agua y aceite, típicamente formados en presencia de moléculas tensoactivas o polímeros anfifílicos, los cuales presentan la capacidad de reducir la tensión interfacial, adsorbiéndose en la interfaz y orientando su estructura para minimizar la energía libre de Gibbs, y alcanzar una disposición termodinámicamente favorable después de la adsorción y/o formando una película interfacial viscoelástica, que prolonga el tiempo de vida media respecto a la separación de fases (Walstra, 1993; McClements, 2005; Aranberri *et al.*, 2006; Piorkowski y McClements, 2013; Schröder *et al.*, 2017).

1.1.1.- Clasificación de las emulsiones de acuerdo a la fase dispersa

En general, las emulsiones se clasifican de acuerdo a la organización espacial relativa de su fase continua o dispersante: agua-en-aceite (W/O) y aceite-en-agua (O/W); en esta última se dispersan gotas de aceite en una fase continua acuosa y permiten la incorporación de agentes funcionales liposolubles a sistemas alimenticios. También existen emulsiones dobles y/o múltiples de agua-en-aceite-en-agua (W/O/W), y aceite-en-agua-en-aceite (O/W/O) (McClements, 2005).

1.1.2.- Clasificación de las emulsiones de acuerdo al tamaño de gota

Las emulsiones también se pueden clasificar de acuerdo con el tamaño de su gota en tres categorías: McClements y Rao (2011) proponen la siguiente clasificación:

- Emulsiones (radio de gota 100 nm – 100µm)
- Nanoemulsiones (radio de gota 10 – 100 nm)
- Microemulsiones (radio de gota 2 – 100 nm)

Las microemulsiones, nanoemulsiones y emulsiones son de particular interés como sistemas de suministro coloidal porque pueden fabricarse a partir de ingredientes grado alimentario usando operaciones de procesamiento relativamente simples, tales como mezclado y homogeneización (Dickinson, 2009; Qian y McClements, 2011; McClements y Rao, 2011; Donsì *et al.*, 2012).

1.1.3.- Nanoemulsiones

En los últimos años ha despertado el interés por el uso de nanoemulsiones debido a sus propiedades funcionales tales como apariencia, estabilidad física, química y a la mayor

biodisponibilidad de ingredientes activos cuando son encapsulados (Weiss *et al.*, 2009; Burapapadh *et al.*, 2010; McClements, 2011; Salvia-Trujillo *et al.*, 2013; Saberi *et al.*, 2013; Adjonu *et al.*, 2014b; Guerra-Rosas *et al.*, 2017). No obstante, existe un número limitado de tensoactivos de calidad alimentaria, disponibles para preparar y estabilizar nanoemulsiones (Burapapadh *et al.*, 2010; Adjonu *et al.*, 2014b; Ozturk *et al.*, 2014; Komaiko *et al.*, 2016; Yerramilli *et al.*, 2017), y la mayoría de los que se utilizan son de origen sintético y no están permitidos para su aplicación en todos los países, o sólo pueden usarse en niveles bajos debido a problemas regulatorios, económicos o sensoriales (Kralova y Sjoblom, 2009; McClements y Rao, 2011).

1.1.4.- Procesos que influyen en la formación de nanoemulsiones

De acuerdo a Jafari *et al.* (2006); Qian y McClements (2011); Donsì *et al.* (2012) y Adjonu *et al.*, (2014b) los procesos que influyen en la formación de nanoemulsiones son:

- Mecanismo de homogeneización.
- Tipo, concentración y propiedades interfaciales del agente tensoactivo/emulsificante.
- Volumen de fase dispersa/fracción masica y viscosidad.
- Tiempo de adsorción del tensoactivo sobre las superficies de gotas recientemente creadas.
- Frecuencia y escala de tiempo de la colisión entre gotas.

1.1.4.1.- Mecanismo de emulsificación

Existen dos formas de emulsificación para obtener nanoemulsiones: alta energía y baja energía. En la actualidad los métodos de alta energía son comúnmente los más utilizados para la preparación de nanoemulsiones, debido a que se pueden producir a gran escala y se pueden usar una gran variedad de materiales (Donsì *et al.*, 2012; Piorkowski y McClements, 2013; Guerra-Rosas *et al.*, 2017). No obstante, el alto cizallamiento puede causar efectos adversos en la calidad y funcionalidad de algunos emulsificantes/estabilizantes, los cuales pueden influir en la estabilidad de las emulsiones (Costa *et al.*, 2017). Los métodos de emulsificación de alta energía requieren intensas entradas de energía mecánica y los tres tipos principales de dispositivos que se utilizan generalmente son: agitadores de alta cizalladura, homogeneizadores de alta presión y generadores de ultrasonidos (Figura 1) (Lee y McClements, 2010; McClements, 2011; Burapapadh *et al.*, 2012; Piorkowski y McClements, 2013; Salvia-Trujillo *et al.*, 2013; Ozturk *et al.*, 2014; Yerramilli *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2017).

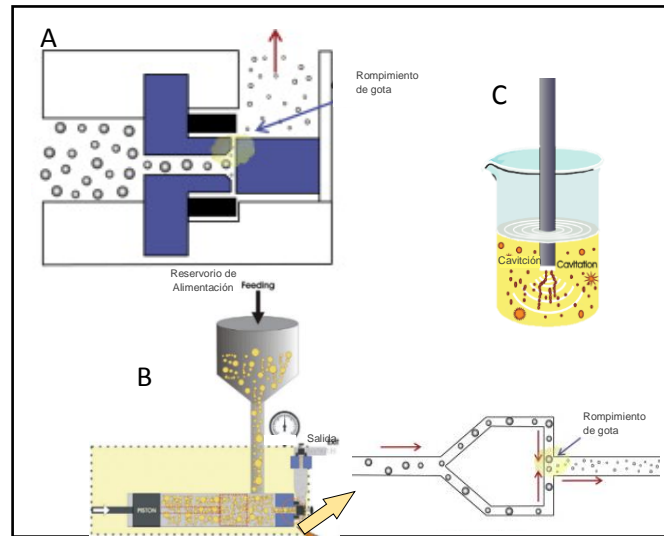


Figura 1.- Esquema representativo de los dispositivos de emulsificación de alta energía. A) Homogeneizadores de válvulas de alta presión; B) Microfluidizadores y C) Ultrasonidos. (Fuentes: Piorkowski y McClements, 2013; Costa *et al.*, 2017).

Por el contrario, los métodos de emulsificación de baja energía, son aquellos que hacen uso de la energía química interna almacenada en los componentes al cambiar la curvatura espontánea de los tensoactivos y se necesita una baja cantidad de energía para producir nanoemulsiones. Los métodos incluyen: emulsificación espontánea y métodos de inversión de fases (Ostertag *et al.*, 2012; Saberi *et al.*, 2013).

1.1.4.2.- Composición de la gota

Las nanoemulsiones pueden contener una gran variedad de diferentes compuestos; tales como aceites esenciales, de sabor, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas, nutraceuticos, agentes antimicrobianos, etc. Estos compuestos presentan diferentes propiedades fisicoquímicas y moleculares, lo cual, en turno influyen en la formación, estabilidad y funcionalidad de estos sistemas (Walstra, 1993; Rao y McClements, 2012).

1.1.4.3.- Distribución del tamaño de gota

La distribución del tamaño de gota en una emulsión tiene un fuerte impacto sobre su estabilidad física y sus propiedades ópticas (McClements, 2005). Típicamente, producir una emulsión que tenga una distribución monomodal estrecha, proporciona estabilidad a largo plazo.

La distribución del tamaño de las gotas y la polidispersidad se pueden medir mediante diversas técnicas experimentales, tales como: difracción láser, dispersión dinámica de luz y microscopía óptica (Guzey y McClements, 2006; Li *et al.*, 2010; Burapapadh *et al.*, 2012; Benjasirimongkol y Sriamornsak, 2016; Guerra-Rosas *et al.*, 2017). De acuerdo a Brittain, (2001), las definiciones comúnmente utilizadas son:

- Diámetro medio ponderado en números (d_N o $d_{1,0}$),
- Diámetro medio ponderado en superficie (o Sauter) (d_S o $d_{3,2}$) y
- Diámetro medio ponderado en volumen (d_V o $d_{4,3}$).

1.1.4.4.- Carga de las gotas

Las gotas en la mayoría de las emulsiones tienen una carga eléctrica debido a la adsorción de especies iónicas a sus superficies (proteínas, polisacáridos iónicos, tensoactivos iónicos, fosfolípidos, ácidos grasos, y algunos iones) (McClements, 2005). Las características eléctricas de una superficie de gota dependen del tipo, concentración y organización de las especies ionizadas presentes, así como la composición iónica y las propiedades físicas de la fase acuosa circundante. Las características eléctricas de una gota en una emulsión se caracterizan usualmente en términos de su densidad de carga superficial, potencial eléctrico, y/o potencial zeta (potencial- ζ) (Hunter, 1986).

El potencial- ζ es una representación de las características eléctricas de una gota de aceite, ya que representa la adsorción de contraiones o especies iónicas a la superficie de la gota y su determinación puede ayudar a predecir la floculación y coalescencia, ya que la estabilidad de la emulsión puede verse influenciada por las cargas eléctricas interfaciales (Guzey y McClements, 2006, Li *et al.*, 2010). El potencial- ζ se calcula a partir de las medidas de la movilidad electroforética, usando la teoría de von Smoluchowski modificada por Henry (Hunter, 1986). Cuanto mayor es la magnitud absoluta de potencial- ζ , mayor es la repulsión electrostática entre las gotas y, por lo tanto, mejor es la estabilidad (Dickinson, 2009).

1.1.4.5.- Interacciones coloidales

Las interacciones coloidales entre dos gotas de aceite pueden ser descritos en términos de un potencial de interacción, que es la energía necesaria para conseguir que dos gotas a una distancia aparten una separación de superficie a superficie. Generalmente el potencial de la interacción se

compone de las contribuciones de los distintos tipos de interacciones, siendo las más importante las de van der Waals, estérica, electrostática, agotamiento e interacciones hidrofóbicas (McClements, 2005; Israelachvili, 2011). Estas interacciones individuales varían en su signo (atracción o de repulsión), magnitud (débil a fuerte) y rango (corto a largo). Las interacciones coloidales atractivas y repulsivas, que se dan entre las gotas de aceite de las emulsiones determinan su estabilidad a la floculación y coalescencia (McClements, 2005).

1.1.5. Mecanismos de desestabilización en emulsiones

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables. Esta inestabilidad conduce a un cambio en la organización estructural de los componentes del sistema, ocurriendo los siguientes fenómenos: floculación, coalescencia, separación gravitatoria (cremado o sedimentación) y maduración de Ostwald (Figura 2) (McClements y Rao, 2011).

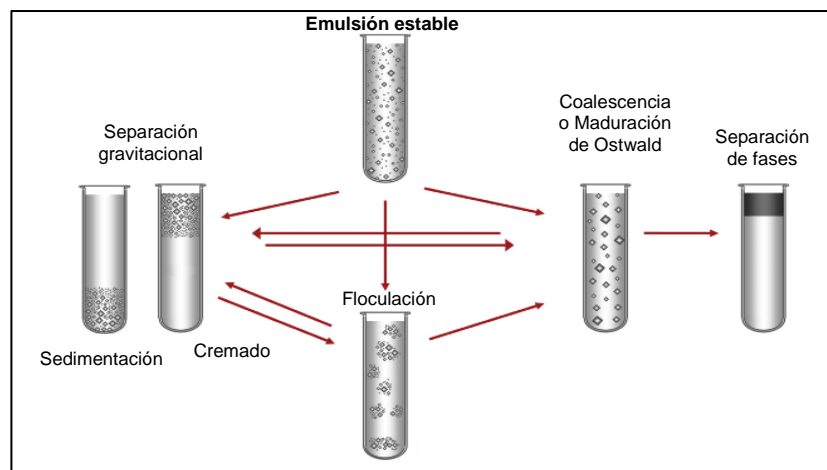


Figura 2.- Representación esquemática de los mecanismos de inestabilidad de emulsiones (**Fuente:** McClements y Rao, 2011).

1.1.5.1.- Separación gravitacional

Es una de las formas más comunes de la inestabilidad física en emulsiones y puede llevarse a cabo por medio de la formación de crema (cremado) o sedimentación dependiendo de las densidades relativas de las gotas de aceite y la fase dispersante. Se puede inhibir o prevenir la separación gravitacional por medio de tres enfoques: la primera es haciendo coincidir la densidad de las fases dispersas y continuas; en segundo lugar, por la reducción del tamaño de las gotas en la emulsión y, en tercer lugar, por el aumento de la viscosidad de la fase acuosa (mediante la adición

de agentes espesantes ogelificantes). Este enfoque influirá en la textura y sensación en la boca del producto final (Piorkowski y McClements, 2013).

1.1.5.2.- Floculación

Es el proceso mediante el cual dos o más gotas se unen para formar un agregado en el que las gotas conservan su integridad individual (McClements, 2005). La tendencia para que ocurra agregación de gotas en una emulsión depende del equilibrio de fuerzas atractivas y repulsivas que operan entre las gotas y de las propiedades fisicoquímicas de las fases dispersa, continua e interfacial (Piorkowski y McClements, 2013). Los flóculos formados son el primer paso para la sedimentación de gotas (en emulsiones W/O) o la formación de crema (en emulsiones O/W). En algunos casos, el mecanismo de floclación es reversible y la simple agitación magnética o manual puede romper los flóculos (Walstra, 1993).

1.1.5.3.- Coalescencia

Es el proceso mediante el cual dos o más gotas se fusionan entre sí para formar una gota mayor. La coalescencia provoca en las gotas de emulsión, cremado o sedimentación aumentando más rápido su tamaño (Lobo y Svereika, 2003; Nazarzadeh *et al.*, 2013).

1.1.5.4.- Maduración de Ostwald

La maduración de Ostwald se debe a la difusión de moléculas de aceite, de pequeñas a grandes a través de la fase continua en aceites relativamente hidrosolubles, lo que lleva a un aumento en el tamaño de las gotas de aceite (Kabalnov, 2001; Rao y McClements, 2012; Nazarzadeh *et al.*, 2013). Esta susceptibilidad está determinada principalmente por la solubilidad de la fase oleosa en la fase acuosa: cuanto mayor es la solubilidad, más inestable la emulsión.

1.1.6. Propiedades interfaciales de los agentes emulsificantes

Las emulsiones están constituidas por tres regiones, las cuales presentan propiedades fisicoquímicas diferentes: la fase dispersa, la fase continua y la interfaz. Todas las moléculas o ingredientes de la emulsión se distribuyen según su concentración y polaridad a lo largo de las regiones antes mencionadas (Aranberri *et al.*, 2006). En la mayoría de los casos, la estabilidad de la interfaz está controlada por emulsificantes, ya sean naturales o sintéticos, los cuales facilitan la

ruptura de las gotas dentro del homogeneizador (formando de este modo gotas más pequeñas) y previniendo el crecimiento de las gotas después de su formación (aumentando con ello la estabilidad a largo plazo) (McClements, 2005; Mendoza *et al.*, 2014). El uso óptimo de emulsificantes en aplicaciones tecnológicas alimentarias depende del conocimiento sobre sus características fisicoquímicas interfaciales, tales como actividad superficial, cantidad adsorbida, cinética de formación de película, estructura, grosor, interacciones entre moléculas adsorbidas, propiedades reológicas interfaciales, etc (Maldonado-Valderrama y Rodríguez-Patino, 2010).

La capacidad de disminuir la tensión interfacial en la interfaz aceite/agua, debe ocurrir en una escala de tiempo que sea relevante para el proceso de preparación de la emulsión, es decir, la tasa de adsorción del emulsificante en la interfaz aceite/agua recién formada y la tasa asociada al desarrollo de la capa adsorbida durante la emulsificación, deberá exceder la tasa de colisiones entre gotas (Walstra, 1993). En términos moleculares, la capacidad de los emulsificantes para estabilizar la interfaz se debe a la naturaleza anfifílica de sus estructuras, los grupos hidrofílicos son atraídos a la fase acuosa, mientras que los grupos lipofílicos interactúan con la fase oleosa (Gülseren y Corredig, 2012). El grupo hidrofílico puede ser no iónico, aniónico o catiónico, mientras que el grupo lipofílico puede variar en el número, la longitud y grado de insaturación de las cadenas (Kralova y Sjoblom, 2009; McClements, 2005). Además, el agente emulsificante no debe ser propenso a una fuerte agregación o gelificación; de lo contrario, la alta viscosidad resultante de la fase acuosa inhibirá la ruptura de la fase oleosa en gotas pequeñas (Dickinson, 2018).

En el transporte de difusión, los tensoactivos de bajo peso molecular se adsorben más rápidamente debido a que tienen coeficientes de difusión relativamente altos y, en consecuencia, disminuyen la tensión interfacial muy rápidamente, pero muestran pequeños reordenamientos estructurales (Gülseren y Corredig, 2012). Mientras que las proteínas e hidrocoloides se adsorben más lentamente (Tcholakova *et al.*, 2008; Dickinson, 2009), sin embargo, pueden interactuar extensamente una vez adsorbidas en la interfaz, creando películas con diferentes propiedades viscoelásticas (Xu *et al.*, 2012; Yerramilli *et al.*, 2017).

En la interfaz aceite/agua o aire/agua, la adsorción y la presión superficial (π) desarrollada por proteínas y polisacáridos se lleva a cabo en tres etapas principales: a) difusión y cobertura completa de las gotas por el emulsificante; b) fuerte adsorción y despliegue de la macromolécula en la interfaz, y c) reorganización de las moléculas en la interfaz fluida (Graham y Phillips, 1979; Rodríguez-Patino y Pilosof, 2011).

1.2.- Pectinas

Las pectinas son utilizadas como agentes estabilizantes en emulsiones, debido a que reducen los movimientos de las gotas al aumentar la viscosidad de la fase continua, y en algunos casos inducen interacciones electrostáticas repulsivas o impedimentos estéricos entre las gotas (Liang *et al.*, 2015; Naqash *et al.*, 2017).

1.2.1.- Características estructurales

La pectina es un componente común en los tejidos de frutas y hortalizas y desempeña un papel importante en el crecimiento y desarrollo de éstas. De manera general, la pectina es más abundante en la lamela media, seguida de las paredes celulares primarias de la célula vegetal (Voragen *et al.*, 2009; Suárez *et al.*, 2013).

Estructuralmente, la pectina se define como un polisacárido aniónico constituido por tres regiones principales: Homogalacturonano (HG), Ramnogalacturonano-I (RG-I) y Galacturonanos sustituidos (GS; constituida principalmente de Ramnogalacturonano II).

El HG también llamado “región lisa”, es un homopolímero compuesto principalmente de 60–65 % de unidades de ácido α -D-galactopiranosilurónico (GalpA) enlazado a través de enlaces glucósidos α -1, 4. De acuerdo a Willats *et al.* (2001) el HG parece sintetizarse en el aparato de Golgi y luego transferirse a la lamela media y a las paredes celulares primarias. Además, las unidades de HG pueden sustituirse en las posiciones C-2 o C-3 con residuos de xilosa o apiosa, produciendo dominios conocidos como xilogalacturonano (XG) o apiogalacturono (APG), respectivamente, alterando las propiedades funcionales del HG (Ovodov, 2009).

Ramnogalacturonano-I (RG-I) heteropolímero altamente ramificados de unidades repetidas de disacáridos de GalpA y ramnosa (Rha) $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow]_n$ con cadenas laterales altamente ramificadas de azúcares incluyendo xilosa, manosa, glucosa y fucosa, estos azúcares pueden también pueden estar unidos covalentemente a la cadena principal de RG-I dependiendo de la fuente y el método de extracción (Maxwell *et al.*, 2015). Esta naturaleza altamente ramificada de RG-I también se le conoce como “región vellosa”. Se ha informado que los residuos de GalpA en la región RG-I podrían estar esterificados con O-acetilo, pero no esterificados en metilo (Caffall y Mohnen, 2009).

RG-II, no está estructuralmente relacionado con RG-I, a pesar de que sus nombres se manejan en secuencia y al hecho de que también se incluye en la “región vellosa”. Es un dominio

péctico ramificado que contiene una cadena principal de HG. RG-II es un homopolímero altamente compacto de alrededor de siete a nueve restos de 1→4 unidos α -D-GalpA (de las cuales algunas están esterificadas con metilo) con cuatro cadenas laterales heteropoliméricas unidas (Caffall y Mohnen, 2009). Una representación de estas características estructurales se presenta en la Figura 3.

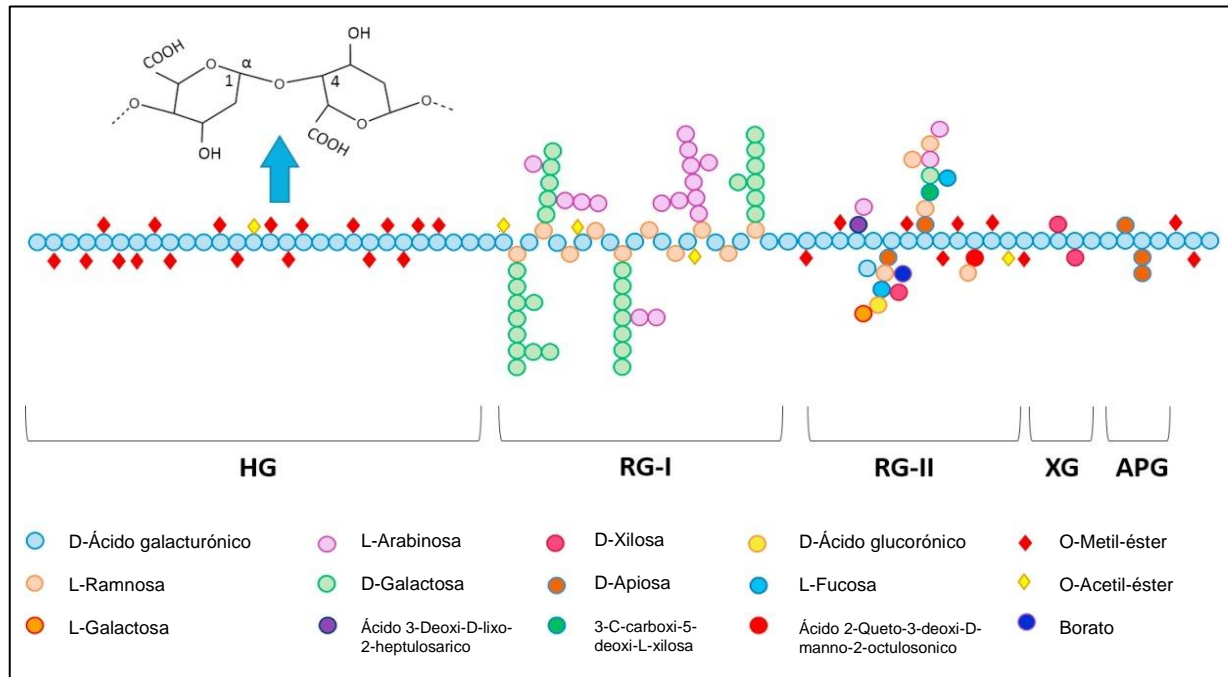


Figura 3.- Diagrama esquemático de la estructura de la pectina. Homogalacturonano (HG); Ramnogalacturonano-I (RG-I); Ramnogalacturonano-II (RG-II); Xilogalacturonano (XG) y Apiogalacturonano (APG) (Fuente: Wang *et al.*, 2018).

1.2.2.- Fuentes de pectina

La pectina constituye aproximadamente el 30 % de las paredes celulares primarias de las plantas (Scheller *et al.*, 2007). A pesar de su disponibilidad en un gran número de especies vegetales, las fuentes comerciales son limitadas. Históricamente, el orujo de manzana ha sido la principal fuente de obtención de pectinas, pero en los últimos años la utilización de cáscara de cítricos se ha incrementado (Putnik *et al.*, 2017). Hoy en día, la pectina disponible comercialmente se extrae principalmente de cáscara de cítricos (85.5 %), seguido de orujo de manzana (14.0 %) y en menor medida, pulpa de remolacha azucarera (0.5 %) (Garna *et al.*, 2007; Ciriminna *et al.*, 2015; Putnik *et al.*, 2017). Otras fuentes de obtención de pectinas incluyen cáscaras de mango (*Mangifera indica*), de cacao (*Theobroma cacao*), de fruta del dragón (*Hylocereus polyrhizus*), fruto del tejocote (*Crataegus spp.*), rodajas de sandía (*Citrullus lanatus*), cabezas de girasol (*Helianthus annuus*),

pulpa de tomate (*Solanum lycopersicum*) y fruta de la pasión (*Passiflora edulis*) (Vriesmann *et al.*, 2012; Chan y Choo, 2013; Yapo y Koffi, 2013; Muhammad *et al.*, 2014; Hua *et al.*, 2015; Cuevas-Bernardino *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2018).

1.2.3. Métodos de extracción de pectina

Los procesos de extracción se rigen por principios de transferencia de masa, por lo que aislar la pectina depende de qué tan rápido: a) se produce la hidrólisis de la protopectina (es decir, el polisacárido péctico *in situ* unido a otros compuestos de la pared celular); b) la solubilización de la pectina resultante y (c) cuando el solvente de extracción alcanza un estado de equilibrio (o saturación) (Garna *et al.*, 2007; Chan y Choo, 2013; Alba *et al.*, 2015). El uso de un método adecuado para la extracción de pectina es significativo para maximizar su rendimiento y calidad.

1.2.3.1.- Métodos convencionales

La extracción convencional (extracción sólido-líquido) depende de numerosos factores tales como: temperatura, pH, propiedades del disolvente, relación de sólido a disolvente, humedad de la muestra, tamaño y distribución de partícula y velocidad de difusión (Vriesmann *et al.*, 2012; Marić *et al.*, 2018). La extracción industrial generalmente se lleva a cabo mediante tratamientos ácidos (pH 1–3) a temperaturas altas (70–90 °C) (Munarin *et al.*, 2012). Los ácidos minerales comúnmente usados incluyen: ácido clorhídrico y nítrico, a una concentración entre 0.1–6M (Yapo *et al.*, 2007; Vriesmann *et al.*, 2011). Sin embargo, la extracción convencional con ácidos minerales tiene algunos inconvenientes importantes tales como: la pérdida de algunos compuestos volátiles y problemas desde el punto de vista ambiental (Marić *et al.*, 2018).

1.2.3.2.- Métodos no convencionales

Hoy en día, se han propuesto procedimientos de extracción de pectina distintos a los industriales, con la finalidad de aumentar el rendimiento, reducir costos, mejorar el proceso de extracción y obtener estructuras químicas con propiedades controladas (Munarin *et al.*, 2012). Con la popularización de la “Química Verde” se han desarrollado y utilizado nuevas tecnologías, así como algunos enfoques de extracción innovadores, tales como la extracción asistida por enzimas, microondas, campo eléctrico, ultrasonido y ácidos orgánicos; estos métodos y tecnologías ecoeficientes se han desarrollado para reducir o eliminar el uso de solventes tóxicos, proporcionar

mayor rendimiento y mejorar la calidad en la pectina (Vriesmann *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016; Zouambia *et al.*, 2017; Marić *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018).

Los ácidos orgánicos tienen una capacidad hidrolizante menor que los ácidos minerales (debido a su menor constante de disociación) y, por lo tanto, se espera que provoquen una menor despolimerización en las pectinas (Marić *et al.*, 2018). En adición, Chan y Choo, (2013) y Yang *et al.* (2018) han reportado que, con los ácidos orgánicos, (principalmente el ácido cítrico) se pueden alcanzar mayores rendimientos de pectina en comparación con los ácidos inorgánicos.

1.2.4.- Clasificación de las pectinas

En el HG algunos de los grupos carboxilo están metil-esterificados en posición C-6 y/o acetil-esterificados predominantemente en posición O-3 y ocasionalmente en posición O-2, dependiendo de las especies de plantas (Rombouts y Thibault, 1986; Yang *et al.* 2018). El grado de metil-esterificación (también llamado grado de esterificación) (GE) de las unidades de GalpA se usa para clasificar la pectina (Singthong *et al.*, 2004; Fella *et al.*, 2009). GE es un porcentaje que expresa la relación molar de unidades de GalpA esterificadas por metanol (incluyendo tanto GalpA libre como GalpA sustituido). La variación en el GE se ve afectada por las fuentes botánicas, la localización de la pectina (pared primaria o lamela media), condiciones climáticas y los métodos de extracción (Vriesmann *et al.*, 2011; Vriesmann *et al.*, 2012; Yapo y Koffi, 2013; Kyomugasho *et al.*, 2015). Esto hace de la pectina la siguiente categorización:

Pectinas con más del 50 % de metil-esterificación se define como pectinas de alto contenido de metilo o de alto metoxilo (HMP, por sus siglas en inglés) y aquellas con menos del 50 % se definen como pectinas de bajo contenido de metilo o de bajo metoxilo (LMP, por sus siglas en inglés). HMP forma geles en concentraciones altas de co-soluto (55–75 %) y cuando se calienta en soluciones ácidas con un pH bajo (pH 2.5–3.5), que se estabilizan mediante enlaces de hidrógeno intermoleculares y enlaces hidrófobos entre ésteres de metilo (Oakenfull y Scott, 1984; Vriesmann y Petkowicz, 2013); mientras, que LMP, puede formar geles en un amplio rango de pH (2.0–6.0) con o sin agregar sacarosa a la solución pero con la concentración apropiada de iones divalentes como el calcio (Ca_2^+) para la reticulación entre dos carboxilatos de dos cadenas diferentes a través de la fuerza iónica (Walkinshaw y Arnott, 1981).

Otro tipo de pectinas a saber son aquellas pectinas amidadas, las cuales contienen grupos amino primarios $-\text{CO}-\text{NH}_2$, y son generalmente reconocidas como seguras (GRAS, por sus siglas en

inglés) por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés), la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) y la Comisión Europea (EC) (Chen *et al.*, 2015). El método usual de su obtención es la amonólisis de grupos éster metílico de pectinas de alto metoxilo, ya sea por amoníaco y alcohol o amoniaco acuoso concentrado, lo cual provoca la desesterificación parcial de la pectina (Šimkovic *et al.*, 2009).

Por otra parte, existen pectinas altamente acetiladas, como aquellas extraídas de la pulpa de remolacha azucarera (SBP, por sus siglas en inglés) (Dea y Madden, 1986; Chen *et al.*, 2016a; Chen *et al.*, 2016b), de las vainas de Okra (*Abelmosus esculentus*) (Alba *et al.*, 2015), de la pulpa de papa (*Solanum tuberosum*) (Yang *et al.*, 2018) y aquellas de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao*) (Vriesmann y Petkowicz, 2013), estas fuentes pueden ser una nueva alternativa de pectinas con alto potencial para su uso como agente emulsificante/estabilizante, debido a su alto contenido de grupos acetilo.

1.2.5.- Factores que influyen en las propiedades emulsificantes/estabilizantes

La pectina tiene propiedades anfifílicas que ayudan a reducir la tensión interfacial entre las fases de aceite y agua, esta característica suele atribuirse típicamente con la estructura química del biopolímero tal como el grado de metil-esterificación y acetilación, las características macromoleculares (peso molecular, grado de ramificación de cadenas laterales) y la presencia de estructuras funcionales tales como: proteínas y ácidos ferúlicos (Liang *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016b; Alba y Kontogiorgos, 2017; Yang *et al.* 2018). El conocimiento de estas propiedades fisicoquímicas permite que este material se utilice como agente estabilizante, espesante y gelificante en aplicaciones particulares (Burapapadh *et al.*, 2010; Munarin *et al.*, 2012; Vriesmann y Petkowicz, 2013; Yapo y Koffi, 2013; Yang *et al.*, 2018). A continuación, se informan algunos factores que contribuyen al efecto interfacial de pectinas:

1.2.5.1.- Proteína y ácido ferúlico

A menudo se sugiere que la actividad interfacial de la pectina está relacionada con la presencia de restos proteicos que actúan como anclas hidrofóbicas que facilitan la adsorción de las cadenas de pectina en la interfaz, lo que da como resultado la reducción de la tensión interfacial. El contenido de proteína en pectina depende de la fuente, condiciones de aislamiento y métodos de

detección, de esta manera se han detectado valores para SBP de ~6.0 %, para pectina de okra de ~5.0 % en comparación con pectina de cítricos o manzana (~3.0 % y ~1.0 %, respectivamente) (Funami *et al.*, 2011; Yapo *et al.*, 2007; Alba *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016a).

Leroux *et al.* (2003) estudiaron la capacidad emulsificante de SBP en relación con su estructura química y concluyeron que su capacidad emulsificante está relacionada con su alta concentración de componentes proteínicos. Lo cual es acorde a lo informado por Funami *et al.* (2007) quienes han demostrado la contribución de los restos proteínicos en la capacidad emulsificante de la pectina, al eliminar parcialmente la fracción proteica de SBP (de 1.56 ± 0.15 % a 0.13 ± 0.02 %) utilizando tratamientos enzimáticos, obtuvieron como resultado una disminución en la actividad emulsificante, lo que se vio reflejado en mayores diámetros medios de gota ($d_{3,2}$ y $d_{4,3}$), distribuciones más amplias de tamaño de gota y mayor tensión interfacial, lo que hizo que las gotas de las emulsiones fueran grandes, gruesas y a veces floculadas en comparación con emulsiones hechas con pectina no modificada.

Recientemente se ha argumentado a través de modificación enzimática secuenciada de SBP que la proteína, el complejo ácido ferúlico–arabinogalactano–proteína y el ácido ferúlico desempeñan papeles importantes en la mejora de la actividad superficial, capacidad y estabilidad emulsificante. El grado de disminución de la actividad emulsificante siguió el siguiente orden: ácido ferúlico > complejo de ácido ferúlico–arabinogalactano–proteína > proteína, esto se debe a que tanto el ácido ferúlico como la proteína son hidrofóbicos y actúan como una conexión “tipo puente” entre la gota de aceite y el polisacárido (Chen *et al.* 2016b). Por otra parte, Chen *et al.* (2016a) determinaron que la concentración de proteína en SBP afectó el tamaño de gota de las emulsiones, caracterizado en términos de diámetro volumétrico medio ($d_{4,3}$), ellos encontraron que a medida que el contenido de proteína aumentaba de 0.5 a 3.0 %, el tamaño de gota de la emulsión disminuía bruscamente de 4.12 a 1.30 μm , respectivamente, a concentraciones mayores no existieron diferencias significativas, por lo tanto, plantearon que se necesita un contenido de proteína de ~3.0 % para una actividad superficial óptima en SBP.

En conclusión, las proteínas y el ácido ferúlico parecen desempeñar un papel crucial en la capacidad emulsificante (actividad interfacial y estabilidad de la emulsión) de SBP, estos resultados coinciden con los hallazgos informados por Siew y Willians, (2008) quienes mencionan que las fracciones de SBP adsorbidas en la interfaz O/W eran abundantes en proteínas y ácido ferúlico.

1.2.5.2.- Los grupos acetilo y metilo

Rombouts y Thibault (1986) han demostrado que el 80–90 % de los grupos acetilo se encuentran en las regiones “lisas” en posiciones O-2 y/o O-3 de las unidades de ácido galacturónico y que se distribuyen a lo largo de la cadena. SBP tiene propiedades de gelificación deficientes atribuidas principalmente a su alto contenido de grupos acetilo (Dea y Madden, 1986), no obstante, su capacidad emulsificante se puede explicar al alto contenido de este grupo funcional en su estructura química (Leroux *et al.*, 2003; Siew y Williams, 2008). Estas aseveraciones están acordes a los informados por (Chen *et al.*, 2016b), al indicar que los grupos acetilo pueden prevenir la agregación de las gotas de aceite, mediante la estabilización estérica y mecánica. Estudios recientes demuestran que se mejoran considerablemente las propiedades emulsificantes de la pectina cuando se tiene mínimo 10 % de GAc, y existen bajos contenidos de proteína (Chen *et al.*, 2016b, Schmidt *et al.*, 2015; Alba y Kontogiorgos, 2017). Dea y Madden (1986) informaron que SBP eran capaces de producir y estabilizar emulsiones O/W que las pectinas comerciales con alto o bajo contenido de metoxilo, esto debido al alto contenido de sus grupos acetilo (2.0–9.0 %) en su estructura.

Por el contrario, la disminución de los grupos ésteres metílicos afectan principalmente los tamaños de gota de la emulsión (Chen *et al.*, 2016b). Además, Liang *et al.* (2015), demostraron que las pectinas cítricas alquiladas con diferente longitud de cadena alquílica y grado de sustitución de alquilo, exhiben actividad emulsificante mejorada que aquellas pectinas sin modificar, evidenciada por diámetros medios de gota más pequeños de $\sim 7 \mu\text{m}$ para emulsiones estabilizadas con pectina modificada y de $\sim 60 \mu\text{m}$ para pectinas no alquiladas. Schmidt *et al.* (2015) han demostrado una relación directa entre el GE y la capacidad emulsificante de la pectina cítrica al aumentar el GE de 70 % a 80 %. Curiosamente, también se ha demostrado que el aumento del GE más allá del 80 % no produce una reducción adicional del tamaño de gota, algo que se ha atribuido a la auto asociación de la pectina cítrica y, por lo tanto, disminución de la accesibilidad de los grupos hidrofóbicos a la interfaz aceite/agua (Alba y Kontogiorgos, 2017). Chen *et al.* (2016b) determinaron que la desmetoxilación de SBP produjo un aumento en la tensión superficial e interfacial (45.2 mN/m y 24.3 dinas/cm) que aquellas pectinas sin modificar (44.3 mN/m y 17.5 dinas/cm), esto debido a la pérdida de grupos ésteres metílicos, que en consecuencia resultó en la disminución de la actividad superficial e interfacial.

1.2.5.3.- El peso molecular, las cadenas laterales y las interacciones electrostáticas

El peso molecular de las pectinas es alto, generalmente en el rango de 50 a 200 kDa (Alba *et al.*, 2015; Hua *et al.*, 2015). Un peso molecular bajo (<80 kDa) favorece la actividad emulsificante de la pectina, incluso con un bajo contenido de grupos acetilo (<0.8 %), posiblemente debido a la mejor accesibilidad de los grupos de superficie activa causados por la despolimerización o la cinética de adsorción incrementada (Mazoyer *et al.*, 1999), sin embargo, de acuerdo a Schmidt *et al.* (2015) pectinas de muy bajo peso molecular (76 a 47 kDa) dan como resultado menor actividad interfacial y emulsiones más gruesas debido a la incapacidad de las cadenas cortas del polímero para proporcionar una estabilización estérica eficiente (Leroux *et al.*, 2003; Yapo *et al.*, 2007).

La falta de consenso del impacto del peso molecular sobre la capacidad emulsificante de la pectina también sugiere que las otras características estructurales discutidas anteriormente (GAc, GE, la presencia de ácido ferúlico y proteína) no puedan descartarse, como lo informan Cuevas-Bernardino *et al.* (2016) al indicar que debe de haber un balance entre el alto peso molecular de las pectinas de tejocote (*Crataegus* spp.) y sus fracciones hidrofóbicas (proteína, grado de esterificación y fenoles totales).

Se ha demostrado que las fracciones de SBP adsorbidas en la interfaz aceite/agua se encuentran enriquecidas de azúcares neutros (por ejemplo, arabinosa y galactosa) lo que sugiere que esta pectina contiene mayor proporción de regiones ramificadas (RG-I) las cuales le confieren tener propiedades emulsificante mejoradas en comparación de pectinas con estructura lineal, este comportamiento se puede deber al hecho de que los ésteres fenólicos (especialmente ácido ferúlico) y la proteína se encuentran unidos a las cadenas laterales de la galactosa y arabinosa (Siew y Williams, 2008; Chen *et al.*, 2016b), mientras que, la estabilidad de la emulsión a largo plazo se debe a efectos estéricos atribuidos principalmente a la presencia de cadenas laterales de azúcares neutro (Funami *et al.*, 2011). También se ha informado que la adsorción multicapa de SBP en la interfaz es posible y se origina a partir de interacciones electrostáticas entre los restos proteicos cargados positivamente dentro de las cadenas de SBP y los residuos de ácido galacturónico cargados negativamente (Siew y Williams, 2008). Por lo tanto, la capacidad de la pectina para estabilizar estéricamente gotas de aceite se atribuye a los dominios RG-I, mientras que la estabilización electrostática se origina en dominios HG debido a la ionización de grupos carboxílicos.

Las emulsiones estabilizadas con pectina son sensibles al pH y a la fuerza iónica, los cambios en estos factores producen alteraciones en su capacidad emulsificante y estabilidad a largo plazo. El

número y la distribución de las cargas negativas de la pectina están determinados principalmente por el grado de esterificación de los grupos metilo. A valores de pH superiores a 3.5 los grupos carboxilos de la pectina se ionizan y el biopolímero alcanza una conformación extendida, debido a las repulsiones electrostáticas entre los aniones carboxilato; en consecuencia, la des-adsorción puede ocurrir fácilmente dejando la superficie de la gota expuesta y sujeta a coalescencia debido a que pocos grupos se encuentran unidos a la interfaz aceite/agua; por el contrario, a valores bajos de pH ($\text{pH} < \text{pKa}$), disminuye la ionización de los grupos carboxílicos, las cadenas del biopolímero alcanzan conformaciones compactas debido a la protonación de GalpA, lo que permite que los grupos hidrófobos se acerquen mucho a la interfaz del aceite y se adsorban, dando como resultado una estabilización estérica efectiva que evita la coalescencia de las gotas (Alba y Kontogiorgos, 2017). Se ha demostrado que la pectina de okra y de SBP estabilizadas en interfaz aceite/agua a valores de pH bajos, (donde los biopolímeros adoptan conformaciones muy compactas) dan como resultado la formación de capas interfaciales gruesas que proporcionan una estabilización estérica efectiva como se mencionó anteriormente (Alba *et al.*, 2015; Castellani *et al.*, 2010).

1.2.5.4.- Los procedimientos de extracción

La mayoría de las pectinas aisladas utilizando métodos de extracción convencionales presentan alto peso molecular (~200 kDa) y mezclas complejas de HG, RG-I y RG-II en lugar de una estructura uniforme, esta distribución de las cadenas de la pectina varía considerablemente de una especie a otra y está controlada por las condiciones de extracción. Por ejemplo, se ha informado que la extracción de pectinas de remolacha azucarera y cáscaras de cacao a $\text{pH} < 2.0$ son ricas en ácido galacturónico y sólo se ven afectadas por la selección del tiempo y la temperatura de extracción (Yapo *et al.*, 2007; Vriesmann *et al.*, 2011); por el contrario, largos tiempos de extracción y baja temperatura favorecen la desesterificación de la pectina, la producción de HMP de gelificación lenta o incluso LMP (Nussinovitch y Hirashima, 2013). Por otro lado, algunos autores observaron el efecto de la temperatura en la disminución de la pureza (expresada como GalpA) de pectinas aislada cáscara de cacao y de orujo de manzana a pH bajo (~1.5) (Chan y Choo, 2013; Garna *et al.*, 2007), mientras que el contenido de proteína de SBP a $\text{pH} \sim 1.5$ fue menor en comparación con aquellos aislados usando condiciones de $\text{pH} 2.0$ (Yapo *et al.*, 2007).

La modificación del pH de extracción también da como resultado el aislamiento de la pectina con diferentes grados de metil-esterificación. Las extracciones ácidas producen pectina de alto grado

de metoxilación, mientras que los valores altos de pH generalmente resultan en pectinas con bajo grado de metoxilación debido a la saponificación de los grupos éster (Alba y Kontogiorgos, 2017).

Se ha demostrado que la etapa de precipitación con etanol tiene un impacto considerable sobre el rendimiento y las propiedades fisicoquímicas de la pectina y, por lo tanto, podría utilizarse para modular su estructura y propiedades funcionales (Garna *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2014). Estudios previos informaron una disminución en el grado de metoxilación de pectina con aumento en el volumen de etanol; este efecto se atribuyó a las interacciones entre moléculas de agua, grupos carboxílicos de la pectina y grupos hidroxilo del etanol (Faravash y Ashtiani, 2007).

Cabe señalar que la interacción entre las variables de extracción determinará la estructura final del polímero. Además, el origen botánico influirá en la composición final (Alba y Kontogiorgos, 2017).

1.2.6. Pectina de cáscara de cacao

Las semillas del cacao (*Theobroma cacao*), representa la mayor cosecha económica del mundo tropical, de acuerdo a la Organización Internacional del Cacao (ICCO, por sus siglas en inglés) la existencia de cacao en grano en el mundo se estimó en 1,505 millones de ton en el periodo 2014/2015 (ICCO, 2017), sin embargo, enormes cantidades de cáscaras de cacao son desechadas después de obtener el producto final. Barazarte *et al.* (2008) informan que, por cada tonelada de grano seco producido, 10 toneladas de cáscaras de cacao en húmedo son generadas. Por lo tanto, se concluye que la actividad cacaotera del mundo generó en promedio aproximadamente 15,050 millones de toneladas de cáscaras en el lapso señalado, representando un serio problema ambiental. Vriesmann *et al.* (2012) han informado que la extracción de pectinas de cáscaras de cacao con ácido cítrico es efectiva en términos de rendimiento y propiedades fisicoquímicas en comparación con aquellas extraídas con ácido nítrico, además de ser económico y benéfico desde el punto de vista ambiental. Mientras que Mollea, *et al.*, (2008) han procesado las cáscaras de cacao por extracción con ácido caliente y el uso de microondas como pretratamiento y obtuvieron los mejores resultados a pH 2.5 y una duración de extracción de 60 min. Además, mostraron una mejora significativa en el rendimiento de pectina (3.60 %) después de usar microondas en comparación de aquellas en las que no se utilizó. En adición, Yapó y Koffi (2013) informaron de la utilización de pectinas de cáscaras de cacao como agente emulsificante/estabilizante eficaz, pero en emulsiones O/W no alimentarias, sin embargo, no dan informes del tamaño de gota producido.

1.2.7. Emulsiones estabilizadas con pectinas

La actividad emulsificante y estabilizante está dada por: a) grupos hidrofóbicos unidos a ciertos residuos glucosídicos a lo largo de las cadenas de carbohidratos (es decir octenilo, metilo, acetilo, fenólico, etc.), y b) regiones cortas de proteína unida covalentemente (Dickinson, 2018). Por ejemplo, la actividad emulsificante de SBP se atribuye principalmente a la fracción proteica y también a sus grupos acetilo ya que el hidrocoloide en sí es predominantemente hidrófilo (Leroux *et al.*, 2003; Funami *et al.*, 2007 Siew y Williams, 2008). Mientras que, la estabilidad de la emulsión generalmente está respaldada por la fracción de hidratos de carbono a través de los efectos de viscosidad, impedimento estérico e interacciones electrostáticas (Chanamai *et al.*, 2002). A continuación, se presenta algunos reportes de la utilización de pectina como agente emulsificante para la formación y estabilización de emulsiones:

HMP se empleó para preparar emulsiones cargadas de resveratrol, en donde la pectina actuó como emulsificante. Las emulsiones de HMP se mantuvieron estables durante siete días de almacenamiento y no mostraron separación de fases (Benjasirimongkol y Sriamornsak, 2016).

Guerra-Rosas *et al.* (2017) evaluaron la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de orégano (*Origanum compactum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y mandarina (*Citrus reticulata*) en nanoemulsiones de HMP contra *Escherichia coli* y *Listeria innocua*. Y demostraron que el tipo de aceite esencial utilizado en la formulación afectó significativamente el tamaño de gota de los sistemas de nanoemulsión y se encontró que las nanoemulsiones de limoncillo-HMP con tamaño de gota entre 11 y 13 nm mostraron la actividad antimicrobiana más fuerte.

Burapapadh *et al.* (2012) compararon las propiedades físicas de nanoemulsiones a base de pectina cargadas con itraconazol (un fármaco modelo) preparadas por homogeneizador de alta presión y sonicador. Las nanoemulsiones preparadas por homogeneización a alta presión tenían un tamaño de partícula más pequeño cuando se aumentó el tiempo de homogeneización, además, se encontró que el tipo de pectina afectó el tamaño de las emulsiones, siendo las nanoemulsiones preparadas con HMP las que presentaron tamaño de partícula más pequeño en comparación con las preparadas con LMP y LMP amidada probablemente debido a la alta porción de grupos hidrófobos en HMP.

1.3.- Proteínas

Algunos emulsificantes naturales de superficie activa, son las proteínas, las cuales pueden ser aisladas de diversas fuentes, incluyendo la leche, la carne, el pescado y los vegetales, sin embargo, los más utilizados en la industria alimentaria son los derivados de la leche de vaca, es decir, las proteínas de caseína y el lactosuero (Bansal y Bhandari, 2016).

1.3.1.- Proteínas del lactosuero

Las proteínas del lactosuero son aquellas que permanecen solubles después de la coagulación de la caseína a $\text{pH} < 5.0$ durante la manufactura de quesos frescos (Walstra *et al.*, 2006; Lievore *et al.*, 2015). Y están compuestas por α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, albúmina de suero bovino, lactoferrinas e inmunoglobulinas. Constituyen aproximadamente el 20 % de la proteína total en la leche y tienen un alto valor nutricional debido a su alto contenido de aminoácidos (Walstra *et al.*, 2006; Bansal y Bhandari, 2016) y su temperatura de desnaturalización es de alrededor de 70–80 °C (Anema y McKenna, 1996). Aproximadamente el 55 % de la proteína del lactosuero es β -lactoglobulina (18,300 g/mol); mientras que la α -Lactalbumina (14,200 g/mol) representa el 25 %, otras proteínas de menor importancia son las inmunoglobulinas y albúmina de suero, las cuales representan aproximadamente el 15 % y 5 %, respectivamente (de Wit, 1981).

Las proteínas lácteas, y en particular las proteínas del lactosuero, se han utilizado ampliamente como emulsificantes en emulsiones del tipo O/W por su velocidad de difusión y velocidad de adsorción a la interfaz, la capacidad de desplegar su estructura molecular globular y su agregación en la interfaz (Lee y McClements, 2010). Un número de diferentes ingredientes de proteína de lactosuero están disponibles para su uso en la industria alimentaria como emulsificantes, incluyendo concentrado, aislado e hidrolizado de proteína de lactosuero (WPC, WPI y WPH, respectivamente, por sus siglas en inglés) y las fracciones de proteínas altamente purificadas, tales como: β -lactoglobulina (β -Lg) y α -lactoalbúmina (α -La) (Lee y McClements, 2010; Adjonu *et al.*, 2014a).

Los procesos de adsorción de proteínas en una escala de tiempo corto parecen estar controlados por difusión, en contraste con una barrera de energía que ocurre durante observaciones a largo plazo que limita la adsorción del emulsificante (Singh y Dalgleish, 1998; Tang y Shen, 2015). Posteriormente, forman capas gruesas que evitan que las gotas coalescan o floculen, principalmente

por interacciones hidrofóbicas en la interfaz aceite/agua y también por enlaces disulfuro entre la proteína adsorbida en las gotas de aceite (Schröder *et al.*, 2017; Dickinson, 2018).

Los recubrimientos interfaciales formados por las proteínas son por lo general relativamente delgados y eléctricamente cargados y, por lo tanto, el principal mecanismo de la prevención de floculación en las emulsiones estabilizadas por proteína es la repulsión electrostática (en lugar de repulsión estérica) (McClements, 2005; Dickinson, 2009). Por consiguiente, las emulsiones estabilizadas con proteína son particularmente sensibles a los efectos del pH y fuerza iónica (Piorkowski y McClements, 2013), y tienden a flocular a valores de pH cerca de su punto isoelectrico (*pI*) o cuando la fuerza iónica excede de un cierto nivel (McClements, 2005)

1.3.2.- Hidrolizados de proteína de lactosuero

La capacidad de los hidrolizados de proteína de lactosuero para formar y estabilizar gotas de emulsión depende de sus características (longitud de cadena/tamaño molecular, conformación, hidrofiliidad e hidrofobicidad) (Gauthier y Pouliot, 2003; Lam y Nickerson, 2013), así como del grado de hidrólisis (el porcentaje de enlaces peptídicos rotos durante la hidrólisis) (Singh y Dalgleish, 1998; Schröder *et al.*, 2017). La hidrólisis (generalmente enzimática) de proteínas de lactosuero produce péptidos que son más pequeños, poseen menos estructuras secundarias y terciarias, y tienen un núcleo hidrófobo parcialmente expuesto (Lam y Nickerson, 2013;). Estas características explican su mayor tasa de difusión y migración a la interfaz aceite/agua y su capacidad para cubrir un área más grande que las proteínas nativas (Schröder *et al.*, 2017). La adsorción de péptidos en la interfaz depende de las propiedades hidrófobas de estos, que posteriormente permitirán formar películas fuertes y cohesivas alrededor de las gotas y, por lo tanto, funcionar como buenos emulsificantes (Singh y Dalgleish, 1998; Lam y Nickerson, 2013; Schröder *et al.*, 2017). Por ejemplo, el aumento del grado de hidrólisis aumenta la solubilidad del péptido y la capacidad emulsificante (Singh y Dalgleish, 1998; Schröder *et al.*, 2017), pero si el grado de hidrólisis es demasiado alto, reduce la formación y estabilidad emulsiones y espumas (Agboola *et al.*, 1998). Por otra parte, péptidos de mayor tamaño son capaces de modificar la estructura interna de una emulsión formando redes entrelazadas y limitando la tendencia a la desestabilización, probablemente porque presentan grupos hidrofóbicos e hidrofílicos en la misma molécula; mientras que, mayores concentraciones de péptidos hidrófilos y de cadena corta pueden limitar sus propiedades interfaciales y de estabilización estérica (Singh y Dalgleish, 1998). Es decir, durante la

formación de emulsiones, los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas del lactosuero se pueden usar como agente estabilizador debido a su tendencia a exponerse a la fase acuosa y unirse al agua y actuar a través de efectos estéricos, mientras que los aminoácidos hidrofóbicos interactúan con las gotas de aceite siendo los responsables de la actividad superficial (Singh y Dalgleish, 1998; Lam y Nickerson, 2013).

La inclusión de péptidos de proteína de lactosuero en emulsiones podría dar como resultado productos con una modificación de muchas de sus características, tales como textura, sabor, atributos sensoriales y estabilidad de almacenamiento, además de proporcionar bioactividades (tales como: actividad antioxidante, antihipertensiva, inmunoestimulante, antitrombótico, antigástrico, antimicrobiano y anticancerígeno) que pueden ser beneficiosas para promover una buena salud (Gauthier y Pouliot, 2003; Korhonen y Pihlanto, 2006; Adjonu *et al.*, 2014b).

1.4.- Sistemas emulsionantes mixtos de proteína–polisacárido

Anteriormente, la mayoría de los estudios realizados en la estabilización de emulsiones se habían concentrado en el uso de tensioactivos sintéticos y de bajo peso molecular (*tweens* y *spans*) debido a su excelente difusividad interfacial, en comparación con macromoléculas como proteínas y polisacáridos (Tcholakova *et al.*, 2008; Maldonado-Valderrama y Rodríguez-Patino, 2010; Bouyer *et al.*, 2012; Ozturk *et al.*, 2014). Sin embargo, hoy en día, las preocupaciones sobre la seguridad, la toxicidad y el metabolismo de los emulsificantes sintéticos en el cuerpo humano limitan su aplicación a los sistemas alimentarios. Por ello existe un interés creciente en explotar las ventajas combinadas de las proteínas y los polisacáridos como ingredientes emulsificantes y estabilizadores, mediante una combinación de mecanismos electrostáticos y estéricos (Perez *et al.*, 2009; Dickinson, 1995; Guzey y McClements, 2006; Dickinson, 2008).

Las proteínas se emplean principalmente como agentes estabilizadores y formadores de emulsiones debido a su alta actividad superficial, mientras que los polisacáridos se usan principalmente como agentes espesantes o gelificantes (Dickinson, 2009; Dickinson, 2018). Los efectos sinérgicos resultantes de la mezcla de estos biopolímeros son debido a su alta actividad superficial, su capacidad para aumentar la viscosidad del medio de dispersión y su capacidad para formar capas adsorbidas gruesas y cargadas (Harnsilawat *et al.*, 2006; Ye, 2008; Rodríguez-Patino y Pilosof, 2011). Al mezclar soluciones de polisacáridos y proteínas, se puede observar cualquiera de las posibilidades representadas en la Figura 4.

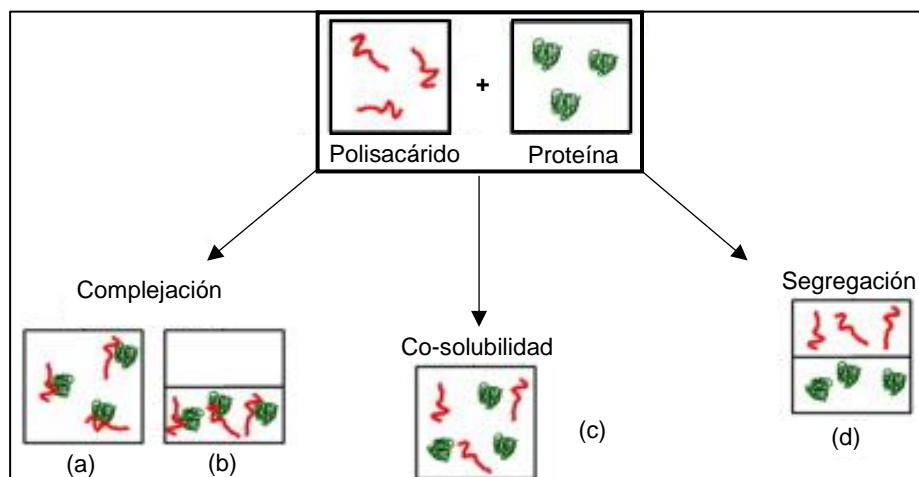


Figura 4.- Esquema representativo del comportamiento de la mezcla proteína–polisacárido (Fuente: Rodríguez-Patino y Pilosof, 2011).

Para soluciones muy diluidas, la mezcla es estable ya que domina la entropía de mezcla, por lo que la proteína y el polisacárido son co-solubles (Figura 4c) y pueden formar soluciones estables. Sin embargo, si la proteína y el polisacárido son incompatibles (es decir, si se repelen uno del otro) ocurre separación de fase termodinámica o también llamada segregación (Figura 4d), la separación de fases exhibe una fase rica en proteína y otra rica en polisacárido (Ye, 2008). En contraste, si la proteína y el polisacárido muestran una atracción neta, usualmente a través de interacciones electrostáticas (cuando tienen grupos opuestos cargados) puede conducir a la formación de complejos solubles y/o insolubles (Figura 4a y 4b, respectivamente). La formación de complejos electrostáticos entre proteínas y polisacáridos aniónicos ocurre generalmente en el intervalo de pH entre el valor del pK de los grupos aniónicos (grupos carboxilos) de los polisacáridos y del pI de las proteínas; es usualmente un proceso reversible, que depende de variables como el pH y fuerza iónica (Tolstoguzov, 1997; Ye, 2008). Además, durante la formación de complejos electrostáticos la carga neta general del polisacárido aniónico disminuye, con la agregación gradual de la proteína, disminuyendo las cargas netas opuestas y reduciendo la solubilidad e hidrofiliidad del complejo resultante (Tolstoguzov, 1997) y disminuyendo el pI del complejo cuando se le compara con la proteína inicial (Dickinson, 1995).

Los complejos solubles se forman cuando la proporción de biopolímeros está lejos de ser equivalente (es decir, cuando la relación de carga neta de los biopolímeros es cercana a la unidad); mientras que la formación de complejos insolubles conduce a un fenómeno de separación de fases llamado coacervación o separación de fases asociativa y la mezcla se separa en dos fases: la fase inferior contiene el complejo proteína-polisacárido, mientras que la fase superior contiene principalmente el solvente (Schmitt *et al.*, 1998; Ye, 2008).

Las interacciones proteína-polisacárido también pueden modificar la reología interfacial, formando capas poliméricas más voluminosas alrededor de las gotas de la emulsión y proporcionando una estabilización mejorada de las gotas a través de los efectos estéricos y creando nuevas nano, micro o macroestructuras funcionales (Rodríguez-Patino y Pilosof, 2011; Xu *et al.*, 2012).

1.4.1.- Factores que influyen en la formación de complejos proteínas/polisacáridos

Las proteínas poseen una carga neta negativa por encima del pI y una carga neta positiva por debajo de este pH, en su pI no tienen carga neta, pero hay regiones localizadas en la superficie de la

proteína que tienen carga positiva o negativa, lo que la hace interesante para su interacción con polisacáridos iónicos (Cooper *et al.*, 2005).

Varios parámetros fisicoquímicos influyen en el fenómeno de complejación de la proteína y el polisacárido, tales como pH, fuerza iónica, relación proteína/polisacárido, densidad de carga y concentración total de biopolímero (Jones *et al.*, 2010; Schmitt y Turgeon, 2011; Salminen y Weiss, 2014).

La complejación ocurre generalmente como resultado de interacciones electrostáticas entre polisacáridos aniónicos y parches superficiales cargados positivamente (especialmente grupos NH_3^+) en las proteínas (Cooper *et al.*, 2005). Este mecanismo de “parche” también puede verse influenciado por la regulación de la carga y las interacciones ion-dipolo a pH cercano a su *pI* (da Silva y Jönsson, 2009). Dependiendo de las condiciones electrostáticas, los complejos permanecerán como complejos solubles (CS) o se someterán a una separación de fases asociativa o segregativa (Weinbreck *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2005; Turgeon *et al.*, 2007).

Los factores importantes para determinar la presión superficial/interfacial de estos sistemas son: a) la carga electrostática de los complejos proteína/polisacárido en la solución, regida por la densidad de carga de cada biopolímero y su proporción de mezcla, y b) el orden de adsorción de biopolímeros a la interfaz (simultánea o secuencial) (Rodríguez-Patino y Pilosof, 2011).

1.4.1.1.- Influencia del pH y la fuerza iónica sobre la formación de complejos solubles

Hoffmann *et al.* (1996), investigaron la dependencia del pH sobre la turbidez de soluciones acuosas de β -lactoglobulina sola y/o β -lactoglobulina/pectina de remolacha azucarera en una relación 1:1 y encontraron lo siguiente: la turbidez de las soluciones de SBP pura fue cercana a cero en todo el rango de pH estudiado, lo que indica que no se autoasocia, lo que puede atribuirse a la repulsión electrostática y estérica entre las moléculas de polisacáridos ramificados cargados negativamente. Mientras que la dependencia del pH sobre la turbidez de soluciones mixtas de β -Lg/SBP permaneció relativamente baja desde un pH de 7 a 5, lo que indica que las proteínas y los polisacáridos existían como moléculas aisladas y/o como complejos solubles que eran demasiado pequeños para dispersar la luz con fuerza. En estas condiciones de pH, tanto las moléculas de proteína como las de polisacáridos tienen una carga negativa relativamente alta, por lo que existe una fuerte repulsión electrostática entre ellas, lo que impide la coacervación. Hubo un aumento en la turbidez de las soluciones de biopolímeros mezclados cuando el pH se redujo por debajo de

aproximadamente 5. Este aumento fue bastante gradual cuando el pH se redujo de 5 a 4, pero se hizo mucho más pronunciado cuando el pH se redujo aún más. A estos valores de pH más bajos, algunos sistemas formaron dispersiones coloidales turbias relativamente estables. Adicionalmente, se obtuvo información del potencial- ζ como función del pH de los complejos proteína-polisacárido, el cual fue menos negativo que los de la pectina sola y más negativo que los de la proteína sola, lo que indica que el fenómeno de complejación, se llevó a cabo con éxito.

1.4.1.2.- Influencia de la relación proteína-polisacárido

Las propiedades de los complejos electrostáticos formados entre proteínas y polisacáridos dependen de la relación en masa de proteína y polisacárido (R) en solución, que depende de factores tales como la densidad de carga lineal, la conformación y la flexibilidad del biopolímero (Turgeon *et al.*, 2007; Schmitt *et al.*, 1998). Jones *et al.* (2010) investigaron la interacción de la relación en masa (R) de β -Lg/LMP a diferentes valores de pH y a una concentración de proteína fija, usando mediciones de turbidez y potencial- ζ y descubrieron que por debajo de pH 5.5, la proteína puede agregarse con otras moléculas de proteína debido a la auto asociación cercana al punto isoeléctrico ($pI \sim 5.2$) o interactuar en la solución circundante con grupos cargados opuestamente como polisacáridos aniónicos. A bajas R la mayoría de las moléculas de proteína se unen a moléculas de polisacáridos (poca proteína libre para auto asociarse), y los complejos formados presentan alta carga neta negativa por lo que son relativamente estables a la agregación, y pueden recubrir toda la superficie de las gotas de aceite (adsorción cooperativa) formando una multicapa macromolecular gruesa que proporciona contribuciones electrostáticas y estéricas a la estabilidad (Dickinson, 2008). Por otro lado, a altas R, existe una disminución apreciable en la carga negativa en los complejos y un aumento en la turbidez de la solución, que puede atribuirse a la auto asociación de proteínas, neutralización de carga de los complejos, y/o efectos de puente asociados con los altos niveles de proteína. Estos resultados demuestran que es posible prevenir la agregación isoeléctrica de proteínas globulares mediante la identificación del valor R óptimo para el polisacárido iónico utilizado.

1.4.1.3.- Comportamiento interfacial de proteína-polisacárido

Cuando una proteína se adsorbe en una interfaz fluida en presencia de polisacáridos en condiciones de compatibilidad termodinámica limitada, pueden ocurrir tres fenómenos: a) el polisacárido se adsorbe en la interfaz por sí solo en competencia con la proteína (adsorción

competitiva) b) el polisacárido se compleja con la proteína adsorbida principalmente por interacciones electrostáticas o enlaces de hidrógeno y (c) debido a la existencia de una compatibilidad termodinámica limitada entre la proteína y el polisacárido, el polisacárido se concentra en la proteína adsorbida (Baeza *et al.*, 2004; Dickinson, 2011).

El anclaje del polisacárido en la película interfacial puede ocurrir por el mecanismo a o b, dependiendo de la estructura química del polisacárido y del pH. Una vez que el polisacárido entra en la interfaz o se une por complejación, podría conducir a un aumento del potencial químico o modificación de la actividad termodinámica de la proteína en la interfaz. Por lo tanto, la proteína en la interfaz funcionaría como una película más concentrada, lo que llevaría a un aumento en la presión superficial. Incluso si el polisacárido no participa en la interfaz (es decir, no se adsorbe por sí mismo o no se compleja con proteína adsorbida), la existencia de una compatibilidad termodinámica limitada entre la proteína y el polisacárido en las proximidades de la interfaz podría conducir a la concentración de proteína adsorbida por un mecanismo de agotamiento (Rodríguez-Patino y Pilosof, 2011).

1.4.2. Emulsiones hechas con sistemas mixtos de proteína-polisacárido

Se ha demostrado que los complejos de proteína-polisacárido pueden tener mejores propiedades emulsificantes que si estos biopolímeros se utilizaran de manera individual (Guzey y McClements, 2006; Dickinson, 2011).

El sistema proteína-polisacárido se pueden unir entre sí mediante a) enlace covalente o b) interacciones electrostáticas. El método a) consiste en preparar una solución mixta de los biopolímeros, y luego usar el complejo proteína-polisacárido resultante como el agente emulsificante durante la homogeneización, también llamado “emulsiones mixtas”. El método b) consiste en preparar la emulsión inicialmente con proteína como agente emulsificante, mezclar la emulsión con la solución del polisacárido y permitir que el polisacárido se adsorba sobre la monocapa de proteína como una capa secundaria complejante definido como “emulsiones bicapa” (McClements *et al.*, 2007). Por lo tanto, existe un potencial para el uso de capas interfaciales mixtas en emulsiones que contienen hidrocoloides para el desarrollo de vehículos de entrega y protección de nutrientes, contra la degradación enzimática durante la digestión (Dickinson, 2008; Dickinson, 2011, Rodríguez-Patiño y Pilosof, 2011; Schmitt y Turgeon, 2011).

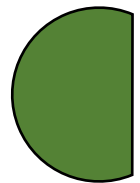
Las emulsiones que contienen gotas recubiertas con complejo proteína-polisacárido son más resistentes a diferentes cambios ambientales (pH, alta fuerza iónica y temperaturas elevadas) que las recubiertas con proteína sola (Harnsilawat *et al.*, 2006). La razón principal puede atribuirse al hecho de que las gotas están rodeadas por una capa gruesa y densa de complejo proteína-polisacárido fuertemente unido que conduce a un aumento de las repulsiones estéricas, así como a una disminución de la atracción van-der-Waals entre las gotas (Dickinson, 2008). Sin embargo, la desestabilización de la emulsión siempre se produce por floculación ya sea por una concentración baja o extremadamente alta de polisacárido (Jourdain *et al.*, 2008).



Capítulo 2

JUSTIFICACIÓN

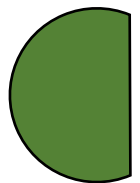
Las cáscaras, representan el principal desperdicio del proceso de extracción del grano de cacao, reflejando un serio problema ambiental e inoculo de enfermedades para el cultivo. Por ello, la valorización de este subproducto para la obtención de pectinas es cada vez más evidente, debido a las tendencias por obtener y caracterizar pectinas a partir de nuevas fuentes botánicas o bien de desechos agroindustriales con características fisicoquímicas similares o superiores a las obtenidas comercialmente. Se ha reportado sobre la obtención de pectina de cáscara de cacao utilizando diferentes condiciones de extracción y tipos de ácido, sin embargo, su aplicación se limita en las propiedades gelificantes y escasos estudios evalúan sus propiedades emulsificantes/estabilizantes, pero en emulsiones no alimentarias. Las pectinas son utilizadas como agentes estabilizantes en emulsiones, debido a que reducen los movimientos de las gotas al aumentar la viscosidad de la fase continua, sin embargo, en la interfaz aceite/agua exhiben baja difusidad y anclaje, esta dificultad no permite que las moléculas de pectina cubran la gota de aceite durante el proceso de homogeneización y en consecuencia se obtengan gotas de aceite grandes. Para contrarrestar este inconveniente, la utilización de hidrolizados de proteína de lactosuero, debido a su bajo peso molecular, anfifilicidad y su rápida difusidad hacia la interfaz aceite/agua, en combinación con las pectinas de cáscara de cacao, bajo condiciones especiales de pH y relación en peso entre ambos biopolímeros, se pueden formar complejos solubles, los cuales representan una alternativa de agente emulsificante/estabilizante natural mejorado, que potencializan las características de los biopolímeros que si se utilizan de manera individual y puede ser utilizados en el diseño y formulación de emulsiones grado alimenticio. Además, esta tecnología puede contribuir en la generación de conocimientos sobre la utilización de desechos agroindustriales con potencial uso.



Capítulo 3

HIPÓTESIS

El aprovechamiento de la actividad superficial de la pectina de cáscara de cacao, debida a la presencia de alto contenido de grupos hidrofóbicos acetilo y metilo y una fracción proteica en su estructura, permitirá la formación de complejos electrostáticos solubles con hidrolizados de proteína de lactosuero, que conduzcan a la formación de nanoemulsiones tipo aceite-en-agua, mejorando sus propiedades fisicoquímicas de estabilidad cinética respecto al uso individual de la pectina de cáscara de cacao como agente emulsificante.



Capítulo 4

OBJETIVOS

4.1. General

Evaluar las propiedades emulsificantes/estabilizantes de pectinas de cáscara de cacao y la modificación de estas mediante la complejación electrostática con hidrolizado de proteína de lactosuero, en la formación y estabilización de emulsiones aceite-en-agua grado alimenticio.

4.2. Específicos

- Caracterizar la estructura química de pectinas extraídas de la cáscara de cacao, mediante la determinación del contenido de los principales grupos funcionales que las conforman.
- Establecer las condiciones de relación en peso entre biopolímeros y pH para obtener un complejo soluble de hidrolizado de proteína de lactosuero HPS-PCC ($CS_{HPS-PCC}$).
- Evaluar las propiedades interfaciales de PCC y $CS_{HPS-PCC}$, mediante su comportamiento dinámico de adsorción interfacial.
- Evaluar las características funcionales de PCC y $CS_{HPS-PCC}$ de acuerdo con su capacidad de formación y estabilización de emulsiones aceite-en-agua grado alimenticio.



Capítulo 5

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Materiales y reactivos químicos

Frutos de cacao (*Theobroma cacao* L., variedad Trinitario), procedentes de la región de la Chontalpa del Estado de Tabasco, México, fueron cosechados y suministrados por la Asociación Local Agrícola de Productores de Cacao de “Huimanguillo” (ALAPCH), durante el mes de marzo de 2016. Esta región se encuentra localizada entre los 17° 49' latitud norte y los 93° 23' longitud oeste, presenta una elevación sobre el nivel del mar promedio de 10 m. La precipitación media anual y la temperatura es de 2,500 mm y de 23 °C, respectivamente, mientras que el tipo de suelo es gleysol, vertisol, cambisol y fluvisol. El clima, al igual que en la mayor parte del estado es cálido-húmedo, con abundantes lluvias en verano y de acuerdo con la clasificación de Köppen es del tipo A del subtipo Am. Hidrolizado de proteína de lactosuero (HPS; Hilmar™ 8390, 78 % de proteína en base seca, 5.5 % de grasa, 3.5 % de humedad, 4.5 % de cenizas, 3.0 % de lactosa y distribución de peso molecular de 70.8 % <1,000 daltons, 12.9 % de 1,000–5,000 daltons, 6.6 % de 5,000–20,000 daltons y 9.5 % > 20,000 daltons; Hilmer Cheese Company, Hilmar, CA, E.U.A.). Aceite de canola (O; Great Value, Wal-Mart, México, D.F.). Ácido cítrico (C₆H₈O₇), ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH), sulfato de magnesio hepta-hidratado (MgSO₄ • 7H₂O), ácido sulfúrico (H₂SO₄) y etanol del 96 %, fueron suministrados por J. T. Baker (Edo. de México, México). Ácido sulfámico (H₃NSO₃), sulfamato de potasio (K₂SO₄), tetraborato de sodio (Na₂B₄O₇), 3-fenilfenol (C₆H₅C₆H₄OH), solución de tartrato de carbonato de cobre (CTC), dodecilsulfato de sodio (NaC₁₂H₂₅SO₄), Folin–Ciocalteu y ácido D-galacturónico y albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich Química, S. de R. L. de C. V.; Toluca, Estado de México, México). En todos los experimentos se utilizó agua desionizada, libre de CO₂.

5.2.- Extracción y purificación de la pectina de cáscara de cacao

Se cortaron las vainas de cacao de manera longitudinal y se separaron manualmente las semillas de la cáscara. Las cáscaras se cortaron en trozos pequeños de aproximadamente 2 cm × 2 cm × 2 cm, se deshidrataron en un horno con circulación de aire (Riossa Digital, HCF- 62, Nuevo León, México) a 55 °C hasta peso constante (36 – 48 h). Estas piezas de cáscara secas fueron pulverizadas en un molino para nixtamal y grano (Nixtamatic^{MR}, Ciudad de México, México) utilizando tamices sucesivos de 2 mm y 1 mm. El material final que pasó a través del tamiz de 1 mm fue denominado como harina de cáscaras de cacao (HCC).

La pectina de cáscara de cacao se extrajo de la HCC por hidrólisis ácida de acuerdo a la metodología propuesta por Vriesmann *et al.* (2012), con ligeros cambios. Brevemente 100 g de HCC se mezclaron con 2.5 L de ácido cítrico (relación sólido-líquido de 1:25 p/v) y se colocaron en un baño de agua con agitación constante. Las condiciones de extracción fueron: pH de 3.0, temperatura y tiempo de extracción de 85 °C y 90 min, respectivamente. El extracto resultante se enfrió a temperatura ambiente (23 ± 2 °C) y se filtró usando una tela sintética. Posteriormente el extracto fue centrifugado a $8,000 \times g$ por 10 min (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburg, Alemania), y se descartó el precipitado (impurezas). Al supernadante se le añadió etanol 96 % en una proporción de 2:1 v/v y se mantuvo durante 24 h a 4 ± 1 °C, para permitir la precipitación de la pectina (Muhammad *et al.*, 2014).

A continuación, la pectina se separó por filtración a través de papel filtro Whatman N° 1 y se lavó dos veces con etanol al 70 % en una proporción de 1:1 v/v para la eliminación de azúcares libres, oligosacáridos de bajo peso molecular, pigmentos y otras impurezas. El excedente de alcohol fue eliminado por centrifugación a $8,000 \times g$ por 25 min a 20 °C, y se descartó el supernadante; el sobrenadante se secó a 35 ± 1 °C durante 24 h en un horno con circulación de aire. La pectina seca se molió en un mortero con el fin de obtener un polvo fino.

El rendimiento de extracción se estimó acorde a la siguiente Ecuación (1).

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left(\frac{\text{Pectina en polvo (g)}}{\text{Harina de cáscara de cacao (g)}} \right) \times 100 \% \quad \dots (1)$$

El contenido de humedad de PCC se determinó en un analizador de humedad (Ohaus, MB23, Parsippany, N.J., E.U.A.) mediante el secado de la muestra a 105 °C, hasta alcanzar peso constante (Food Chemical Codex, 1996).

5.3.- Caracterización fisicoquímica de la pectina de cáscara de cacao

5.3.1.- Determinación del grado de esterificación (GE), grado de amidación (GAmd) y grado de acetilación (GAc)

El grado de esterificación (GE), grado de amidación (GAmd) y el grado de acetilación (DAc) de PCC fue determinado acorde a lo informado por Hua *et al.* (2015), con ligeras modificaciones. Dispersiones de pectina (0.500 mg/100 mL de agua desionizada) se valoraron con

NaOH 0.1 mol/L utilizando fenolftaleína como indicador y el volumen consumido fue registrado como “V1”. Después, la pectina fue saponificada con la adición de 20 mL de NaOH 0.5 mol/L y se dejó reaccionar por 15 min en agitación constante; la reacción se detuvo con la adición de 20 mL de HCl 0.5 mol/L. El HCl excesivo se valoró con NaOH 0.1 mol/L y el volumen consumido fue registrado como “V2”. Posteriormente, la solución se saturó con 20 mL de NaOH 2.5 mol/L y se mezcló en un matraz de destilación de 1,000 mL y se conectó a un condensador, cuya línea de suministro fue sumergido en una mezcla de 150 mL de agua y 20 mL de HCl 0.1 mol/L. La mezcla se destiló hasta que se recogieron ~100 mL del destilado. El HCl excesivo se valoró con NaOH 0.1 mol/L utilizando rojo de metilo como indicador y el volumen consumido fue registrado como “S”. Un ensayo en blanco se realizó usando 20 mL de HCl 0.1 mol/L y el volumen consumido de HCl fue registrado como “B”. La diferencia de B y S se asumió como “V3”.

Para determinar la cantidad de acetyl, 0.500 mg de PCC se dispersó en 25 mL de NaOH 0.125 mol/L, después de agitar durante 4 h, la solución se diluyó en un matraz aforado de 50 mL. Una alícuota de 20 mL de solución diluida y 20 mL de solución Clark (100 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.8 mL de H_2SO_4 y 180 mL de H_2O), se transfirieron a un matraz de destilación de 1,000 mL y se recogieron los primeros 15 mL del destilado en una probeta graduada. Inmediatamente se inició el suministro de vapor y se continuó la destilación hasta obtener 150 mL del destilado. El destilado se valoró con NaOH 0.05 mol/L hasta alcanzar un pH de 8.5 y el volumen consumido se registró como “A”. Agua desionizada se utilizó como blanco para la titulación y el volumen consumido se registró como “A₀”. La diferencia de A y A₀ se asumió como “V4” (Ecuaciones 2-4).

$$\% GE = \frac{V2 (mL)}{V1(mL) + V2(mL) + V3(mL) - V4(mL)} \times 100 \quad \dots (2)$$

$$\% GAm d = \frac{V3 (mL)}{V1(mL) + V2(mL) + V3(mL) - V4(mL)} \times 100 \quad \dots (3)$$

$$\% GA c = \frac{V4 * 10^{-3}(L) \times 0.05 \left(\frac{mol}{L}\right)}{0.500 (g) \times 0.821} \times 194.14 (g/mol) \times 100 \quad \dots (4)$$

5.3.2.- Porcentaje grupos metoxilo

El porcentaje de grupos metoxilo (% GM) fue determinado acorde a Zouambia *et al.* (2017). El GM se encuentra relacionado con el GE, debido a que la cantidad de grupos metoxilo en 100 % de pectina esterificada es de 16.32 %. El porcentaje de metoxilación fue calculado con base a la siguiente ecuación (5).

$$\% GM = \frac{16.32}{100} \times GE \quad \dots (5)$$

5.3.2.- Determinación de ácido galacturónico

El contenido de ácido galacturónico fue estimado por el método colorimétrico de sulfamato/3-fenilfenol, acorde a lo informado por Filisetti-Cozzi y Carpita (1991). A 0.4 mL de PCC (100 µg/mL) se añadieron 40 µL de solución de sulfato de potasio 4 M a pH 1.6, y luego se añadieron 2.5 mL de solución de tetraborato de sodio 75 mM disuelto en H₂SO₄ y se agitó vigorosamente con un vórtex (Vortex Genie, Modelo G560, Scientific Industries Inc., New York, EUA) durante 1 min y la mezcla se enfrió a temperatura ambiente en un baño de hielo. Después los tubos se incubaron en agua hirviendo durante 15 min, y la reacción se detuvo enfriándolos en baño de hielo durante 1.0–1.5 min. Finalmente, se añadieron 80 µL de 3-fenilfenol 0.5 % (p/v) disueltos en NaOH 0.5 % (p/v), la muestra se mezcló vigorosamente en el vórtex antes de leer su absorbancia a 525 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, EUA). La cuantificación del ácido galacturónico se realizó utilizando ácido D-galacturónico como estándar (Sigma-Aldrich México, Toluca, Estado de México, México).

5.3.4.- Determinación del contenido de proteína

El contenido de proteína fue determinado por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Primero se añadieron 0.5 mL de PCC (0.01 g/mL) y 0.5 mL de agua desionizada en tubos de vidrio ámbar. Después se adicionó 1 mL de solución A (CTC (CuSO₄ • 5H₂O al 0.1 %, tartrato de Na K al 0.2 %, Na₂CO₃ al 10 %. Se disolvió el Na₂CO₃ en la mitad del volumen final y se agregó lentamente a la solución de CuSO₄ con agitación), NaOH 0.8 N y dodecil sulfato de sodio al 10 %) se agitó vigorosamente en un vórtex durante 1 min y se dejó reposar durante 10 min. Posteriormente, a la mezcla, se añadieron 0.5 mL de solución B (reactivo Folin-Ciocalteu 0.3 N) a cada uno de los tubos de vidrio ámbar y se agitó vigorosamente en un vórtex durante 1 min. Finalmente, las absorbancias se leyeron a 750 nm en un espectrofotómetro después de 30 min de

reposo, utilizando albúmina de suero bovina (BSA, por sus siglas en inglés) como estándar (Sigma-Aldrich México, Toluca, Estado de México, México). Los valores de absorbancia se corrigieron multiplicando por un factor de dilución de 2.

5.3.5.- Viscosidad intrínseca y estimación del peso molecular viscosimétrico medio

La determinación de la viscosidad intrínseca $[\eta]$ se realizó acorde al procedimiento de Cuevas-Bernardino *et al.*, 2016 con ligeras modificaciones. Se prepararon soluciones patrón de dispersiones de PCC (0.1 % p/v) en agua desionizada (100 mM NaCl), bajo agitación magnética durante 30 min o hasta su completa dispersión y almacenadas a 25 °C por 24 h, para asegurar la completa hidratación.

Esta solución patrón fue diluida en un intervalo de concentración de 0.001- 0.1 g/100 mL. Muestras diluidas fueron vigorosamente agitadas por lo menos 15 min antes de las mediciones de viscosidad. La viscosidad fue determinada utilizando un reómetro Physica MCR 301 (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania) usando una geometría de cilindros concéntricos DG26.7 con doble *gap* a una velocidad de corte de 62.1 s⁻¹, dejando reposar la muestra por 5 min para la recuperación de su estructura y equilibrio a una temperatura de 25 °C con ayuda de un sistema peltier (Physica TEK 150P), antes de cada medición.

La viscosidad relativa (η_{rel}), específica (η_{esp}) y reducida (η_{red}), fueron calculados de acuerdo a las siguientes Ecuaciones (6-8):

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_1}{\eta_0} \quad \dots (6)$$

$$\eta_{esp} = \left(\frac{\eta_1}{\eta_0} \right) - 1 \quad \dots (7)$$

$$\eta_{red} = \frac{\left(\frac{\eta_1}{\eta_0} \right) - 1}{C} \quad \dots (8)$$

Donde η_1 es la viscosidad de la solución de pectina, η_0 es la viscosidad del solvente (solución de NaCl 100 mM) y C es la concentración de la pectina.

La viscosidad intrínseca $[\eta]$ fue calculada extrapolando linealmente la viscosidad reducida a concentración cero. La viscosidad intrínseca está relacionada con el peso molecular (PM) a través de la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (Ecuación 9):

$$[\eta] = k'(PM)^\alpha \quad \dots (9)$$

Donde k' y α son constantes empíricas, que dependen de la temperatura, así como el sistema de polímero-disolvente y corresponden a valores de $5.08 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-4}$ y 0.71 ± 0.02 dL/g, respectivamente (Cuevas-Bernardino *et al.*, 2016). Cabe aclarar que estas constantes se pueden utilizar para determinar el peso molecular viscosimétrico medio de pectinas, si se mantienen las condiciones del sistema (25 °C y una solución de 100 mM de NaCl como disolvente).

5.4.- Preparación de complejos solubles

Se prepararon soluciones patrón de PCC y HPS (1.0 % p/p) y se almacenaron a 4 °C durante 24 h para asegurar su completa hidratación. Estas soluciones patrón se diluyeron con agua desionizada hasta la concentración requerida para el experimento dado.

El potencial- ζ de las soluciones acuosas de biopolímeros (0.05 % p/p) se determinó con un Zetasizer Nano ZS90 acoplado a un autotitulado MTP-2 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, Reino Unido) a valores de pH entre 2.0 y 7.0 a 25 °C. El pH de las soluciones se ajustó al valor deseado mediante la adición de NaOH 0.1 N o HCl 0.1 N. El potencial- ζ se determinó midiendo la dirección y la velocidad de las soluciones biopoliméricas a medida que se desplazaban a lo largo de un campo eléctrico aplicado. El software del equipo convirtió las medidas de movilidad electroforética en valores de potencial- ζ utilizando el modelo matemático de Smoluchowski.

Posteriormente, se graficaron los valores de potencial- ζ vs pH para comprender la fuerza motriz de interacción electrostática entre el HPS y la PCC. El pH en el que se produjo la máxima diferencia estequiométrica entre el potencial- ζ positivo de HPS y el potencial- ζ negativo de PCC (pH_{esteq}) fue seleccionado como el pH para conducir la interacción electrostática entre ambos biopolímeros. Sin embargo, la complejación entre biopolímeros cargados opuestamente no únicamente depende del pH, sino también de la relación en peso entre la interacción entre biopolímeros (Turgeon *et al.*, 2007).

Con la finalidad de determinar la relación en peso entre HPS y PCC ($R_{\text{HPS-PCC}}$) que condujera a la formación de complejos solubles (CS), 10 mL de solución de PCC (0.02 mg/mL) a pH_{esteq} , fue transferido al autotitulado MTP-2 y se fue titulado con soluciones de HPS (0.5 mg/mL) a pH_{esteq} , midiendo los cambios en potencial- ζ y diámetro hidrodinámico (d_h) de las mezclas HPS-PCC conforme se fueron añadiendo alícuotas de ~0.25 mL de HPS a la dispersión de PCC. El d_h fue determinado con un Zetasizer Nano ZS90 y calculado de acuerdo a la ecuación de Einstein–Stokes.

La $R_{\text{HPS-PCC}}$ seleccionada para la formación de CS fue aquella en la que el d_h permaneció prácticamente constante, hasta antes de comenzar un incremento drástico.

5.5.- Viscosidad aparente

La viscosidad aparente de soluciones de PCC y $\text{CS}_{\text{HPS-PCC}}$ (1.0 % p/p) se determinó en un reómetro utilizando una geometría de cilindros concéntricos con doble gap y aplicando una velocidad al corte de 50 s^{-1} , ya que se ha informado que este valor, puede representar una aproximación de la sensación percibida en la boca (Wang *et al.*, 2016).

5.6.- Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier

Muestras en polvos de PCC, HPS y $\text{CS}_{\text{HPS-PCC}}$ fueron sometidas a análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés) para determinar los principales grupos funcionales. El espectro FT-IR fue obtenido usando un espectrómetro (Frontier FT-IR/FIR, Perkin Elmer, Waltham, MA, E.U.A.) equipado con un accesorio de muestreo de diamante universal ATR (reflexión total atenuada, por sus siglas en inglés). Aproximadamente, 0.2 g de muestra fueron colocados sobre la plataforma de medición, las cuales entraron en contacto con el accesorio del espectrómetro ATR y se prensaron a un ajuste de 60 unidades de fuerza. Se realizaron mediciones en un intervalo de frecuencia de $4,000$ a 400 cm^{-1} y una resolución de 4 cm^{-1} . Se registraron 40 escaneos por muestra los cuales se integraron para obtener valores medios del espectro. Para mejorar la resolución de los espectros se les corrigió la línea base y se deconvolucionó con el software del equipo.

5.7.- Tensión interfacial dinámica

La dinámica de adsorción interfacial de PCC y $\text{CS}_{\text{HPS-PCC}}$ (1.0 % p/p) en la interfaz aceite de canola/agua se determinó por seguimiento de la evolución de la tensión interfacial (γ) con el tiempo (θ). El método utilizado fue el descrito por Tang y Shen (2015), con ligeras modificaciones. Se utilizó el medidor de ángulo de contacto óptico OCA-20, equipado con un accesorio de gota oscilante ODG-20 (Dataphysics Instruments GmbH, Filderstadt, Alemania). Una gota de $\sim 40 \mu\text{L}$ de PCC y $\text{CS}_{\text{HPS-PCC}}$ se formaron automáticamente con ayuda de una jeringa dentro de una cubeta de vidrio que contenía la fase de aceite de canola purificado. Agua desionizada fue utilizada como líquido testigo ($\gamma = 29.5 \pm 0.5 \text{ mN/m}$). La forma de la gota fue analizada para registrar los cambios

en la tensión interfacial por un periodo de 10,800 s (3.0 h) con una cámara CCD. Los experimentos se llevaron a cabo a 25 °C.

5.8.- Preparación y caracterización de emulsiones

5.8.1.- Preparación

Emulsiones aceite-en-agua (O/W) fueron preparadas usando PCC y CS_{HPS-PCC} (1.0 % p/p) a pH 3.25 como agentes emulsificantes (fase continua; W) y aceite de canola como fase oleosa (fase dispersa; O). Se formularon emulsiones O/W modelo, cuya fracción másica (ϕ) fue de 0.1. Estas emulsiones modelo fueron codificadas como E_x; donde “x”, representa el agente emulsificante utilizado.

Las E_x se prepararon incorporando gota a gota la fase dispersa con agitación controlada a las distintas fases continuas usando un homogeneizador (Ultra-Turrax® T50 basic IKA Works, Inc. Wilmington, E.U.A.), operado a 8,000 rpm por 3 min, para formar la emulsión gruesa, que subsecuentemente fue homogeneizada usando un homogeneizador de alta presión (Microfluidics® M-110P, Newton Massachusetts, E.U.A.) operado a 100 MPa, por tres ciclos. Se utilizó un baño de hielo para evitar el incremento de la temperatura durante la formación de las E_x. Las E_x se almacenaron a 4 ± 1 °C para su análisis posterior.

5.8.2.- Caracterización de las emulsiones

5.8.2.1.- Diámetro superficial medio

El diámetro superficial medio ($d_{3,2}$) de las E_x recién preparadas se verificó utilizando un analizador de tamaño de partícula por difracción láser estático (Malvern Mastersizer 3000, Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Los índices de refracción de las fases continuas y dispersa utilizadas en los cálculos fueron 1.466 y 1.330, respectivamente, determinados con un refractómetro (refractómetro ABBE 5, Modelo 44-501, American Optical Co., E.U.A.). Los cambios en el $d_{3,2}$ de las E_x fue monitoreado inmediatamente después de su preparación, y luego a los 1, 7, 14, 21 y 28 días, a temperatura de 4 ± 1°C.

5.8.2.2.- Índice de cremado

El índice de cremado de las E_x se evaluó en una centrífuga LUMiSizer (LUM GmbH, Berlín, Alemania), un instrumento que emplea la fuerza centrípeta para acelerar los fenómenos de

inestabilidad de las emulsiones, debido a fenómenos de agregación (Yuan *et al.*, 2013). Los parámetros instrumentales utilizados para las mediciones fueron los siguientes: 0.4 mL de E_x colocadas en la celda; velocidad de rotación 3,000 rpm; 255 mediciones determinadas a intervalos de tiempo de 30 s y temperatura de 25 °C (Xu *et al.*, 2012). El índice de cremado se obtiene a partir de una pendiente proporcionada por el software informático del equipo, que integra el porcentaje de luz transmitida desde la celda por hora y proporciona un valor cuantitativo que se correlaciona con la estabilidad de la emulsión: cuanto mayor fue el índice de cremado, menor fue la estabilidad de la emulsión (Yuan *et al.*, 2013).

5.8.2.3.- Potencial zeta

El potencial- ζ de las E_x recién preparadas se determinó con un equipo Zetasizer Nano ZS90. Muestras de las E_x, fueron diluidas en agua desionizada (relación 1:100 v/v), se llenaron en una celda de prueba (Folded capillary cells. DTS 1061, Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, Reino Unido) y se colocaron en el equipo de medición.

5.8.2.4.- Viscosidad aparente

La viscosidad aparente de las E_x se determinó después de un día de preparación, el procedimiento fue acorde a lo informado en la sección 5.5. Aproximadamente 3.7 mL de las E_x, se colocaron cuidadosamente en el sistema de medición, se dejaron reposar por 5 min para la recuperación de su estructura y equilibrio y posteriormente se procedió con la medición.

5.9.- Análisis estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado de tres experimentos independientes usando un diseño experimental aleatorio y los valores fueron expresados como valores medios \pm desviación estándar. Los valores se sometieron a análisis de varianza de clasificación simple y en casos pertinentes a análisis de comparación de medias por medio de la prueba Tukey. La significancia fue establecida como $p \leq 0.05$. El análisis de los datos se llevó a cabo en el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia, E.U.A.).



Capítulo 6

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1.- Características fisicoquímicas de la pectina de cáscara de cacao

La identificación y caracterización de biopolímeros que puedan ser utilizados como agentes emulsificantes es fundamental para determinar la capacidad que tienen estos de formar y estabilizar emulsiones grado alimentario. Los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica de la pectina de cacao se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de la pectina extraída de la cáscara de cacao.

	PCC
GE (%)	83.22 ± 0.96
GAmd (%)	0.62 ± 0.09
GAc (%)	10.20 ± 0.33
GM (%)	13.58 ± 0.16
Ácido galacturónico (%)	70.01 ± 0.20
Proteína (%)	3.68 ± 0.22
Humedad (%)	4.94 ± 0.30
Rendimiento (g/100 g)	6.18 ± 0.31
Viscosidad aparente (Pa·s) *	0.07042
Viscosidad intrínseca (dL/g)	8.82
Peso molecular viscosimétrico (kDa)	255.85

* Determinada a una tasa de corte de 50 s⁻¹ y a una concentración de 1.0 % p/v

Los porcentajes son tomados en base seca

El rendimiento de pectina extraída de la cáscara de cacao, así como de las características fisicoquímicas y funcionales dependen de diversas condiciones de extracción, entre las más importantes se podrían citar: el pH, el tiempo, la temperatura, el tipo de ácido y la relación de extracción de sólido a líquido (Alba y Kontogiorgos, 2017). En este estudio, se decidió evaluar el ácido cítrico (ácido orgánico) en el proceso de extracción de PCC a fin de utilizar un procedimiento de extracción amigable con el ambiente. Diversos autores, como Vriesmann *et al.* (2012) y Chan y Choo, (2013) han informado que la extracción con ácido cítrico de pectinas de cáscara de cacao es más eficaz que cuando se utilizan ácidos minerales en términos de rendimiento y propiedades fisicoquímicas, independientemente de los beneficios ambientales.

El rendimiento que se obtuvo en la extracción de PCC, en este estudio fue de 6.18 g/100 g en base seca, superiores a los 3.7 g/100 g reportados por Yapo y Koffi, (2013) cuando utilizan ácido nítrico; y a los 4.06 g/100g informados por Barazarte *et al.* (2008), quienes utilizaron ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). No obstante, Vriesmann *et al.* (2012), utilizando ácido cítrico reportan rendimientos de 11 g/100g.

El contenido de ácido galacturónico fue superior al 65 %, que es el requerimiento mínimo para aplicaciones alimentarias (Schmidt *et al.*, 2017). Estos resultados están acordes a lo informado por diversos autores: Vriesmann *et al.* (2012) reportan rendimientos de 54.4 a 68.9 % utilizando ácido cítrico; Vriesmann *et al.* (2011) de 50.6 a 82.5 % y Yapo y Koffi, (2013) de 50.9 a 74.8 %, estos dos últimos utilizando ácido nítrico. Los intervalos mencionados, son obtenidos a diversas condiciones de extracción (tiempo, temperatura y pH). Por lo tanto, el rendimiento y contenido de ácido galacturónico, dependen del tipo de ácido utilizado y de las condiciones de tiempo, temperatura y pH de extracción.

El GE de PCC fue de 83.22 %, por lo que pueden ser clasificadas como pectinas de alto metoxilo (GE > 50 %). Esto indica que más del 50 % de los grupos carboxilos se encuentran esterificados con grupos metilo (Hua *et al.*, 2015). Estos resultados están en discrepancia con los reportados por varios autores quienes informan valores de GE en un intervalo de 36.7 %–56.6 % (Vriesmann *et al.*, 2011; Vriesmann *et al.*, 2012; Yapo y Koffi, 2013). Se ha informado que la presencia de grupos metoxilo puede mejorar la naturaleza hidrófoba de las moléculas de pectina, dándole un carácter superficial activo, con potencial para actuar como agente interfacial en la formación y estabilización de emulsiones aceite-en-agua (Burapapadh *et al.*, 2012).

El GAmD de PCC fue de 0.62 %, valor inferior para lograr una eficiencia en la liberación de compuestos de aromáticos (alcoholes, cetonas, aldehídos y ésteres) como lo informan Kim *et al.* (2016) para pectinas con 14 % de grado de amidación.

Pectinas altamente acetiladas pueden favorecer la mejora en las propiedades emulsificantes, como ocurre con SBP (Leroux *et al.*, 2003; Alba y Kontogiorgos, 2017; Chen *et al.*, 2016a; Chen *et al.*, 2016b), cuyo grupo hidrófobo (grupo acetilo, principalmente) juega un papel significativo en la mejora de la actividad interfacial de dichas pectinas. De hecho, Ralet *et al.* (2005) han informado que aproximadamente el 75 % de todos los grupos acetilo se encuentran en el HG y el 25 % en el RG-I de la pectina extraída. Zouambia *et al.*, (2009) han reportado valores de grado de acetilación mayores a 20 % para SBP y en las cuales la tensión superficial se redujo; mientras que Alba y

Kontogiorgos, (2017) mencionan que con 10 % de grado de acetilación como mínimo, las pectinas mejoran considerablemente las propiedades emulsificantes. En este sentido, Yapó y Koffi (2013) han informado que pectinas de cáscara de cacao con grado de acetilación de 9.8 %, poseen buenas propiedades emulsificantes en emulsiones no alimentarias, a diferencia de aquellas de otras fuentes como las pectinas de cáscara de cítricos y de manzana en las que tienen que ser modificadas química o enzimáticamente para reducir el peso molecular y puedan ser utilizados como agentes emulsificantes. Por otra parte, Vriesmann y Petkowicz, (2013), han informado de pectinas de cáscara de cacao con alto grado de acetilación (17 %), sin embargo, solo se enfocan en las propiedades de gelificación y no en la formación y estabilización de emulsiones grado alimenticio.

El GAc de PCC que se obtuvo en esta investigación fue de 10.20 % y con base en lo mencionado anteriormente se puede inferir que dichas pectinas pueden tener efecto significativo en la reducción de la tensión interfacial, así como en la estabilización de emulsiones O/W. En conclusión, la pectina sufre importantes cambios estructurales durante los procedimientos de extracción (Munarin *et al.*, 2012). Con base en las características informadas anteriormente, se propone un modelo esquemático hipotético de la estructura química de PCC (Figura 5).

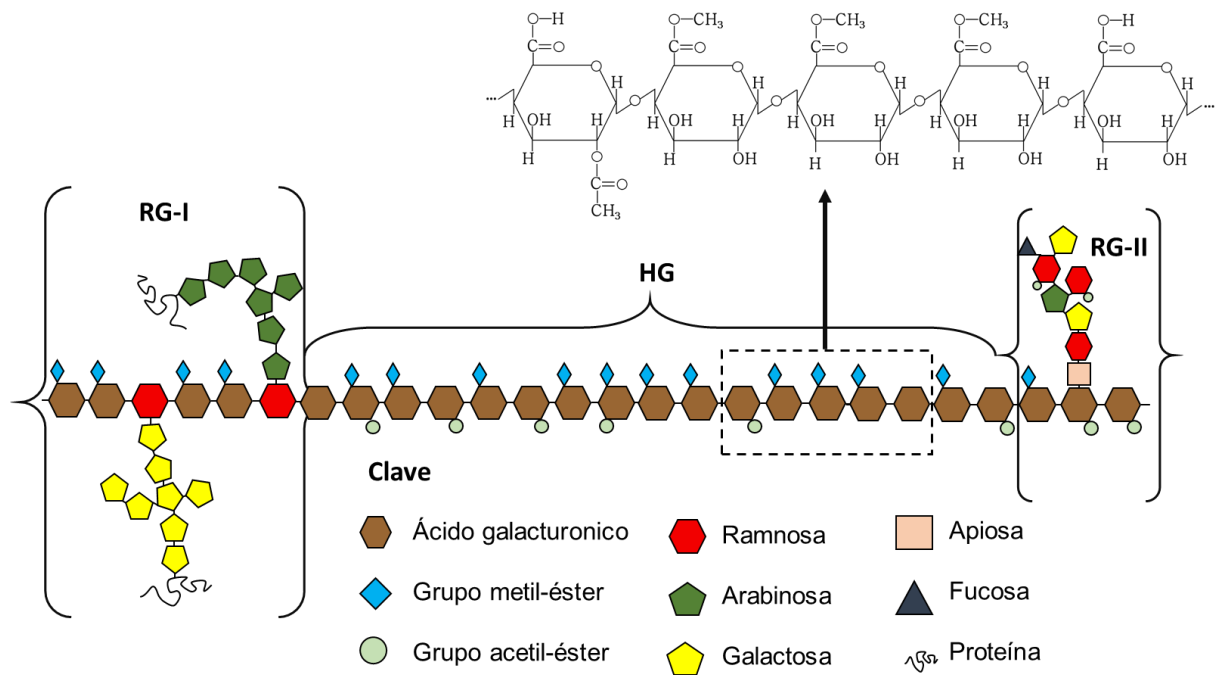


Figura 5.- Representación esquemática hipotética de la estructura química de la pectina de cáscara de cacao (PCC).

6.2.- Viscosidad intrínseca y estimación del peso molecular viscosimétrico

El comportamiento de la viscosidad reducida vs concentración de soluciones diluidas de PCC se estudiaron con la finalidad de obtener su viscosidad intrínseca $[\eta]$ y se detallan en la Figura 6.

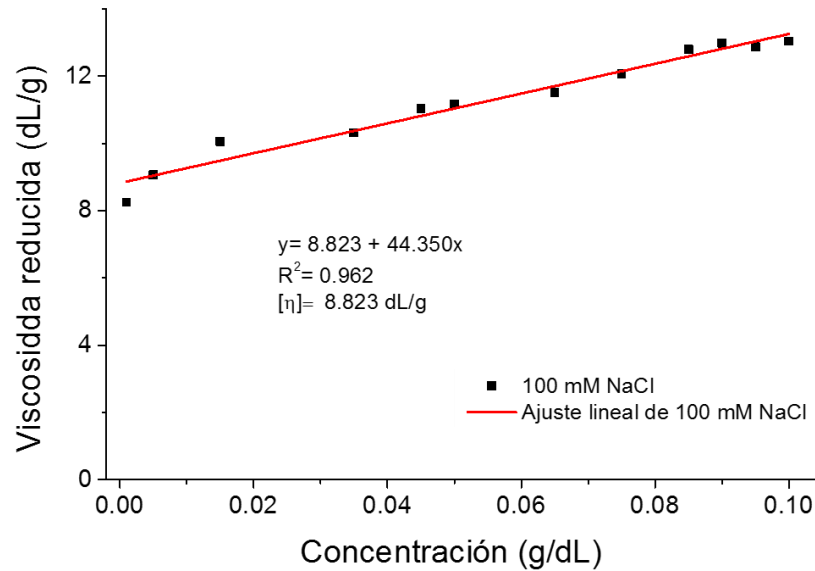


Figura 6.- Viscosidad reducida *versus* concentración de pectina de cáscara de cacao (PCC), dispersadas en soluciones acuosas de 100 mM de NaCl. La línea continua muestra una relación lineal entre la viscosidad reducida y la concentración de PCC.

Tras la dilución en agua pura, polielectrolitos como pectinas inicialmente muestran una disminución en la viscosidad reducida (η_{red}) seguido de un aumento, debido a una expansión de las cadenas en forma de espiral de la pectina por la repulsión mutua entre cargas similares unidas a la misma cadena (Cuevas-Bernardino *et al.*, 2016). La adición de cloruro de sodio se usa comúnmente para reducir o eliminar los cambios conformacionales con la concentración de polielectrolitos, y se produce una dependencia lineal de la viscosidad reducida sobre la concentración de polielectrolitos (Pasika, 1977). Esto se debe a que los contraiones Na^+ detectan las interacciones iónicas y las moléculas adoptan una conformación más compacta en solución y, por lo tanto, el valor de $[\eta]$ disminuye (Brunchi *et al.*, 2014). $[\eta]$ mide el volumen hidrodinámico por gramo de sustancia macromolecular a dilución infinita, y se obtiene cuando los datos de η_{red} se extrapolan a concentración "cero", donde teóricamente se suprimen las interacciones moleculares de los polímeros.

$[\eta]$ es una característica relacionada con el peso molecular y la conformación de biopolímeros (Yang y Zhang, 2009). Las conformaciones de la pectina incluyen espirales al azar, esferas, barras rígidas y pueden afectar el mecanismo de adsorción en la interfaz aceite/agua (Yapo y Koffi, 2013; Liu *et al.*, 2017).

$[\eta]$ y el peso molecular viscosimétrico (PM) de PCC fueron 8.82 dL/g y 255.85 kDa, respectivamente. Estos valores son más altos que los reportados por Yapo y Koffi (2013) para la pectina de las cáscaras de cacao que fueron de 1.62–3.04 dL/g para $[\eta]$ y de 43–82 kDa para PM. Las diferencias se pueden atribuir al método de extracción, origen, variedad del género *Theobroma* y condiciones edafoclimáticas.

6.3.- Potencial zeta de dispersiones stock y formación de complejos solubles.

El potencial- ζ describe la magnitud de la carga existente sobre una partícula coloidal; es calculado a partir de la movilidad electroforética de un coloide. La presencia de interacciones de atracción proteína- polisacárido en interfaz aceite/agua puede influir profundamente en la estabilidad de emulsiones (Schmitt y Turgeon, 2011; Hernández-Marín *et al.*, 2013), por lo que es importante determinar las características eléctricas de estos biopolímeros. Para ello se realizó un barrido de pH vs potencial- ζ de las distintas dispersiones biopoliméricas de PCC y HPS, las cuales se presentan en la Figura 7.

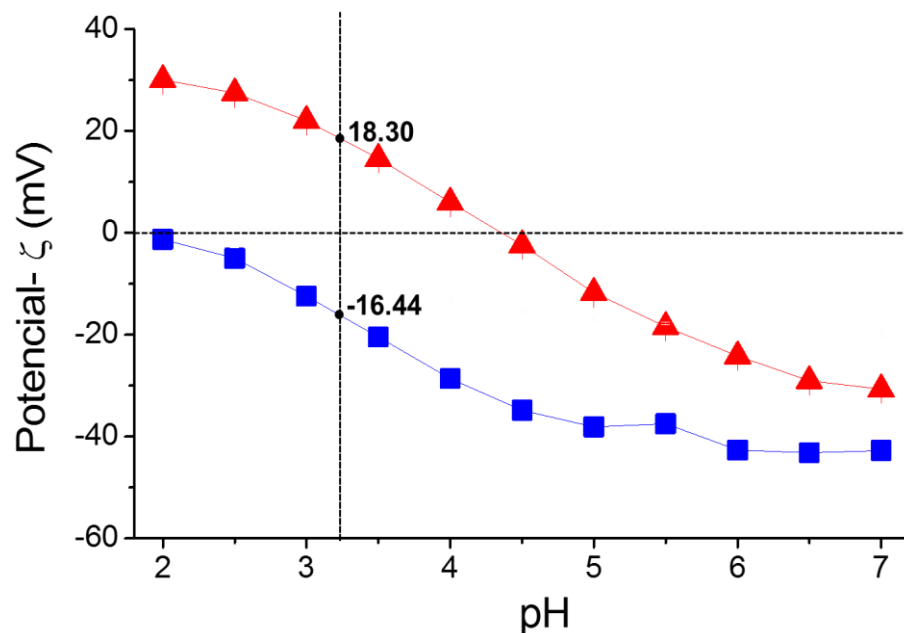


Figura 7.- Variación del potencial- ζ como función del pH de dispersiones de HPS (▲) y PCC (■).

Como se muestra en la Figura 7, los valores de potencial- ζ para dispersiones de PCC fueron negativos en todo el intervalo de pH estudiado, debido a los bajos valores de pK_a de sus grupos carboxilo. Los valores de potencial- ζ presentados por PCC están acordes a los reportados por Jones *et al.* (2010) para pectinas de alto metoxilo. Incrementos en la magnitud de los valores negativos de potencial- ζ al aumentar el pH, reflejaron la conversión de los grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$) presentes a bajos valores de pH, en grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$) conforme aumentó el pH. El valor de pH relacionado con la pendiente máxima de la curva de potencial- ζ de las dispersiones de PCC estuvo en un intervalo de pH entre 3.0 a 4.0 y se encuentra relacionado aproximadamente con el pK_a de las soluciones del polisacárido (Jones *et al.*, 2010). Particularmente a estos valores de pH puede haber una mayor fuerza de interacción entre moléculas de PCC si se acompleja con alguna proteína.

El potencial- ζ de HPS varió de 30.0 ± 0.75 mV a $\text{pH} = 2.0$ hasta -30.7 ± 1.2 mV a $\text{pH} = 7.0$. Un valor de potencial- ζ cero se produjo en el punto isoeléctrico (pI ; pH de 4.27). Los valores de potencial- ζ negativos que se produjeron a valores de $\text{pH} > pI$ se pueden atribuir a la ionización de los grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$) en grupos carboxilatos ($-\text{COO}^-$); mientras que los valores de potencial- ζ positivos a valores de $\text{pH} < pI$ son debidos a la protonación de los grupos amino ($-\text{NH}_2$) resultando en grupos amonio ($-\text{NH}_4^+$). Esta tendencia concuerda con lo reportado para proteínas de lactosuero (Jones *et al.*, 2010; Hernández-Marín *et al.*, 2013).

El pH del medio afectó fuertemente la densidad de carga de los biopolímeros estudiados, lo que repercute en consecuencia en la fuerza de acomplejamiento o interacción entre los mismos. El intervalo de pH en el cual los biopolímeros (HPS y PCC) presentaron cargas eléctricas de signo opuesto, ocurre de $\text{pH} 2.0$ a $\text{pH} <$ del pI del HPS (Figura 7). De acuerdo con la ventana de interacción entre el HPS cargado positivamente y la PCC cargada negativamente, el pH en el que se produce la máxima diferencia estequiométrica fue de 3.25, por lo tanto, este valor se usó como pH_{esteq} , para la formación de los complejos solubles, ya que a este valor aún existe diferencia de cargas eléctricas entre los biopolímeros.

Para proporcionar información sobre la influencia de la relación en peso entre el HPS y PCC ($R_{\text{HPS-PCC}}$) en la formación de complejos solubles, se midieron los cambios en el potencial- ζ y diámetro hidrodinámico (d_h), cuando una dispersión de PCC (0.02 mg mL^{-1}) se valora con una dispersión de HPS (0.5 mg mL^{-1}) a pH_{esteq} (Figura 8).

Inicialmente, la dispersión de PCC era completamente transparente y las moléculas de pectina exhibían un d_h de 2,173 nm y un potencial- ζ de -20.83 mV (Figura 8). Al agregar la

dispersión de HPS a la dispersión de PCC, se reveló la aparición progresiva de dos fases principales de complejación: (1) la primera fase (llamada región A) comprendida entre $R_{0.24:1}$ a $R_{5:1}$, donde el d_h del sistema HPS-PCC disminuyó ligeramente, después de lo cual alcanzó una meseta con valores de alrededor de 821 nm, mientras que los valores de potencial- ζ variaron de -19.96 mV a -10.38 mV, lo que indica que la carga negativa del sistema disminuyó. En esta región, el aspecto óptico (cualitativo) del sistema HPS-PCC era una dispersión uniformemente turbia. La disminución del diámetro hidrodinámico de PCC podría deberse a la contracción de la molécula de pectina, que se vuelve menos expandida a medida que el HPS interactúa con los grupos carboxílicos de este polisacárido (Weinbreck *et al.*, 2003). No todos los restos cargados negativamente de PCC son neutralizados por los restos cargados positivamente del HPS, de modo que los complejos formados poseen una carga neta negativa y por lo tanto permanecen solubles en la mayor parte de la fase acuosa (Weinbreck *et al.*, 2003).

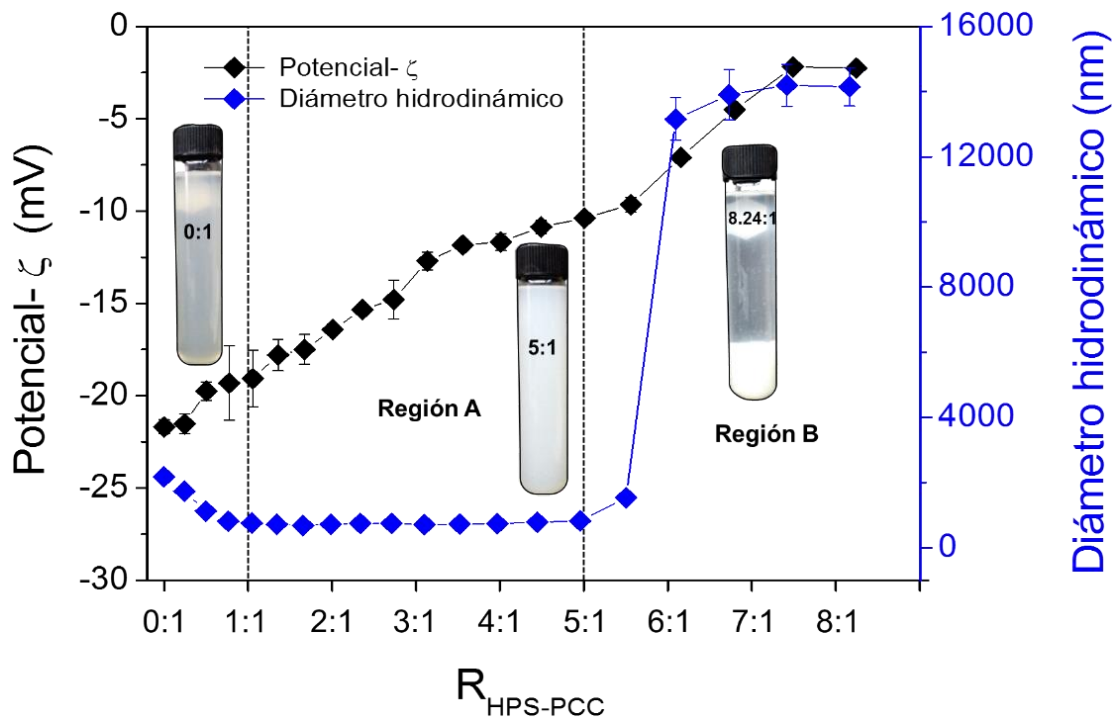


Figura 8.- Evolución del potencial- ζ y diámetro hidrodinámico como función de la relación en peso entre HPS y PCC ($R_{\text{HPS-PCC}}$) a pH 3.25 y temperatura de 25 °C.

(2) la segunda fase (llamada región B) comprendida entre $R_{5.5:1}$ a $R_{8.24:1}$ se caracterizó por un cambio progresivo en los valores de potencial- ζ con tendencias hacia cero y por un incremento drástico en los valores del d_h los cuales alcanzaron valores de hasta 14,747 nm; este comportamiento

es el resultado indicativo de la neutralización progresiva de las cargas negativas de la PCC por el aumento de las cantidades añadidas de HPS, que dio como resultado la asociación de los complejos solubles en complejos insolubles (coacervados complejos) como se evidenció por la separación de fases macroscópicas (Espinosa-Andrews *et al.*, 2013). Por lo tanto, a partir de estos resultados, se eligió una R_{5:1} para la formación del CS.

6.4.- Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

Los espectros de FT-IR de PCC, HPS y CS_{HPS-PCC} se muestran en la Figura 9. Diversas bandas de absorción de infrarrojos han sido reportadas en la literatura para pectinas, ya que es un polisacárido que puede variar en su composición de acuerdo a la fuente vegetal (Liang *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016a). Sin embargo, las dos principales señales espectrales que dictan las propiedades funcionales de esta molécula ocurren a 1725 y 1607 cm⁻¹ y son atribuida a los grupos carboxilos esterificados y a los grupos carboxílicos iónicos (-COO⁻), respectivamente (Fellah *et al.*, 2009; Pretsch *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2016a; Chen *et al.*, 2016b).

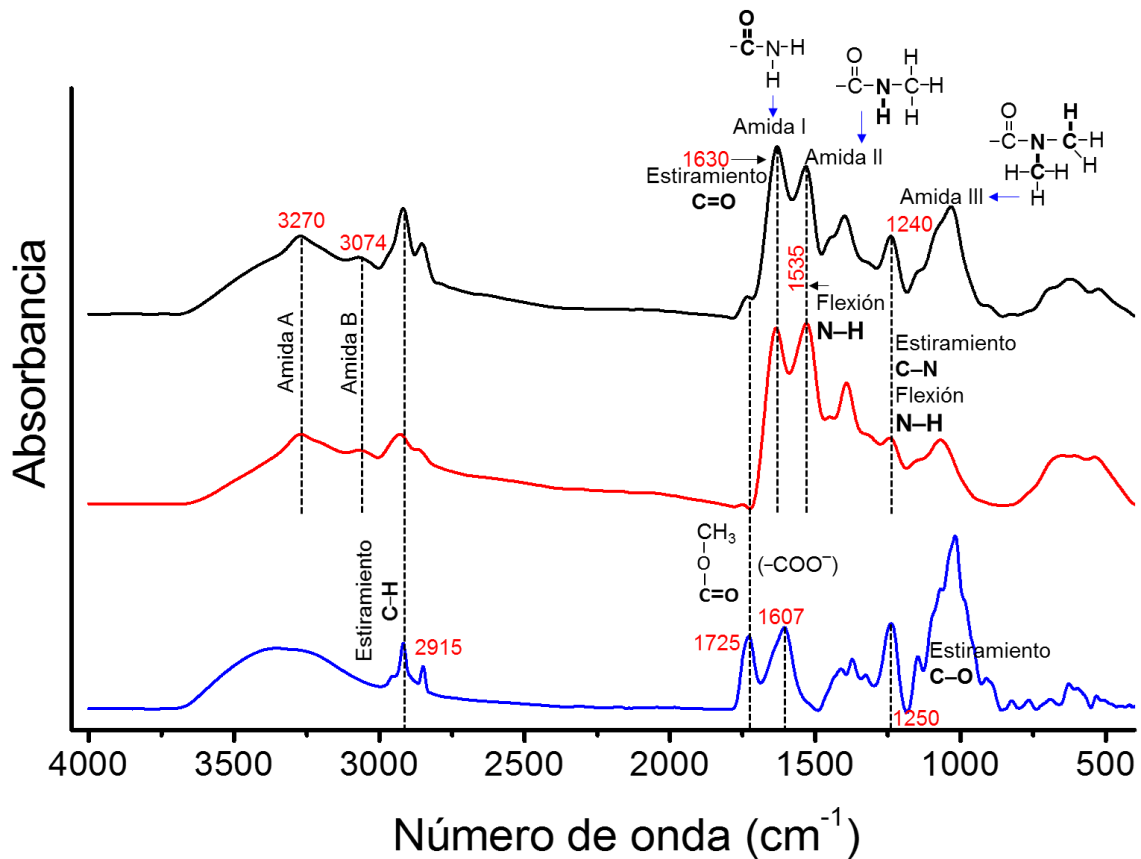


Figura 9.- Espectro FT-IR de PCC (—), HPS (—) y CS_{HPS-PCC} (—).

El grupo acetilo, tiene múltiples vibraciones de onda, entre las más importantes, podrían citarse aquellas que ocurren, alrededor de 1720 cm^{-1} correspondientes a picos de estiramiento del grupo C=O; la vibración de estiramiento C–H del grupo CH₃ entre 2960 y 2870 cm^{-1} y la vibración de estiramiento del enlace C–O alrededor de 1250 cm^{-1} y 1255 cm^{-1} (Karnik *et al.*, 2016). Las bandas de absorción antes mencionadas son características de polisacáridos modificados químicamente por acetilación (Li *et al.*, 2016) y también se encuentran presentes en el espectro de PCC, indicando con ello que en la estructura principal de esta molécula se encuentra este grupo funcional (Figura 5) lo cual también está acorde a lo reportado en la Tabla 1. En el espectro de PCC también se observó un amplio pico de estiramiento alrededor de $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ característico de grupos hidroxilo (–OH).

El espectro del HPS, mostró vibraciones de onda a 1630 cm^{-1} , la cual corresponde a estiramiento del C=O de la Amida I; a 1535 cm^{-1} correspondientes a la flexión del N–H de la Amida II y finalmente a 1240 cm^{-1} la cual corresponde a estiramiento del C–N y flexión del N–H de la Amida III (Carbonaro y Nucara, 2010; Zhu *et al.*, 2017). En la región espectral de la Amida I se manifiestan algunos aminoácidos tales como: arginina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, tirosina, histidina y fenilalanina (Carbonaro y Nucara, 2010), los cuales se encuentran presentes en el HPS.

El espectro del CS_{HPS-PCC}, mostró picos desplazados con diferentes intensidades y en algunos casos la aparición y/o superposición de nuevas señales de absorción, es decir, presentó vibraciones de onda pertenecientes a la región espectral de la PCC, a números de onda de 2915 , 1734 y 1250 cm^{-1} . Además de señales espectrales a 1630 , 1535 y 1240 cm^{-1} , los cuales son propias del espectro del HPS. La señal de absorción en la región de la Amida I en el FT-IR se considera la más útil para el análisis de la estructura secundaria de las proteínas y su ubicación depende la conformación de la estructura de la proteína, misma que determina su reactividad química, interacciones intermoleculares y propiedades funcionales tales como solubilidad, capacidad de retención de agua, gelificación, formación de espuma y emulsificación (Pelton y McLean, 2000; McClements, 2005). Como se mencionó anteriormente el pico de absorción de la Amida I para el HPS se observó a 1630 cm^{-1} , el cual está relacionado con estructuras de tipo espirales aleatorias (Yakimets *et al.*, 2005). En adición, Turgeon y Laneuville, (2009) informaron que las estructuras del tipo espirales aleatorias son una conformación más favorable en términos de entropía que puede facilitar la interacción de los biopolímeros durante el proceso de complejación.

Como resultado de la interacción de los biopolímeros, el FT-IR de CS_{HPS-PCC} cambió significativamente en la región carbonil-amida. Los grupos -NH_3^+ (Amida B) para HPS, mientras que para PCC desaparecieron las vibraciones de estiramiento asimétrico y simétrico del grupo -COO^- a 1607 cm^{-1} y 1423 cm^{-1} , respectivamente, lo que indica la interacción electrostática entre los grupos amina de HPS (NH_3^+) y grupos carboxilo de PCC (-COO^-) (Anvari y Chung, 2016). Al mismo tiempo, el complejo soluble mostró un pico de absorción correspondiente a la Amida A en un número de onda de 3270 cm^{-1} inferior al mostrado por el HPS, lo que indica que se produjeron algunos puentes de hidrógeno entre el grupo amino o -OH del HPS y -OH de PCC (Anvari y Chung, 2016). Por lo tanto, las manifestaciones de este tipo de vibraciones en los números de onda mencionados permitieron establecer cambios en la conformación original de los biopolímeros, lo que sugiere que la el acomplejamiento entre el HPS y la PCC fue exitosa. Una representación esquemática del sistema CS_{HPS-PCC} derivada de las observaciones anteriores se proporciona en la Fig. 10.

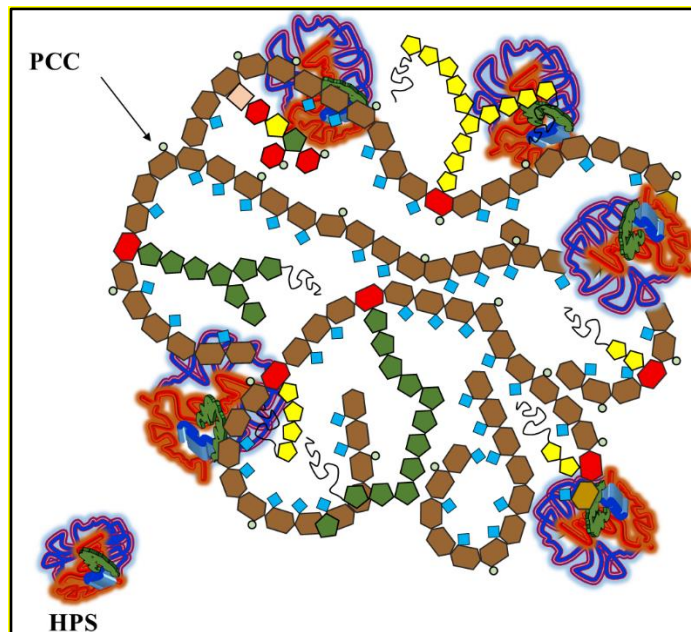


Figura 10.- Representación esquemática de un modelo hipotético de la estructura del CS_{HPS-PCC}.

6.5.- Tensión interfacial dinámica

La adsorción de moléculas con capacidad superficial activa en la interfaz aceite/agua es el paso más importante es la formación de emulsiones (Wan *et al.*, 2014). Durante el proceso de adsorción, estas moléculas deben experimentar cambios conformacionales debido a la interacción

con la interfaz (Yuan *et al.*, 2013). La dependencia de la tensión interfacial (γ) como función del tiempo de PCC (1.0 % p/p) y de CS_{HPS}-PCC (1.0 % p/p) en la interfaz aceite de canola- agua, se presenta en la Figura 11.

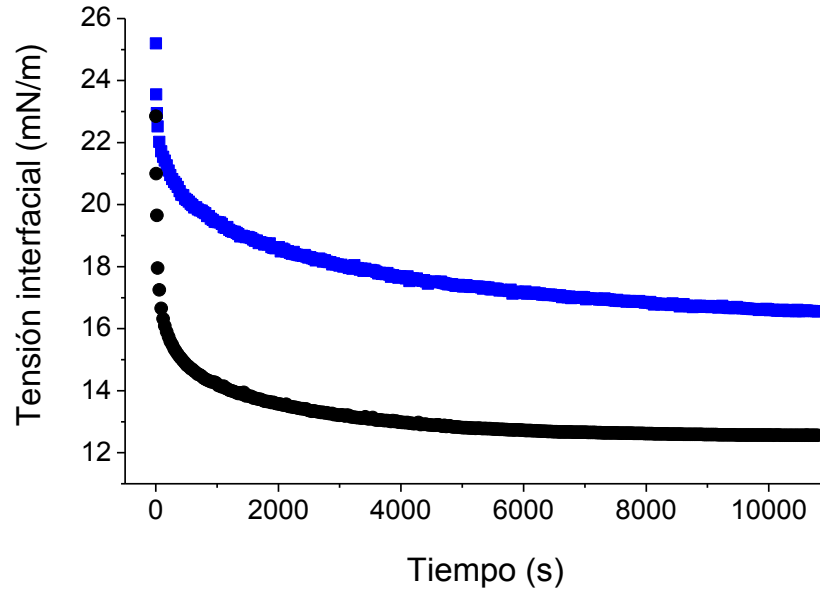


Figura 11.- Dinámica adsorción de la tensión interfacial en la interfaz aceite de canola/agua de PCC (■) y CS_{HPS}-PCC (●) al 1.0 % p/p.

La tensión interfacial del agua desionizada fue de 29.5 ± 0.5 mN/m, mientras que el de PCC fue de 25.20 ± 0.43 mN/m después de 10 s. Esta disminución de γ puede estar relacionada a tres componentes estructurales de PCC: 1) grupos hidrofóbicos (metil-éster y acetilo); 2) conformación molecular y 3) la presencia de residuos proteicos. Estos componentes actuaron como anclas hidrofóbicas y facilitaron la adsorción de PCC en la interfaz, resultando en la disminución de la tensión interfacial (Zouambia *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2017; Alba y Kontogiorgos, 2017). En adición, Alba y Kontogiorgos (2017) han informado que la adsorción de pectinas a la interfaz también se puede originar a partir de interacciones electrostáticas de las fracciones de proteína cargada positivamente y los residuos de ácido galacturónico cargado negativamente dentro de las cadenas de pectina, como ocurre con SBP.

La tensión interfacial inicial del CS_{HPS}-PCC evaluada a los 10 s fue de 22.85 ± 0.30 mN/m, menor que el de la PCC, lo cual indica que las moléculas del CS_{HPS}-PCC se difundieron y anclaron en la interfaz a una velocidad más rápida que las de PCC, debido probablemente al aumento en los grupos amino, los cuales actuaron como una fuerza motriz para la difusión a la interfaz, saturando

más rápidamente la monocapa interfacial. La posterior disminución de la tensión interfacial tanto de PCC y CS_{HPS-PCC} en tiempos más largos que tardó hasta 10800 s para alcanzar los valores de la meseta puede ser causada por la reconfiguración de las moléculas adsorbidas en la interfaz (Cuevas-Bernardino *et al.*, 2016).

La cinética de adsorción de los biopolímeros se determinó a partir de los cambios de presión superficial (π) a lo largo del tiempo, que se derivó de los datos de la Figura 11. En todos los casos, los valores de π aumentaron con el tiempo de adsorción. De acuerdo a lo informado por Castellani *et al.* (2010), las gráficas de dinámicas de adsorción están gobernadas por tres etapas: Etapa I: En este período, las moléculas llegan a la interfaz pero aún no han establecido una barrera interfacial efectiva, lo cual es un requisito para promover la disminución de la tensión interfacial; Etapa II: Esta etapa se caracteriza por el desarrollo de la presión interfacial (caída pronunciada de la tensión interfacial) y corresponde a la saturación de la interfaz, que se consigue principalmente por dos factores: la relajación de moléculas en la interfaz y la llegada de nuevas moléculas al sistema; Etapa III: La cual corresponde al cambio de una caída pronunciada a una caída gradual de la tensión interfacial como consecuencia de los cambios conformacionales y finalmente la formación de una película multicapa.

Las principales etapas de la cinética de adsorción que se pueden definir en función de los perfiles de las curvas presión superficial-tiempo (Figura 12) son las siguientes: (i) difusión de la molécula de superficie activa de la fase acuosa a la interfaz aceite/agua, (ii) adsorción (penetración) en la interfaz y desplegamiento interfacial, (iii) agregación (reordenamiento) de moléculas en la interfaz aceite/agua, formación multicapa y posiblemente gelificación interfacial, que da lugar a las constantes de velocidad de difusión (k_{diff}), penetración (k_{pen}) y reordenamiento molecular (k_{rea}), respectivamente (Rodríguez-Patino y Pilosof, 2011).

Durante la primera etapa, a presiones superficiales relativamente bajas, que es cuando la velocidad de difusión es la etapa de control del proceso, se puede usar una forma modificada de la ecuación de Ward y Tordai (1946) para correlacionar el cambio en la presión superficial con el tiempo (Ecuación 10):

$$\pi = 2C_0KT \left(\frac{D\theta}{3.14} \right)^{1/2} \quad \dots (10)$$

Donde C_0 es la concentración de biopolímero en la fase acuosa, K es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, D es el coeficiente de difusión y θ es el tiempo de adsorción. Si la difusión es la etapa que controla el proceso de adsorción, la representación de π versus $\theta^{1/2}$ puede ser lineal y la pendiente que se obtiene a partir de esta corresponderá a la constante de difusión (k_{diff}) (Xu y Damodaran, 1994; Perez *et al.*, 2009; Tang y Shen, 2015).

De la Figura 12A se puede apreciar que tanto para PCC como para CS_{HPS}-PCC, la adsorción controlada por difusión ocurrió dentro de los 90 s, y fue definido como un indicador de la velocidad de k_{diff} . Se eligió este tiempo en función del k_{diff} del CS_{HPS}-PCC y con la finalidad de facilitar la comparación entre los diferentes biopolímeros, este periodo de tiempo es similar a lo informado por Tang y Shen, (2015) para proteínas de origen bovino.

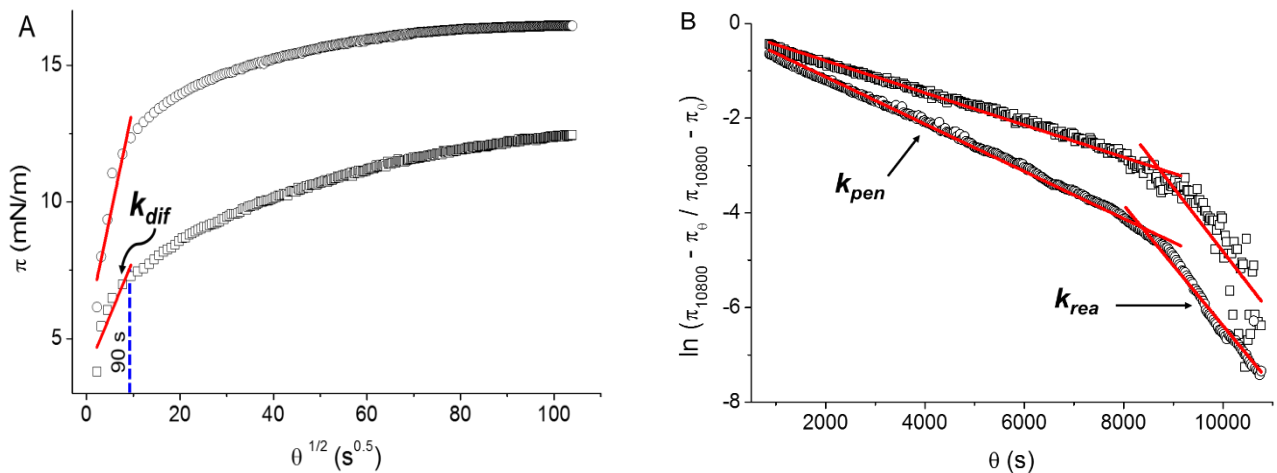


Figura 12.- A) Dependencia de la presión superficial (π) en función de la raíz cuadrada del tiempo ($\theta^{1/2}$). La línea sólida continua representa la pendiente lineal de las curvas donde la adsorción está controlada por k_{diff} . **B)** gráfica de $\ln(\frac{\pi_{10800} - \pi_0}{\pi_{10800} - \pi_0})$ versus θ . Las líneas sólidas continúan describen la primera pendiente que corresponde con la constante cinética de primer orden de adsorción/penetración (k_{pen}), mientras que la segunda pendiente corresponde con la constante cinética de primer orden de reordenamiento estructural (k_{rea}). Para PCC (\square) y CS_{HPS}-PCC (\circ) en la interfaz aceite/agua a concentración del 1.0 % p/p.

Los valores de k_{diff} para PCC y CS_{HPS}-PCC se resumen en la Tabla 2. CS_{HPS}-PCC exhibió una pendiente más pronunciada que PCC, este comportamiento puede estar relacionado con el contenido grupos amino del CS_{HPS}-PCC (contenido de proteína de 54.39 ± 1.47 %) que fue 14.7 veces mayor que el de PCC. Además, la viscosidad aparente a 50 s^{-1} del CS_{HPS}-PCC ($0.0074 \pm 3.10 \times 10^{-5} \text{ Pa}\cdot\text{s}$) fue 3.5 veces menor que la de PCC, por lo tanto, las moléculas del CS encontraron una menor

resistencia a la movilidad, y fueron capaces de migrar más rápido a la interfaz agua/aceite. Este comportamiento difiere de lo informado por diversos autores: Rodríguez-Patino y Pilosof (2011) quienes indican que la adsorción lenta de los complejos proteína-polisacárido se atribuye al aumento del diámetro hidrodinámico y la viscosidad, mientras que Ganzevles *et al.* (2006) informan que el complejamiento entre moléculas de proteína y pectina, puede afectar negativamente la velocidad de difusión, esto debido a la viscosidad y el peso molecular del polisacárido lo cual en turno, puede obstaculizar la llegada de la proteína a la interfaz. Sin embargo, en esta investigación el complejamiento entre HPS y PCC, mitigaron esta competencia probablemente debido a que se utilizó una mayor cantidad de proteína respecto al polisacárido, ($R_{5:1}$), es decir 83.33 % de HPS, por lo tanto, existía una mayor cantidad de proteína disponible para la adsorción directa en la interfaz lo cual, en turno, pudo explicar la mayor tasa de difusión y migración a la interfaz aceite/agua (Christiansen *et al.*, 2004). Además, el 70.8 % del peso molecular del HPS era menor a 1,000 Da, lo cual también pudo repercutir en la mayor disminución de la tensión superficial, respecto a PCC, tal como lo informan Maldonado-Valderrama y Rodríguez-Patino, (2010), quienes indican que tensoactivos de bajo peso molecular se difunden rápidamente a la interfaz que aquellos de mayor peso molecular.

Después del período de adsorción inicial controlado por difusión (≤ 90 s), la velocidad de adsorción de PCC y $CS_{HPS-PCC}$ disminuye gradualmente en la interfaz hasta 10,800 s, debido a la presencia de una barrera de energía, la cual obstaculiza la velocidad de adsorción y propicia que se manifieste la penetración, el despliegue y el reordenamiento de los biopolímeros a la interfaz (Perez *et al.*, 2009).

Con la finalidad de obtener los k_{pen} y k_{rea} de los biopolímeros adsorbidos en la interfaz, se emplea la siguiente ecuación fenomenológica de primer orden (Graham y Philips, 1979) (Ecuación 11):

$$\ln\left(\frac{\pi_{10800} - \pi_{\theta}}{\pi_{10800} - \pi_0}\right) = -k_i\theta \quad \dots (11)$$

Donde π_{10800} , π_{θ} , π_0 , son los valores de presión superficial en el tiempo de adsorción experimental final (10,800 s), en cada momento (θ) y en el momento inicial (90 s), respectivamente y k_i es una constante cinética de primer orden.

El ajuste de los datos experimentales para obtener k_{pen} y k_{rea} se realizó a intervalos de tiempo basados en la regresión lineal, teniendo en cuenta que estos intervalos no fueron afectados por k_{diff} . En el gráfico resultante se producen dos pendientes lineales, donde la primera pendiente se refiere a k_{pen} , y la segunda pendiente a k_{rea} . El gráfico de $\ln [(\pi 10800 - \pi \theta) / (\pi 10800 - \pi 0)]$ frente al tiempo para CS_{HPS-PCC} y PCC mostró perfiles similares (Figura 12B). CS_{HPS-PCC} exhibió un valor más alto de k_{pen} (Tabla 2) indicativo de que las moléculas complejas podrían penetrar la monocapa en la interfaz más fácilmente que las de PCC, probablemente debido a la mayor afinidad (mayor hidrofobicidad) de sus segmentos moleculares a la fase oleosa. Por otro lado, después de k_{pen} , los valores de k_{rea} aumentaron. PCC mostró un valor más alto para k_{rea} que CS_{HPS-PCC}, lo que indica que estas últimas moléculas se empaquetaron en la interfaz a un ritmo más rápido, logrando una saturación de monocapa interfacial, lo cual restringió su libertad para la reorganización (Cuevas-Bernardino *et al.*, 2016).

Tabla 2. Parámetros de las dinámicas de adsorción de los biopolímeros bajo estudio en la interfaz aceite/agua.

Tipo de biopolímero	k_{diff} (mN/m s ^{0.5})	$k_{pen} \times 10^4$ (s ⁻¹)	$k_{rea} \times 10^4$ (s ⁻¹)
PCC	0.41 ± 0.09	3.45 ± 0.02	15.90 ± 1.03
CS _{HPS-PCC}	0.81 ± 0.14	4.99 ± 0.02	13.40 ± 0.22

PCC: pectina de cáscara de cacao; CS_{HPS-PCC}: complejo soluble entre PCC e hidrolizado de proteína de lactosuero (HPS); Constantes de difusión (k_{diff}), penetración (k_{pen}) y reordenamiento molecular (k_{rea}).

6.6.- Formación y estabilización de emulsiones aceite-en-agua

El tamaño de las gotas de aceite de la fase dispersa de una emulsión, es determinado por los dos procesos fundamentales que ocurren durante su preparación: la fragmentación de la fase dispersa en gotas pequeñas y la coalescencia de estas últimas. Los agentes emulsificantes/estabilizantes tienen efectos sobre ambos procesos, mediante: a) la reducción de la tensión superficial e interfacial, promoviendo así la ruptura de la fase dispersa en pequeñas gotas y b) la formación de una película biopolimérica interfacial, la cual impide el fenómeno de coalescencia cuando dos gotas colisionan (Lobo y Svereika, 2003).

La Figura 13, muestra la evolución en el tamaño de gota ($d_{3,2}$) de las emulsiones de aceite-en-agua preparadas utilizando PCC (1.0 % p/p) y CS_{HPS}-PCC (1.0 % p/p), almacenadas a 4 ± 1 °C durante 28 días. E_{HPS-PCC} exhibió gotas de aceite con un $d_{3,2}$ inicial significativamente menor (86.98 ± 4.0 nm) que E_{PCC} (113.2 ± 0.5 nm). E_{HPS-PCC} no presentaron cambios significativos en el tamaño de la gota (90.36 ± 1.13 nm), mientras que E_{PCC} sufrió un aumento significativo (162.0 ± 3.61 nm) durante los 28 días de almacenamiento.

Varios autores han informado sobre la formación de emulsiones O/W estabilizadas con pectina de varias fuentes botánicas, como manzana, cítricos, remolacha azucarera y tejocote (concentraciones de 0.5-1.5 %) y tamaños de gota en un intervalo de 0.4-20 μ m (Guerra-Rosas *et al.*, 2017; Cuevas-Bernardino *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016a; Burapapadh *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2015), cabe señalar que los tamaños medios de gotas obtenidos en este trabajo fueron en escala nanométrica, mientras que los informados en los trabajos citados anteriormente cayeron básicamente dentro de la escala micrométrica. Yapo y Koffi (2013) informaron que la pectina de las cáscaras de cacao exhibió buenas propiedades emulsificantes y estabilizantes, pero no proporcionaba detalles del tamaño de gota de las emulsiones.

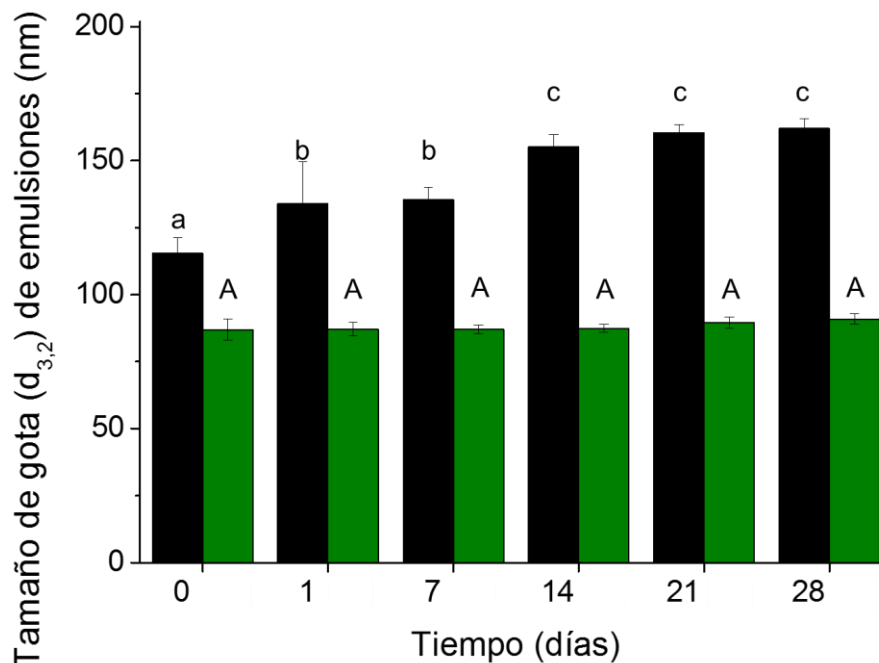


Figura 13.- Variación del diámetro superficial medio ($d_{3,2}$) de las gotas de aceite durante 28 días de almacenamiento a 4 ± 1 °C. E_{PCC} (■) y E_{HPS-PCC} (■) al 1.0 % p / p. Letras minúsculas y mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre medias ($p \leq 0.05$).

Las posibles explicaciones involucradas para el mejor rendimiento emulsificante y estabilizante de CS_{HPS-PCC} en comparación con PCC son las siguientes: a) CS_{HPS-PCC} mostró un mayor k_{diff} debido a su mayor carácter hidrófobo que PCC, por lo que las moléculas se difundieron y anclaron más rápidamente en la interfaz, formando tamaños de gota iniciales más pequeños, esto se pudo deber a que durante las etapas iniciales de homogeneización, la fase dispersa se divide en pequeñas gotas que se entremezclan con la fase continua y cuanto más rápido las moléculas emulsificantes alcanzaron a cubrir la superficie de las gotas, menor resultó el tamaño de gota inicial y mayor fue la capacidad emulsificante del CS_{HPS-PCC} respecto a PCC; y b) una vez que se formaron gotas pequeñas, el factor clave que afectó la estabilidad a largo plazo de la emulsión fue la conformación de las moléculas adsorbidas en la interfaz, y la capacidad de formar capas estabilizadoras estéricas gruesas. El k_{pen} más alto y el k_{rea} más bajo exhibidos por CS_{HPS-PCC} en comparación con PCC, indicaron que la penetración y el empaquetamiento mejorados se produjeron como resultado del diámetro hidrodinámico más pequeño y de las cargas superficiales negativas más bajas mostradas por el CS. El efecto general fue la formación de una capa interfacial más voluminosa alrededor de las gotas de E_{HPS-PCC} que alrededor de las gotas de E_{PCC}. Una representación esquemática de un modelo hipotético del mecanismo de estabilización de emulsiones aceite-en-agua, utilizando PCC y CS_{HPS-PCC} como agentes emulsificantes se presentan en la Figura 14.

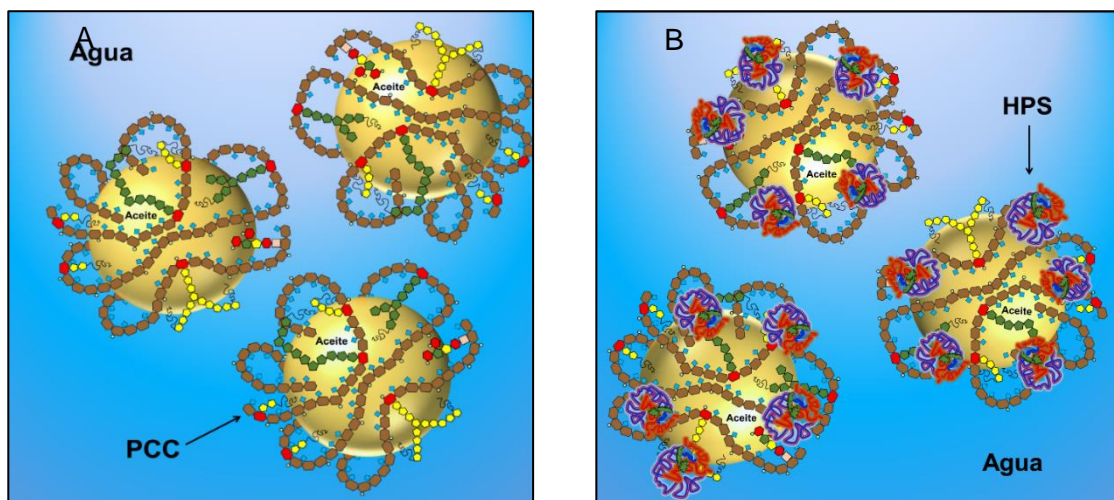
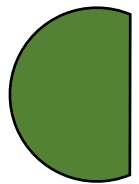


Figura 14.- Representación esquemática de un modelo hipotético del mecanismo de estabilización de la PCC (A) y el CS_{HPS-PCC} (B) en emulsiones O/W.

Finalmente, E_{PCC} mostró un índice de cremado significativamente más alto ($9.72 \pm 0.33 \%$) que $E_{HPS-PCC}$ ($3.53 \pm 0.55 \%$), a pesar de que $E_{HPS-PCC}$ mostró una viscosidad aparente más baja ($0.143 \pm 0.008 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) y un potencial- ζ más bajo ($-25.36 \pm 0.42 \text{ mV}$) que E_{PCC} ($0.250 \pm 0.001 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ y $-37.32 \pm 0.28 \text{ mV}$, respectivamente). Estos resultados parecen indicar que la mayor concentración de gotas de menor tamaño en $E_{HPS-PCC}$ mejoró la formación de la red tridimensional, donde el término de estabilización estérica fue el mecanismo estabilizador dominante (Cuevas-Bernardino *et al.*, 2016), y donde el potencial- ζ de la gota y la viscosidad aparente de la emulsión tuvo poca influencia en la estabilidad de la emulsión. Estos resultados están parcialmente en desacuerdo con los informados por Xu *et al.* (2016), quienes mencionan que a medida que aumenta la viscosidad de las emulsiones, se forman capas interfaciales gruesas que cubren completamente las gotas de aceite y por lo tanto, se incrementa la estabilidad de la emulsión, por otra parte Weiss *et al.* (2009), mencionan que las emulsiones se vuelven estables cuando el tamaño de gota cae por debajo de un valor crítico (diámetro de partícula $< 100 \text{ nm}$).



Capítulo 7

CONCLUSIONES

Las cáscaras generadas de la agroindustria del cacao pueden ser utilizadas para obtener pectinas usando un proceso de extracción simple y amigable con el ambiente. La pectina de cáscara de cacao (PCC) mostró actividad superficial activa y actividad emulsificante atribuida principalmente a sus grupos hidrofóbicos los cuales actuaron como anclas en la interfaz aceite/agua, sin embargo, estas propiedades fueron pobres, en la estabilización de emulsiones aceite-en-agua (E_{PCC}) reflejadas en los cambios significativos del tamaño de gota durante el almacenamiento. La modificación de PCC por su complejación electrostática con hidrolizado de proteína de lactosuero (HPS) mejoró significativamente la actividad superficial activa y actividad emulsificante. Emulsiones O/W utilizando el complejo soluble ($CS_{HPS-PCC}$) como agente emulsificante/estabilizante produjo tamaños de gota en escala nanométrica que no mostraron cambios significativos durante 28 días de almacenamiento y exhibieron bajo índice de cremado bajo prueba de centrifugación acelerada. Por lo tanto, una contribución importante de este estudio fue proporcionar un método para producir un emulsificante natural eficiente a partir de los desechos generados de las cáscaras del cacao, y el conocimiento derivado de este estudio podría ser útil en la industria alimentaria.



Capítulo 8

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P. y Agboola, S. (2014a). Formation of whey protein isolate hydrolysate stabilised nanoemulsion. *Food Hydrocolloids*, 41: 169–177.
- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P. y Agboola, S. (2014b). Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. *Journal of Food Engineering*, 122: 15–27.
- Agboola, S. O., Singh, H., Munro, P. A., Dalgleish, D. G. y Singhs, A. M. (1998). Destabilisation of oil-in-water emulsions formed using highly hydrolysed whey proteins. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 46(1): 84–90.
- Alba, K. y Kontogiorgos, V. (2017). Pectin at the oil-water interface: Relationship of molecular composition and structure to functionality. *Food Hydrocolloids*, 68: 211–218.
- Alba, K., Laws, A. P. y Kontogiorgos, V. (2015). Isolation and characterization of acetylated LM-pectins extracted from okra pods. *Food Hydrocolloids*, 43: 726–735.
- Anema, S. G. y McKenna, A. B. (1996). Reaction kinetics of thermal denaturation of whey proteins in heated reconstituted whole milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 422–428.
- Anvari, M. y Chung, D. (2016). Dynamic rheological and structural characterization of fish gelatin – gum arabic coacervate gels cross-linked by tannic acid. *Food Hydrocolloids*, 60: 516–524.
- Aranberri, I., Binks, B. P., Clint, J. H. y Flercher, P. D. I. (2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensoactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 7(3): 211–231.
- Baeza, R., Carrera, C., Pilosof, A. M. R. y Rodriguez-Patino, J. M. (2004). Interactions of polysaccharides with β -lactoglobulin spread monolayers at the air–water interface. *Food Hydrocolloids*, 18: 959–966.
- Bansal, N. y Bhandari, B. (2016). Functional milk proteins: production and utilization – whey-based ingredients. P.L.H. McSweeney, J.A. O’Mahony (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry*, Springer, New York. pp. 67–98.
- Barazarte, H., Sangronis, E. y Unai, E. (2008). La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): una posible fuente comercial de pectinas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58: 64-70.
- Benjasirimongkol, P. y Sriamornsak, P. (2016). Stability study of resveratrol-loaded emulsions using pectin as an emulsifier. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11: 199–200.

- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J. L. y Agnely, F. (2012). Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *International Journal of Pharmaceutics*, 436(1–2): 359–378.
- Brittain, H.G. (2001). Particle-size distribution, Part I: Representation of particle shape and size. *Pharmaceutical Technology*, 25(12): 38–45.
- Brunchi, C. E., Morariu, S. y Bercea M. (2014). Intrinsic viscosity and conformational parameters of xanthan in aqueous solutions: salt addition effect. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 122: 512–519.
- Burapapadh, K., Kumpugdee-Vollrath, M., Chantasart D. y Sriamornsak, P. (2010). Fabrication of pectin-based nanoemulsions loaded with itraconazole for pharmaceutical application. *Carbohydrate. Polymers*, 82: 384–393.
- Burapapadh, K., Takeuchi, H. y Sriamornsak, P. (2012). Novel pectin-based nanoparticles prepared from nanoemulsion templates for improving *in vitro* dissolution and *in vivo* absorption of poorly water-soluble drug. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82: 250–261.
- Caffall, K. H. y Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14): 1879–1900.
- Carbonaro M. y Nucara, A. (2010). Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region. *Amino Acids*, 38: 679–690.
- Castellani, O., Al-Assaf, S., Axelos, M., Phillips, G. O., y Anton, M. (2010). Hydrocolloids with emulsifying capacity. Part 2- Adsorption properties at the n-hexadecane-water interface. *Food Hydrocolloids*, 24: 121–130.
- Chan, S. y Choo, W. (2013). Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks. *Food Chemistry*, 141(4): 3752–3758.
- Chanamai, R., Horn, G. y McClements, D. J. (2002). Influence of oil polarity on droplet growth in oil-in-water emulsions stabilized by a weakly adsorbing biopolymer or a nonionic surfactant. *Colloid and Interface Science*, 247(1): 167–176.
- Chen, H., Qiu, S., Gan, J., Liu, Y., Zhu, Q. y Yin, L. (2016a). New insights into the functionality of protein to the emulsifying properties of sugar beet pectin. *Food Hydrocolloids*, 57: 262–270.

- Chen, H.-m., Fu, X. y Luo, Z.-g. (2016b). Effect of molecular structure on emulsifying properties of sugar beet pulp pectin. *Food Hydrocolloids*, 54: 99-106.
- Chen, J., Liu, W., Liu, C.M., Li, T., Liang, R.H. y Luo, S.J. (2015). Pectin modifications: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(12): 1684–1698.
- Christiansen, K. F., Vegarud, G., Langsrud, T., Ellekjaer, M.R. y Egelanddal, B. (2004). Hydrolysed whey proteins as emulsifiers and stabilisers in high-pressure processed dressings. *Food Hydrocolloids*, 18(5): 757–767.
- Ciriminna, R., Chavarría-Hernández, N., Rodríguez Hernández, A. I. y Pagliaro, M. (2015). Pectin: A new perspective from the biorefinery standpoint. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, 9(4): 368–377.
- Cooper, C. L., Dubin, P. L., Kayitmazer, A. B. y Turksen, S. (2005). Polyelectrolyte–protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10(1–2): 52–78.
- Costa, A. L. R., Gomes, A., de Andrade, C. C. P. y Cunha, R. L. (2017). Emulsifier functionality and process engineering: Progress and challenges. *Food Hydrocolloids*, 68: 69–80.
- Cuevas-Bernardino, J. C., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramirez, J. y Vernon-Carter, E. J. (2016). Physicochemical characterisation of hawthorn pectins and their performing in stabilising oil-in-water emulsions. *Reactive and Functional Polymers*, 103: 63–71.
- da Silva, F. L. B. y Jönsson, B. (2009). Polyelectrolyte-protein complexation driven by charge regulation. *Soft Matter*, 5(15): 2862–2868.
- de Wit, J. N. (1981). Structure and functional behavior of whey proteins. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 35, 47–57.
- Dea, I. C. M. y Madden, J. K. (1986). Acetylated pectic polysaccharides of sugar beet. *Food Hydrocolloids*, 1: 71–88.
- Dickinson, E. (1995). Emulsion stabilization by polysaccharide and protein–polysaccharide complexes. In A. M. Stephen (Ed.), *Food polysaccharides and their applications*. New York: Marcel Dekker.
- Dickinson, E. (2008). Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein–polysaccharide interactions. *Soft Matter*, 4: 932–942.
- Dickinson, E., (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23: 1473–1482.

- Dickinson, E., (2011). Mixed biopolymers at interfaces: competitive adsorption and multilayer structures. *Food Hydrocolloids*, 25: 1966–1983.
- Dickinson, E., (2018). Hydrocolloids acting as emulsifying agents—How do they do it? *Food Hydrocolloids*, 78: 2–14.
- Donsì, F., Annunziata, M., Vincenzi, M. y Ferrari, G. (2012). Design of nanoemulsion based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier. *Journal of Biotechnology*, 159(4): 342–350.
- Espinosa-Andrews, H., Enríquez-Ramírez, K. E., García-Márquez, E., Ramírez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C. y Vernon-Carter J. (2013). Interrelationship between the zeta potential and viscoelastic properties in coacervates complexes. *Carbohydrate Polymers*, 95: 161–166.
- Faravash, R. S. y Ashtiani, F. Z. (2007). The effect of pH, ethanol volume and acid washing time on the yield of pectin extraction from peach pomace. *International Journal of Food Science & Technology*, 42: 1177–1187.
- Fellah, A., Anjukandi, P., Waterland, M. R. y Williams, M. A. K. (2009). Determining the degree of methylesterification of pectin by ATR/FT-IR: Methodology optimisation and comparison with theoretical calculations. *Carbohydrate Polymers*, 78: 847–853.
- Filisetti-Cozzi, N. y Carpita, N. C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Journal: Analytical Biochemistry*, 197(1): 157–162.
- Food Chemical Codex. (1996). National Academy of Sciences. Washington D. C. Fourth Edition. 283–286.
- Funami, T., Nakauma, M., Ishihara, S., Tanaka, R., Inoue, T. y Phillips, G. O. (2011). Structural modifications of sugar beet pectin and the relationship of structure to functionality. *Food Hydrocolloids*, 25(2): 221–229.
- Funami, T., Zhang, G., Hiroe, M., Noda, S., Nakauma, M., Asai, I., Cowman, M. K., Al-Assaf, S. y Phillips, G. O. (2007). Effects of the proteinaceous moiety on the emulsifying properties of sugar beet pectin. *Food Hydrocolloids*, 21(8): 1319–1329.
- Ganzevles, R. A., Cohen Stuart, M. A., van Vliet, T. y de Jongh, H. H. J. (2006). Use of polysaccharides to control protein adsorption to the air–water interface. *Food Hydrocolloids*, 20: 872–878.

- Garna, H., Mabon, N., Robert, C., Cornet, C., Nott, K., Legros, H., Wathelet, B. y Paquot, M. (2007). Effect of extraction conditions on the yield and purity of apple pomace pectin precipitated but not washed by alcohol. *Journal of Food Science*, 72(1): C1–C9.
- Gauthier, S. y Pouliot, Y., 2003. Functional and biological properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 86: E78–E87.
- Graham, D. E. y Philips, M. C. (1979). Proteins at liquid interfaces: I. Kinetics of adsorption and surface denaturation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70: 403–414.
- Guerra-Rosas, M. I., Morales-Castro, J., Cubero-Márquez, M. A., Salvia-Trujillo, L. y Martín-Belloso, O. (2017). Antimicrobial activity of nanoemulsions containing essential oils and high methoxyl pectin during long-term storage. *Food Control*, 77: 131–138.
- Gülseren, I. y Corredig, M. (2012). Interactions at the interface between hydrophobic and hydrophilic emulsifiers: Polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and milk proteins, studied by drop shape tensiometry. *Food Hydrocolloids*, 29: 193–198.
- Guzey, D. y McClements, D.J. (2006). Influence of environmental stresses on O/W emulsions stabilized by beta-lactoglobulin-pectin and beta-lactoglobulin-pectin-chitosan membranes produced by the electrostatic layer-by-layer deposition technique. *Food Biophys*, 1: 30–40.
- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R. y McClements, D. J. (2006). Stabilization of model beverage cloud emulsions using protein-polysaccharide electrostatic complexes formed at the oil-water interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 5540–5547.
- Hernández-Marín, N. Y., Lobato-Calleros, C. y Vernon-Carter, E. J. (2013). Stability and rheology of water-in-oil-in-water multiple emulsions made with protein-polysaccharide soluble complexes. *Food Engineering*, 119: 181–187.
- Hoffmann, M. A. M., Roefs, S. F. M., Verheul, M., van-Mil, P. J. J. M. y de Kruif, K. G. (1996). Aggregation of β -lactoglobulin studied by *in situ* light scattering. *Journal of Dairy Research*, 63(3): 423–440.
- Hua, X., Wang, K., Yang, R., Kang, J. y Zhang, J. (2015). Rheological properties of natural low-methoxyl pectin extracted from sunflower head. *Food Hydrocolloids*, 44: 122–128.
- Hunter, R. J. (1986). Transport properties of suspensions. In: Hunter, R. J. (Ed.), *Foundation of Colloid Science*, vol. 1. Oxford University Press, New York, 494–536.

- ICCO (International Cocoa Organization). (2017). Assessment of world cocoa bean stocks for 2015-16. Available on <<https://www.icco.org/home/latest-news.html>> Fecha de acceso: 19/01/2017.
- Israelachvili, J. (2011). *Intermolecular and Surface Forces* (3a. ed.). Londres: Academic Press.
- Jafari, S. M., He, Y. y Bhandari, B. (2006). Nano-emulsion production by sonication and microfluidization – A comparison. *International Journal of Food Properties*, 9(3): 475–485.
- Jones, O. G., Lesmes, U., Dubin, P. y McClements, D. J. (2010). Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles created by heat treatment of β -lactoglobulin–pectin complexes. *Food Hydrocolloids*, 24: 374–383.
- Jourdain, L., Leser, M. E., Schmitt, C., Michel, M. y Dickinson, E. (2008). Stability of emulsions containing sodium caseinate and dextran sulfate: Relationship to complexation in solution. *Food Hydrocolloids*, 22: 647–659.
- Kabalnov, A. (2001). Ostwald ripening and related phenomena. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 22(1): 1–12.
- Karnik, D., Jung, J., Hawking, S. y Wicker, L. (2016). Sugar beet pectin fractionated using isopropanol differs in galacturonic acid, protein, ferulic acid and surface hydrophobicity. *Food Hydrocolloids*, 60: 179–185.
- Kim, M. J., Ju, H. K., Kim, Y., Yoo, S.-H. y Kim, Y.-S. (2016). Effects of amidation and/or methylesterification of pectin on aroma release at different calcium concentration. *Food Hydrocolloids*, 52: 343–349.
- Komaiko, J., Sastrosubroto, A. y 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.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9): 945–960.
- Kralova, I. y Sjoblom, J. (2009). Surfactants used in food industry: a review. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 30(9): 1363–1383.
- Kyomugasho, C., Christiaens, S., Shpigelman, A., Van Loey, A. M. y Hendrickx, M. E. (2015). FT-IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit- and vegetable-based matrices. *Food Chemistry*, 176: 82–90.

- Lam, R. S. H. y Nickerson, M. T. (2013). Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. *Food Chemistry*, 141(2): 975–984.
- Lee, S. y McClements, D. (2010). Fabrication of protein-stabilised nanoemulsions using a combined homogenisation and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach. *Food Hydrocolloids*, 24(6–7): 560–569.
- Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V. y Mazoyer, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17: 455–462.
- Li, J., Hu, X., Li, X. y Ma, Z. (2016). Effects of acetylation on the emulsifying properties of *Artemisia sphaerocephala* Krasch. polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 144: 531–540.
- Li, Y., Hu, M., Xiao, H., Du, Y., Decker, E. A. y McClements, D. J. (2010). Controlling the functional performance of emulsion-based delivery systems using multicomponent biopolymer coatings. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 76, 38–47.
- Liang, R.-h., Wang, L.-h., Chen, J., Liu, W. y Liu, C.-m. (2015). Alkylated pectin: Synthesis, characterization, viscosity and emulsifying properties. *Food Hydrocolloids*, 50: 65–73.
- Lievore, P., Simoes, D. R. S., Silva, K. M., Drunkler, N. L., Barana, A. C., Nogueira, A. y Demiate, I. M. (2015). Chemical characterisation and application of acid whey in fermented milk. *Journal of Food Science and Technology*, 52: 2083–2092.
- Liu, C. M., Guo, X. J., Liang, R. H., Liu, W. y Chen, J. (2017) Alkylated pectin: Molecular characterization, conformational change and gel property, *Food Hydrocolloids*, 69: 341–349.
- Lobo, Ll. y Svereika, A. (2003). Coalescence during emulsification. 2. Role of small molecule surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 261: 498–507.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265–275.
- Maldonado-Valderrama, J. y Rodríguez-Patino, J. M. (2010). Interfacial rheology of protein-surfactant mixtures. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15: 271–282.
- Marić, M., Ninčević-Grassino, A., Zhu, Z., Barba, F. J., Brnčić, M. y Rimac-Brnčić, S. (2018). An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends in Food Science & Technology*, 76: 28–37.

- Maxwell, E. G., Colquhoun, I. J., Chau, H. K., Hotchkiss, A. T., Waldron, K. W., Morris, V. J. y Belshaw, N. J. (2015). Rhamnogalacturonan I containing homogalacturonan inhibits colon cancer cell proliferation by decreasing ICAM1 expression. *Carbohydrate Polymers*, 132(5): 546–553.
- Mazoyer, J., Leroux, J., y Bruneau, G. (1999). Use of depolymerized citrus fruit and apple pectins as emulsifiers and emulsion stabilizers. U.S. Patent 5,900,268.
- McClements, D. J. (2005). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*, 2a. ed. Boca Raton: CRC Press.
- McClements, D. J. (2007). Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47: 611–649.
- McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: Fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 7(6): 2297–2316.
- McClements, D. J. y Rao, J., 2011. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews. Food Science and Nutrition* 51(4): 285–330.
- Mendoza, A. J., Guzmán, E., Martínez-Pedrero, F., Ritacco, H., Rubio, R. G., Ortega, F., Starov, V. M. y Miller, R. (2014). Particle laden fluid interfaces: Dynamics and interfacial rheology. *Advances in Colloid and Interface Science*, 206: 303–319.
- Mollea, C., Chiampo, F. y Conti, R. (2008). Extraction and characterization of pectins from cocoa husks: A preliminary study. *Food Chemistry*, 107(3), 1353–1356.
- Muhammad, K., Zahari, N. I. M., Gannasin, S. P., Adzahan, N. M. y Bakar, J. (2014). High methoxyl pectin from dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel. *Food Hydrocolloids*, 42: 289–297.
- Munarin, F., Tanzi, M. C., y Petrini, P. (2012). Advances in biomedical applications of pectin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51: 681–689.
- Naqash, F., Masoodi, F.A., Rather, S.A., Wani, S.M. y Gani, A. (2017). Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin-A Review. *Carbohydrate Polymers*, 168: 227–239.
- Nazarzadeh, E., Anthonypillai, T. y Sajjadi, S. (2013). On the growth mechanisms of nanoemulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 397: 154–162.
- Nussinovitch, A. y Hirashima, M. (2013). *Cooking innovations: Using hydrocolloids for thickening, gelling, and emulsification*. London: CRC Press.

- Oakenfull, D. y Scott, A. (1984). Hydrophobic interaction in the gelation of high methoxyl pectins. *Journal of Food Science*, 49(4): 1093–1098.
- Ostertag, F., Weiss, J. y McClements, D. J. (2012). Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *Journal of Colloid and Interface Science*, 388: 95–102.
- Ovodov, Y. S. (2009). Current views on pectin substances. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 35(3): 269–284.
- Ozturk, B., Argin, S., Ozilgen, M. y McClements, D. J. (2014). Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin E delivery systems using natural surfactants: Quillaja saponin and lecithin. *Food Engineering*, 142: 57–63.
- Pasika, W. M. (1977). Polysaccharide polyelectrolytes, in: P.A. Sanford, A. Laskin (Eds.), *Extracellular Microbial Polysaccharides*, ACS Symp. Ser. 45, Washington, D.C. 128–143.
- Pelton, J. T. y McLean, L. R. (2000). Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Analytical Biochemistry*, 277: 167–176.
- Perez, A. A., Carrara, C. R., Carrera-Sánchez, C., Santiago, L. G., y Rodríguez-Patino, J. M. (2009). Interfacial dynamic properties of whey protein concentrate/polysaccharide mixtures at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, 23, 1253–1262.
- Piorkowski, D. T. y McClements, D. J. (2013). Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, 42(1): 5–41.
- Pretsch, E., Bühlmann, P. y Badertscher, M. (2009). Structure determination of organic compounds. *Tables of spectral data*. 4th ed. Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
- Putnik, P., Bursac Kovacevic, D., Režek Jambrak, A., Barba, F. J., Cravotto, G., Binello, A., Lorenzo, J. M. y Shpigelman, A. (2017). Innovative “green” and novel strategies for the extraction of bioactive added value compounds from citrus wastes – A review. *Molecules*, 22(5): 680–704.
- Qian, C. y McClements, D. J. (2011). Formation of nanoemulsions stabilised by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenisation: Factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids*, 25(5): 1000–1008.
- Ralet, M. C., Cabrera, J. C., Bonnin, E., Quemener, B., Hellin, P. y Thibault, J. F. (2005). Mapping sugar beet pectin acetylation pattern. *Phytochemistry*, 66: 1832–1843.

- Rao, J. y McClements, D. J. (2012). Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. *Food Hydrocolloids*, 29: 326–334.
- Rodríguez-Patino, J. M. y Pilosof, A. M. R. (2011). Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 25: 1925–1937.
- Rombouts, F. M. y Thibault, J. -F. (1986). Sugar beet pectins: chemical structure and gelation through oxidative coupling. In M. L. Fishman & J. J. Jen (Eds.), *Chemistry and function of pectins* (pp. 49–60). Washington, DC: American Chemical Society.
- Saberi, A. H., Fang, Y. y McClements, D. J. (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 391: 95–102.
- Salminen, H. y Weiss, J. (2014). Electrostatic adsorption and stability of whey protein-pectin complexes on emulsion interfaces. *Food Hydrocolloids*, 35: 410–419.
- Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O. y McClements, D. J. (2013). Influence of particle size on lipid digestion and β -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chemistry*, 141: 1472–1480.
- Scheller, H. V., Jensen, J. K., Sørensen, S. O., Harholt, J. y Geshi, N. (2007). Biosynthesis of pectin. *Physiologia Plantarum*, 129: 283–295.
- Schmidt, U. S., Koch, L., Rentschler, C., Kurz, T., Endreß, H. U. y Schuchmann, H. (2015). Effect of molecular weight reduction, acetylation and esterification on the emulsification properties of citrus pectin. *Food Biophysics*, 10: 217–227.
- Schmidt, U. S., Schütz, L. y Schuchmann H. P. (2017). Interfacial and emulsifying properties of citrus pectin: Interaction of pH, ionic strength and degree of esterification. *Food Hydrocolloids*, 62: 288–298.
- Schmitt, C. y Turgeon, S. L. (2011). Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167: 63–70.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S. y Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein–polysaccharide complexes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(8): 689–753.
- Schröder, A., Berton-Carabin, C., Venema, P. y Cornacchia, L. (2017). Interfacial properties of whey protein and whey protein hydrolysates and their influence on O/W emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 73: 129–140.

- Siew, C. K., y Williams, P. A. (2008). Characterization of the surface-active components of sugar beet pectin and the hydrodynamic thickness of the adsorbed pectin layer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 8111–8120.
- Šimkovic, I., Synytsya, A., Uhliariková, I. y Čopíková, J. (2009). Amidated pectin derivatives with n-propyl-, 3-aminopropyl-, 3-propanol- or 7-aminoheptyl-substituents. *Carbohydrate Polymers*, 76(4): 602–606.
- Singh, A. M. y Dalgleish, D. G. (1998). The emulsifying properties of hydrolysates of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 81(4): 918–924.
- Singthong, J., Cui, S. W., Ningsanond, S. y Goff, H. D. (2004). Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy (*Cissampelos pareira*) pectin. *Carbohydrate Polymers*, 58(4, 7): 391–400.
- Suárez, C., Zienkiewicz, A., Castro, A. J., Zienkiewicz, K., Majewska-Sawka, A. y Rodríguez-García, M. I. (2013). Cellular localization and levels of pectins and arabinogalactan proteins in olive (*Olea europaea* L.) pistil tissues during development: Implications for pollen–pistil interaction. *Planta*, 237(1): 305–319.
- Tang, C. H. y Shen, L. (2015). Dynamic adsorption and dilatational properties of BSA at oil/water interface: Role of conformational flexibility. *Food Hydrocolloids*, 43: 388–548.
- Tcholakova, S., Denkov, N. D. y Lips, A. (2008). Comparison of solid particles, globular proteins and surfactants as emulsifiers. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10: 1608–1627
- Tolstoguzov, V. B. (1997). Protein-polysaccharide interactions. In: *Food Proteins and Their Applications* (edited by S. Damodaran & A. Paraf). New York, Marcel Dekker. 171–199.
- Turgeon, S. L. y Laneuville, S. I. (2009). Protein plus polysaccharide coacervates and complexes: from scientific background to their application as functional ingredients in food products, in: S. Kasapis, I.T. Norton, J.B. Ubbink (Eds.), *Modern Biopolymer Science: Bridging the Divide between Fundamental Treatise and Industrial Application*, Academic Press, San Diego, 327–363.
- Turgeon, S. L., Schmitt, C. y Sanchez, C. (2007). Protein–polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12: 166–178.
- Voragen, A. J., Coenen, G.-J., Verhoef, R., y Schols, H. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2): 263–275.

- Vriesmann, L. C. y Petkowicz, C. L. O. (2013). Highly acetylated pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) forms gel. *Food Hydrocolloids*, 33: 58–65.
- Vriesmann, L. C., Teófilo, R. F. y Petkowicz, C. L. O. (2011). Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 84: 1230–1236.
- Vriesmann, L. C., Teófilo, R. F. y Petkowicz, C. L. O. (2012). Extraction and characterization of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) with citric acid. *LWT - Food Science and Technology*, 49(1): 108–116.
- Walkinshaw, M.D. y Arnott, S. (1981). Conformations and interactions of Pectins II. Models for junction zones in pectinic acid and calcium pectate gels. *Journal of Molecular Biology*, 153(4): 1075–1085.
- Walstra, P. (1993). Principles of emulsion formation. *Chemical Engineering Science*, 48(2): 333–349.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. y Geurts, T. J. (2006). Dairy science and technology. CRC Press, Boca Raton.
- Wan, Z. L., Wang, L. Y., Wang, J. M. Zhou, Q., Yuan, Y. y Yang, X. Q. (2014). Synergistic interfacial properties of soy protein-stevioside mixtures: Relationship to emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 39: 127–135.
- Wang, M., Huang, B., Fan, Ch., Zhao, K., Hu, H., Xu, X., Pan, S. y Liu, F. (2016). Characterization and functional properties of mango peel pectin extracted by ultrasound assisted citric acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91: 794–803.
- Wang, W., Chen, W., Zou, M., Lv, R., Wang, D., Hou, F., Feng, H., Ma, X., Zhong, J., Ding, T., Ye, X. y Liu, D. (2018). Applications of power ultrasound in oriented modification and degradation of pectin: A review. *Journal of Food Engineering*, 234: 98–107.
- Ward, A. F. H., y Tordai, L. (1946). Time dependence of boundary tensions of solutions. *Journal of Chemical Physics*, 14: 353–361.
- Weinbreck, F., de Vries, R., Schrooyen, P. y de Kruif, C. G. (2003). Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. *Biomacromolecules*, 4(2): 293–303.
- Weiss, J., Gaysinsky, S., Davidson, M. y McClements, D. J. (2009). Nanostructured encapsulation systems: food antimicrobials. En *Global issues in food science and technology*. (Gustavo, B.

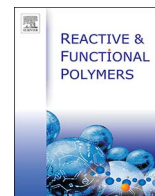
- C., Alan, M., David, L., Walter, S., Ken, B., Paul, C., eds.). San Diego: Academic Press. 425-479
- Willats, W. T., McCartney, L., Mackie, W. y Knox, J. P. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. In N. C. Carpita, M. Campbell, & M. Tierney (Eds.), *Plant cell walls*. Netherlands: Springer. 9–27.
- Xu, D., Aihemaiti, Z., Cao, Y., Teng, C., y Li, X. (2016). Physicochemical stability, microrheological properties and microstructure of lutein emulsions stabilized by multilayer membranes consisting of whey protein isolate, flaxseed gum and chitosan. *Food Chemistry*, 202: 156–164.
- Xu, D., Wang, X., Jiang, J., Yuan, F. y Gao, Y. (2012). Impact of whey protein - Beet pectin conjugation on the physicochemical stability of β -carotene emulsions. *Food Hydrocolloids*, 28: 258–266.
- Xu, J., Yue, R.-Q., Liu, J., Ho, H.-M., Yi, T., Chen, H.-B. y Han, Q. B. (2014). Structural diversity requires individual optimization of ethanol concentration in polysaccharide precipitation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67: 205–209.
- Xu, S., y Damodaran, S. (1994). Kinetics of adsorption of protein at the air-water interface from a binary mixture. *Langmuir*, 10: 472–480.
- Yakimets, I., Wellner, N., Smith, A. C., Wilson, R. H., Farhat, I. y Mitchell, J. (2005). Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. *Polymer*, 46: 12577–12585.
- Yang, J. S., Mu, T. H. y Ma, M. M. (2018). Extraction, structure, and emulsifying properties of pectin from potato pulp. *Food Chemistry*, 244: 197–205.
- Yang, L. y Zhang, L.-M. (2009). Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate Polymers*, 76: 349–361.
- Yapo, B. M. y Koffi, K. L. (2013). Extraction and characterization of gelling and emulsifying pectin fractions from cacao pod husk. *Journal of Food and Nutrition Research*, 1(4): 46–51.
- Yapo, B. M., Robert, C., Etienne, I., Wathélet, B. y Paquot, M. (2007). Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. *Food Chemistry*, 100: 1356–1364.

- Ye, A. (2008). Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: Principles and applications - A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(3): 406–415.
- Yerramilli, M., Longmore, N. y Ghosh, S. (2017). Improved stabilization of nanoemulsions by partial replacement of sodium caseinate with pea protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 64: 99–111.
- Yuan, F., Xu, D., Qi, X., Zhao, J. y Gao, Y. (2013). Impact of high hydrostatic pressure on the emulsifying properties of whey protein isolate–chitosan mixtures. *Food Bioprocess Technology*, 6: 1024–1031.
- Zhu, J., Sun, X., Wang, S., Xu, Y. y Wang, D. (2017). Formation of nanocomplexes comprising whey proteins and fucoxanthin: characterization, spectroscopic analysis, and molecular docking. *Food Hydrocolloids*, 63: 391–403.
- Zouambia, Y., Ettoumi, K. Y., Krea, M. y Moulai-Mostefa, N. (2017). A new approach for pectin extraction: Electromagnetic induction heating. *Arabian Journal Chemistry*, 10(4): 480–487.
- Zouambia, Y., Moulai-Mostefa, N. y Mohamed, K. (2009). Structural characterization and surface activity of hydrophobically functionalized extracted pectins. *Carbohydrate Polymers*, 78: 841–846.



Anexo

PUBLICACIÓN CIENTÍFICA



Complexation with whey protein hydrolysate improves cacao pods husk pectin surface active and emulsifying properties

Daniel Trujillo-Ramírez^a, Consuelo Lobato-Calleros^b, Angélica Román-Guerrero^a,
Landy Hernández-Rodríguez^b, Jose Alvarez-Ramirez^c, Eduardo J. Vernon-Carter^{c,*}

^a Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Ciudad de México C.P. 09340, Mexico

^b Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carr. México-Texcoco, Texcoco, Estado de México C.P. 56230, Mexico

^c Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Ciudad de México C. P. 09340, Mexico



ARTICLE INFO

Keywords:

Cacao pod husks pectin
Whey protein hydrolysate
Soluble complex
Adsorption dynamics
Emulsion stability

ABSTRACT

Pectin was extracted from cacao pod husks (CPHP) wastes, having a methylesterification degree of 83.22%, acetylation degree of 10.20%, and protein content of 3.68%. The adsorption dynamics of CPHP at the canola oil-water interface were studied, and diffusion (k_{diff}), penetration (k_{pen}) and rearrangement (k_{rea}) rate constants were determined. Canola oil-in-water (O/W) emulsions (E_{CPHP}) were stabilized which CPHP, and exhibited an initial area-volume mean diameter ($d_{3,2}$) of 113.60 nm, which increased to 162.0 nm during 28 days of storage. CPHP was electrostatically complexed with whey protein hydrolysate (WPH) in a weight ratio 5:1 and pH 3.25, in order to improve the surface active and emulsifying activities. The soluble complex ($SC_{WPH-CPHP}$) decreased the interfacial tension faster and to a lower value, and displayed higher k_{diff} and k_{pen} than CPHP. $SC_{WPH-CPHP}$ yielded O/W emulsions with $d_{3,2} < 90$ nm, which did not suffer significant changes in oil droplet size during storage. The apparent viscosity of $SC_{WPH-CPHP}$ aqueous dispersion was much lower than that of CPHP dispersion. The zeta potential of $E_{WPH-CPHP}$ was lower than for E_{CPHP} . Thus, it was concluded that the greater stability of $E_{WPH-CPHP}$ was due mainly to steric repulsion originated by the soluble complex adsorption layers around the oil droplets.

1. Introduction

Pectin is a heteropolysaccharide exhibiting a wide diversity in its molecular structure. Basically it is a group of polysaccharides rich in galacturonic acid comprising homogalacturonan (HG; homopolymer mainly composed of ~65% of α -D-galactopyranosyluronic acid units), rhamnogalacturonan-I (RG-I, heteropolymer of units repeating α -L-rhamnosyl) and rhamnogalacturonan-II (branched pectic domain containing a HG backbone). The galacturonic acid residues may be partially methyl-esterified on the carboxyl group at C-6 position and O-acetylated at C-2 or C-3 depending on plant species [1–3]. The molecular weight of pectin (Mw), viscosity, the protein content, the degree of acetylation (Dac), amidation (DAm) and methylesterification (DM) are the main factors which dictate the functional properties of pectin [4,5].

Up to the last decade, most pectin applications stemmed from its gel-forming ability, rendering it as suitable to use as gelling, thickening, or stabilizing agent in a wide number of industrial domains, including the food, pharmaceutical and chemistry industries [6–8]. Nowadays,

this hydrocolloid is gradually gaining acceptance as an effective emulsifier and the emulsifying properties are being increasingly assessed in numerous industrial applications [9]. Some pectins from different botanical sources have been tagged as showing surface-activity and to be capable of forming fine oil droplets, including citrus peel pectin [10–12], sugar beet pectin [10,13–15], and hawthorn pectin [16]. However, new sources of pectin from regional botanical sources and agroindustrial wastes continue to be explored.

The cacao (*Theobroma cacao* L.) fruit is an important crop of several tropical and sub-tropical countries, and cacao beans are the main ingredient of the multi-billion worldwide chocolate industry. After the beans extraction, the pod husks (accounting for approx. 52–76% of the weight of the cacao fruit) are discarded and represent a serious environmental problem [17]. Bazarte et al. [18] reported that for each ton of dry cacao beans, 10 tons of wet pod cacao husks were generated. The production of dry cacao beans for the period 2015/2016 was estimated as 3660 metric tons (36,600 metric tons of wet cacao pod husks) [19].

Recently, Yapo and Koffi [20] reported that cacao pod husks pectin exhibited emulsifying activity and emulsion-stabilizing activity,

* Corresponding author.

E-mail address: jvc@xanum.uam.mx (E.J. Vernon-Carter).

without providing information regarding the initial droplet size and the variation in droplet size of the oil-in-water emulsions with storage time.

Pectin is a multifunctional ingredient susceptible to chemical and enzymatic conversions, and selective alterations of pectin molecular structure may render the polymer suitable for numerous applications. In this context the complexation between protein and polysaccharide molecules under special conditions of pH and weight ratio between both biopolymers can promote the formation of soluble complexes (SC), which may exhibit improved emulsifying properties than the individual biopolymers [21–24].

Thus, an ongoing research topic is the identification and characterization of natural emulsifiers which have the potential of emulsifying and stabilizing emulsion oil droplets [25,26] and that can also be successfully used in food matrices [27–29]. Therefore, the objectives of this research were to: (a) obtain and characterize the pectin extracted from cacao pod husks (CPHP); (b) establish the conditions for obtaining whey protein hydrolysate (WPH)-CPHP soluble complex (SC_{WPH-CPHP}); (c) evaluate the dynamic interfacial adsorption of SC_{WPH-CPHP}, and (d) and to evaluate the stability of oil-in-water emulsions emulsified with SC_{WPH-CPHP} in comparison to CPHP.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Cacao fruits (*Theobroma cacao* L., var. Trinitario) from the Chontalpa region of the State of Tabasco, Mexico, was kindly supplied by the Local Agricultural Association of Cacao Producers of Huimanguillo. Whey protein hydrolysate (WPH; Hilmar™ 8390, 78% protein on dry basis, 5.5% fat, moisture 3.5%, ash 4.5%, lactose 3.0% and molecular weight distribution of 70.8% < 1000 Da, 12.9% 1000–5000 Da, 6.6% 5000–20,000 Da and 9.5% > 20,000 Da) was supplied by Hilmar Cheese Company (Hilmar, CA, USA). Citric acid, hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide (NaOH), magnesium sulfate heptahydrate (MgSO₄·7H₂O), sulfuric acid (H₂SO₄) and ethanol, were analytical grade and purchased from J.T. Baker (Xalostoc, State of Mexico, Mexico). Potassium sulfamate, sodium tetraborate, 3-phenylphenol. Other reagent-grade chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Mexico (Toluca, State of Mexico, Mexico). Deionized water was used in all the experiments.

2.2. Extraction of cacao pod husks pectin (CPHP)

Cacao pod was cut lengthwise and seeds were removed manually from the husk. Husks were cut into small pieces, dehydrated in an oven with air circulation (Rioissa Digital, HCF-62, Mexico City, Mexico) at 55 °C until achieving constant weight (~36 h). Dried pieces were milled (Nixtamatic^{MR}, Mexico City, Mexico) using successive sieves of 2 mm and 1 mm. Cacao pod husks flour (CPHF) that passed across the 1 mm sieve was used for the extraction of pectin.

CPHP was extracted by acid hydrolysis as proposed by Vriesmann et al. [17], with slight modifications. Briefly, 100 g of CPHF were mixed with 2.5 L of citric acid (1:25 w/v) and put in a water bath with constant stirring. Extraction conditions were: pH of 3.0, 85 °C and 90 min extraction time. The resulting extract was cooled to room temperature (23 ± 2 °C) and filtered using a synthetic cloth, then this extract was centrifuged at 8000 × g for 10 min (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburg, Germany) and the precipitate was discarded (impurities). Supernatant was added with 96% ethanol in a 2:1 volume ratio and maintained for 24 h at 4 ± 1 °C, to allow pectin precipitation [30]. Pectin was then separated by filtration through Whatman No. 1 filter paper and washed twice with 70% ethanol in a 1:1 volume ratio for removal of free sugars, pigments and other impurities. Excess alcohol was removed by centrifugation at 8000 × g for 25 min at 20 °C, and the supernatant was discarded. The pellet was dried at 55 °C in an oven with air circulation until constant weight was achieved. The dried

pectin was ground in a mortar in order to obtain a fine powder. Extraction yield was estimated as (1):

$$\text{Yield (\%)} = (\text{pectin powder (g)}/\text{cacao pod husk flour (g)}) \times 100\% \quad (1)$$

Moisture content of CPHP was determined with a moisture analyzer (Ohaus, MB23, Parsippany, NJ, USA) by drying the sample at 105 °C to constant weight [31].

2.3. Physicochemical characterization of CPHP

2.3.1. Determination of the degree of methylesterification (DM), degree of amidation (DA_{md}) and degree of acetylation (DA_c)

Degree of methylesterification (DM), degree of amidation (DA_{md}) and degree of acetylation (DA_c) of CPHP was determined as reported by [3], with slight modifications. Pectin solution (0.500 g/100 mL of deionized water) was titrated with 0.1 mol/L NaOH using phenolphthalein as the indicator and the volume consumed was recorded as V1. Afterwards, saponification of pectin was initiated by adding of 20 mL of 0.5 mol/L NaOH and allowed to react for 15 min under constant stirring. The reaction was stopped with the addition of 20 mL of 0.5 mol/L HCl. The excess HCl was neutralized by titration with 0.1 mol/L NaOH and the volume consumed was recorded as V2. Subsequently, the solution was saturated with 20 mL of 2.5 mol/L NaOH and mixed in a 1000 mL distillation flask and connected to a condenser, whose delivery line was submerged into the mixture of 150 mL of deionized water and 20 mL of 0.1 mol/L HCl. The mixture was distilled until ~100 mL of the distillate was collected. The excess HCl was then titrated with 0.1 mol/L NaOH using methyl red as the indicator and the consumed volume was recorded as S. A blank test was performed using 20 mL of 0.1 mol/L HCl and the volume consumed of HCl was recorded as B. The difference of B and S was assumed to be V3.

For determining the amount of acetyl, 0.500 g of the CPHP were dispersed in 25 mL of 0.125 mol/L NaOH, after stirring for 4 h, the solution was diluted in a 50 mL volumetric flask to volume. An aliquot of 20 mL of diluted solution and 20 mL of Clark's solution (containing 100 g MgSO₄·7H₂O, 0.8 mL H₂SO₄ and 180 mL H₂O) was transferred to a 1000 mL distillation flask and the first 15 mL of the distillate were collected by separated in a graduated cylinder. Immediately the steam supply was started and the distillation was continued until 150 mL of the distillate was obtained. This distillate was titrated with 0.05 mol/L NaOH to a pH of 8.5, and the volume required, in mL, was recorded as A. Deionized water was used as a blank for titration and the volume consumed was recorded as A₀. The difference of A and A₀ was assumed to be V4. Eqs. (2)–(4) were used for estimating DM%, DA_{md}% and DA_c%:

$$\text{DM\%} = \text{V2 (mL)}/(\text{V1 (mL)} + \text{V2(mL)} + \text{V3(mL)} - \text{V4(mL)}) \times 100 \quad (2)$$

$$\text{DA}_{\text{md}}\% = \text{V3 (mL)}/(\text{V1 (mL)} + \text{V2(mL)} + \text{V3(mL)} - \text{V4(mL)}) \times 100 \quad (3)$$

$$\text{DA}_{\text{c}}\% = (\text{V4} \times 10^{-3}(\text{L}) \times 0.05 (\text{mol/L}))/((0.500 (\text{g}) \times 0.821) \times 194.14 (\text{g/mol}) \times 100 \quad (4)$$

2.3.2. Methoxyl percentage

Methoxyl percentage (MeO%) was determined according to Zoumbia et al. [32]. MeO is related to DM because the amount of methoxyl groups in 100% of esterified pectin is 16.32%, the methoxyl percentage was calculated from the following Eq. (5).

$$\text{MeO\%} = (16.32/100) \times \text{DM} \quad (5)$$

2.3.3. Determination of galacturonic acid

Galacturonic acid content was estimated by the sulfamate/3-phenylphenol colorimetric assay, reported by Filisetti-Cozzi and Carpita

[33]. 0.4 mL of CPHP ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) were added with 40 μL of 4 M potassium sulfamate solution at pH 1.6, and 2.5 mL of 75 mM sodium tetraborate solution in H_2SO_4 , and the mixture was vortexed for one min and cooled to room temperature in an ice bath. Then the tubes were put into boiling water during 15 min, and the reaction was stopped by cooling in ice-water bath for 1.0–1.5 min. Finally, 80 μL of 0.5% 3-phenylphenol (w/v) in 0.5% NaOH (w/v) was added and the sample was vortexed prior to reading its absorbance at 525 nm in a spectrophotometer (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, USA). The quantification of galacturonic acid was performed, using D-galacturonic acid as standard (Sigma-Aldrich Mexico, Toluca, State of Mexico, Mexico).

2.3.4. Determination of protein content

Protein content was determined by the assay of Lowry [34]. Initially, 0.5 mL of CPHP (0.01 g/mL) and 0.5 mL of deionized water were put into amber glass tubes. Afterwards 1 mL of solution A (sodium tartrate carbonate, 0.8 N NaOH and 10% sodium dodecyl sulfate) was added and the mixture was vortexed for 1 min and left to stand for 10 min. Subsequently, 0.5 mL of solution B (0.3 N Folin-Ciocalteu reagent) was added to each amber glass tubes, vortexed for 1 min, after which the samples were left to stand for 30 min. Finally, absorbance readings were taken at 750 nm, using bovine serum albumin as standard (Sigma-Aldrich Mexico, Toluca, State of Mexico, Mexico).

2.4. Intrinsic viscosity (η) and estimation of the average viscosimetric molecular weight

Intrinsic viscosity [η] determination was realized according to the procedure of Cuevas-Bernardino et al. [16], with slight modifications. Stock solution (0.1% w/v) was prepared by dispersing CPHP in deionized water (100 mM NaCl) under magnetic stirring during 30 min at room temperature until full dissolution, and stored at 25 °C for 24 h in order to complete the hydration. This stock solution was diluted in a range of concentration (0.001–0.1 g/100 mL). Diluted samples were vigorously stirred on a vortex mixer and left to equilibrate at least 15 min prior to viscosity measurements. Viscosity was determined with a Physica MCR 301 Dynamic Shear Rheometer (Physica Messtechnik, Stuttgart, Germany) using the DG26.7 concentric cylinders geometry with double gap at a constant speed of 62.1 s^{-1} (20 rpm), allowing the sample to stand for 5 min to recover its structure, and for temperature to equilibrate at 25 °C with the help of the Physica TEK 150P Peltier system. Relative (η_{rel}), specific (η_{sp}) and reduced (η_{red}) viscosities were calculated from the following Eqs. (6)–(8):

$$\eta_{\text{rel}} = \eta_1 / \eta_0 \quad (6)$$

$$\eta_{\text{sp}} = (\eta_1 / \eta_0) - 1 \quad (7)$$

$$\eta_{\text{red}} = (\eta_1 / \eta_0) - 1 / C \quad (8)$$

where η_1 is the viscosity of the pectin solution, η_0 is the viscosity of the solvent (100 mM NaCl solution) and C is the pectin concentration.

Intrinsic viscosity [η] was calculated by linearly extrapolating the reduced viscosity to zero concentration. Intrinsic viscosity is related to the molecular weight [Mw] through the Mark-Houwink-Sakurada Eq. (9):

$$[\eta] = k' [\text{Mw}]^\alpha \quad (9)$$

where k' and α are empirical constants, which depend on temperature, as well as the polymer-solvent system and correspond to values of $5.08 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-4}$ and $0.71 \pm 0.02 \text{ dL/g}$, respectively [16]. It should be noted that these constants can be used to determine the average viscosimetric molecular weight of pectin if the system conditions are maintained (25 °C and a solution of 100 mM NaCl as solvent).

2.5. Soluble complexes preparation

Aqueous stock solutions (1.0% w/w) of CPHP and WPH were prepared and stored at $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ during 24 h to ensure their complete hydration. These stock solutions were diluted with deionized water to a desired concentration required for a given experiment. The zeta potential (ζ -potential) of the biopolymers solutions (0.05% w/w) was determined with a Zetasizer Nano ZS90 coupled to the autotitrator MTP-2 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) at pH values ranging between 2.0 and 7.0 at 25 °C. The pH of the solutions was adjusted to the desired value by the addition of either 0.1 N NaOH or 0.1 N HCl. The ζ -potential was determined by measuring the direction and velocity of the dispersion molecules as they moved along the applied electric field. The equipment software converted the electrophoretic mobility measurements into ζ -potential values using the Smoluchowski mathematical model.

Complexation between oppositely charged biopolymers not only depends on pH, but also on the relative weight ratio between the interacting biopolymers. The pH where the maximum stoichiometric ($\text{pH}_{\text{stoich}}$) difference between the positive ζ -potential of WPH and negative ζ -potential of CPHP occurred was selected as the pH for driving the electrostatic interaction between both biopolymers. In order to determine the weight ratio between WPH and CPHP leading to soluble complexes formation ($R_{\text{WPH-CPHP}}$); CPHP dispersion 10 mL (0.02 mg mL^{-1}) at $\text{pH}_{\text{stoich}}$ was transferred to the autotitrator and titrated with WPH dispersion (0.5 mg mL^{-1}) at $\text{pH}_{\text{stoich}}$. Changes in ζ -potential and average hydrodynamic diameter (d_h) of the WPH-CPHP mixtures were measured as aliquots of $\sim 0.25 \text{ mL}$ of WPH were added to the CPHP dispersion. The $R_{\text{WPH-CPHP}}$ selected for soluble complex formation was the last point where the hydrodynamic diameter remained practically constant, before commencing to increase sharply.

2.6. Apparent shear viscosity

The apparent shear viscosity of CPHP and $\text{SC}_{\text{WPH-CPHP}}$ solutions (1.0% w/w) was determined on a rheometer using a concentric cylinder geometry with double-gap and applying a shear rate of 50 s^{-1} , since it has been reported that this shear rate value is equivalent to that applied in the mouth, and correlates well with the perceived viscosity by consumers [35].

2.7. Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR)

CPHP, WPH and $\text{SC}_{\text{WPH-CPHP}}$ were subjected to FT-IR analysis to determine their major functional groups. The FT-IR spectra were obtained using a spectrometer (Frontier FT-IR/FIR, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) equipped with a crystal diamond universal ATR sampling accessory. Approximately 0.2 g of sample were placed on the ATR spectrometer attachment and pressed with the ATR head. Measurements were obtained over the range of 4000 to 400 cm^{-1} at a resolution of 4 cm^{-1} . There were 40 scans per sample which were integrated to obtain mean values of the spectrum. Fourier self-deconvolution and second derivative resolution enhancement were applied to increase the spectral resolution with the equipment software.

2.8. Dynamic interfacial tension

Dynamic of interfacial adsorption of CPHP (1.0% w/w) and $\text{SC}_{\text{WPH-CPHP}}$ (1.0% w/w) at the canola oil-water interface was determined by monitoring the evolution of interfacial tension (γ) with time (θ). The method used was that described by Tang and Shen [36], with slight modifications. An optical contact angle meter, OCA-20, equipped with oscillating drop accessory ODG-20 (Dataphysics Instruments GmbH, Filderstadt, Germany) was used. One drop of approximately 40 μL of CPHP and $\text{SC}_{\text{WPH-CPHP}}$ were automatically formed with the aid of a syringe into a glass cuvette containing the purified canola oil phase. The

shape of the drop was analyzed to record changes in interfacial tension over a period of 10,800 s (3.0 h) with a CCD camera. Experiments were carried out at 25 °C.

2.9. Preparation and characterization of emulsions

2.9.1. Preparation

Oil-in-water emulsions were prepared using CPHP and SC_{WPH-CPHP} (1.0% w/w) at pH 3.25 as the continuous phase (w) and canola oil as oily phase (o). The o/w emulsions had a dispersed phase mass fraction of 0.1. The o/w emulsions were coded as E_x, where x stands for the emulsifying agent used.

Emulsions were prepared by incorporating the dispersed phase drop-wise with continuous agitation into the continuous phase with the help of a high shear homogenizer (Ultra-Turra[®] T50 basic IKA Works, Inc., Wilmington, USA), operated at 8000 rpm for 3 min to form coarse emulsion. Finally, the coarse emulsions were passed through a high-pressure homogenizer (Microfluidics[®] M-110P, Newton Massachusetts, USA) operated at 100 MPa for three cycles. An ice bath was used for avoiding temperature increase during emulsion formation. The emulsions were stored at 4 ± 1 °C prior to further analysis.

2.9.2. Characterization of emulsions

The area-volume mean diameter (d_{3,2}) of the freshly prepared emulsions was verified using a static laser diffraction particle size analyzer (Malvern Mastersizer 3000, Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, UK). Refractive indexes of the dispersed and continuous phases used in the calculations were 1.466 and 1.330, respectively, determined with a refractometer (ABBE 5 refractometer, Model 44-501; American Optical Co., USA). The change in d_{3,2} of E_x was monitored at 0, 1, 7, 14, 21 and 28 days.

Creaming rate of the emulsions was evaluated in a LUMiSizer centrifuge (LUM GmbH, Berlin, Germany), an instrument that uses centripetal force to accelerate the instability of emulsions due to aggregation phenomena [37]. Instrumental parameters used for the measurements were as follows: volume, 0.4 mL of emulsion in the cell; rotation speed of 3000 rpm; 255 measurements determined at time intervals of 30 s and temperature of 25 °C [38]. Creaming rate was provided by the equipment software, and provides a measure of the stability of the emulsion: the higher the rate of creaming, the lower the emulsion stability [37].

ζ-Potential of the freshly prepared emulsions was determined with a Zetasizer Nano ZS90 equipment. Samples of E_x were diluted in deionized water (ratio of 1:100 v/v) and then filled into the test cell and placed on the measuring equipment.

2.10. Statistical analysis

All experiments were done in triplicate from 3 independent experiments using a randomized experimental design and values were expressed as mean values ± SD. Data were subjected to simple classification analysis of variance and in pertinent cases to Tukey's mean comparison analysis. Significance was established at p ≤ 0.05. Data analysis was performed with the Statgraphics Plus software (Statistical Graphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia, USA).

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical characteristics of cacao pod husks pectin

CPHP yield was of 6.18 g/100 g in dry basis (d.b.), which was within the range of 2.64 to 10.6 g/100 g reported by several authors [17,18,20]. The physicochemical characteristics of CPHP are presented in Table 1. CPHP had a galacturonic acid content higher than 65%, which is the minimum requirement for commercial applications [6].

Table 1

Physicochemical characteristics of pectin extracted from the cacao pod husks (CPHP).

	CPHP
DM (%)	83.22 ± 0.96
DAmD (%)	0.62 ± 0.09
DAC (%)	10.20 ± 0.33
MeO (%)	13.58 ± 0.16
Galacturonic acid (%)	72.01 ± 0.20
Protein (%)	3.68 ± 0.22
Moisture (%)	4.94 ± 0.30
Yield (g/100 g)	6.18 ± 0.31
Apparent viscosity (Pa·s) ^a	0.026 ± 7.27 × 10 ⁻⁵
Intrinsic viscosity (dL/g)	8.82
Molecular weight (viscosimetric) (kDa)	255.85

The percentages are on dry basis.

^a Determined at a shear rate of 50 s⁻¹ and at a concentration of 1.0% w/w.

DM value was 83.22%, so CPHP can be classified as a high methoxyl pectin (DM > 50%) [1,3,39]. Fig. 1 shows the schematic representation of CPHP. It has been reported that methoxyl groups on pectin backbone can act as a driving force for the molecular diffusion mechanism to oil-in-water interface during emulsions formation, due to its hydrophobic nature [8,40]. DAmD (0.62%) of CPHP is too low for achieving an efficient release of aromatic compounds (alcohols, ketones, aldehydes, and esters), as Kim et al. [41] reported that an amidation degree of 14% or more was required for achieving this purpose. DAC of CPHP was 10.20%, and according to Alba and Kontogiorgos [39], pectins with a DAC of at least 10%, may show good emulsifying and interfacial activities, such as in the case of sugar beet pectins [10,42,43]. Vriesmann and Petkowicz [44] reported that CPHP with 17% DAC possessed good gelling properties. Protein content (3.68%) of CPHP was lower than 8.6% reported by Vriesmann et al. [45].

3.2. Intrinsic viscosity and viscosimetric molecular weight estimation

Behavior of the reduced viscosity vs concentration of dilute CPHP solutions was studied in order to obtain the intrinsic viscosity [η] (Fig. 2). Upon dilution in pure water, polyelectrolytes such as gum Arabic and pectin initially exhibit a decrease in reduced viscosity (η_{red}) followed by an increase, due to a coil expansion by the mutual repulsion between like charges attached to the coil [16]. Addition of sodium chloride is commonly used to reduce or eliminate conformational changes with concentration of polyelectrolytes, and a linear dependence of the reduced viscosity over polyelectrolyte concentration occurs [46]. This is because Na⁺ counterions screen the ionic interactions and molecules adopt a more compact conformation in solution and thus, intrinsic viscosity [η] value decreases [47]. [η] measures the hydrodynamic volume per gram of macromolecular substance at infinite dilution, and is obtained when the η_{red} data is extrapolated to “zero” concentration, where theoretically the molecular interactions of the polymers are suppressed. [η] is a characteristic related to the molecular weight and the conformation of polymers [48]. Conformations of pectin include random coils, spheres, rigid rod-like, and may affect the adsorption mechanism at the oil-water interface [20,49].

[η] and viscosimetric molecular weight (Mw) of CPHP were 8.82 dL/g and 255.85 kDa, respectively. These values are higher than those reported by Yapo and Koffi [20] for cacao pod husks pectin which were of 1.62–3.04 dL/g for [η] and of 43–82 kDa for Mw. The differences can be attributed to extraction method, origin, variety, and edafoclimatic conditions.

3.3. ζ-Potential of stock dispersions and formation of SC_{WPH-CPHP}

ζ-Potential variation with pH for CPHP and WPH dispersions is shown in Fig. 3. ζ-Potential values for CPHP dispersions were negative throughout the pH range studied, due to the low pK_a values of their

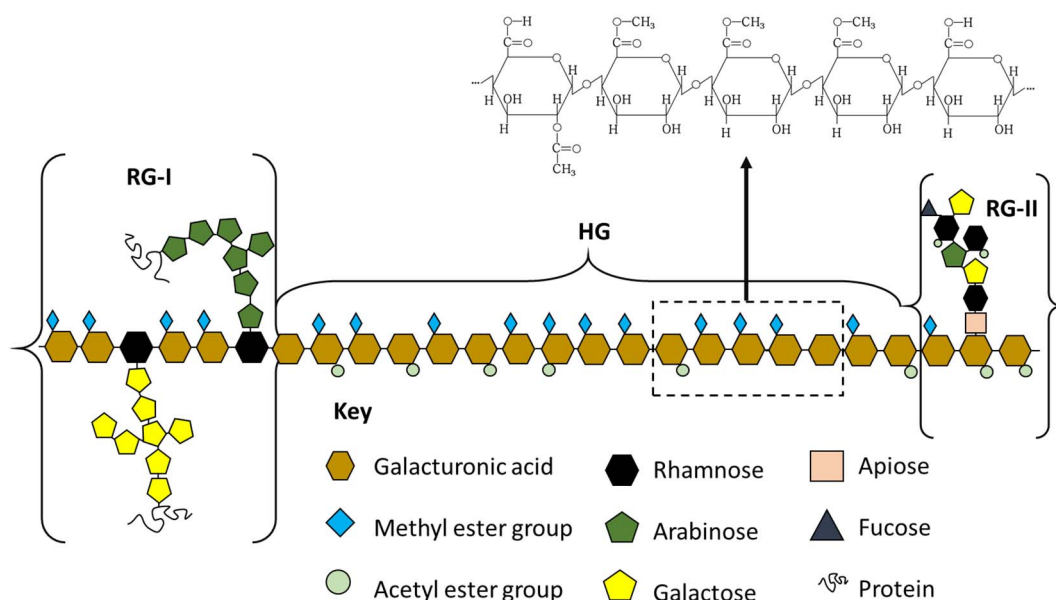


Fig. 1. Schematic representation of the structure of the cacao pods husk pectin (CPHP).

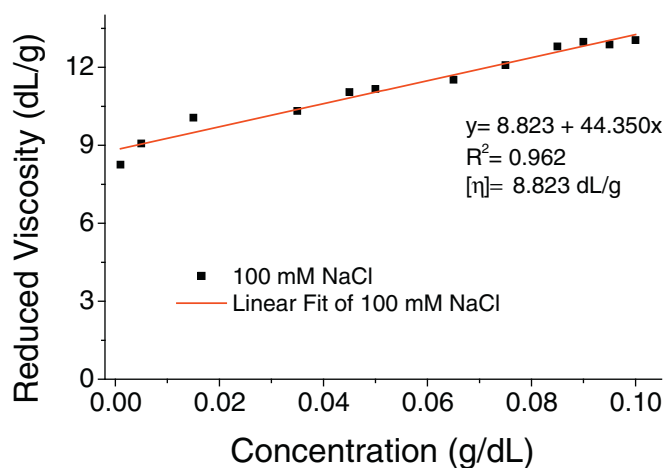


Fig. 2. Reduced viscosity vs concentration of cacao pods husk pectin (CPHP) dispersed in 100 mM NaCl aqueous solution. The solid line shows a linear relationship between reduced viscosity and pectin concentration.

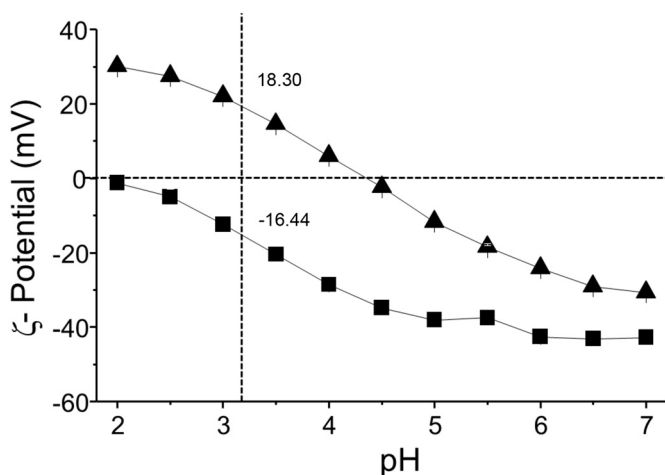


Fig. 3. ζ-Potential versus pH profiles of WPH (▲) and CPHP (■) at 0.05% w/w.

carboxyl groups. ζ-potential values presented by CPHP were in accordance with those reported by Jones et al. [50] for high methoxyl pectins. The carboxylic groups ($-\text{COOH}$) present at low pH were converted to carboxylate groups ($-\text{COO}^-$) as pH increased, and the magnitude of negative ζ-potential value increased. The maximum slope of the ζ-potential curve of the CPHP occurred in a pH range of 3.0 to 4.0, and can be related to the pK_a of CPHP solutions [50].

For WPH, ζ-potential values varied between $30.0 \pm 0.75 \text{ mV}$ at pH 2.0 to $-30.7 \pm 1.2 \text{ mV}$ at pH 7.0. A zero ζ-potential value occurred at the isoelectric point (pI ; pH of 4.27). The negative ζ-potential values that occurred at pH values $> \text{pI}$ can be attributed to the ionization of the carboxylic groups ($-\text{COOH}$) into carboxylate groups ($-\text{COO}^-$), while the positive ζ-potential values at $\text{pH} < \text{pI}$ are due to the protonation of the amino moieties ($-\text{NH}_2$) giving rise to ammonium groups ($-\text{NH}_4^+$).

pH of the medium strongly affected the charge density of the studied biopolymers, which in turn affect the strength of complexation or interaction between them. According to the interaction window between positively charged WPH and negatively charged CPHP, the pH where the maximum stoichiometric difference occurred was 3.25, therefore this value was used as $\text{pH}_{\text{stoich}}$.

ζ-Potential and hydrodynamic diameter (d_h) measurements were used to provide information about the influence of the weight ratio between WPH and CPHP ($R_{\text{WPH-CPHP}}$) on the formation of soluble complexes. These parameters were measured as a CPHP dispersion (0.02 mg mL^{-1}) was titrated with a WPH dispersion (0.5 mg mL^{-1}) at pH 3.25. Initially the CPHP dispersion was completely transparent and the pectin molecules exhibited a d_h of 2173 nm and a ζ-potential of -20.83 mV (Fig. 4). By adding WPH dispersion to CPHP dispersion the progressive appearance of two complexation main phases was revealed: (1) the first phase (called region A) comprised between $R_{0.24:1}$ to $R_{5:1}$ where the d_h of the WPH-CPHP system decreased slightly, after which it reached a plateau with values around of 821 nm, while the ζ-potential values varied from -19.96 mV to -10.38 mV , indicating that the negative charge of the system decreased. In this region the appearance of the WPH-CPHP system was of a uniformly turbid dispersion. The decrease of the CPHP hydrodynamic diameter could be due to the contraction of the pectin molecule, which becomes less expanded as WPH interacts with the carboxylic groups of the polysaccharide [51]. Not all of the negatively charged CPHP moieties are neutralized by the positively charged WPH moieties, so that the complexes formed possess a net negative charge and thus remain soluble in the bulk of the

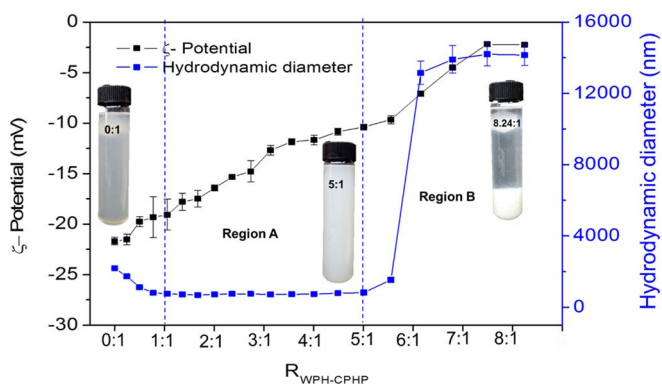


Fig. 4. Evolution of the ζ -potential and hydrodynamic diameter as function of the weight ratio ($R_{\text{WPH-CPHP}}$) between WPH and CPHP at pH 3.25.

aqueous phase [51]; and (2) the second phase (called region B) comprised between $R_{5.5:1}$ to $R_{8.24:1}$ was characterized by a drift in the ζ -potential values towards zero and by a sharp upward increase in d_h reaching values of up to 14,747 nm. These results are indicative of the progressive neutralization of the negative charges of the CPHP by increased added amounts of WPH, which resulted in association of the soluble complexes in larger and insoluble complexes (complex coarces) as was evidenced by the macroscopic phase separation [52]. Thus, from these results a $R_{5:1}$ was chosen for obtaining the SC.

3.4. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

FT-IR spectra of CPHP, WPH and $\text{SC}_{\text{WPH-CPHP}}$ are shown in Fig. 5. The two principal absorbance peaks that dictate the major functional properties of CPHP occur approximately at 1725 and 1607 cm^{-1} , which are attributed to the esterified carboxyl groups and to the ionic carboxyl groups ($-\text{COO}^-$), respectively [53–55]. The acetyl group has multiple wavenumbers, the most important being $\text{C}=\text{O}$ stretching peaks, around 1720 cm^{-1} , the $\text{C}-\text{H}$ stretching vibration of the CH_3 group between 2960 and 2870 cm^{-1} and the $\text{C}-\text{O}$ stretching vibration around 1250 cm^{-1} and 1255 cm^{-1} [56,57]. The above mentioned absorption bands are characteristic of chemically modified polysaccharides by acetylation [58,59] and they are present in the CPHP spectrum, indicating that this molecule has this functional group which is consistent with the data reported in Table 1.

WPH spectrum, showed absorbance peaks around 1630 cm^{-1} corresponding to $\text{C}=\text{O}$ stretching of amide I, around 1535 cm^{-1} corresponding to $\text{N}-\text{H}$ bend of the amide II and finally around 1240 cm^{-1} corresponding to $\text{C}-\text{N}$ stretching and $\text{N}-\text{H}$ bend of the amide III [60–63].

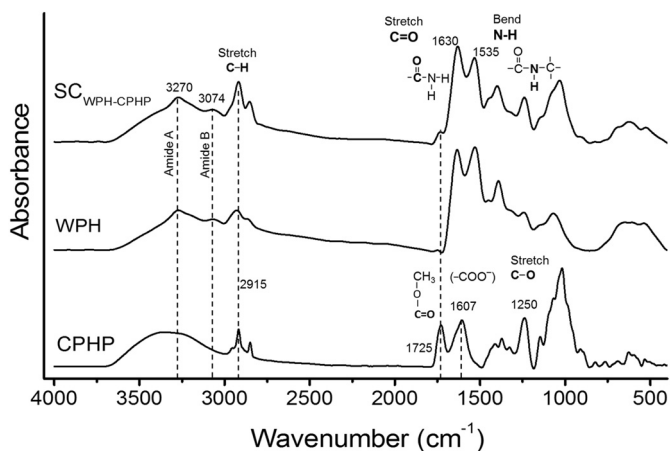


Fig. 5. FT-IR spectra of CPHP, WPH and $\text{SC}_{\text{WPH-CPHP}}$.

$\text{SC}_{\text{WPH-CPHP}}$ spectrum showed displaced peaks with different intensities and in some cases the appearance and/or overlap of new absorption signals, presented wave vibrations belonging to the spectral regions of CPHP at 2915 , 1734 and 1250 cm^{-1} , and of WPH at 1630 , 1535 and 1240 cm^{-1} . The absorption in amide I region is considered the most useful for FT-IR analysis of the secondary structure of proteins, same that determines its chemical reactivity, intermolecular interactions, and functional properties such as solubility, water holding capacity, gelation, foaming, and emulsification [64]. In this case, the amide I peak for WPH was observed at 1630 cm^{-1} , which has been related to random coil type structures with more entropically favorable conformations, which facilitates the complexation process between the biopolymers [65]. As a result of the biopolymer interaction, FT-IR of $\text{SC}_{\text{WPH-CPHP}}$ changed significantly in the carbonyl-amide region. The $-\text{NH}_3^+$ groups (Amide B) for WPH and asymmetric and symmetric $-\text{COO}^-$ stretching vibration at 1607 cm^{-1} and 1423 cm^{-1} for CPHP disappeared, respectively, indicating the electrostatic interaction between the amine groups of WPH (NH_3^+) and carboxyl groups of CPHP ($-\text{COO}^-$) [66]. At the same time, the soluble complex showed an amide A peak at a lower wavenumber (3270 cm^{-1}) than WPH, indicating some hydrogen bindings between amino or $-\text{OH}$ of WPH and $-\text{OH}$ of CPHP took place [66]. Therefore, the manifestations of this type of vibrations in the wavenumbers mentioned permitted to establish changes in the original conformation of the biopolymers, suggesting that the complexing between WPH and CPHP was successful. A schematic representation of $\text{SC}_{\text{WPH-CPHP}}$ derived from the above observations is given in Fig. 6.

3.5. Dynamic interfacial tension

The adsorption of molecules with surface-active capacity at the oil-water interface is the most important step in the formation of emulsions [29]. During the adsorption process, these molecules undergo conformational changes as they interact with the interface [37]. The dependence of the interfacial tension (γ) as a function of time of CPHP (1.0% w/w) and $\text{SC}_{\text{WPH-CPHP}}$ (1.0% w/w) at the canola oil-water interface is shown in Fig. 7.

The interfacial tension of the deionized water was 29.5 ± 0.50 mN/m , whereas that of CPHP was 25.20 ± 0.43 mN/m after 10 s. This decrease may be related to structural components of CPHP as: i) hydrophobic groups (methyl ester and acetyl), ii) molecular conformation and iii) the presence of protein residues. These

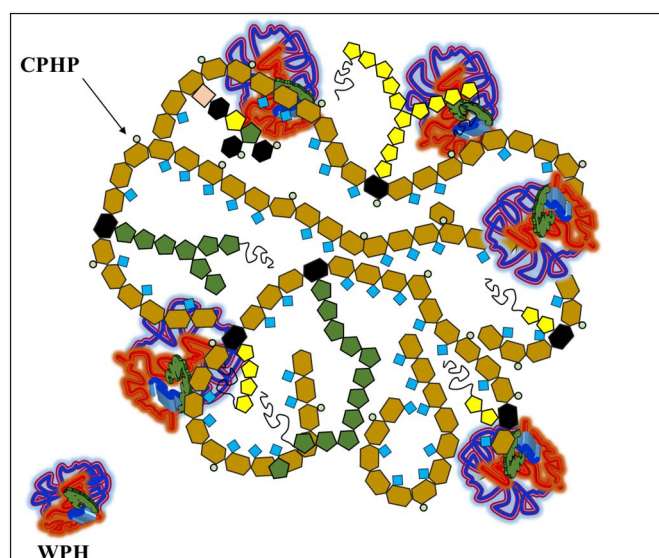


Fig. 6. Schematic representation of the structure of $\text{SC}_{\text{WPH-CPHP}}$.

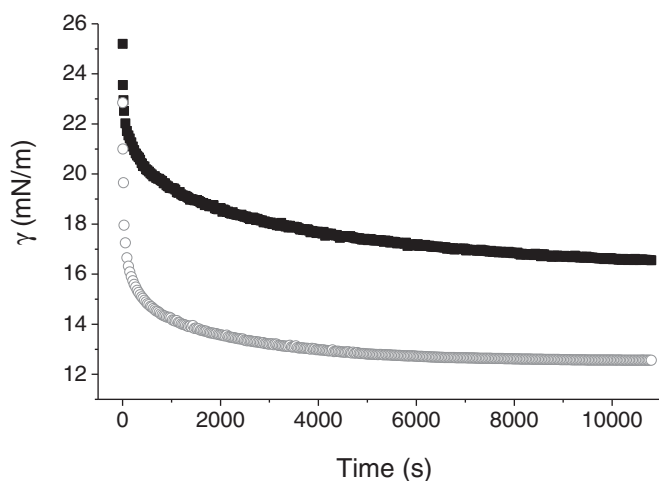


Fig. 7. Interfacial tension adsorption dynamics at the oil-water interface of CPHP (■) and SC_{WPH-CPHP} (○) at 1.0% w/w.

components acted as hydrophobic anchors and facilitated the adsorption of CPHP at the interface, resulting in the reduction of interfacial tension [12,39,40,42].

The initial interfacial tension (10 s) of SC_{WPH-CPHP} was 22.85 ± 0.30 mN/m and was lower than that of CPHP after 10 s. The increase in the amino groups acted as a driving force for diffusion to the interface, indicating that the SC_{WPH-CPHP} molecules diffused to and anchored at the interface at a faster rate than those of CPHP, saturating faster the interfacial monolayer. The subsequent relative slow drop in the interfacial tension at longer times of CPHP and SC_{WPH-CPHP} can be caused by the reconfiguration of the adsorbed molecules in the interface [16].

The adsorption kinetics of the biopolymers were determined from surface pressure changes (π) over time, which was derived from the data of Fig. 7. The main stages of adsorption kinetics that can be defined based on the surface pressure-time curves profiles are as follows: (i) diffusion, (ii) penetration and (iii) rearrangement of molecules at the oil-water interface, multilayer formation and possibly interfacial gelling, which give rise to diffusion (k_{diff}), penetration (k_{pen}) and molecular rearrangement (k_{rea}) rate constants, respectively [67]. During the first stage, at relatively low surface pressures a modified form of the Ward and Tordai [68] equation can be used to correlate the change in surface pressure with time (Eq. 10):

$$\pi = 2C_0KT(D\theta/3.14)^{1/2} \quad (10)$$

where C_0 is the initial biopolymer concentration in the aqueous phase, K is the Boltzmann constant, T is the absolute temperature, D is the diffusion coefficient and θ is the adsorption time. If diffusion at the interface controls the adsorption process, a plot of π against $\theta^{1/2}$ will be linear and the slope of this plot will be k_{diff} , [36]. From Fig. 8a it can be seen that for both CPHP and SC_{WPH-CPHP} the diffusion controlled adsorption occurred within 90 s. k_{diff} values for CPHP and SC_{WPH-CPHP} are given in Table 2. SC_{WPH-CPHP} exhibited a steeper slope than CPHP. This behavior may be related to the amino group's content of SC_{WPH-CPHP} (protein content of $54.39 \pm 1.47\%$) which was 14.7 times greater than that of CPHP. Additionally, the apparent viscosity at 50 s^{-1} of SC_{WPH-CPHP} ($0.0074 \pm 3.10 \times 10^{-5} \text{ Pa}\cdot\text{s}$) was 3.5 times lower than that of CPHP, so that the molecules of the former encountered a lower resistance to their mobility, and were capable of migrating faster to the oil-water interface.

After the sharp initial adsorption period (≤ 90 s), the rate of adsorption of CPHP and SC_{WPH-CPHP} slowed down up to 10,800 s, and the $\pi - \theta$ data within this time interval can be analyzed with the following first-order phenomenological Eq. (11) [69], in order to obtain k_{pen} and k_{rea} constants:

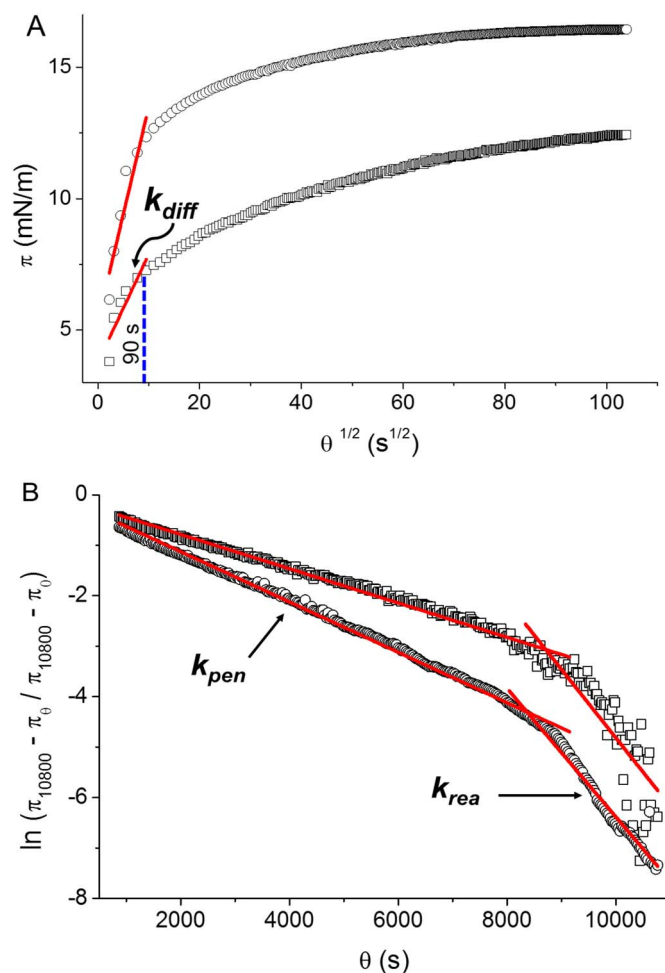


Fig. 8. a) Dependence of surface pressure (π) as a function of the square root of time ($\theta^{0.5}$). The solid-solid line depicts the linear slope of the curves where the adsorption is diffusion-controlled (k_{diff}). b) Plot of $\ln(\pi_{10800} - \pi_0)/(\pi_{10800} - \pi_0)$ versus θ . The continuous solid line depicts the first slope corresponding to the first-order rate constants of adsorption/penetration (k_{pen}), while the second slope corresponds to the first-order rate constants of structural rearrangement (k_{rea}). For CPHP (□) and SC_{WPH-CPHP} (○) at the oil-water interface at 1.0% w/w concentration.

Table 2

Parameters of the adsorption dynamics of the biopolymers under study at the oil-water interface.

Type of biopolymer	k_{diff} (mN/m ⁻¹ s ^{0.5})	$k_{pen} \times 10^4$ (s ⁻¹)	$k_{rea} \times 10^4$ (s ⁻¹)
CPHP	0.41 ± 0.09	3.45 ± 0.02	15.90 ± 1.03
SC _{WPH-CPHP}	0.81 ± 0.14	4.99 ± 0.02	13.40 ± 0.22

CPHP: cacao pod husks pectin; SC_{WPH-CPHP}: soluble complex between CPHP and whey protein hydrolysate (WPH); diffusion (k_{diff}), penetration (k_{pen}) and rearrangement (k_{rea}) constants.

$$\ln(\pi_{10800} - \pi_0/\pi_{10800} - \pi_0) = -k_i\theta \quad (11)$$

where π_{10800} , π_0 , π_0 , are the surface pressure values at the experimental final adsorption time (10,800 s), of each step (θ) and at the initial time (90 s), respectively, and k_i is the first-order rate constant. These plots usually yield two linear slopes, where the first slope refers to k_{pen} , and the second slope k_{rea} . The plot of $\ln[(\pi_{10800} - \pi_0)/(\pi_{10800} - \pi_0)]$ against the time for SC_{WPH-CPHP} and CPHP showed similar profiles (Fig. 8b). SC_{WPH-CPHP} exhibited a higher value of k_{pen} (Table 2) indicative that the complex molecules could penetrate the monolayer at the interface more easily than those of CPHP, probably because of the higher affinity (higher hydrophobicity) of its molecular segments to the oil phase. On the other hand, CPHP displayed a higher value for k_{rea}

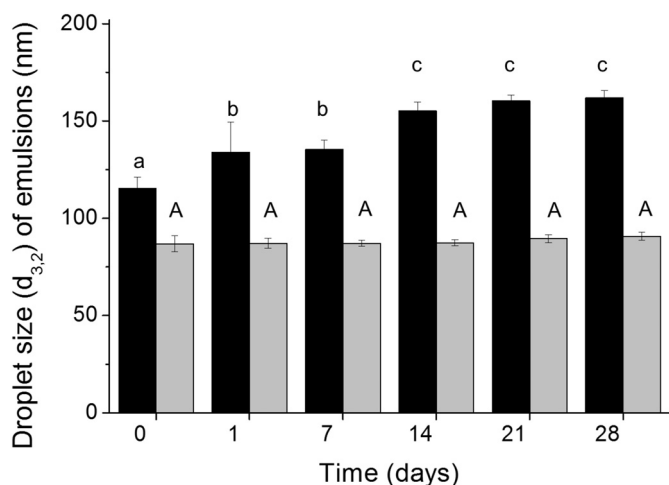


Fig. 9. Variation of the area-volume mean diameter ($d_{3,2}$) of the oil droplets during 28 days of storage at 4 ± 1 °C. $E_{\text{C PHP}}$ (■) and $E_{\text{WPH-CPHP}}$ (■) at 1% w/w. Different lowercase and uppercase letters indicate significant differences between means ($p \leq 0.05$).

than $SC_{\text{WPH-CPHP}}$, indicative that the latter molecules packing at the interface was higher than that of the former molecules, which restricted their freedom for rearrangement [16].

3.6. Formation and stabilization of oil-water emulsions

The size of O/W emulsion droplets is determined by the two fundamental processes that occur during its preparation: the fragmentation of the dispersed phase into small droplets and the coalescence of the recently formed droplets. The emulsifying/stabilizing agents have effects on both processes, by: a) the reduction of the interfacial tension, which promotes the rupture of the dispersed phase into small droplets and b) the formation of an interfacial biopolymer film, which prevents the phenomenon of coalescence [70].

Fig. 9 shows the $d_{3,2}$ evolution of the O/W emulsions prepared with CPHP (1% w/w) and $SC_{\text{WPH-CPHP}}$ (1% w/w), stored at 4 ± 1 °C for 28 days. $E_{\text{WPH-CPHP}}$ displayed oil droplets with significantly lower initial $d_{3,2}$ (86.98 ± 4.0 nm) than $E_{\text{C PHP}}$ (113.2 ± 0.5 nm). $E_{\text{WPH-CPHP}}$ did not show a significant change in droplet size (90.36 ± 0.13 nm), while $E_{\text{C PHP}}$ suffered a significant increase (162.0 ± 3.61 nm) during the 28 days of storage time.

Several authors have reported the formation of O/W emulsions stabilized with pectin from various botanical sources, such as apple, citrus, sugar beet and hawthorn (conc. 0.5–1.5%) and droplet sizes in the range of 0.4–20 μm [11,16,55,71,72]. Notice that the mean droplet sizes obtained in this work were in the nanometric scale while those reported in the works cited above fell basically within the micrometric scale. Yapo and Koffi [20] reported that pectin from cacao pod husks exhibited good emulsifying and emulsion-stabilizing activities, but did not provide details of the droplet size of the emulsions.

The possible explanations involved for the better emulsifying and stabilizing performance of $SC_{\text{WPH-CPHP}}$ in comparison to CPHP are the following: (a) $SC_{\text{WPH-CPHP}}$ displayed a higher k_{diff} due to its higher hydrophobic character than CPHP, so that the molecules diffused and anchored more rapidly at the interface, forming initial smaller droplet sizes; and (b) Once small droplets have been formed, the key factor affecting emulsion long-term stability is how the adsorbed molecules conform at the interface, and if they are able of forming thick steric stabilizing layers. The higher k_{pen} and lower k_{rea} displayed by $SC_{\text{WPH-CPHP}}$ in comparison to CPHP, indicated that the improved penetration and packing occurred as a result of the smaller hydrodynamic diameter and lower negative surface charges showed by the complex. The overall effect was the formation of a bulkier interfacial layer around $E_{\text{WPH-CPHP}}$

droplets than around $E_{\text{C PHP}}$ droplets.

Finally, $E_{\text{C PHP}}$ showed a significantly higher creaming index ($9.72 \pm 0.33\%$) than $E_{\text{WPH-CPHP}}$ ($3.53 \pm 0.55\%$), despite that $E_{\text{WPH-CPHP}}$ displayed lower apparent viscosity (0.143 ± 0.008 Pa·s) and lower ζ -potential (-25.36 ± 0.42 mV) than $E_{\text{C PHP}}$ (0.250 ± 0.001 Pa·s and -37.32 ± 0.28 mV, respectively). These results seem to pinpoint that the higher concentration of smaller sized droplets in $E_{\text{WPH-CPHP}}$ enhanced the formation of 3-D network, where the steric stabilization term was the dominant stabilizing mechanism [16], and where ζ -potential of the droplet and the apparent viscosity of the emulsion had little bearing on emulsion stability.

4. Conclusions

Cacao pod husks agroindustrial wastes can be used for obtaining pectin by using a simple environmental friendly extraction process. The cacao pod husks pectin (CPHP) showed both surface active and emulsifying activities. Modification of CPHP by its complexing with whey protein hydrolysate (WPH) improved significantly the surface active and emulsifying activities. Oil-in-water emulsion utilizing WPH-CPHP soluble complex ($SC_{\text{WPH-CPHP}}$) as emulsifier/stabilizer producing nanometric droplet sizes, which did not show significant changes during 28 days of storage, and displayed a low creaming index under accelerated centrifugation testing. Thus, an important contribution of this work was to provide a simple and efficient methodology for imparting superior surface active and emulsifying activities to CPHP, and the knowledge derived from this study could broaden CPHP application in the food industry, and contribute to reduce contamination problems associated with cacao processing byproducts.

Acknowledgements

This research was partially supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) of Mexico, through projects 236500 and 410175.

References

- [1] F. Munarin, M.C. Tanzi, P. Petrini, Review: advances in biomedical applications of pectin gels, *Int. J. Biol. Macromol.* 51 (2012) 681–689.
- [2] L. Zhang, Z. Shi, W. Shanguan, Y. Fang, K. Nishinari, G.O. Phillips, F. Jiang, Emulsification properties of sugar beet pectin after modification with horseradish peroxidase, *Food Hydrocoll.* 43 (2014) 107–113.
- [3] X. Hua, K. Wang, R. Yang, J. Kang, J. Zhang, Rheological properties of natural low-methoxyl pectin extracted from sunflower head, *Food Hydrocoll.* 44 (2015) 122–128.
- [4] R. Lutz, A. Aserin, L. Wicker, N. Garti, Structure and physical properties of pectins with block-wise distribution of carboxylic acid groups, *Food Hydrocoll.* 23 (2009) 786–794.
- [5] C. Kyomugasho, S. Christiaens, A. Shpigelman, A.M. Van Loey, M.E. Hendrickx, FT-IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit- and vegetable-based matrices, *Food Chem.* 176 (2015) 82–90.
- [6] C.D. May, Industrial pectins: sources, production and applications, *Carbohydr. Polym.* 12 (1990) 79–99.
- [7] B.R. Thakur, R.K. Singh, A.K. Handa, M.A. Rao, Chemistry and uses of pectin—a review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37 (1997) 47–73.
- [8] K. Burapapad, H. Takeuchi, P. Sriamornsak, Novel pectin-based nanoparticles prepared from nanoemulsion templates for improving *in vitro* dissolution and *in vivo* absorption of poorly water-soluble drug, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 82 (2012) 250–261.
- [9] E.D. Nguémazong, S. Christiaens, A. Shpigelman, A. Van Loey, M. Hendrickx, The emulsifying and emulsion-stabilizing properties of pectin: a review, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 14 (2015) 705–718.
- [10] J. Leroux, V. Langendorff, G. Schick, V. Vaishnav, J. Mazoyer, Emulsion stabilizing properties of pectin, *Food Hydrocoll.* 17 (2003) 455–462.
- [11] M.I. Guerra-Rosas, J. Morales-Castro, L.A. Ochoa-Martínez, L. Salvia-Trujillo, O. Martín-Belloso, Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils, *Food Hydrocoll.* 52 (2016) 438–446.
- [12] U.S. Schmidt, L. Schütz, H.P. Schuchmann, Interfacial and emulsifying properties of citrus pectin: interaction of pH, ionic strength and degree of esterification, *Food Hydrocoll.* 62 (2017) 288–298.
- [13] P.A. Williams, C. Sayers, C. Viebke, C. Senan, Elucidation of the emulsification properties of sugar beet pectin, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3592–3597.

- [14] T. Funami, G. Zhang, M. Hiroe, S. Noda, M. Nakauma, I. Asai, M.K. Cowman, S. Al-Assaf, G.O. Phillips, Effects of the proteinaceous moiety on the emulsifying properties of sugar beet pectin, *Food Hydrocoll.* 21 (2007) 1319–1329.
- [15] B.M. Yapo, C. Robert, I. Etienne, B. Wathelet, M. Paquot, Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts, *Food Chem.* 100 (2007) 1356–1364.
- [16] J.C. Cuevas-Bernardino, C. Lobato-Calleros, A. Román-Guerrero, J. Alvarez-Ramirez, E.J. Vernon-Carter, Physicochemical characterisation of hawthorn pectins and their performing in stabilising oil-in-water emulsions, *React. Funct. Polym.* 103 (2016) 63–71.
- [17] L.C. Vriesmann, R.F. Teófilo, C.L.O. Petkowicz, Extraction and characterization of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) with citric acid, *LWT-Food Sci. Technol.* 49 (1) (2012) 108–116.
- [18] H. Bazarte, E. Sangronis, E. Unai, La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): Una posible fuente comercial de pectinas, *Arch. Latinoam. Nutr.* 58 (2008) 64–70.
- [19] International Cocoa Organization (ICCO), Assessment of world cocoa bean stocks for 2014–15, <https://www.icco.org/home/latest-news.html>, (2016), Accessed date: 1 September 2017.
- [20] B.M. Yapo, K.L. Koffi, Extraction and characterization of gelling and emulsifying pectin fractions from cacao pod husk, *J. Food Nutr. Res.* 1 (4) (2013) 46–51.
- [21] C. Schmitt, S.L. Turgeon, Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems, *Adv. Colloid Interf. Sci.* 167 (2011) 63–70.
- [22] N.Y. Hernández-Marín, C. Lobato-Calleros, E.J. Vernon-Carter, Stability and rheology of water-in-oil-in-water multiple emulsions made with protein-polysaccharide soluble complexes, *J. Food Eng.* 119 (2013) 181–187.
- [23] H. Salminen, J. Weiss, Electrostatic adsorption and stability of whey protein-pectin complexes on emulsion interfaces, *Food Hydrocoll.* 35 (2014) 410–419.
- [24] J.P. Pérez-Orozco, E. Barrios-Salgado, A. Román-Guerrero, R. Pedroza-Islas, Interaction of mesquite gum-chitosan at the interface and its influences on the stability of multiple emulsions $W_1/O/W_2$, *Rev. Mex. Ing. Quim.* 10 (3) (2011) 487–499.
- [25] D.J. McClements, J. Rao, Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51 (4) (2011) 285–330.
- [26] I. Gülsersen, M. Corredig, Interactions at the interface between hydrophobic and hydrophilic emulsifiers: polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and milk proteins, studied by drop shape tensiometry, *Food Hydrocoll.* 29 (2012) 193–198.
- [27] E. Dickinson, Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers, *Food Hydrocoll.* 23 (2009) 1473–1482.
- [28] B. Ozturk, S. Argin, M. Ozilgen, D.J. McClements, Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin E delivery systems using natural surfactants: Quillaja saponin and lecithin, *J. Food Eng.* 142 (2014) 57–63.
- [29] Z.L. Wan, L.Y. Wang, J.M. Wang, Q. Zhou, Y. Yuan, X.Q. Yang, Synergistic interfacial properties of soy protein-stevioside mixtures: relationship to emulsion stability, *Food Hydrocoll.* 39 (2014) 127–135.
- [30] K. Muhammad, N.I.M. Zahari, S.P. Gannasin, N.M. Adzahan, J. Bakar, High methoxyl pectin from dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel, *Food Hydrocoll.* 42 (2014) 289–297.
- [31] Committee on Chemicals Codex, Food chemical codex, National Academy of Sciences, Monograph Specifications–Pectin, Washington, D.C. 1996, pp. 283–286.
- [32] Y. Zouambia, K.Y. Ettoumi, M. Krea, N. Moulai-Mostefa, A new approach for pectin extraction: electromagnetic induction heating, *Arab. J. Chem.* 10 (4) (2014) 480–487.
- [33] N. Filisetti-Cozzi, N.C. Carpita, Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars, *J. Anal. Biochem.* 197 (1) (1991) 157–162.
- [34] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1) (1951) 265–275.
- [35] M. Wang, B. Huang, Ch. Fan, K. Zhao, H. Hu, X. Xu, S. Pan, F. Liu, Characterization and functional properties of mango peel pectin extracted by ultrasound assisted citric acid, *Int. J. Biol. Macromol.* 91 (2016) 794–803.
- [36] C.H. Tang, L. Shen, Dynamic adsorption and dilatational properties of BSA at oil/water interface: role of conformational flexibility, *Food Hydrocoll.* 43 (2015) 388–398.
- [37] F. Yuan, D. Xu, X. Qi, J. Zhao, Y. Gao, Impact of high hydrostatic pressure on the emulsifying properties of whey protein isolate–chitosan mixtures, *Food Bioprocess Technol.* 6 (2013) 1024–1031.
- [38] D. Xu, X. Wang, J. Jiang, F. Yuan, Y. Gao, Impact of whey protein–beet pectin conjugation on the physicochemical stability of β -carotene emulsions, *Food Hydrocoll.* 28 (2012) 258–266.
- [39] K. Alba, V. Kontogiorgos, Pectin at the oil-water interface: relationship of molecular composition and structure to functionality, *Food Hydrocoll.* 68 (2016) 211–218.
- [40] A.A. Perez, C. Carrera-Sánchez, J.M. Rodríguez-Patino, A.C. Rubiolo, L.G. Santiago, Surface adsorption behavior of milk whey protein and pectin mixtures under conditions of air-water interface saturation, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 85 (2011) 306–315.
- [41] M.J. Kim, H.K. Ju, Y. Kim, S.-H. Yoo, Y.-S. Kim, Effects of amidation and/or methylesterification of pectin on aroma release at different calcium concentration, *Food Hydrocoll.* 52 (2016) 343–349.
- [42] Y. Zouambia, N. Moulai-Mostefa, K. Mohamed, Structural characterization and surface activity of hydrophobically functionalized extracted pectins, *Carbohydr. Polym.* 78 (2009) 841–846.
- [43] H.-m. Chen, X. Fu, Z.-g. Luo, Effect of molecular structure on emulsifying properties of sugar beet pulp pectin, *Food Hydrocoll.* 54 (2016) 99–106.
- [44] L.C. Vriesmann, C.L.O. Petkowicz, Highly acetylated pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) forms gel, *Food Hydrocoll.* 33 (2013) 58–65.
- [45] L.C. Vriesmann, R.D.M.C. Amboni, C.L.O. Petkowicz, Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) composition and hot-water-soluble pectins, *Ind. Crop. Prod.* 34 (2011) 1173–1181.
- [46] W.M. Pasika, Polysaccharide polyelectrolytes, in: P.A. Sanford, A. Laskin (Eds.), *Extracellular Microbial Polysaccharides*, American Chemical Society, Washington, D.C., 1977, pp. 128–143.
- [47] C.E. Brunchi, S. Morariu, M. Bercea, Intrinsic viscosity and conformational parameters of xanthan in aqueous solutions: salt addition effect, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 122 (2014) 512–519.
- [48] L. Yang, L.-M. Zhang, Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources, *Carbohydr. Polym.* 76 (2009) 349–361.
- [49] C.M. Liu, X.J. Guo, R.H. Liang, W. Liu, J. Chen, Alkylated pectin: Molecular characterization, conformational change and gel property, *Food Hydrocoll.* 69 (2017) 341–349.
- [50] O.G. Jones, U. Lesmes, P. Dubin, D.J. McClements, Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles created by heat treatment of β -lactoglobulin–pectin complexes, *Food Hydrocoll.* 24 (2010) 374–383.
- [51] F. Weinbreck, R. de Vries, P. Schrooyen, C.G. de Kruif, Complex coacervation of whey proteins and gum arabic, *Biomacromolecules* 4 (2) (2003) 293–303.
- [52] H. Espinosa-Andrews, K.E. Enriquez-Ramírez, E. García-Márquez, C. Ramírez-Santiago, C. Lobato-Calleros, E.J. Vernon-Carter, Interrelationship between the zeta potential and viscoelastic properties in coacervates complexes, *Carbohydr. Polym.* 95 (2013) 161–166.
- [53] A. Fellah, P. Anjukandi, M.R. Waterland, M.A.K. Williams, Determining the degree of methylesterification of pectin by ATR/FT-IR: methodology optimisation and comparison with theoretical calculations, *Carbohydr. Polym.* 78 (2009) 847–853.
- [54] E. Pretsch, P. Bühlmann, M. Badertscher, *Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data*, fourth ed., Springer, Berlin, 2009.
- [55] H. Chen, S. Qiu, J. Gan, Y. Liu, Q. Zhu, L. Yin, New insights into the functionality of pectin to the emulsifying properties of sugar beet pectin, *Food Hydrocoll.* 57 (2016) 262–270.
- [56] J.F. Mano, D. Koniarova, R.L. Reis, Thermal properties of thermoplastic starch/synthetic polymer blends with potential biomedical applicability, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 14 (2003) 127–135.
- [57] D. Karnik, J. Jung, S. Hawking, L. Wicker, Sugar beet pectin fractionated using isopropanol differs in galacturonic acid, protein, ferulic acid and surface hydrophobicity, *Food Hydrocoll.* 60 (2016) 179–185.
- [58] J.G. Salcedo-Mendoza, M.C. Rodríguez-Lora, J.A. Figueroa-Flórez, Effect of acetylation on structural and functional properties of starches from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and yam (*Dioscorea alata* cv. Diamante 22), *Rev. Mex. Ing. Quim.* 15 (3) (2016) 787–796.
- [59] J. Li, X. Hu, X. Li, Z. Ma, Effects of acetylation on the emulsifying properties of *Artemisia sphaerocephala* Krasch. polysaccharide, *Carbohydr. Polym.* 144 (2016) 531–540.
- [60] M. Carbonaro, A. Nucara, Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region, *Amino Acids* 38 (2010) 679–690.
- [61] L.G. Gómez-Mascaraque, B. Miralles, I. Recio, A. López-Rubio, Microencapsulation of a whey protein hydrolysate within micro-hydrogels: impact on gastrointestinal stability and potential for functional yoghurt development, *J. Funct. Foods* 26 (2016) 290–300.
- [62] J. Zhu, X. Sun, S. Wang, Y. Xu, D. Wang, Formation of nanocomplexes comprising whey proteins and fucoxanthin: characterization, spectroscopic analysis, and molecular docking, *Food Hydrocoll.* 63 (2017) 391–403.
- [63] F. López-García, C. Jiménez-Martínez, D. Guzmán-Lucero, A. Maciel-Cerda, R. Delgado-Macuil, D. Cabrero-Palomino, E. Terrés-Rojas, I. Arzate-Vázquez, Physical and chemical characterization of a biopolymer film made with corn starch and nopal xocostle (*Opuntia joconotle*) mucilage, *Rev. Mex. Ing. Quim.* 16 (1) (2017) 147–158.
- [64] D.J. McClements, *Food Emulsions – Principles, Practices, and Techniques*, second ed., (2004) (New York).
- [65] S.L. Turgeon, S.I. Laneville, Protein plus polysaccharide coacervates and complexes: from scientific background to their application as functional ingredients in food products, in: S. Kasapis, I.T. Norton, J.B. Ubbink (Eds.), *Modern Biopolymer Science: Bridging the Divide between Fundamental Treatise and Industrial Application*, Academic Press, San Diego, 2009, pp. 327–363.
- [66] M. Anvari, D. Chung, Dynamic rheological and structural characterization of fish gelatin – gum arabic coacervate gels cross-linked by tannic acid, *Food Hydrocoll.* 60 (2016) 516–524.
- [67] J.M. Rodríguez-Patino, A.M.R. Pilosof, Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces, *Food Hydrocoll.* 25 (2011) 1925–1937.
- [68] A.F.H. Ward, L. Tordai, Time dependence of boundary tensions of solutions, *J. Chem. Phys.* 14 (1946) 353–361.
- [69] D.E. Graham, M.C. Phillips, Proteins at liquid interfaces: I. Kinetics of adsorption and surface denaturation, *J. Colloid Interface Sci.* 70 (1979) 403–414.
- [70] L.L. Lobo, A. Sverreika, Coalescence during emulsification. 2. Role of small molecule surfactants, *J. Colloid Interface Sci.* 261 (2003) 498–507.
- [71] K. Burapapad, M. Kumpugdee-Vollrath, D. Chantasant, P. Sriamornsak, Fabrication of pectin-based nanoemulsions loaded with itraconazole for pharmaceutical application, *Carbohydr. Polym.* 82 (2010) 384–393.
- [72] H.M. Chen, X. Fu, Z.G. Luo, Esterification of sugar beet pectin using octenyl succinic anhydride and its effect as an emulsion stabilizer, *Food Hydrocoll.* 49 (2015) 53–60.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00206

Matrícula: 2143800357

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y PROPIEDADES EMULSIFICANTES DE PECTINA DE CÁSCARA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) Y SU COMPLEJACIÓN CON HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE LACTOSUERO EN LA ESTABILIZACIÓN DE EMULSIONES ACEITE-EN-AGUA.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 30 del mes de noviembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO
DR. JUAN CARLOS CUEVAS BERNARDINO
DRA. ANA GUADALUPE ESTRADA FERNANDEZ
DRA. OFELIA SANDOVAL CASTILLA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: DANIEL TRUJILLO RAMIREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



DANIEL TRUJILLO RAMIREZ
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

VOCAL

DR. JUAN CARLOS CUEVAS BERNARDINO

VOCAL

DRA. ANA GUADALUPE ESTRADA FERNANDEZ

SECRETARIA

DRA. OFELIA SANDOVAL CASTILLA