



**Universitat**  
de les Illes Balears

## **TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

# **ESTABILIZACIÓN DE EMULSIONES DE ACEITE EN AGUA CON SUBPRODUCTOS DE NARANJA**

**Laura Llull Maria**

**Máster Universitario Ciencia y Tecnología Química**

**(Especialidad/Itinerario *Química y Tecnologías alimentarias*)**

**Centro de Estudios de Postgrado**

**Año Académico 2020-21**

# **ESTABILIZACIÓN DE EMULSIONES DE ACEITE EN AGUA CON SUBPRODUCTOS DE NARANJA**

**Laura Llull Maria**

**Trabajo de Fin de Máster**

**Centro de Estudios de Postgrado**

**Universidad de las Illes Balears**

**Año Académico 2020-21**

Palabras clave del trabajo:

Subproducto de naranja, pectina, emulsión, viscosidad, índice de cremosidad,  
potencial zeta, tamaño de gota, microencapsulación

*Nombre Tutora del Trabajo: Valeria Soledad Eim Iznardo*

*Nombre Tutora: Susana Simal Florindo*



<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Los subproductos de la industria alimentaria	8
1.1.1. Subproductos de la naranja	9
1.2. Pared celular	10
1.3. Pectinas	11
1.3.1. Estructura de las pectinas	11
1.3.2. Calidad de las pectinas	12
1.3.3. Uso de las pectinas	12
1.4. Extracción sólido-líquido	13
1.4.1. Proceso de extracción de pectinas asistida por ultrasonidos	13
1.5. Emulsiones	14
1.5.1. Emulsionantes	15
1.5.2. Estabilizantes	16
1.5.3. Interacción proteína-polisacáridos	16
1.5.4. Estabilidad de las emulsiones	17
1.6. Técnica de microencapsulación mediante secado por pulverización	17
1.6.1. Características de las emulsiones a encapsular	18
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. Materia prima	20
3.2. Reactivos	20
3.3. Diseño experimental	21
3.4. Proceso para la obtención del concentrado del subproducto de naranja	22
3.5. Proceso de extracción de las pectinas	23
3.5.1. Equipo de extracción: ultrasonidos de potencia	24
3.5.2. Determinación de la capacidad calorífica del disolvente de extracción	24
3.5.3. Determinación de la potencia de los equipos de ultrasonido	25
3.6. Características físico-químicas del concentrado del subproducto de naranja y de las pectinas	25
3.6.1. Contenido en humedad	25
3.6.2. Determinación del color	26
3.6.3. Extracción de la fibra alimentaria. Residuo insoluble en alcohol (AIR)	27
3.6.4. Identificación y cuantificación de azúcares	27
3.6.5. Determinación del grado de esterificación metílico	29
3.6.6. Capacidad antioxidante y contenido en compuestos fenólicos	29
3.7. Emulsiones	30

3.7.1. Elaboración de emulsiones	30
3.8. Caracterización de las emulsiones	32
3.8.1. Determinación de la viscosidad	32
3.8.2. Determinación del índice de cremosidad	32
3.8.3. Determinación del tamaño de las gotas de aceite	32
3.8.4. Determinación del potencial zeta	34
3.8.5. Determinación del color	34
3.9. Tratamiento estadístico	34
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1. Capacidad calorífica del solvente de extracción	35
4.2. Caracterización de la sonda de temperatura	35
4.3. Obtención y caracterización del concentrado del subproducto de naranja y de las pectinas comerciales y extraídas	35
4.3.1. Contenido en humedad	36
4.3.2. Determinación del color	37
4.3.3. Extracción de la fibra alimentaria. Residuo insoluble en alcohol (AIR)	38
4.3.4. Identificación y cuantificación de azúcares	38
4.3.5. Determinación del grado de esterificación metílico	40
4.3.6. Capacidad antioxidante y contenido en compuestos fenólicos	41
4.4. Caracterización de las emulsiones	42
4.4.1. Determinación de la viscosidad	42
4.4.2. Determinación del potencial zeta	44
4.4.3. Determinación del índice de cremosidad	45
4.4.4. Determinación del tamaño de las gotas de aceite	46
4.4.5. Determinación del color	53
5. CONCLUSIONES	54
6. BIBLIOGRAFÍA	56

## RESUMEN

A nivel mundial se producen aproximadamente 55 millones de t/año de naranjas. España se encuentra dentro de los diez primeros países con mayor producción de naranjas a nivel mundial. Alrededor del 70% de la producción mundial de naranjas se destina a la industria del zumo, generando aproximadamente el 50% en peso de residuos, formados principalmente por pieles (flavedo y albedo), pulpa y semillas.

Gran parte de estos residuos se utilizan mayoritariamente para reponer nutrientes en el suelo mediante compostaje o como alimento para animales, y la parte restante para la extracción de aceite esencial. No obstante, estos residuos son ricos en compuestos fenólicos, pigmentos y, en particular, polisacáridos de pared celular como las pectinas, hemicelulosas y celulosa. En concreto, las pectinas resultan útiles para estabilizar emulsiones de aceite en agua debido a su habilidad para formar geles y a su capacidad de estabilización y, además, la presencia de compuestos fenólicos y antioxidantes mejora la estabilidad oxidativa del aceite. Este aprovechamiento total de los residuos generados se enmarca dentro la economía circular.

El objetivo principal del presente estudio consiste en evaluar la utilidad de un concentrado del subproducto de naranja y de pectinas de naranja, como ingredientes en la formulación de emulsiones estables destinadas a la microencapsulación de aceite mediante secado por pulverización. Para ello, se obtuvo un concentrado del subproducto de naranja (CSN), se extrajeron las pectinas y se compararon con pectinas comerciales, se formularon emulsiones y se evaluó si las características de estas emulsiones eran adecuadas para la microencapsulación de aceite.

El color del CSN fue anaranjado claro con elevada luminosidad y componente amarilla, con algo de rojo, mientras que las pectinas extraídas, presentaron un color blanquecino, reteniendo algunos pigmentos, y mostrando mayor coloración que las comerciales que fueron prácticamente blancas. El análisis de la composición en azúcares de la fibra indicó un elevado contenido en base seca (b.s) de pectinas en el CSN ( $83,2 \pm 0,1$  % b.s) y en el extracto de pectinas ( $90 \pm 1$ , % b.s). En cuanto al grado de esterificación metílico, las pectinas extraídas resultaron ser de alto metoxilo ( $95 \pm 3$  %) y las comerciales y CSN de bajo metoxilo (pectinas comerciales =  $48 \pm 2$  % y CSN =  $39,5 \pm 0,5$  %). Finalmente, el CSN mostró una capacidad antioxidante considerable, mientras que en las pectinas fue casi inexistente.

En cuanto a las emulsiones, se prepararon variando el contenido en proteína de soja, de pectina y de CSN, pero manteniendo un 40 % de materia seca y un 6 % de aceite de girasol. Además, se utilizó maltodextrina como material de pared y se preparó una emulsión control utilizando Tween® 20 como agente emulgente comercial.

Las emulsiones preparadas con pectina y CSN presentaron una viscosidad superior, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) al añadir proteína y en las emulsiones con la concentración más alta de CSN (34CSN) y de pectina (05PC), lo que significa que le confieren mayor estabilidad que el emulgente comercial. Aun existiendo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre algunas de las emulsiones evaluadas, todas presentaron valores inferiores a 300 cP. También se determinó el índice de cremosidad a las 24 h después de su preparación y aquellas emulsiones con mayor % de pectina (0,5 %) y CSN (3,4 %) fueron las más estables. A su vez, se estudió el potencial zeta, obteniéndose valores negativos excepto en las

emulsiones preparadas con solo proteína de soja (03PR y 06PR) que presentaron valores positivos debido a que la proteína a pH 3,5 tiene carga positiva.

En cuanto al tamaño de gota, se determinó en el momento de la preparación de la emulsión y pasadas 24 h para evaluar si se mantenía estable con el tiempo. De todas las emulsiones, las más estables fueron aquellas que en su composición llevaban pectina o CSN, y proteína de soja; ambos ingredientes en la mayor proporción estudiada (0,5 % pectina o 3,4 % CSN).

Por tanto, se puede concluir que es posible la revalorización de subproductos del zumo de naranja como fuente de pectinas y/o concentrado de pectinas y otros compuestos antioxidantes, y que éstos podrían ser utilizados en la formulación de emulsiones estables de aceite en agua, que, según sus características, podrían resultar adecuadas para la microencapsulación de aceite mediante secado por pulverización.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. LOS SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

El actual sistema económico está basado en un modelo de crecimiento que se apoya en la producción de bienes y servicios bajo las pautas de “usar, consumir, tirar”. Este modelo conlleva un uso intensivo de recursos naturales y crea una elevada presión sobre el medio ambiente que está detrás de las manifestaciones más graves de la crisis ambiental que atravesamos, incluido el cambio climático o la pérdida de biodiversidad. Según el documento, España Circular 2030, nuestro país necesita más de dos veces y medio su superficie para abastecer las necesidades de nuestra economía (MITECO, 2020).

Para dar respuesta a esta situación, se ha elaborado la Estrategia Española de Economía Circular: España Circular 2030, que contribuye a los esfuerzos de nuestro país por lograr una economía sostenible, descarbonizada, eficiente en el uso de recursos y competitiva. Esta iniciativa se alinea con los objetivos de los dos planes de acción de economía circular de la Unión Europea, “Cerrar el círculo: un plan de acción de la UE para la economía circular” de 2015 y “Un nuevo Plan de Acción de Economía Circular para una Europa más limpia y competitiva” de 2020 (MITECO, 2020). Además, sienta las bases para impulsar un nuevo modelo de producción y consumo en el que productos, materiales y recursos se mantengan en la economía durante el mayor tiempo posible, en el que se reduzca al mínimo la generación de residuos y se aprovechen con el mayor alcance posible aquellos que no se pueden evitar (Ministerio para la transición ecológica y el reto demográfico, 2020).

La Directiva Europea (Dir. 2006/12/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 5 abril de 2006) establece que: “es importante favorecer la valorización de los residuos y la utilización de materiales valorizados a fin de preservar los recursos naturales. Su desarrollo busca contribuir a la transformación de los países miembros de la Unión Europea en una “sociedad del reciclado”, que trate de evitar la generación de residuos y que utilice los residuos como un recurso”. Del mismo modo, la ley 22/2011, de 20 de Julio, de residuos y suelos contaminados, establece el marco jurídico para la gestión de los residuos, el cual define como “cualquier sustancia u objeto que su poseedor deseché o tenga la intención o la obligación de desechar”. Por ello, el objetivo actual de las industrias es transformar el residuo en un subproducto, que viene definido por la ley 22/2011, de 20 Julio, como “una sustancia resultante de producción cuya finalidad primaria no sea la producción de esa sustancia, pero que tenga un valor comercial”.

### 1.1.1. Subproductos de naranja

El árbol frutal más abundante en el mundo es el naranjo (*Citrus sinensis L.*) (Bambeni et al., 2021). Según los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) del año 2019, la producción mundial de naranja fue de 78 millones de t/año, mientras que en Europa fue de 6 millones de t/año. España se encuentra dentro de los diez primeros países con mayor producción de naranjas a nivel mundial (ver Tabla 1) (FAO, 2019). Alrededor del 70% de la producción mundial de naranjas se destina a la industria del zumo, generando aproximadamente el 50% en peso de residuos, formados principalmente por pieles (flavedo y albedo), pulpa y semillas (Crizel et al., 2013).

En la actualidad, gran parte de estos residuos se utilizan mayoritariamente para reponer nutrientes en el suelo mediante compostaje o como alimento para animales, y la parte restante para la extracción de aceite esencial. No obstante, dado su elevado contenido en pectinas, útiles como estabilizantes de emulsiones, y de compuestos fenólicos y otros antioxidantes, estos residuos podrían ser utilizados para estabilizar emulsiones de aceite en agua.

Tabla 1.1. Producción de naranjas a nivel mundial de los diez primeros países (Atlas Big, 2018-2020)

País	Producción (t)
Brasil	16.713.534
China	9.246.305
India	8.367.000
Estados Unidos	4.833.480
México	4.737.990
España	3.639.853
Egipto	3.246.483
Indonesia	2.510.442
Turquía	1.900.000
Irán	1.889.252

## 1.2. PARED CELULAR

La pared celular es una estructura dinámica y compleja de la célula vegetal, es fundamental para el crecimiento de la planta, y media la interacción entre la célula y su entorno (Corrêa-Ferreira et al., 2019). Es importante para el desarrollo de la planta, su crecimiento y supervivencia en diversos ambientes. Su composición es una mezcla compleja de polisacáridos que varía en función de la planta y el tipo de tejido (Zhang et al., 2016). Estos polisacáridos son las celulosas, las hemicelulosas y las pectinas (Caffall & Mohnen, 2009).

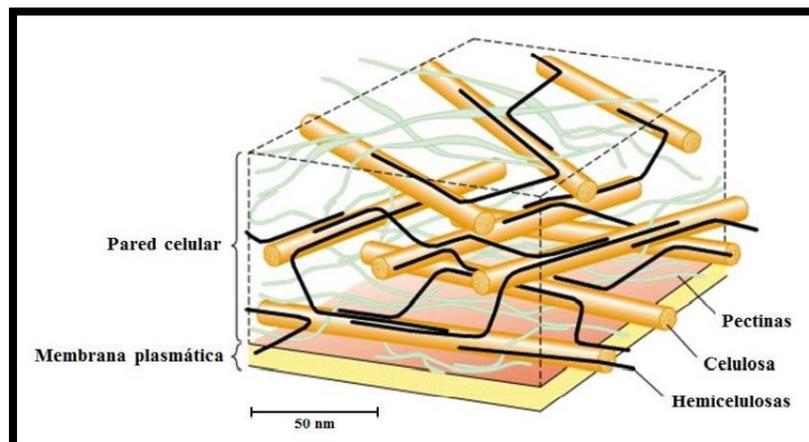


Figura 1.2. Representación esquemática de la pared celular (González-Centeno et al., 2013)

Las celulosas son homopolímeros lineales constituidos por cadenas largas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos tipo  $\beta$ -1,4, uniéndose firmemente por enlaces de hidrógeno formando microfibrillas (Agoda-Tandjawa et al., 2021). Estas microfibrillas están unidas por una matriz de gel compuesto de hemicelulosas, lignina y carbohidratos para formar macrofibras.

La disposición y la orientación de las microfibrillas en la pared celular son muy importantes porque determina la capacidad y la dirección de la deformación de la pared celular (Yu et al, 2008).

Las hemicelulosas son polímeros heterogéneos compuestos por varios tipos diferentes de monosacáridos, que incluyen xilosa, arabinosa y galactosa (Yang et al., 2021). El hecho de tener diferentes monosacáridos hace que se formen diferentes heteropolímeros tales como xilanos, mananos,  $\beta$ -glucanos de enlace mixto y xiloglucanos, siendo estos últimos los que destacan en frutas y hortalizas (González-Centeno et al, 2013). Las unidades constituyentes de las hemicelulosas pueden consistir en azúcares pentosa (arabinosa y xilosa) o azúcares hexosa (manosa, glucosa y galactosa) y ácidos urónicos (ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y  $\alpha$ -D-galacturónico). Además, la ramnosa y la fucosa también están presentes en forma de trazas. Por lo tanto, a diferencia de las celulosas, las hemicelulosas son polímeros vegetales complejos hechos de múltiples unidades monoméricas (Quaseem et al., 2021).

### 1.3. PECTINAS

Las pectinas son heteropolisacáridos complejos ricos en ácidos D-galacturónicos unidos por enlaces  $\alpha$ -1,4. Estos ácidos D-galacturónicos están parcialmente esterificados en los grupos ácido carboxílico (Reichembach et al., 2021). A la proporción de ácidos galacturónicos que están esterificados por grupos metilo se le conoce como grado de metilesterificación (GME), siendo de gran importancia para el uso de pectinas como agentes gelificantes.

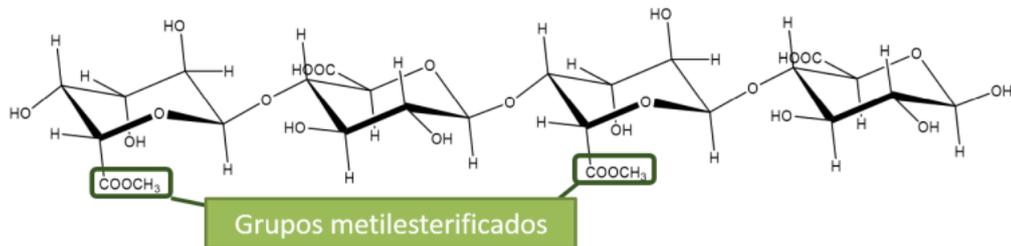


Figura 1.3. Cadena de ácido D-galacturónico con grupos metilesterificados

Las pectinas, al igual que las hemicelulosas, son ricas en ácido galacturónico, arabinosa y galactosa, y contienen pequeñas cantidades de xilosa, ramnosa y glucosa (Badaró et al., 2020). Estos polisacáridos tienen muchas aplicaciones en la industria alimentaria como agente gelificante, estabilizante y emulsionante (Zanella et al., 2015); y en la farmacéutica como antitumoral, antioxidante, antidiabético y anticancerígeno (Hosseini et al., 2019).

Para fines industriales, las fuentes de obtención de las pectinas se restringen principalmente a las cáscaras de frutos cítricos (20-35%), infrutescencia del girasol (15-25%), remolacha (10-20%) y pulpa de manzana (10-15%) (Silva et al., 2008).

#### 1.3.1. Estructura de las pectinas

El concepto de pectina describe una familia de oligosacáridos y polisacáridos que tienen características comunes, pero son extremadamente diversas en sus estructuras finas. Sin embargo, todas las pectinas son ricas en ácido galacturónico (GalA), y según la FAO para considerarse pectina debe tener al menos un 65% de GalA (FAO, 2009).

La presencia de los grupos esterificados y también de azúcares neutros, como cadenas laterales, conduce a la creación de varias partes covalentemente conectadas entre sí, de las cuales el homogalacturonano (HG), el ramnogalacturonano I (RGI) y II (RGII) son las más importantes, los cuales contienen GalA en mayor o menor cantidad (Hosseini et al., 2019).

El HG consiste en un polímero lineal formado por GalA unidos mediante enlaces  $\alpha$ -1,4, que pueden estar parcialmente metilesterificados o acetilados. Por su parte, el RGI consiste en la repetición del disacárido de GalA con la presencia de unidades de ramnosa intercaladas (Mikkelsen et al., 2006). Las cadenas laterales, unidas a la posición C<sub>4</sub> de la ramnosa, están principalmente constituidas por arabinosa y galactosa (Arnous & Meyer, 2009). Por último, el RGII consiste en una columna vertebral de HG en lugar de RG, con cadenas laterales complejas unidas a los GalA (Mikkelsen et al., 2006).

Las estructuras finas de las pectinas pueden ser extremadamente heterogéneas entre plantas, tejidos e incluso dentro de una única pared celular. Las longitudes de las cadenas de los diversos dominios pueden variar considerablemente y la composición de azúcar de RGI también puede ser heterogénea; en cambio, el RGII tiene una estructura muy conservada (Mikkelsen et al., 2006).

### 1.3.2. Calidad de las pectinas

La mayoría de las investigaciones relacionan el término de calidad de las pectinas con aquellas características fisicoquímicas que le confieren a la molécula la propiedad de formar geles. Las pectinas forman geles cuando porciones de homogalacturonano se entrecruzan para formar una red cristalina tridimensional en la que quedan atrapados el agua y los solutos. Varios factores determinan las propiedades gelificantes, incluida la temperatura, el tipo de pectina, el grado de esterificación metílico (GME) y el grado de acetilación, entre otros (Williats et al., 2006).

Dependiendo del GME, las pectinas se clasifican en dos categorías: pectina de alto metoxilo (HMP, *High Methoxyl Pectin*) con un grado de esterificación superior al 50% y bajo metoxilo (LMP, *Low Methoxyl Pectin*) con un grado de esterificación inferior al 50% (Agoda-Tandjawa et al., 2012). En las HMP, las zonas de unión están formadas por la reticulación de HG por puentes de hidrógeno y fuerzas hidrófobas entre grupos metoxilo, ambos promovidos por una alta concentración de azúcar y un pH bajo. En las LMP, las zonas de unión están formadas por entrecruzamiento de calcio entre grupos carboxilo libres (Williats et al., 2006).

### 1.3.3. Uso de las pectinas

Las pectinas son ampliamente usadas en la industria de los alimentos debido a su capacidad para formar geles acuosos y a su capacidad de estabilización. Los geles de pectina son importantes para crear o modificar la textura de salsas, jaleas, compotas; en la industria láctea para la fabricación de yogures frutados y productos lácteos bajos en grasa y en la industria de bebidas dietéticas para la preparación de refrescos, debido a su bajo contenido en carbohidratos, por sus propiedades estabilizantes y por incrementar la viscosidad (Silva et al., 2008). El consumo anual mundial de pectinas estima en alrededor de 45 millones de kg, con un valor de mercado global de menos de 400 millones de euros (Williats et al., 2006).

Además, se está investigando su uso para estabilizar emulsiones. Por ejemplo, en el estudio de Serfert et al., (2013) estudiaron el impacto de la atomización y el secado en la funcionalidad de emulsiones preparadas con proteínas y pectinas. Asimismo, en el estudio realizado por Noello et al. (2016), produjeron emulsiones de aceite de chía estabilizadas por concentrado de proteínas de suero y pectina.

#### 1.4. EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO

El proceso de extracción es una de las operaciones unitarias más utilizadas en la industria alimentaria. Su uso principal es para obtener componentes deseados inicialmente retenidos en una matriz de alimentos (Pinelo et al., 2006).

La extracción sólido-líquido es un proceso mediante el cual uno o varios componentes de una fase sólida, como por ejemplo un alimento se transfiere a una fase líquida, que se conoce como disolvente. Para que tenga lugar en una única etapa, se mezcla durante un tiempo el disolvente y el alimento para que se produzca un transporte de materia entre ambos. El sentido de la transferencia es siempre desde el sólido hacia el líquido (Ibarz et al., 2005).

La mayoría de los métodos convencionales aplicados para la extracción de pectina implican el uso de ácidos minerales como el ácido clorhídrico, ácido nítrico o ácido sulfúrico, a valores de pH comprendidos entre 1,5 y 3,0. Además, estos procesos se llevan a cabo en condiciones de alta temperatura (entre 60 y 100 °C) y tiempos de extracción prolongados (de 0,5 a 7h). Con estos mecanismos, de forma general, se obtienen rendimientos limitados. Además, a nivel industrial, el uso de ácidos minerales y sus efluentes pueden causar serios problemas ambientales, lo que representa un costo excesivo para las empresas alimentarias. Para ello, se ha investigado la sustitución de estos ácidos minerales por ácidos orgánicos como el ácido cítrico, obteniendo rendimientos similares o incluso mayores. El uso de temperaturas elevadas puede provocar la degradación no enzimática de las pectinas. Por tanto, se han propuesto nuevas tecnologías como la extracción con agua subcrítica, la extracción asistida por microondas y la extracción asistida por ultrasonidos para mejorar estos procesos convencionales (Umaña et al., 2019).

##### 1.4.1. Proceso de extracción de pectinas asistido por ultrasonidos

En un sistema de extracción sólido-líquido, la aplicación de ultrasonidos de potencia puede intensificar el proceso aumentando la velocidad de extracción y/o incrementando la cantidad de soluto extraída. Esto se atribuye fundamentalmente al fenómeno de la cavitación, es decir, aparición, crecimiento e implosión o colapso de las burbujas de gas en el seno del líquido. Cuando ocurre cerca de la superficie del sólido, puede provocar múltiples efectos físicos como fragmentación, erosión y el llamado efecto sonocapilar (Umaña et al., 2020). El efecto sonocapilar es el aumento de la profundidad y la velocidad de penetración del disolvente en los canales y poros de cavitación (Martínez-Ramos et al., 2020). Todo esto permite que el solvente penetre en la estructura interna y facilite la liberación de los solutos. A su vez, puede mejorar la difusión de los solutos y contribuir a la renovación constante de la capa superficial de solvente en contacto con el sólido (Umaña et al., 2020). Wang et al., 2015, aplicaron ultrasonidos en el proceso de extracción de pectinas de cáscara de pomelo, observando reducciones en el tiempo de extracción de 37,8 % y un aumento de 16,34 % en la temperatura.

## 1.5. EMULSIONES

Una emulsión es una dispersión termodinámicamente inestable de dos líquidos inmiscibles, normalmente de naturaleza apolar y polar, en la que uno de ellos forma gotas de pequeño tamaño (fase dispersa) en otro fluido que se conoce como fase continua. En la práctica debe contener un tercer componente, un emulsionante, que es una sustancia anfifílica que facilita la formación de la emulsión disminuyendo la tensión interfacial entre la fase apolar (oleosa) y la polar (acuosa) y, además, aporta al menos una cierta estabilidad física durante un tiempo, que puede ser más o menos largo, dependiendo de la composición y características del procesado (Muñoz-García et al, 2007).

Las emulsiones alimentarias más frecuentes son las emulsiones de aceite en agua (O/W), que consisten en gotitas de aceite dispersas en una fase acuosa, por ejemplo, leche y salsas; y las emulsiones de agua en aceite (W/O), que son sistemas de gotitas de agua dispersas en una fase oleosa, por ejemplo, margarina y mantequilla (Xu et al, 2019).

Las emulsiones de aceite en agua son sistemas termodinámicamente inestables y existen varios mecanismos de inestabilidad (ver figura 1.4) que se trata de procesos fisicoquímicos que pueden ser responsables de la ruptura de las emulsiones y alteraciones en sus propiedades (McClements et al., 2016).

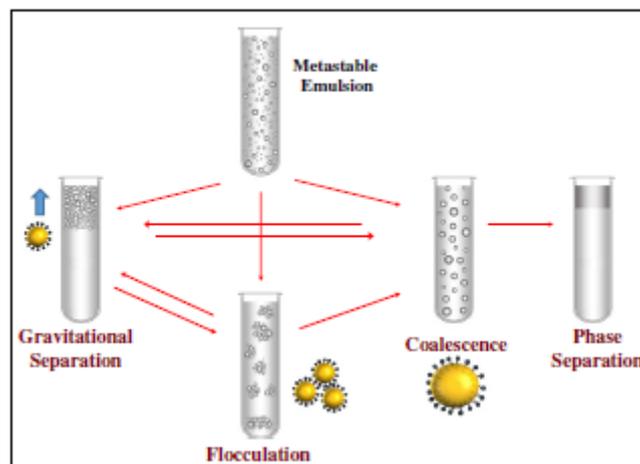


Figura 1.4. Mecanismos de inestabilidad de las emulsiones (McClements et al., 2016)

- ✚ Creaming/Sedimentación: proceso causado por la acción de la gravedad que consiste en el movimiento ascendente de las gotas debido a su menor densidad en comparación con la fase acuosa (Loi et al., 2019). Mientras que la sedimentación es el movimiento descendente de las gotas ya que tienen una mayor densidad que la del líquido circundante (Robins, 2000).
- ✚ Floculación: es la asociación de dos o más gotas en un grupo, conservando las dimensiones originales de cada gota individual (McClements et al., 2016).
- ✚ Coalescencia: es el proceso mediante el cual dos o más gotas se fusionan para formar una sola gota más grande (McClements et al., 2016).
- ✚ Maduración de Ostwald: se debe al aumento de tamaño de las gotas grandes gracias a que las pequeñas son prácticamente absorbidas por las grandes hasta que prácticamente desaparecen (McClements et al., 2016).

Además, se pueden preparar emulsiones de doble capa, las cuales son sistemas multicompartimentalizados caracterizadas por la coexistencia de una emulsión en agua ( $O/W$ ) y otra de agua en aceite ( $W/O$ ), en el que los glóbulos de la fase dispersa contienen dentro de ellos gotas igualmente dispersas más pequeñas (ver Figura 1.5). Las emulsiones de doble capa, al igual que las simples, se pueden clasificar en emulsiones de aceite-en-agua-en-aceite ( $O_1/W/O_2$ ) o de agua-en-aceite-en-agua ( $W_1/O/W_2$ ), siendo estas últimas las más utilizadas en la industria alimentaria (Freire Rodríguez, M.J, 2018).

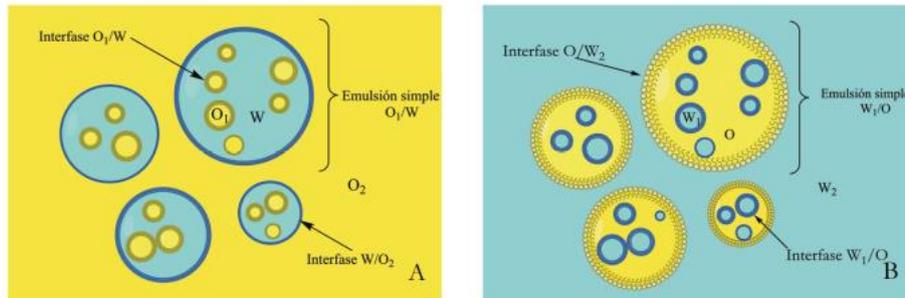


Figura 1.5. Representación esquemática de emulsiones de doble capa (Freire- Rodríguez, M.J 2018)

### 1.5.1. Emulsionantes

Para obtener productos comerciales con una vida útil suficientemente larga y con resistencias a las tensiones durante su utilización es necesario incorporar estabilizantes, como emulsionantes, agentes espesantes, gelificantes, de peso e inhibidores de maduración. Muchos de los emulsionantes para estabilizar las emulsiones de aceite en agua son tensioactivos sintéticos, como el Tween®20 o emulsionantes de origen animal, como proteína de huevo y gelatina (McClements et al., 2016). Los tensioactivos moleculares son generalmente moléculas anfifílicas que constan tanto de grupos hidrófilos como de hidrófobos. Estas moléculas anfifílicas tienden a adsorberse en la interfaz agua/aceite con el grupo hidrofílico sumergido en agua y el grupo hidrofóbico en aceite, lo que podría reducir eficazmente la tensión interfacial (Sun et al., 2021).

Sin embargo, ha habido una creciente demanda de los consumidores de productos más naturales, productos comerciales sostenibles y respetuosos con el medio ambiente, y muchos fabricantes han reformulado sus productos para reemplazar los tensioactivos sintéticos por otros más aptos (polisacáridos, fosfolípidos, biosurfactantes) y las proteínas de origen animal por proteínas de origen vegetal (proteína de soja) (McClements et al., 2016).

Existen emulsionantes de bajo y alto peso molecular. Como ejemplos de emulsionantes de bajo peso molecular se pueden citar los tensioactivos, lípidos polares y glicolípidos. Entre los emulsionantes de alto peso molecular, se pueden citar las proteínas, lipoproteínas, copolímeros de bloque y algunos polisacáridos exudados como la goma arábiga (Muñoz-García et al., 2007).

Los emulsionantes desempeñan dos funciones clave en la creación de productos: facilitan la formación inicial de finas gotitas de lípidos durante la homogenización y mejoran la estabilidad de las gotitas de lípidos una vez que se ha formado (ver Figura 1.6).

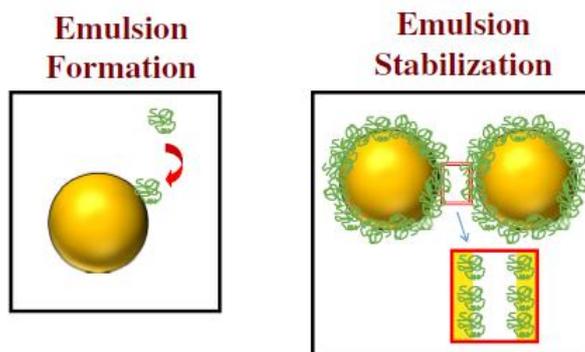


Figura 1.6 Funciones de los emulsionantes (McClements et al., 2016)

Por lo tanto, un emulsionante puede acelerar la producción de gotitas finas adsorbiendo rápidamente a las superficies de las gotas y disminuyendo la tensión superficial. Cuanto mayor sea la capacidad de un emulsionante para reducir la tensión superficial, más pequeñas serán las gotas que se pueden generar. Sin embargo, la tasa de adsorción del emulsionante debe ser más rápida que la tasa de fragmentación de las gotas; de lo contrario, las gotas no se cubrirán completamente con el emulsionante antes de que ocurra la ruptura de éstas.

#### 1.5.2. Estabilizantes

Un estabilizante es un compuesto químico normalmente de naturaleza macromolecular que hidratado en la fase acuosa confiere a una emulsión O/W una estabilidad física durante un tiempo prolongado. La estabilización de la emulsión se consigue restringiendo la movilidad de las gotas de la fase dispersa, gracias al aumento de la viscosidad de la fase continua. Además, contribuyen a la estabilidad de la emulsión favoreciendo principalmente las interacciones estéricas entre las gotas, si bien también pueden ser significativas las electrostáticas. Como ejemplos de estabilizantes se pueden citar los polímeros sintéticos hidrófilos y polisacáridos: goma xantana, galactomananos, almidones, entre otros.

Los polímeros usados para estabilizar emulsiones alimentarias O/W son mayoritariamente hidrocoloideos de naturaleza polisacárida (gomas alimentarias). Se pueden clasificar en naturales (pectinas, almidones obtenidos a partir de cereales), semisintéticos (almidones modificados y propilenglicol alginato) y sintéticos (polímeros de tipo polioxietilados).

#### 1.5.3. Interacción proteína-polisacáridos

La composición de muchas emulsiones alimentarias incluye proteínas como emulsionante y polisacáridos como estabilizante, biopolímeros que conjuntamente controlan la consistencia y textura del producto. Son de hecho, los compuestos responsables de la estructura de las emulsiones, junto con las gotas de la fase dispersa (Muñoz-García et al., 2007).

Las proteínas y polisacáridos presentes en una formulación pueden interactuar de formas diferentes según sus respectivas estructuras químicas, temperatura y el resto de la composición. La formación de complejos proteína-polisacárido estables frente a diferentes condiciones del medio (pH, contenido en sales, azúcar, etc.) requiere la formación de enlaces covalentes o interacciones electrostáticas atractivas (Muñoz-García et al., 2007). En el último caso, es importante elegir bien los polímeros y las condiciones fisicoquímicas para que la proteína y el

polisacárido lleven cargas opuestas. Otra forma de estabilizar las emulsiones es combinar las propiedades de las proteínas y los polisacáridos sin desarrollar interacciones atractivas entre los dos biopolímeros (Bouyer et al., 2012).

Las proteínas y los polisacáridos se pueden asociar entre sí bajo condiciones de carga eléctrica opuesta. Las proteínas poseen una carga neta negativa por encima de su punto isoeléctrico y una carga neta positiva por debajo de este punto. Las proteínas que poseen una carga negativa tienen una fuerza repulsiva contra polisacáridos aniónicos. Sin embargo, cuando el pH se ajusta alrededor del punto isoeléctrico de la proteína, los segmentos catiónicos de la proteína interactúan de manera atractiva con los grupos aniónicos del polisacárido que conduce a una formación de complejos débiles (Ribero et al., 2021).

Los complejos proteína-polisacárido covalentes se pueden incorporar al sistema a emulsionar antes de la homogenización en sí. Actúan como emulsionantes que forman membranas interfaciales gruesas, en las que las macromoléculas de polisacárido se extienden hacia la fase continua de emulsiones O/W, impartiendo estabilidad mediante fuertes repulsiones estéricas. Alternativamente se pueden aprovechar las interacciones electrostáticas atractivas entre una proteína y un polisacárido para utilizar el emulsionante en una primera etapa de la homogeneización y formar una emulsión. En una segunda etapa, se añade el polisacárido para realizar una homogeneización secundaria que permite la formación de una bicapa de biopolímeros en la interfase. Siguiendo este método se pueden formar emulsiones con multicapas de emulsionante y polisacáridos (Muñoz-García et al., 2007).

#### 1.5.4. Estabilidad de las emulsiones

La estabilidad de una emulsión es el resultado de la estabilidad física (sin fase de separación), estabilidad química (sin reacción química) y estabilidad microbiológica (sin desarrollo de gérmenes) (Bouyer et al., 2021). En cuanto a la estabilidad física, el tamaño de las gotas juega un importante papel. La carga superficial (potencial zeta) de la gota es un parámetro que también determina la estabilidad (Wiacek & Chibowski, 1999).

El potencial zeta es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática entre las partículas. Sus mediciones pueden ayudar a predecir la floculación y coalescencia porque la estabilidad de la emulsión puede verse influida por cargas eléctricas interfaciales (Bouyer et al., 2012). Además, en el caso de emulsiones que contienen polisacáridos y proteínas, el potencial zeta puede dar información valiosa a cerca de la carga que tienen estos polímeros en la emulsión.

#### 1.6. Técnica de microencapsulación mediante secado por pulverización

La microencapsulación es un proceso mediante el cual un agente o ingrediente activo puede almacenarse dentro una cápsula, recubriéndose con una película continua de material polimérico. Por tanto, una microcápsula consta de una pared externa compuesto de lo que se conoce comúnmente como material de pared y una cavidad central interna para agentes o ingredientes activos. El material de pared puede actuar como barrera física, protegiendo los ingredientes activos de las condiciones ambientales como oxígeno, humedad, ácidos, alcalinidad, calor e incluso interacciones con otros compuestos (Alihosseini, 2019).

El secado por pulverización es una de las técnicas más utilizadas en la industria alimentaria para la microencapsulación debido a su bajo coste, menor complejidad y la disponibilidad de equipos a escala industrial. Este método de secado consiste en la producción de partículas secas por contacto directo entre una solución líquida y una corriente de aire caliente dentro de una cámara de secado, archivando la evaporación del agua por masa y la transferencia de calor y finalmente el producto (polvo) se separa en un ciclón.

En la industria alimentaria, muchos de los compuestos o ingredientes bioactivos a encapsular consisten en compuestos lipofílicos, por lo que es necesario que el líquido de alimentación en el proceso de secado por pulverización sea una emulsión de aceite en agua, que contenga el lípido a encapsular y el material de pared.

#### 1.6.1. Características de las emulsiones para encapsular

Para encapsular compuestos lipídicos mediante secado por pulverización, la emulsión inicial debe tener unas características compatibles con este proceso (Hernandez - Sanchez et al., 2015); las principales se describen a continuación:

- La emulsión debe ser físicamente estable hasta y durante el secado por pulverización (Janiszewska et al., 2015).
- Generalmente, la distribución de las gotas debe ser del orden de 1-100  $\mu\text{m}$  de diámetro (Gharsallaoui et al., 2007).
- La viscosidad de la emulsión es un parámetro importante para tener en cuenta en la formulación de emulsiones para su estabilidad y posterior secado por pulverización. Una viscosidad elevada evita los fenómenos de floculación y coalescencia debido a que está dificultada la movilidad de las gotas (Tonon et al., 2011). Sin embargo, dependiendo del tipo de equipo, existen limitaciones técnicas para el secado de emulsiones muy viscosas. Los secadores por atomización a escala de laboratorio suelen estar limitados a una viscosidad de 300 mPa·s (BUCHI, 2010).
- La formulación de la emulsión debe ser adecuada para la encapsulación, es decir, debe contener un material de pared en una concentración adecuada (Hernández Sánchez et al, 2015). El tipo de material de pared es muy importante para la eficiencia de la encapsulación y la protección del núcleo (Gharsallaoui et al., 2007).

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente estudio consiste en evaluar la utilidad de un concentrado del subproducto de naranja y de pectinas de naranja, como ingredientes en la formulación de emulsiones estables destinadas a la microencapsulación de aceite mediante secado por atomización.

Para poder alcanzar este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- O1 – Obtener un concentrado del subproducto del zumo de naranja rico en pectinas
- O2 – Extraer pectinas del concentrado del subproducto de naranja y compararlas con pectinas comerciales
- O3 – Formular emulsiones (O/W) estables mediante la sustitución total de agentes emulgentes comerciales, y parcial del material de pared comercial, por el concentrado del subproducto de naranja o pectina comercial de naranja, combinándolos con proteína de soja para obtener emulsiones de doble capa.
- O4 – Evaluar si las características de las emulsiones obtenidas son adecuadas para la microencapsulación de aceite mediante secado por pulverización.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIA PRIMA

La materia prima, naranja var. *Navelina*, se adquirió en mercados locales en Palma de Mallorca (España). Para el estudio, se utilizaron únicamente los subproductos de la naranja después de extraer el zumo, incluyendo el flavedo y el albedo, así como también el eje central y los septos (ver Figura 3.1).

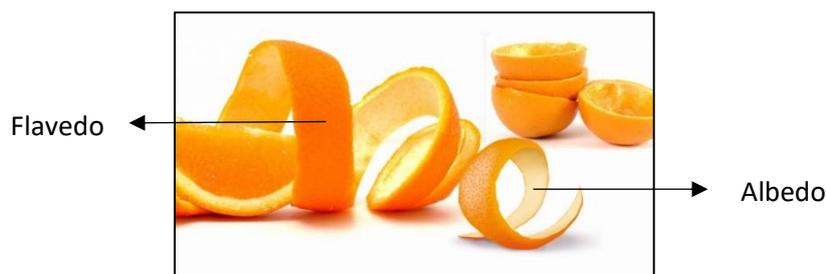


Figura 3.1. Subproductos de la naranja

#### 3.2. REACTIVOS

Durante todo el estudio realizado se han utilizado los siguientes reactivos:

- ✚ Proceso de extracción de pectinas:  
Ácido cítrico monohidratado, Scharlau), acetona (Scharlau), etanol 96 % (Scharlau) y ácido acético glacial QP (Panreac) y NaOH (pellets, Scharlau).
- ✚ Preparación de las emulsiones  
Proteína de soja (Manufacturas Ceylan, S.L.), Tween® 20 (Panreac), pectina comercial (Sigma Aldrich), maltodextrina (Glucidex® 12) y aceite refinado de girasol (Carrefour).
- ✚ Análisis físico-químicos  
Ácido clorhídrico 0,1 N (Scharlau), ácido clorhídrico 37 % (Scharlau), metanol (Scharlau), 2-deoxy-D-glucosa (Sigma Aldrich), amoníaco 25 % (Scharlau), 1-metilimidazol (Merck), Folin-Ciocalteu (Scharlau), Neocuprina (Sigma Aldrich), Cobre (III) cloruro dihidrato (Scharlau), potasio peroxodisulfato purísimo (Scharlau), sal diamónica 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (Sigma Aldrich), Trolox® 97 (Acros organics), ácido gálico monohidratado (Scharlau), Hierro (III) cloruro hexahidratado (Scharlau), 2,4,6 – tris (2-piridil) – triazina (Fluka Analytical), bromuro de potasio (Sigma Aldrich), persulfato de potasio (Scharlau).

### 3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

En esta investigación se evaluó el uso de dos materiales para estabilizar emulsiones: por un lado, un concentrado del subproducto de naranja (CSN) obtenido por liofilización y molienda del subproducto, que contenía pectinas de forma natural en su composición, además de otros componentes; y por otro, pectina pura de naranja comercial.

Con el objeto de comparar las pectinas comerciales con las pectinas extraídas del subproducto de naranja, se procedió a su extracción en el laboratorio asistido por ultrasonidos de potencia. No se llevó a cabo la elaboración de las emulsiones a partir de la pectina extraída en el laboratorio debido a que la cantidad necesaria excedía la capacidad de extracción a nivel de laboratorio.

Se realizó la caracterización fisicoquímica del CSN y de las pectinas de naranja tanto extraídas en el laboratorio, como las comerciales y se determinó la composición de monosacáridos (azúcares neutros por cromatografía de gases y ácidos urónicos por espectroscopia UV). Dado que las pectinas son macromoléculas compuestas principalmente de ácido urónico y algunos azúcares neutros, estos análisis permiten estimar la cantidad de pectina en el CSN. Se determinó además el color, el contenido en humedad, el grado de esterificación metílico por espectroscopia infrarroja, y la capacidad antioxidante y el contenido en compuestos fenólicos por espectroscopia UV.

En la formulación de emulsiones también se evaluó el uso de proteínas en combinación con las pectinas y del CSN, con el objetivo de obtener emulsiones de doble capa mediante la formación de un complejo polisacárido-proteína.

Se formularon y elaboraron emulsiones variando la composición de pectinas, CSN y proteína de soja. Además, se preparó una emulsión control utilizando un emulgente comercial, Tween®20. Una vez elaboradas las emulsiones se determinaron su viscosidad, índice de cremosidad, potencial zeta y microestructura, ésta última, también al cabo de 24 horas que se analizó mediante la obtención de fotos con un microscopio óptico en el momento de su realización y después de 24 h. Estos análisis fueron elegidos por su utilidad para evaluar la estabilidad de la emulsión; además, la viscosidad ayudará a determinar si la emulsión resulta adecuada para la técnica de secado por pulverización debido a que a escala de laboratorio esta técnica está limitada al secado de líquidos con un máximo de 300 cP de viscosidad. En la Figura 3.2 se muestra un esquema del diseño experimental.

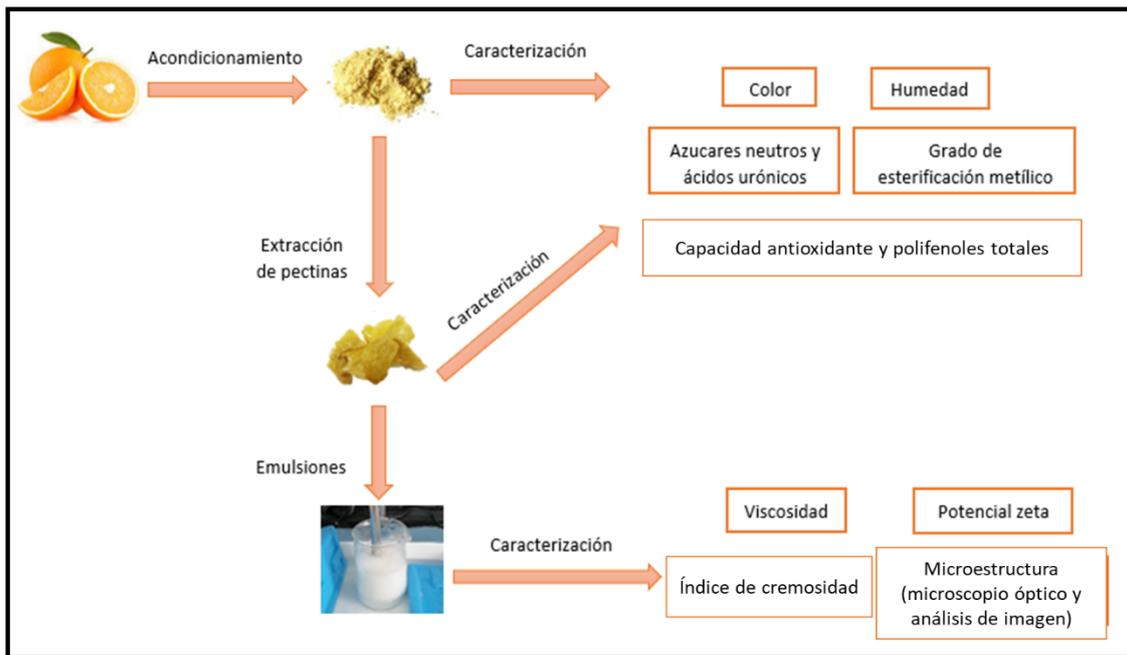


Figura 3.2. Esquema del diseño experimental

### 3.4. PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO DEL SUBPRODUCTO DE NARANJA (CSN)

Con el objetivo de estabilizar y obtener un concentrado de polisacáridos del subproducto de naranja se procedió tal y como se muestra en la Figura 3.3. Previo al inicio del proceso, se descartaron aquellas piezas que presentaban daños o estaban en mal estado.

Inicialmente se cortó cada naranja por la mitad con un cuchillo para llevar a cabo la extracción del zumo con un exprimidor automático. Cada una de las mitades de piel se cortó en cuatro partes y se sometió a un proceso de escaldado con vapor de agua a 100 °C durante 5 min con el fin de inactivar las enzimas endógenas que podrían degradar las pectinas.

A continuación, se esperó a que la muestra se enfriara y se congeló a -80 °C para posteriormente llevar a cabo la liofilización a 0,3 mbar y -50 °C en un liofilizador de laboratorio (LyoQuest, Telstar, España). Seguidamente, se molió (ZM 200, Retsch®, Alemania) y se recolectó el concentrado del subproducto de naranja (ver Figura 3.3).

Finalmente, la muestra se envasó al vacío, en bolsas de plástico de poliamida/polietileno 20/70 con permeabilidad al O<sub>2</sub> 2.58 x 10<sup>-7</sup> mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup>. Éstas se conservaron a 4 °C y protegidas de la luz hasta su uso para la elaboración de las emulsiones.

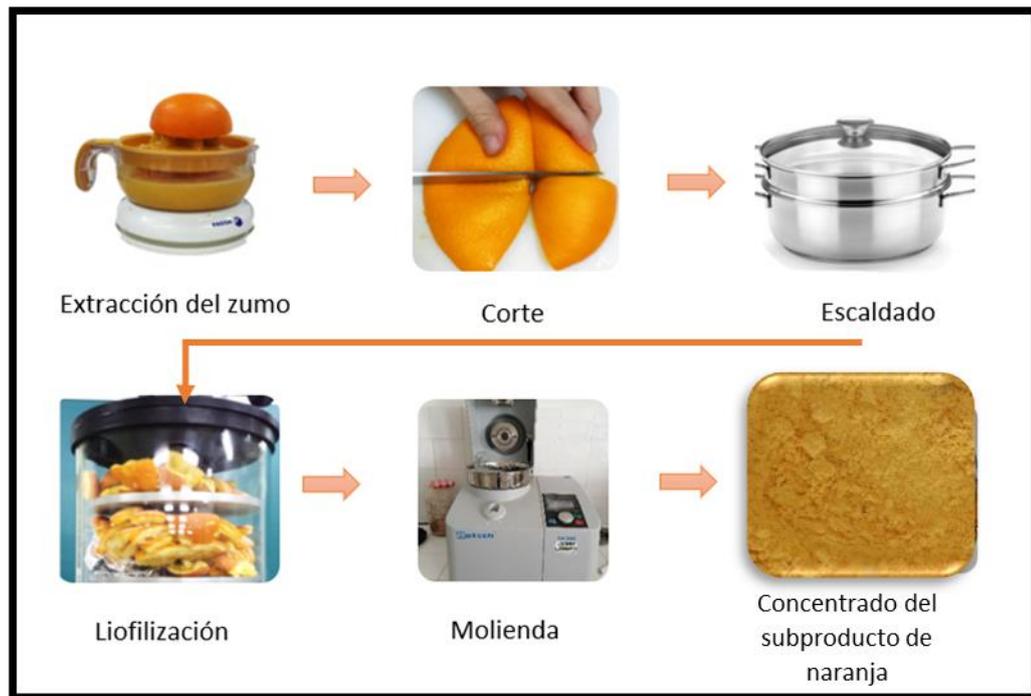


Figura 3.3. Procedimiento para la obtención del concentrado del subproducto de naranja

### 3.5. PROCESO DE EXTRACCIÓN DE LAS PECTINAS

El CSN fue sometido a un proceso de extracción haciendo uso de un equipo de extracción con asistencia acústica utilizando una relación de CSN/disolvente de 5/300 (w/v, g/mL) durante 30 min a  $25 \pm 2$  °C. Como disolvente de extracción se utilizó una disolución de ácido cítrico a pH 1,5.

Después de la extracción se procedió según la metodología propuesta por Panchev & Kirtchev (1989) y Canteri-Schemin et al. (2005). Se filtró la mezcla de CSN/disolvente a través de filtros Whatman GF/C (filtros de microfibras de vidrio, libre de celulosa) de 90 mm. El sólido se descartó y el filtrado líquido se trató su volumen con etanol 96% dos veces con el objetivo de hacer precipitar las pectinas y se homogenizó con un agitador magnético a 1100 rpm durante 10 min. Finalmente se centrifugó a 3900 rpm durante 20 min para precipitar las pectinas.

El extracto se separó por filtración a vacío utilizando filtros Whatman GF/C (filtros de microfibras de vidrio, libre de celulosa) de 90 mm. Se lavó dos veces con 40 mL de etanol 96% y una vez con 50 mL de acetona.

Las pectinas se secaron en una estufa a una temperatura de 40 °C durante 24 h. Posteriormente, se molieron y tamizaron, seleccionando un tamaño de partícula  $< 0,355$  mm.

### 3.5.1. Equipo de extracción: ultrasonidos de potencia

La extracción se llevó a cabo con un equipo de ultrasonidos UP400S (Hielscher Ultrasound Technology, Alemania) al cual se le acopló una sonda de 22 mm de diámetro y 100 mm de longitud. Se utilizó un vaso encamisado de 250 mL de capacidad conectado a un baño termostático de recirculación de modo que la temperatura en el vaso se mantuviera constante ( $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) durante los experimentos. La sonda de ultrasonidos se colocó en el eje central del vaso siempre en la misma posición (Figura 3.4) sumergida 10 mm en el líquido.

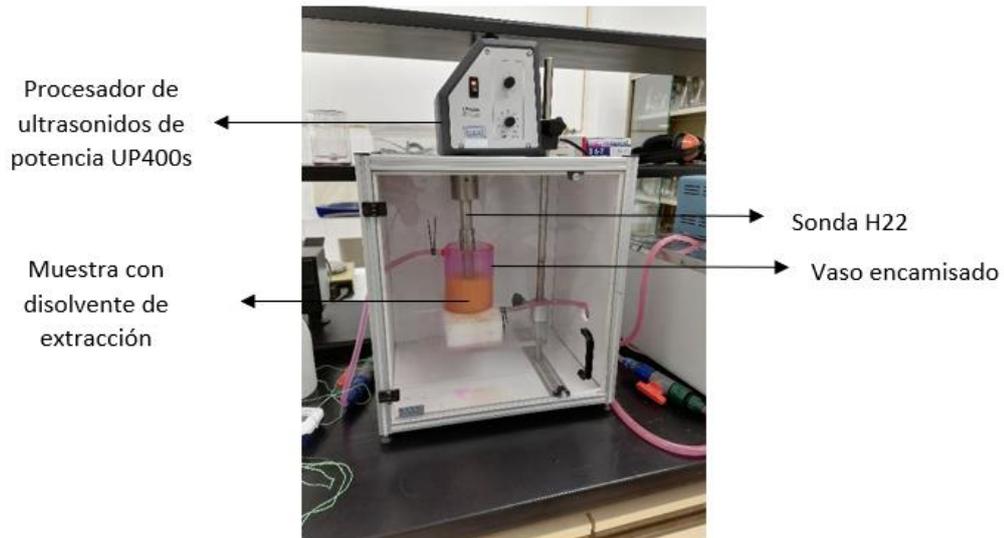


Figura 3.4. Equipo de ultrasonidos

### 3.5.2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD CALORIFICA DEL DISOLVENTE DE EXTRACCIÓN

Se utilizó como disolvente extracción una disolución de ácido cítrico a pH 1,5. La capacidad calorífica de la misma se determinó por calorimetría diferencial de barrido (DSC 920, TA Instruments, Estados Unidos) a partir de la Ecuación 1.

$$C_p = \frac{x}{x'} \cdot x \cdot \frac{m'}{m} \cdot C_p \quad [1]$$

Donde:

- $C_p$ : capacidad calorífica de la muestra ( $\text{J kg}^{-1} \text{K}^{-1}$ )
- $x$ : diferencia entre el flujo de calor registrado de la muestra y una cápsula vacía a la misma temperatura ( $\text{J s}^{-1}$ )
- $x'$ : diferencia entre el flujo de calor registrado del zafiro y una cápsula vacía a la misma temperatura ( $\text{J s}^{-1}$ )
- $m'$ : masa del zafiro (g)
- $m$ : masa de la muestra (g)
- $C_p'$ : capacidad calorífica del zafiro ( $\text{J kg}^{-1} \text{K}^{-1}$ )

### 3.5.3. DETERMINACIÓN DE LA POTENCIA DE LOS EQUIPOS DE ULTRASONIDO

Para poder establecer la densidad de potencia acústica ( $W L^{-1}$ ) suministrada por el sistema se procedió a realizar su determinación por calorimetría. Este procedimiento consiste en la medida del incremento de temperatura del disolvente de extracción que tiene lugar durante los primeros minutos de funcionamiento del equipo de ultrasonidos UP400S (Hielscher Ultrasound Technology, Alemania) utilizando una sonda de ultrasonidos de 22 mm de diámetro (100 00631, Hielscher, Alemania), sin presencia de muestra y sin termostatar el sistema (Raso et al., 1999). La temperatura se registró cada 5 s durante los primeros 5 min. El cálculo de la potencia acústica se realizó utilizando la Ecuación 2 (Sivakumar & Pandit, 2001), a partir de la curva de temperatura-tiempo determinada experimentalmente por triplicado. Dividiendo entre el volumen de trabajo se obtiene la densidad de potencia acústica ( $W L^{-1}$ ).

$$P = \frac{m \cdot C_p \cdot \frac{dT}{dt}}{V} \quad [2]$$

Donde:

- P: potencia acústica (W)
- m: masa del disolvente (kg)
- $C_p$ : capacidad calorífica del disolvente ( $J kg^{-1} K^{-1}$ )
- dT: diferencial de temperatura (K)
- dt: diferencial de tiempo (s)
- V: volumen del disolvente (L)

### 3.6. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS DEL CONCENTRADO DEL SUBPRODUCTO DE NARANJA Y DE LAS PECTINAS

#### 3.6.1. Contenido en humedad

Para determinar el contenido en humedad del CSN y de las pectinas extraídas y comerciales se siguió el procedimiento descrito por la AOAC 934.06 (AOAC, 1997). Por triplicado se secaron aproximadamente 1 g de CSN y 0,5 g de pectinas en una estufa de vacío (Vaciotem-T, Selecta, España) a 70 °C hasta peso contante (aproximadamente 24 h). A partir de la variación de peso se calculó el valor del contenido de humedad y el resultado se expresó en g agua/100 g de muestra en base húmeda (b.h).

### 3.6.2. Determinación del color

La determinación física del color del CSN y de las pectinas extraídas y comerciales, se realizó por triplicado, utilizando un espectrofotómetro (CM5, Konica Minolta, Japón) con componente especular excluido, iluminante D65, una apertura de 30 mm y un observador con un ángulo de 10 °. Se utilizaron las coordenadas CIELab\* (Wang et al., 2015); determinándose los valores de L\* (luminosidad), a\* (define la desviación del punto cromático hacia el rojo si a\* > 0, hacia el verde si a\* < 0) y b\* (define la desviación hacia el amarillo si b\* > 0, hacia el azul si b\* < 0) (Drake & Drake, 2011).

La diferencia total de color  $\Delta E$  (Constenla et al., 2016) del concentrado del subproducto de naranja y de la pectina extraída se calculó mediante la Ecuación 3, tomando como referencia el color de la pectina comercial. Se cogió la cantidad suficiente para cubrir la superficie del recipiente.

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0)^2 + (a^* - a_0)^2 + (b^* - b_0)^2} \quad [3]$$



Figura 3.5. Espectrofotómetro CM5 Konica Minolta para el análisis de color

### 3.6.3. Contenido en fibra alimentaria. Residuo insoluble en alcohol (AIR)

Con el objetivo de determinar el contenido en fibra alimentaria y la composición de los principales tipos de polisacáridos presentes en el CSN se procedió a la extracción de los polisacáridos mediante su precipitación en alcohol (Eim et al., 2013).

El residuo insoluble en alcohol se obtuvo a partir del CSN y para ello se pesaron, por triplicado, 1,5 g de CSN y se añadieron 100 mL de etanol 85 % y se homogenizó durante 2 min a 30.000 rpm mediante Ultra-Turrax (T25 Digital IKA, Staufe, Germany). A continuación, la mezcla se llevó a ebullición 5 min, se volvió a homogenizar 2 min más y otra vez se llevó a ebullición durante 1 min. Luego se filtró al vacío utilizando filtros Whatman GF/C (filtros de microfibra de vidrio, libre de celulosa) de 90 mm. El filtrado se suspendió nuevamente en 100 mL de etanol 85 %. La mezcla se homogenizó y se llevó a ebullición, durante 2 y 1 min, respectivamente, y posteriormente se filtró nuevamente. El proceso anterior se repitió con etanol absoluto. Finalmente, la muestra se lavó dos veces con acetona. El disolvente se evaporó a temperatura ambiente, dejando un residuo insoluble en alcohol, formado mayoritariamente por los componentes que forman las paredes celulares de la piel de naranja. El rendimiento de AIR se expresó en g de AIR por cada 100 g de CSN b.s.

El AIR ha sido la materia sobre la cual se han realizado las determinaciones de contenido en azúcares neutros y ácidos urónicos en el CSN.

### 3.6.4. Identificación y cuantificación de azúcares

Los azúcares, unidades fundamentales de los diferentes polisacáridos que forman el CSN y las pectinas, se liberaron mediante un proceso de hidrólisis ácida (González-Centeno et al., 2019).

Se pesaron aproximadamente 5 mg de CSN o pectinas, se mezclaron con 200  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  12 M (equivalente al 70 % v/v) y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 h. Luego se adicionaron 2,2 mL de agua destilada y se incubaron a 100 °C en un bloque seco durante 2,5 h, produciéndose así la hidrólisis total de los diferentes tipos de azúcares. Trascorrida una hora, se retiraron 0,5 mL del hidrolizado y se continuó con la hidrólisis 1,5 h más (se usará para el análisis de ácidos urónicos).

#### - Azúcares neutros

Una vez terminada la hidrólisis, se adicionan 200  $\mu\text{L}$  de 2-deoxy-glucosa (1 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) como patrón interno, con el objetivo de determinar de forma cuantitativa la presencia de ramnosa, fucosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa.

A continuación, 1,0 mL del hidrolizado se neutralizó con 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_3$  al 25 %. Seguidamente, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_3$  3M con  $\text{NaBH}_4$  al 15 % como agente reductor para conseguir la rotura de los ciclos que tienen los azúcares en su estructura (pasar de aldehído a alcohol). Posteriormente, se incubó durante 1 h a 30 °C. Una vez enfriadas, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial y se homogenizó. Luego, a 300  $\mu\text{L}$  se le añadieron 450  $\mu\text{L}$  de 1-metilimidazol, 3 mL de anhídrido acético y se homogenizó e incubó durante 30 min a 30 °C. De esta manera se consiguieron los acetatos, compuestos volátiles detectables por cromatografía de gases. Seguidamente, se adicionaron 2,5 mL de agua destilada para descomponer el exceso de anhídrido acético y 2,5 mL de diclorometano para extraer los acetatos de alditol.

La fase orgánica con los compuestos de interés se separó mediante centrifugación, para posteriormente eliminar la fase acuosa por aspiración. Finalmente, el diclorometano se evaporó bajo un flujo de argón a 40 °C hasta sequedad.

Los azúcares neutros, convertidos en sus correspondientes alditoles acetatos, se separaron por cromatografía de gases (cromatógrafo Perkin Elmer-Clarus 400) a 220 °C. Se utilizó una columna capilar DB-225 (30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro y 0,15 µm de espesor) y las temperaturas del inyector y del detector se programaron a 220 y 230 °C, respectivamente.

- Ácidos urónicos

El contenido de ácidos urónicos del CSN y de las pectinas se determinó por triplicado siguiendo el método colorimétrico descrito por Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973. Para ambos, se usó el hidrolizado obtenido en la determinación de azúcares neutros.

Para la realización de la recta de calibrado se utilizó ácido galacturónico disuelto en agua destilada (rango de la recta 0 – 80 µg de ácido galacturónico/mL). Para ello, se añadieron 3 mL de borato de sodio 50 mM preparado en ácido sulfúrico concentrado a los tubos de ensayo colocados dentro de un baño de hielo-agua. A continuación, se adicionaron 0,5 mL de la disolución patrón correspondiente, se incubaron durante 10 min a 100 °C y se refrigeraron en un baño de hielo. Estando en el baño de hielo, se adicionaron 100 µL de una disolución al 0,15 % de m-fenilfenol y 0,5 % de NaOH, a todos los tubos excepto a los blancos debido a que este compuesto reacciona con el grupo ácido del ácido galacturónico dando una coloración rosada.

Pasados 30 min, se leyó la absorbancia de cada uno de los tubos con un espectrofotómetro UV-Vis (UV-2401PC, Shimadzu, Japón) a 520 nm y se obtuvo la recta de calibrado.

Para de determinación de los ácidos urónicos presentes en el CSN y en las pectinas se procedió de la misma, introduciendo 0,5 mL del hidrolizado de cada una de las muestras en lugar de las disoluciones patrón de ácido galacturónico. La determinación de la absorbancia permitió, a partir de la recta de calibrado, obtener la cuantificación de los ácidos urónicos presentes en cada una de las muestras.

- Polisacáridos

Las pectinas son polisacáridos complejos formados principalmente por una cadena de HG y cadenas de RGI. La primera se compone por unidades de ácido galacturónico y la segunda contiene principalmente ramnosa, arabinosa y galactosa (Williats et al., 2006). Considerando la composición de los polímeros presentes en la pared celular, se calculó de forma aproximada la proporción de pectinas a partir de la Ecuación 4. Además, también se estimó la cantidad de celulosa y hemicelulosa a través de las Ecuaciones 5 y 6.

$$\% \text{ pectinas} = \frac{[Rha] + [Ara] + [Gal] + [UA]}{\text{azúcares totales}} \cdot 100 \quad [4]$$

$$\% \text{ celulosa} = \frac{0,9 \cdot [Glc]}{\text{azúcares totales}} \cdot 100 \quad [5]$$

$$\% \text{ hemicelulosa} = \frac{[Fuc] + [Xyl] + [Man] + 0,1 \cdot [Glc]}{\text{azúcares totales}} \cdot 100 \quad [6]$$

### 3.6.5. Determinación del grado de esterificación metílico de las pectinas

El grado de esterificación metílico se determinó, por triplicado, mediante espectroscopia infrarroja FTIR siguiendo el método descrito por Manrique & Lajolo (2002).

Para ello, se mezcló una parte de pectina con dos partes de bromuro de potasio y se hizo una pastilla con ayuda de la prensa hidráulica y se analizó por FTIR (IFS 66, Bruker, Estados Unidos). De este modo se obtuvo el espectro con las diferentes bandas presentes en la pectina.

El grado de esterificación metílico se determinó calculando la relación entre el área del pico correspondiente a la vibración de los grupos carboxilo metilesterificados y la suma de ésta más el área correspondiente a la vibración de los grupos carboxilo libres (Ecuación 7). Dicha relación se sustituyó luego en la ecuación propuesta por Manrique & Lajolo (2002) (Ecuación 8).

$$R = \frac{A_{1740}}{A_{1740} + A_{1630}} \quad [7]$$

$$GME = 124,7R + 2,2013 \quad [8]$$

donde  $A_{1740}$  y  $A_{1630}$  representan las absorbancias de las bandas de los grupos carboxilo metilesterificados y los libres, respectivamente.

### 3.6.6. Capacidad antioxidante y contenido en compuestos fenólicos

Para la determinación de la capacidad antioxidante y el contenido total de polifenoles se siguió la metodología propuesta por González-Centeno et al., (2015).

Inicialmente se hizo la extracción de antioxidantes tanto en el CSN como en las pectinas, para luego poder cuantificarlos a través de diferentes métodos. Para ello, se añadieron 0,2 g de muestra en 20 mL de metanol, se homogenizaron con Ultra-Turrax (T25 Digital, IKA, Germany) y se incubaron durante 24 h a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 min y se filtró al vacío para recoger el filtrado.

Una vez preparadas las muestras, se procedió al análisis de antioxidantes mediante los métodos: ABTS, CUPRAC y FRAP (ver Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Características de los diferentes métodos usados para la determinación de la capacidad antioxidante

Método	Reactivo	Absorbancia
ABTS	8 mL de una disolución de ABTS y $K_2S_2O_8$ en EtOH: H <sub>2</sub> O (25:75)	734 nm
CUPRAC	2,5 mL de TPTZ 0,01M + 2,5 mL de tampón de acetato y 25 mL de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,02M	593 nm
FRAP	10 mL Cu (II) 10 mM + 10 mL Neocuprina 7,5 mM y 10 mL de tampón de $NH_4Ac$ 1,0M	450 nm

Para la recta de calibrado, la misma para todos, se utilizó una disolución acuosa de TROLOX (rango de la recta 0 – 400 ppm de TROLOX). Las condiciones y cantidades de muestra fueran las mismas para los tres métodos: 190  $\mu$ L del reactivo correspondiente al método, 10  $\mu$ L del patrón y 10  $\mu$ L de muestra. El tiempo de incubación fue de 30 min (González-Centeno, M.R et al, 2015). Por lo tanto, la capacidad antioxidante se midió en equivalente de TROLOX (TE).

Para la determinación del contenido en polifenoles totales se utilizó el método de Folin Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 75 %. Para la recta de calibrado se utilizó una disolución de ácido gálico en metanol (rango de la recta 0 – 250 ppm de ácido gálico). Para la placa se pusieron 90 µL de agua, 5 µL del reactivo de Folin, 10 µL de muestra, 10 µL de patrón y 80 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5 %. Por lo tanto, los polifenoles totales se midieron en equivalente de ácido gálico (GAE).

### 3.7. EMULSIONES

#### 3.7.1. Elaboración de emulsiones

Se llevaron a cabo una serie de pruebas preliminares para establecer las proporciones adecuadas de cada componente en la formulación de las emulsiones. A partir de estos experimentos se decidió trabajar con un porcentaje constante de materia seca del 40 %, que se mantuvo completando la formulación con maltodextrina, que actúa como material de pared, y un 6 % de aceite de girasol.

Se prepararon 250 g de cada emulsión y para ello se fue variando el contenido en proteína de soja en un intervalo entre 0,30 – 0,60 %, el de pectina comercial entre 0,2 – 0,5 % y el de CSN se estimó de modo que aportara la misma cantidad de pectinas que la pectina pura. Se usó un buffer de acetato de sodio 1,2 M y pH 3,5 ya que de esta manera se consigue que las proteínas tengan carga positiva y puedan formar complejos con las pectinas comerciales.

En la Tabla 3.5 se presenta la formulación de las emulsiones estudiadas, expresadas en porcentaje de cada ingrediente. Las emulsiones se prepararon por duplicado.

Tabla 3.5. Formulación de las emulsiones: porcentaje de cada componente en cada emulsión (% w/w)

Emulsión	Maltodextrina	Buffer pH 3,5	Tween® 20	Aceite	Pectina	CSN	Proteína
Control	33,86	60,00	0,14	6,00	-	-	-
03PR	33,70	60,00	-	6,00	-	-	0,30
06PR	33,20	60,00	-	6,00	-	-	0,60
02PC	33,80	60,00	-	6,00	0,20	-	-
02PC_03PR	33,50	60,00	-	6,00	0,20	-	0,30
02PC_06PR	33,20	60,00	-	6,00	0,20	-	0,60
05PC	33,50	60,00	-	6,00	0,50	-	-
05PC_03PR	33,20	60,00	-	6,00	0,50	-	0,30
05PC_06PR	32,90	60,00	-	6,00	0,50	-	0,60
10CSN	33,05	60,00	-	6,00	-	0,95	-
10CSN_03PR	32,75	60,00	-	6,00	-	0,95	0,30
10CSN_06PR	32,45	60,00	-	6,00	-	0,95	0,60
24CSN	31,62	60,00	-	6,00	-	2,38	-
24CSN_03PR	31,32	60,00	-	6,00	-	2,38	0,30
24CSN_06PR	31,02	60,00	-	6,00	-	2,38	0,60
34CSN	30,60	60,00	-	6,00	-	3,40	-
34CSN_03PR	30,30	60,00	-	6,00	-	3,40	0,30
34CSN_06PR	30,00	60,00	-	6,00	-	3,40	0,60

La nomenclatura utilizada para definir las emulsiones es la siguiente: los números, indican el porcentaje de cada componente eliminando el símbolo de decimal, seguido del indicativo del componte (PR: proteína de soja; PC: pectina comercial; CSN: concentrado del subproducto de naranja), declarando los componentes presentes (PR, PC y/o CSN).

Además, la emulsión Control presenta una formulación convencional, preparada con un tensioactivo sintético (Tween®20).

- Emulsión control

La emulsión control se preparó en dos etapas: primero se disolvió la maltodextrina en el 85 % del buffer, se agitó con un agitador magnético hasta su total disolución y se calentó hasta unos 40 °C. A continuación, se añadió el Tween®20 al resto de agua y se homogenizó con un Ultra-turrax a 16.000 rpm. Seguidamente, se añadió el aceite y se siguió dispersando con el Ultra-turrax durante 10 min. Finalmente, se mezcló la emulsión con la disolución de maltodextrina, siempre que esta última estuviera a 35 °C, con la ayuda de agitación a 200 rpm. Por último, se homogenizó con el Ultra-turrax a 16.000 rpm durante 5 min.

- Emulsión de proteína

Se disolvió la proteína en el agua, se mantuvo 2 h en agitación y se dejó en reposo durante 24 h. Al día siguiente, se disolvió la maltodextrina en el buffer. Se ajustó el pH de la disolución de proteína a 3,5 con una dilución de HCl 37 % 4,8 M. A continuación, se produjo la emulsión añadiendo el aceite a la disolución de proteína y homogenizando con un Ultra-turrax a 16.000 rpm durante 10 min. Finalmente, se volvió a homogenizar con el Ultra-turrax a 16.000 rpm durante 5 min, añadiendo la disolución de maltodextrina.

- Emulsión de CSN

Se disolvió la maltodextrina en el buffer y luego se añadió el concentrado del subproducto de naranja. A continuación, se homogenizó la disolución con el Ultra-turrax a 16.000 rpm durante 8 min y finalmente se preparó la emulsión añadiendo el aceite con homogenización durante 15 min.

- Emulsión de pectina

Se disolvió la pectina en el buffer, se mantuvo en agitación 2 h y se dejó en reposo durante 24 h. Al día siguiente, se añadió la maltodextrina hasta total disolución. Finalmente, se añadió el aceite homogeneizando con un Ultra-turrax a 16.000 rpm durante 15 min.

- Emulsión de CSN y proteína

Se disolvió la proteína en el agua, se mantuvo 2 h en agitación y se dejó en reposo durante 24 h. Al día siguiente, se disolvió la maltodextrina en el buffer, se añadió el concentrado del subproducto de naranja y se ajustó el pH de la disolución de proteína a 3,5 con una dilución de HCl 37 % 4,8 M. A continuación, se homogenizó la disolución de concentrado del subproducto de naranja con un Ultra-turrax a 16.000 rpm durante 8 min. Luego, se preparó la emulsión añadiendo el aceite a la solución de proteínas y homogenizando con el Ultra-turrax a 16.000 rpm durante 10 min. Finalmente, la unión de la disolución del concentrado del subproducto de naranja y la de la proteína se homogeneizó con el Ultra-turrax a 16.000 rpm durante 5 min.

- Emulsión de proteína y pectina

Se disolvió la proteína en el agua y la pectina en el buffer, se mantuvieron 2 h en agitación y se dejaron en reposo durante 24 h. Al día siguiente, se disolvió la maltodextrina en la disolución de la pectina y se ajustó el pH de la disolución de proteína a 3,5 con una dilución de HCl 37 % 4,8 M. A continuación, se preparó la emulsión añadiendo el aceite a la solución de proteínas y homogenizando con un Ultra-turrax a 16.000 rpm durante 10 min. Finalmente, se añadió la

disolución de maltodextrina y pectina y se volvió a homogenizar con el Ultra-turrax a 16.000 rpm durante 5 min.

### 3.8. CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

#### 3.8.1. Determinación de la viscosidad

Las medidas de viscosidad se realizaron por triplicado, con un viscosímetro rotacional (STS – 2011, Selecta, España) sobre un volumen de emulsión de 250 mL a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C. Por la diversa composición de las emulsiones se usaron dos husillos diferentes (R2 y R3) con dos velocidades (100 y 200 rpm). Este equipo, mide el ángulo de desviación del eje dando el valor de la fuerza de torsión y a partir de este dato y el de velocidad, calcula directamente la viscosidad en centipoise (cP).

#### 3.8.2. Determinación del índice de cremosidad (Creaming index)

La estabilidad de las emulsiones se midió a través del método descrito por Verkempinck et al (2018). Se introdujeron 10 mL de emulsión en una probeta y se dejaron reposar 24 h. Cuanto mayor sea el valor del índice de cremosidad (CI), menos estable será la emulsión. Este parámetro se calculó mediante la Ecuación 9.

$$CI = \frac{sh}{th} \cdot 100 \quad [9]$$

donde sh es la altura de la fase formada en la parte inferior de la probeta y th es la altura total de la emulsión en la probeta. Todas las mediciones se hicieron en unidades de mm con un pie de rey y se realizaron por duplicado.

#### 3.8.3. Determinación del tamaño de las gotas de aceite

Para evaluar la estabilidad de las emulsiones se determinó el tamaño de gota de aceite mediante microscopía óptica (BH2, Olympus, España) y análisis de imagen (ImageJ 1.80, Creative commons license). De cada emulsión se hizo una dilución de 100 µL con 1 mL de buffer de acetato de sodio. A continuación, se añadió una gota de la disolución sobre el portaobjetos y se cubrió con el cubreobjetos. Se tomaron imágenes a tiempo 0 (inmediatamente después de la preparación de la emulsión) y a las 24 h. Se adquirieron como mínimo 10 imágenes de cada emulsión. Las emulsiones se conservaron en nevera a una temperatura de 4 °C. A partir de las fotografías se realizó el análisis de imagen que consistió en el escalado, el cual permite relacionar una longitud conocida con un número de píxeles. Primero se mejoró el contraste de la imagen para luego realizar una transformación binaria. Seguidamente se aplicó el filtro *blur* y se usó la opción *watershed* que sirve para separar las gotas que están muy juntas o floculadas. Finalmente, se usó la opción *analyze particles* seleccionando las partículas con una esfericidad entre 0,7 y 1 (Figura 3.7). A partir del análisis de imagen se obtuvieron las áreas de las gotas de aceite, con este dato se calculó el volumen y el diámetro de las gotas asumiendo geometría esféricas. Luego se crearon clases en base al diámetro y se calculó el porcentaje de volumen de aceite que pertenecía a cada clase.

Para describir las distribuciones del tamaño de partícula se calculó el percentil 50; de tal forma que  $d_{50}$  representa el valor medio del tamaño de gotas de aceite, indicando que un 50 % del volumen de aceite pertenece a gotas con diámetro menor a ese valor. A partir de estos datos se calculó el span (Ecuación 10), un parámetro de amplitud de la distribución que permite disponer de una medida del grado de dispersión de los datos alrededor de la mediana (Shamaei et al., 2017).

$$span = \frac{d_{50}}{d_{90} - d_{10}} \quad [10]$$

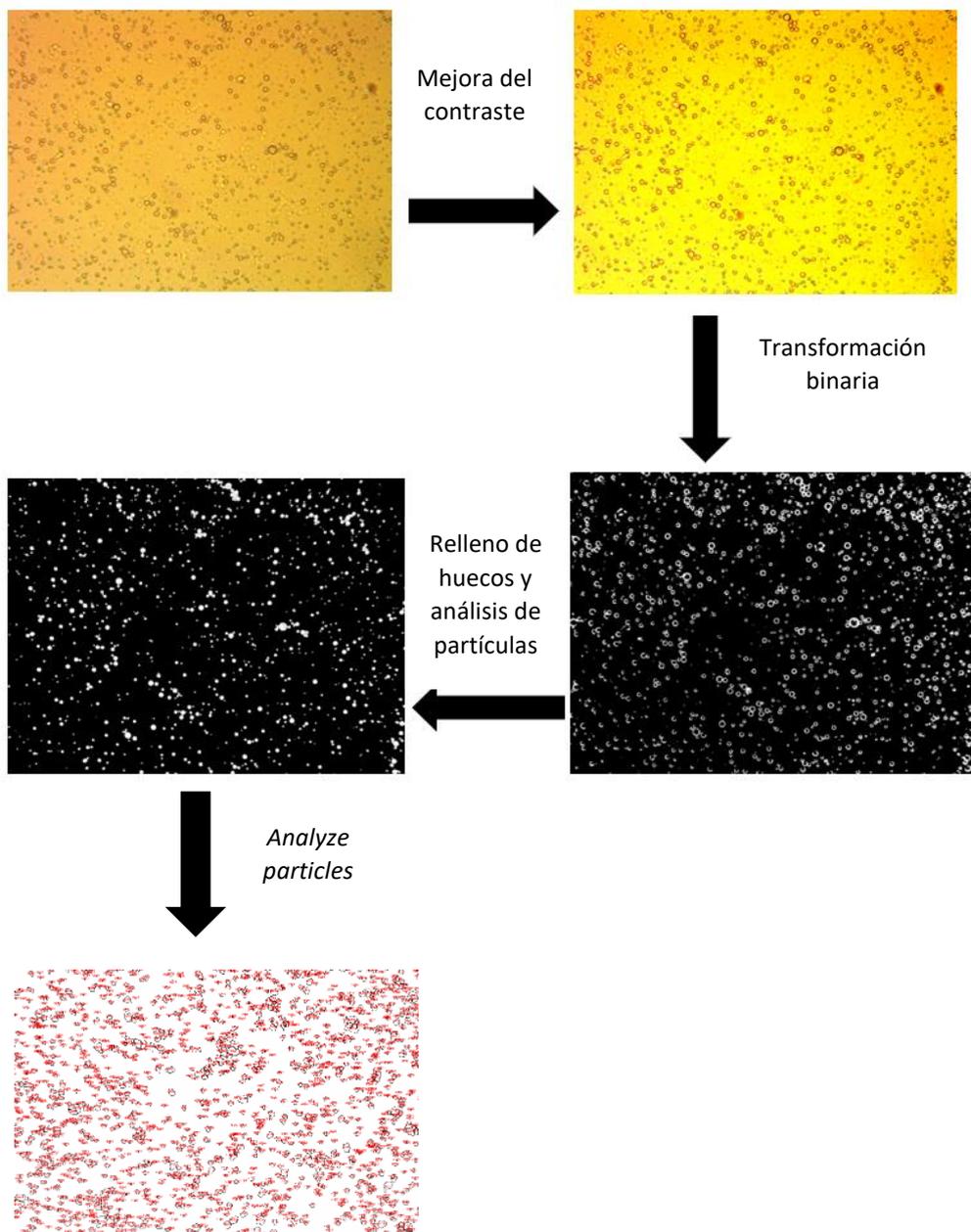


Figura 3.6. Transformación de la imagen en el programa ImageJ

#### 3.8.4. Determinación del potencial zeta

Para determinar el potencial zeta, se disolvieron 100  $\mu$ L de emulsión en 50 mL de agua MilliQ y se ajustó el pH = 3,5 con HCl 0,1 M. Luego, por triplicado, se midió el potencial zeta con un Zetasizer, Nano – ZS90 (Malvern, UK), que directamente estima el potencial zeta a partir de la movilidad electroforética de las gotas usando el modelo de Smoluchowsky (Nayak, A.K, et al., 2017).



*Figura 3.7. Equipo Zetasizer, Nano – ZS90 para la determinación del potencial zeta*

#### 3.8.5. Determinación del color

Para llevar a cabo el análisis del color de las emulsiones se procedió de la misma manera que con las pectinas, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.6.2 pero utilizando 10 mL de emulsión.

#### 3.9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para analizar estadísticamente los resultados obtenidos, se utilizó el programa R (versión 3.5.3, R Foundation for Statistical Computing, Austria). En todas las determinaciones analíticas realizadas, los resultados se presentan como media y desviación estándar de las mediciones realizadas.

Para evaluar la existencia de diferencias significativas entre muestras respecto a los diferentes parámetros analizados, en primer lugar, se utilizó el test de Shapiro para determinar si la distribución de datos era normal y el test de Levene para evaluar la homogeneidad de las varianzas. En caso de que las distribuciones no fueran normales, se procedió a normalizar los datos con una transformación mediante logaritmo ( $\log(x)$  o  $\log(x + 1)$ ). Si los datos resultaron ser normales y homogéneos (con o sin transformación), se utilizaron tests paramétricos (ANOVA y test de Tukey). En caso contrario, se utilizaron tests no paramétricos (test de Kruskal Wallis y test de Pairwise-Wilcox).

#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En este apartado se presentan y discuten los resultados obtenidos del presente estudio. En primer lugar, se presentan los resultados obtenidos en relación con la determinación de la capacidad calorífica del solvente y de la potencia acústica de la sonda utilizada.

Posteriormente, se detallan y discuten los resultados obtenidos para la caracterización del concentrado del subproducto de naranja y de las pectinas, así como de todos los parámetros analizados para la evaluación de la estabilidad de las emulsiones para su uso en secado mediante pulverización.

##### **4.1. CAPACIDAD CALORÍFICA DEL SOLVENTE DE EXTRACCIÓN**

Se determinó la capacidad calorífica de la disolución utilizada para la extracción de las pectinas del concentrado de piel de naranja. Se siguió la metodología descrita en el apartado 3.5.2. La capacidad calorífica de la solución de ácido cítrico de pH 1,5 fue de  $4305 \pm 102 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$  para 25 °C, siendo muy similar a la del agua a la misma temperatura ( $4180 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ).

##### **4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA SONDA DE ULTRASONIDOS**

La densidad de la potencia acústica generada por la sonda de ultrasonidos de 22 mm de diámetro se determinó mediante calorimetría, obteniéndose un valor de  $142 \pm 5 \text{ W L}^{-1}$ .

##### **4.3. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CONCENTRADO DEL SUBPRODUCTO DE NARANJA Y DE PECTINAS EXTRAÍDAS Y COMERCIALES**

Con el objetivo de obtener un material estable, homogéneo y adecuado para utilizar como materia prima para la extracción de pectinas y la elaboración de las emulsiones correspondientes, se procedió a la obtención del CSN según la metodología descrita en el apartado 3.4. También se procedió a la extracción de las pectinas del CSN y a la caracterización de físico-química del CSP, de las pectinas extraídas de él y de las pectinas comerciales siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.5.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en la caracterización físico-química de los tres materiales (CSN, pectinas extraídas y pectinas comerciales) que incluye el contenido en humedad, el color, la fibra alimentaria y composición en polisacáridos, la capacidad antioxidante y el contenido fenólico total y el grado de esterificación metílico.

#### 4.3.1. Contenido en humedad

Para determinar el contenido en humedad (% b.h) se procedió según la metodología descrita en el apartado 3.6.1. En la Tabla 4.3 se presentan los resultados obtenidos tanto para el CSN como para las pectinas extraídas y comerciales.

Tabla 4.3. Contenido en humedad del concentrado del subproducto de naranja (CSN) y de las pectinas extraídas y comerciales.

Contenido en humedad (% b.h)		
CSN	Pectinas extraídas	Pectinas comerciales
<b>5,3 ± 0,5</b>	6,59 ± 0,07	2,5 ± 0,6

El bajo contenido de humedad del CSN le confiere estabilidad, lo que indica que el acondicionamiento realizado fue adecuado. Según la bibliografía encontrada, en el estudio realizado por Kaderides et al. (2017) obtuvieron un valor de contenido en humedad para el concentrado del subproducto de naranja de  $8,52 \pm 0,12$  % b.h; y Crizel et al. (2013) realizaron una determinación del contenido de humedad para dos tipos de concentrado del subproducto de naranja: piel, pulpa y semillas ( $7,9 \pm 0,2$  % b.h) y con solamente piel ( $7,1 \pm 0,1$  % b.h). Estos valores son similares al obtenido en el presente estudio; las diferencias se atribuyen a los procesos llevados a cabo para obtener dicho concentrado del subproducto de naranja.

En cuanto al contenido de humedad de las pectinas extraídas, Kurita et al. (2008) obtuvieron un valor de  $7,4 \pm 0,06$  % b.h, que es próximo al valor que se ha obtenido en este trabajo. El contenido en humedad de las pectinas es importante porque es un indicador de su estabilidad ya que, por sus características químicas, es posible el crecimiento de microorganismos, especialmente hongos. Una pectina muy húmeda es difícil de pulverizar, se adhiere a las superficies y tiene menor estabilidad y tiempo de vida útil. No obstante, una pectina demasiado seca puede ser resistente a la molienda y presentar un color más oscuro (Ardila, 2007).

Comparando el valor de las pectinas extraídas con las comerciales, estas últimas tienen un contenido en humedad menor por lo que presentan una mayor estabilidad frente al posible crecimiento de microorganismos.

#### 4.3.2. Determinación del color

Los resultados obtenidos en la determinación del color del CSN y de las pectinas, tanto las extraídas como las comerciales, en el espacio de color CIELab\*, se presentan en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Resultados obtenidos en el análisis del color. Letras diferentes indican diferencias significativas  $p < 0,05$

	L*	a*	b*	$\Delta E$
CSN	82,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	60,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	48,5 ± 0,4
Pectinas extraídas	71,2 ± 0,09 <sup>b</sup>	6,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	40,5 ± 0,2 <sup>b</sup>	30,6 ± 0,3
Pectinas comerciales	82,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,94 ± 0,03 <sup>c</sup>	12,3 ± 0,2 <sup>c</sup>	-
CSN (Crizel et al. 2013)	67,2 ± 0,9	5,14 ± 0,18	33,43 ± 0,87	-
Piel fresca (Garau et al. 2007)	69,7 ± 2,5	16,3 ± 3,1	69,5 ± 7,3	-

El valor de L\* en los tres productos refleja su color blanquecino, siendo las pectinas extraídas las que presentaron menor luminosidad. El CSN a su vez, tiene una tonalidad anaranjada bastante amarillenta (valor positivo de a\* pero no muy alto y elevado valor de b\*). En la misma tabla en color azul, se presentan los resultados obtenidos en el estudio realizado por Crizel et al. (2013) sobre el CSN y también, los obtenidos por Garau et al. (2007) sobre piel de naranja fresca.

Comparando los valores bibliográficos con los del presente trabajo, el CSN obtenido en este estudio es más luminoso y presenta una cierta decoloración con respecto a los valores obtenidos para la piel de naranja fresca. Esto nos puede indicar que el proceso de acondicionamiento de la materia prima provocó pérdida de color. Además, Garau et al. (2007), determinó el color de la piel de las naranjas frescas y en el presente trabajo se determinó el color del concentrado del subproducto de naranja que incluye el flavedo y albedo, siendo este último blanco, razón que puede explicar la diferencia observada.

En cuanto a las pectinas, los resultados obtenidos para las extraídas y las comerciales son significativamente ( $p < 0,05$ ) diferentes, siendo las comerciales más blancas (valor de L\* superior). Además, observando los valores de los parámetros a\* y b\* de ambas pectinas, podemos decir que las pectinas extraídas ( $a^* = 71,24 \pm 0,09$  y  $b^* = 6,4 \pm 0,1$ ) tienen más coloración que las comerciales ( $a^* 1,94 \pm 0,03$  y  $b^* 12,3 \pm 0,2$ ). Según la FAO (2009), las pectinas presentan un color blanco, amarillento, verdoso o marrón. La fibra alimentaria, y por lo tanto las pectinas, no son coloreadas en la naturaleza, sino más bien blancas. Sin embargo, en las paredes vegetales se encuentran pigmentos orgánicos que pueden ser extraídos junto a las pectinas. Las frutas y vegetales de colores amarillos y verdes suelen ser ricos en flavonoides y carotenoides.

Se calculó la diferencia de color ( $\Delta E$ ) de las pectinas extraídas y del CSN con respecto a las pectinas comerciales. El hecho de obtener un valor superior a cinco hace que sea detectable por el ojo humano. El valor  $\Delta E$  teniendo en cuenta el CSN ( $\Delta E = 48,5 \pm 0,4$ ) es superior al obtenido con las pectinas extraídas ( $\Delta E = 30,6 \pm 0,3$ ) cosa que se explica teniendo en cuenta la coloración natural que tiene el CSN. Por lo tanto, la mayor diferencia de color con las pectinas comerciales se obtuvo con el CSN.

#### 4.3.3. Contenido en fibra alimentaria. Residuo insoluble en alcohol (AIR)

La utilización del AIR como método de cuantificación de fibra alimentaria sólo es adecuado para frutas y verduras que presentan un bajo contenido en almidón debido a que éste precipita junto a los demás polisacáridos. Según Mosa y Kalil (2015) la piel de naranja se encuentra prácticamente libre de almidón, por tanto, el método AIR se ha considerado adecuado.

El contenido en fibra alimentaria o residuo insoluble en alcohol de la materia prima fue de  $32,0 \pm 0,7$  g AIR/100 g CSN b.s. Kaderides et al. (2017), obtuvieron un valor de  $48,9 \pm 0,5$  g AIR/100 g CSN b.s y Crizel et al. (2013) de  $46,2 \pm 2,3$  g AIR/100 g CSN b.s; ambos usando la metodología AOAC Official Methods 991.43. Los valores bibliográficos son superiores al valor obtenido en el presente estudio, esta diferencia podría deberse a diferentes factores como sería el diferente método de análisis, el uso del flavedo y el albedo en la obtención del CSN, o también a la variedad de naranja usada como materia prima.

#### 4.3.4. Identificación y cuantificación de azúcares

##### - Monosacáridos

El contenido en azúcares, unidades básicas que componen las pectinas y demás polisacáridos, se muestran en la Tabla 4.5, tanto para el AIR del CSN como para las pectinas extraídas.

Tabla 4.5. Composición en monosacáridos de las muestras de concentrado del subproducto de naranja y pectinas obtenidas mediante extracción acústica.

Monosacárido	CSN (mg/g CSN b.s)	Pectinas extraídas (mg/g pectina b.s)
Ramnosa	$1,2 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,8$
Fucosa	$1,1 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,2$
Xilosa	$9,5 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,6$
Manosa	$5,6 \pm 0,4$	$5,7 \pm 0,6$
Galactosa	$22,6 \pm 1,1$	$16,0 \pm 1,7$
Glucosa	$29,1 \pm 1,0$	$34,3 \pm 1,5$
Arabinosa	$41,0 \pm 1,5$	$32,8 \pm 2,1$
Ácidos urónicos	$159,2 \pm 6,4$	$261,5 \pm 19,5$

Observando los resultados obtenidos, los azúcares más abundantes, tanto en el AIR del CSN como en las pectinas, fueron los ácidos urónicos. También se detectaron cantidades importantes de arabinosa, glucosa y galactosa. Según Badaró et al., (2020) las pectinas son ricas en ácido galacturónico, arabinosa, galactosa y glucosa, y contienen pequeñas cantidades de xilosa y ramnosa.

En el estudio de Kaya et al., (2014) sobre la caracterización de muestras de pectinas cítricas, se obtuvieron también los ácidos urónicos (35,6 % molar), la arabinosa (15% molar) y la glucosa (29,5% molar) como los monosacáridos mayoritarios presentes en la piel de la naranja.

Umaña et al. (2019) realizaron un estudio sobre los efectos de la potencia acústica y del pH sobre extractos enriquecidos de pectinas obtenidos a partir de subproductos de naranja. Los ácidos urónicos ( $29,5 \pm 1,6\%$  molar), la arabinosa ( $26,2 \pm 1,6\%$  molar) y la glucosa ( $22,2 \pm 3,0\%$  molar) fueron los monosacáridos más abundantes en la piel de naranja.

Hosseini et al., (2019) realizó un estudio sobre la optimización y caracterización de las pectinas extraídas de la piel de la naranja a través del método asistido por ultrasonidos. Las pectinas contenían en mayor proporción ácido urónico (65,3% molar) y galactosa (25,1% molar). De igual manera, en el estudio de Kurita et al. (1998) sobre la caracterización de pectinas extraídas a partir de piel de naranja en presencia de ácido cítrico, los ácidos urónicos ( $35,0 \pm 3,1$  mg/g pectina b.s), la galactosa ( $13,4 \pm 1,0$  mg/g pectina b.s) y la arabinosa ( $23,7 \pm 2,9$  mg/g pectina b.s) fueron los azúcares más abundantes.

En conclusión, en todos los estudios bibliográficos, los azúcares más abundantes son los ácidos urónicos, la arabinosa, la glucosa y la galactosa, al igual que en el presente trabajo.

- Pectina, celulosa y hemicelulosa

La composición en polisacáridos del AIR del CSN se dedujo a partir de la composición en azúcares simples utilizando las Ecuaciones 4, 5 y 6. En la Figura 4.1 se representa la proporción aproximada de los tres compuestos, observando como las pectinas son el principal componente del CSN (83 %), seguido de la celulosa (10 %) y siendo la hemicelulosa el componente minoritario (7 %).

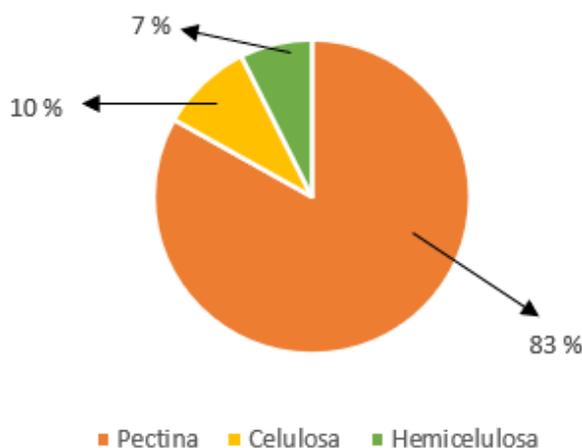


Figura 4.1. Composición en pectina, celulosa y hemicelulosa del concentrado del subproducto de naranja

El hecho de que las pectinas sean el componente mayoritario se explica debido al elevado contenido en ácidos urónicos ( $159,2 \pm 6,4$  mg ácidos urónicos /g CSN b.s) que presenta el CSN. En el estudio realizado por Zegada Franco (2015) en el cual se llevó a cabo la extracción de pectina de residuos de cáscara de naranja por hidrólisis ácida asistida por microondas, se obtuvo un 41,8 % de pectinas, siendo el polisacárido más abundante. El valor obtenido en el presente trabajo es mayor y se puede atribuir al hecho de que se ha incluido el flavedo y el albedo.

#### 4.3.5. Determinación del grado de esterificación metílico

La Figura 4.2 muestra el espectro FTIR de las muestras de pectinas comercial y extraídas. Las bandas más importantes para la determinación del grado de esterificación metílico son aquellas que aparecen alrededor de  $1630\text{ cm}^{-1}$  y  $1750\text{ cm}^{-1}$ . Estas bandas son indicadores de grupos carboxilos libres y esterificados, los cuales son útiles para la identificación de pectinas de alto y bajo metoxilo.

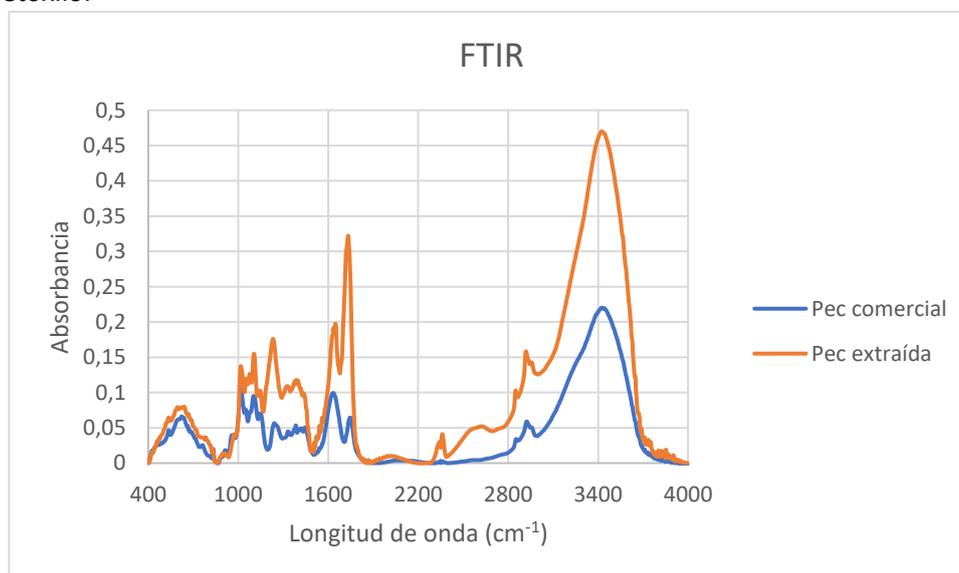


Figura 4.2. Espectro FTIR de las pectinas comerciales y extraídas

En el FTIR de las pectinas comerciales, la banda que aparece a  $1747\text{ cm}^{-1}$  corresponde al enlace de vibración C=O de los grupos carboxilo metilesterificados ( $\text{COOH}$  y  $\text{COOCH}_3$ ) y el pico a  $1633\text{ cm}^{-1}$  pertenece a los grupos carboxilo libres (banda de vibración de tensión simétrica del grupo  $\text{COO}^-$ ). En el caso de las pectinas extraídas, la banda correspondiente a los grupos metilesterificados es la de  $1731\text{ cm}^{-1}$  y la banda a  $1633\text{ cm}^{-1}$  a los grupos libres. Comparando los dos espectros, hay una clara diferencia en el pico correspondiente a los grupos metilesterificados, siendo el área de las pectinas extraídas mucho más grande. Este hecho hace que se puede concluir que las pectinas extraídas son HMP y las comerciales LMP (Kurita et al., 2015, Silva et al., 2008).

Adicionalmente, las intensidades de absorción de los enlaces de estiramiento C-H aparecen a  $2960\text{ cm}^{-1}$  y los dobles enlaces a  $1384\text{ cm}^{-1}$  (Kurita et al., 2008, Silva et al., 2008). Por otro lado, la amplia y fuerte banda de absorción que aparece a  $3423\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración O-H debido a los enlaces inter e intramoleculares de hidrógeno localizados en la cadena principal del ácido galacturónico (Venzon et al., 2015).

Dependiendo del grado de esterificación metílico (GME), las pectinas pueden clasificarse como pectinas de alto metoxilo (HMP) con GME mayor al 50 % y pectinas de bajo metoxilo (LMP) con GME menor al 50 %. Los resultados experimentales se presentan en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Grado de metilesterificación del concentrado del subproducto de naranja (CSN), y de las pectinas comerciales y extraídas

	GME (%)
Pectinas comerciales	$48 \pm 2$
Pectinas extraídas	$95 \pm 3$
CSN	$35,9 \pm 0,5$

Tanto las pectinas comerciales ( $48 \pm 2 \%$ ) como el CSN ( $35,9 \pm 0,5 \%$ ) se clasifican como LMP, aunque su GME está cerca del 50 %. Si comparamos estos valores con el obtenido para las pectinas extraídas ( $95 \pm 8 \%$ ), éstas últimas serían consideradas HMP. No obstante, se obtiene un GME muy elevado que puede ser debido a que aparte de pectinas se han extraído otros polisacáridos.

Ambas son capaces de formar geles, pero bajo diferentes condiciones: las HMP forman geles en altas concentraciones de azúcar y pH bajos mientras que las LMP forman geles en presencia de iones calcio y no requieren de concentraciones altas de azúcar ni pH bajos; por lo tanto, las HMP se utilizan en la industria para la elaboración de geles dulces, mermeladas o para la estabilización de bebidas acidificadas; mientras que las LMP se utilizan para la elaboración de geles en alimentos que no contienen cantidades muy altas de azúcar, incluso para alimentos salados como salsas (Fishman et al, 2015).

#### 4.3.6. Capacidad antioxidante y contenido en polifenoles totales

Un problema importante de las industrias alimentarias es la velocidad de oxidación de diferentes productos alimenticios. Este fenómeno puede evitarse o retrasarse mediante el uso de antioxidantes, ya sean sintéticos o naturales. No obstante, el uso de antioxidantes sintéticos en la industria alimentaria se encuentra bajo gran consideración principalmente por razones toxicológicas. En este sentido los subproductos de los cítricos pueden resultar interesantes no solo por su importante contenido en fibra, sino también por su capacidad antioxidante (Garau et al., 2007).

Tabla 4.8 Resultados obtenidos para la capacidad antioxidante y en contenido en polifenoles totales en el concentrado del subproducto de naranja (CSN) y en las pectinas comerciales.

	Capacidad antioxidante (mg TE/g b.s)			Contenido en polifenoles totales (mg GAE /g b.s)
	CUPRAC	ABTS	FRAP	
<b>CSN</b>	$25 \pm 1$	$27,96 \pm 0,03$	$25 \pm 3$	$17 \pm 2$
<b>Pectina comercial</b>	$2 \pm 1$	No detectable	$1,1 \pm 0,3$	$0,268 \pm 0,005$

En la Tabla 4.8 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de la capacidad antioxidante (de acuerdo con tres métodos diferentes, CUPRAC, ABTS y FRAP) y el contenido en polifenoles totales. Se muestran los valores para las dos muestras analizadas (CSN y pectinas extraídas) Como puede observarse en la tabla, el CSN presentó una capacidad antioxidante considerable, mientras que en las pectinas comerciales es casi inexistente.

Garau, et al. (2007) obtuvieron valores de contenidos en polifenoles totales en la piel de naranja seca (variedad *C. aurantium* cv. Canoneta) de  $51 \pm 3$  mg GAE/g CSN b.s. Para su determinación se usó el mismo método que en el presente trabajo, el método de Folin-Ciocalteu. Las diferencias observadas entre el valor bibliográfico y el experimental se puede atribuir a que Garau, et al., (2007) solo usó la piel de la naranja y en el presente trabajo además de la piel, también se utilizó el flavedo y el albedo. Además, la variedad de la naranja también influye porque por ejemplo la variedad *C. Sinensis* presentó  $89 \pm 5$  mg de ácido gálico/g CSN b.s (Garau et al., 2007).

#### 4.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

La estabilidad de una emulsión describe su capacidad para resistir cambios en sus propiedades con el tiempo. Ésta depende de factores como la viscosidad, tamaño de las gotas de la fase dispersa, propiedades del tensioactivo y las condiciones de almacenamiento (temperatura, agitación, vibración, dilución o evaporación). Para evaluar la estabilidad y características de las emulsiones preparadas se determinó su viscosidad, potencial zeta, índice de cremosidad, y tamaño de las gotas de aceite.

##### 4.4.1. Viscosidad

Se determinó la viscosidad de las emulsiones preparadas siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.8.1. Los resultados se muestran en la figura 4.5 en forma de medias y desviaciones estándar. Se han agrupado las muestras según su contenido en pectina (PC) y en CSN, y en cada grupo, se diferencia de acuerdo con el contenido en proteína de soja (PR). También se ha incluido la viscosidad de la emulsión Control.

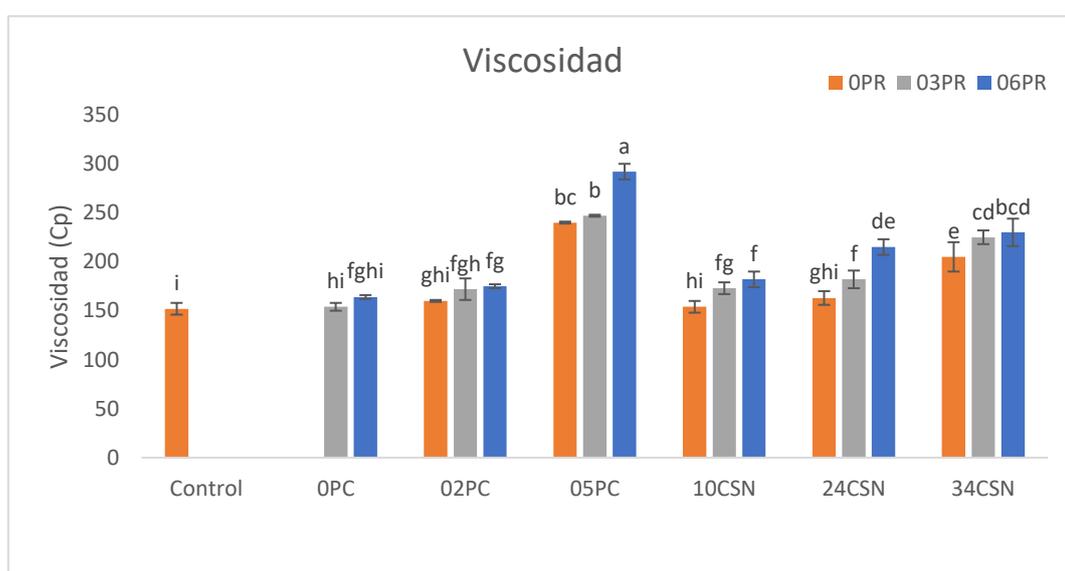


Figura 4.3. Resultados obtenidos en la determinación de la viscosidad. Letras diferentes indican diferencias significativas  $p < 0,05$

La emulsión control, elaborada con el tensioactivo Tween®20, mostró una viscosidad de  $152 \pm 6$  cP. Las emulsiones preparadas con pectina y CSN presentan una viscosidad superior, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) al añadir proteína y en las emulsiones con la concentración más alta de CSN (34CSN) y de pectina (O5PC).

Una viscosidad más alta puede llegar a ser deseable pues incrementa la estabilidad frente a la migración de las gotas hacia arriba y dificulta su movilidad en general. Si observamos las emulsiones que llevan pectina (O2PC =  $160 \pm 1$  y O5PC =  $240 \pm 1$ ), a medida que aumenta el contenido de este componente aumenta significativamente ( $p < 0,05$ ) la viscosidad llegando a valores muy próximos al límite del equipo de secado por pulverización (*spray drying*) (300 cP). Este hecho nos indica que la cantidad de pectina deberá ser limitada al 1-2%, ya que a concentraciones mayores se obtendrían emulsiones con elevada viscosidad, no adecuadas para el proceso de secado por pulverización.

En cuanto a las emulsiones elaboradas con CSN, a medida que aumenta su contenido, aumenta la viscosidad de la emulsión ( $154 \pm 6$  cP en 1CSN,  $163 \pm 7$  cP en 2CSN y  $205 \pm 15$  cP en 34CSN). Para alcanzar los mismos valores de viscosidad que con las pectinas parece que se deberían adicionar más cantidades de CSN.

Por lo que se refiere al contenido en proteínas, se observa que, a mayor cantidad de proteína de soja adicionada, mayor es la viscosidad (por ejemplo,  $173 \pm 6$  cP en 10CSN03PR y  $183 \pm 8$  cP en 10CSN06PR), si bien en la mayoría de los casos, el aumento en un solo incremento dentro del intervalo de concentración de proteína utilizado no provocó cambios significativos en la viscosidad. Aun existiendo diferencias significativas entre algunas emulsiones, todas presentaron valores inferiores a 300 cP.

En conclusión, es necesario adicionar más cantidad de CSN para estabilizar las emulsiones igual de bien que lo hacen las pectinas. Por lo tanto, se comprueba que las pectinas permiten aumentar la viscosidad de las emulsiones incluso a baja concentración, pero hay que tener en cuenta que hay que limitar su cantidad porque se pueden alcanzar valores demasiados elevados de viscosidad

#### 4.4.2. Potencial zeta

El potencial zeta indica la carga eléctrica que hay en la superficie de las gotas de aceite (Noello et al., 2016) dentro de la emulsión. En esta investigación, se han preparado emulsiones de doble capa en donde la proteína de soja es una de las capas y la pectina o el concentrado del subproducto de naranja forma la segunda capa. Las emulsiones se elaboraron a pH = 3,5, estando dicho pH por debajo del punto isoeléctrico (pI) de las proteínas de soja (pI = 4,0), de tal manera que se espera que, a este pH, las proteínas presenten una carga positiva. Al estar cargadas positivamente las proteínas podrían unirse a los polisacáridos con carga negativa (pectinas) para formar complejos que han demostrado eficiencia para estabilizar emulsiones.

Los resultados obtenidos en la medida del potencial zeta de las emulsiones se muestran en la Figura 4.4 en forma de medias y desviaciones estándar. Se han agrupado las muestras según su contenido en pectina (PC) y en CSN, y en cada grupo, se diferencia de acuerdo con el contenido en proteína de soja (PR). También se ha incluido la viscosidad de la emulsión Control.

Todas las emulsiones presentaron valores negativos de potencial zeta, excepto las emulsiones O3PR ( $14,5 \pm 3,6$  mV) y O6PR ( $18,5 \pm 1,6$  mV) debido a que la proteína a pH 3,5 tiene carga positiva. Al añadir la pectina, el valor del potencial zeta es negativo debido a que la pectina tiene carga negativa en el pH de trabajo (pH 3,5). De igual manera ocurre si añadimos el concentrado del subproducto de naranja, por lo que podemos decir que el CSN también tiene carga negativa a pH 3,5, debido a la presencia natural de pectinas en este material.

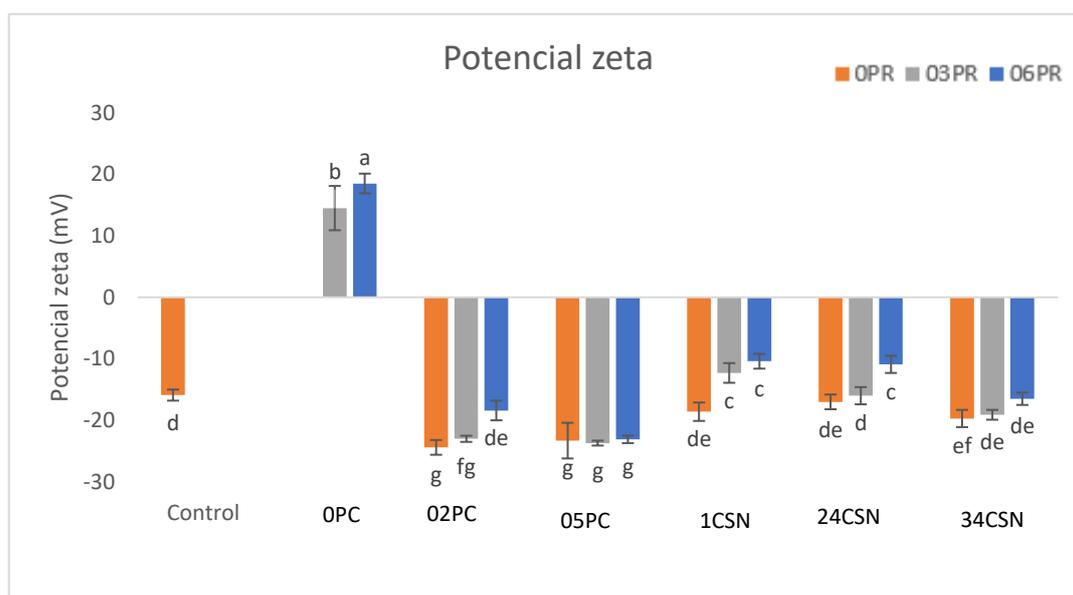


Figura 4.4. Resultados obtenidos en la determinación del potencial zeta. Letras diferentes indican diferencias significativas  $p < 0,05$

Cabe mencionar, que aquellas emulsiones estabilizadas con pectinas y con CSN que tienen mayor contenido en proteína, presentan valores absolutos de potencial zeta más pequeños que cuando tienen menor cantidad de proteína. Por ejemplo, la emulsión O2PC presenta un valor de  $-24,4 \pm 1,2$  mV, la O2PCO3PR tiene un valor de  $-23,0 \pm 0,5$  mV y la emulsión O2PCO6PR tiene un potencial zeta de  $-18,4 \pm 1,6$  mV. Por lo tanto, a mayor contenido de proteína de soja, más cercano a cero es el valor del potencial Z. El cambio de carga después de la adición de pectina sugiere que las gotas de aceite estabilizadas por proteína de soja fueron completamente recubiertas por pectina (Noello et al., 2016).

Resultados similares se encuentran recogidos en la bibliografía. Noello et al., (2016) realizó un estudio de microencapsulación por *spray drying* de aceite de chía usando emulsiones estabilizadas con proteína de suero (láctea) y pectinas. Los resultados que obtuvo en la determinación del potencial zeta se muestran en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9. Valores bibliográficos del potencial zeta

Composición de la emulsión	Potencial zeta (mV)
<b>Aceite de chía + proteína de suero</b>	+25,63 ± 0,53
<b>Aceite de chía + proteína de suero + pectina</b>	-31,43 ± 0,36

En los valores bibliográficos, la emulsión que contiene solo proteína de suero presentó un valor positivo de potencial zeta debido al carácter catiónico de la proteína a pH 3,8. No obstante, con la adición de pectina, la emulsión exhibió un potencial zeta negativo ya que ahora se tiene un carácter aniónico.

#### 4.4.3. Índice de cremosidad

El Índice de cremosidad (CI) de las emulsiones a las 24 h después de haberse preparado la emulsión se calculó a través de la Ecuación 7 y los resultados se presentan en la Figura 4.5.

Los valores  $\gamma$ , por tanto, la estabilidad de las emulsiones depende del agente emulsificante utilizado. Al utilizar Tween®20 (emulsión Control) la emulsión presentó un valor de CI de  $62,5 \pm 2,1$  % después de 24 h. El resto de las emulsiones presentaron valores inferiores excepto la emulsión 10CSN (sólo lleva CSN) que presentó un valor de  $77 \pm 5$  %, siendo, por tanto, la menos estable de todas. Con la presencia de pectina, a medida que aumenta el contenido de ésta y el de proteína, el valor del CI disminuye, hecho que concuerda con qué, a mayor viscosidad de la emulsión, mayor estabilidad y, por lo tanto, hay una menor migración de las gotas de aceite hacia la superficie.

Resultados similares se observaron al formular las emulsiones con CSN, al aumentar su contenido y el de proteína de soja, aumentó la viscosidad  $\gamma$ , como era de esperar, la emulsión resultó ser más estable presentando un valor de CI menor. De hecho, en las emulsiones preparadas con mayor cantidad de pectina y CSN, el CI fue 0, es decir, no se detectó este fenómeno tras las 24 h, por lo que estas emulsiones presentaron gran estabilidad. Esto puede estar relacionado con su alta viscosidad (Figura 4.5).

Según Maravic et al., (2019) obtuvieron valores entre 70–75 % en emulsiones preparadas con concentrado de piel de remolacha, 86 % con pectinas de remolacha y 90 % con almidón modificado. Por lo tanto, las emulsiones más estables fueron las preparadas con concentrado de piel de remolacha, hecho que estos autores relacionaron con el aumento de viscosidad. Esto concuerda con el presente trabajo, ya que las emulsiones preparadas con pectinas y CSN cuando se les añade la proteína son más estables que la preparada con Tween®20.

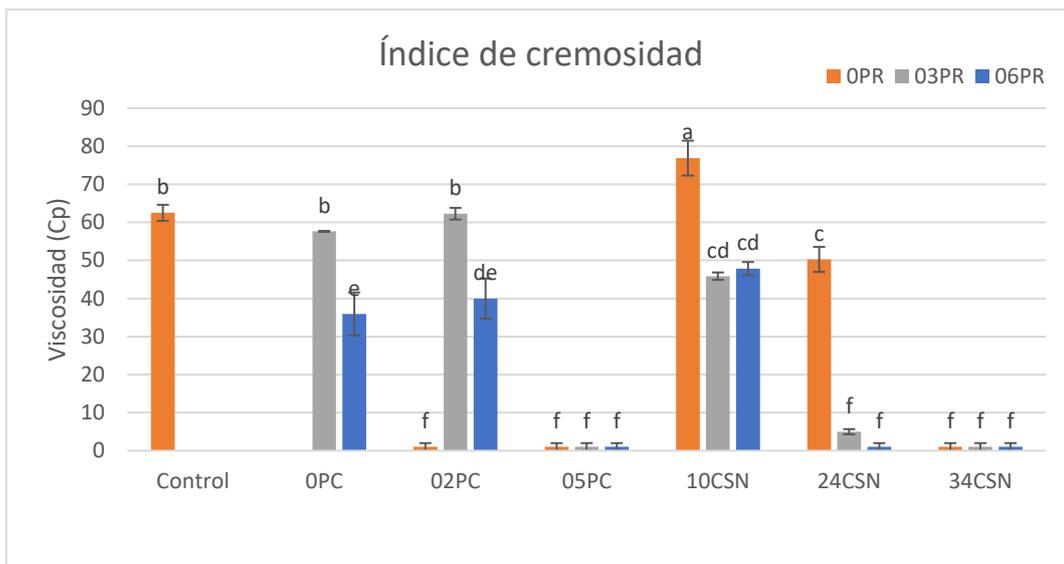


Figura 4.5. Resultados obtenidos en la determinación del índice de cremosidad. Letras diferentes indican diferencias significativas  $p < 0,05$

#### 4.4.4. Tamaño de las gotas de aceite

El tamaño de las gotas de aceite de las emulsiones es una característica muy importante para su estabilidad. Una vez preparada la emulsión, el aumento del tamaño de las gotas se debe a diferentes mecanismos de inestabilidad como floculación, coalescencia, sedimentación y maduración de Ostwald (McClements, 2007). Por lo tanto, se evaluó el efecto de las pectinas y el CSN sobre la estabilidad de la emulsión relativa al tamaño de las gotas dispersas. Para ello, se usó el microscopio óptico y, sobre las imágenes obtenidas, se realizó un análisis de imagen a través del programa ImageJ 1.8 (*Creative commons license*).

A continuación, se presentan, a modo de ejemplo, imágenes de todas las emulsiones al acabar su preparación y a las 24 h (Figuras 4.6 (emulsiones con pectina) y 4.7 (emulsiones con CSN)) obtenidas con el microscopio óptico.

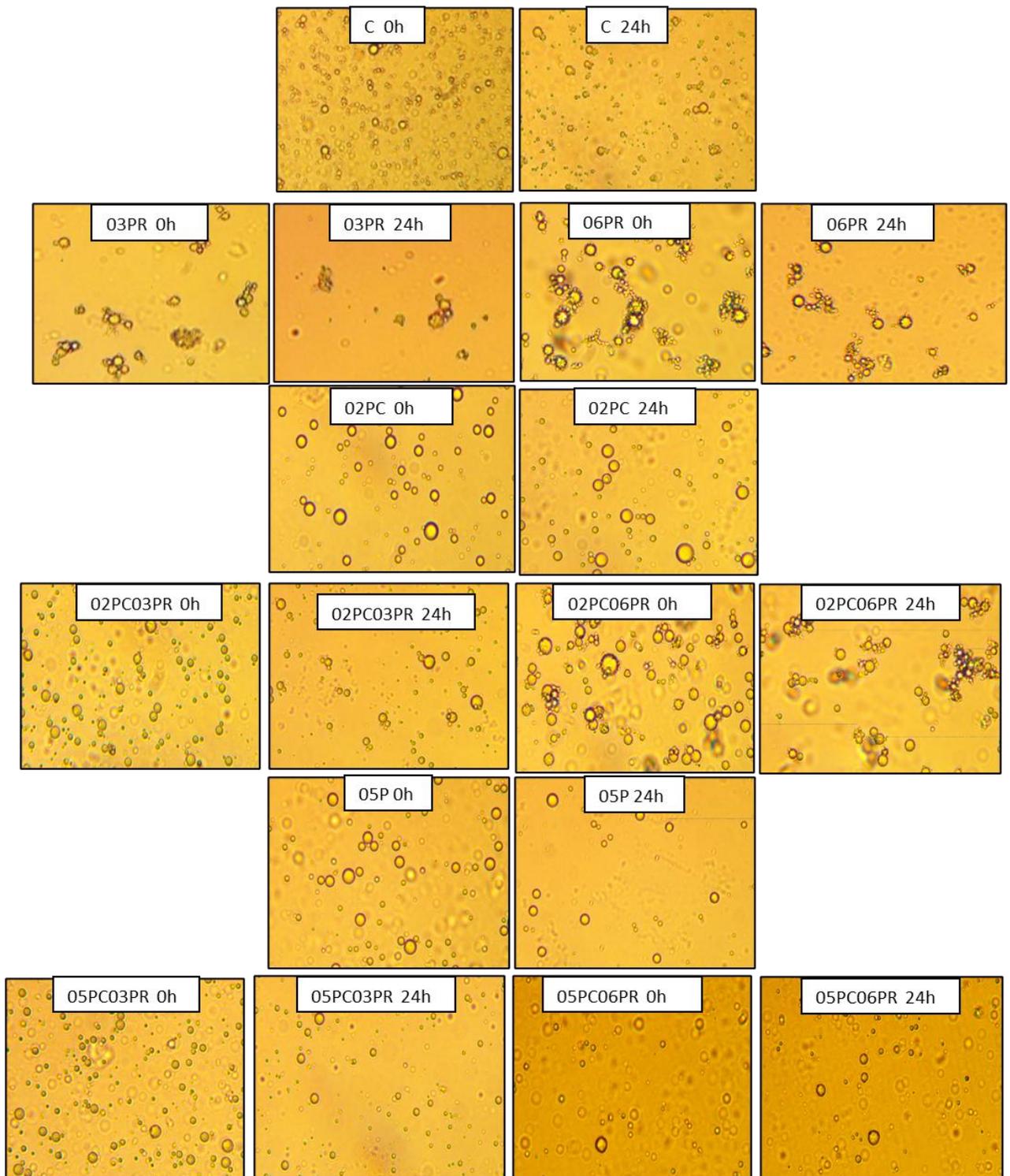


Figura 4.6. Fotografías del microscopio óptico de las emulsiones C, 03PR, 06PR 02PC, 02PC03PR, 02PC06PR, 05PC, 05PC03PR y 05PC06PR a las 0 y 24h.

Como se puede observar, las emulsiones con pectina (02PC y 05PC) presentan gotas más grandes que las emulsiones con proteína (03PR y 06PR) y la emulsión control (C) tanto a tiempo 0 como a las 24 h. Al añadir la proteína, el tamaño de las gotas disminuyó. Además, las emulsiones con proteína y las de menor proporción de pectina y mayor de proteína (02PC06PR) presentaron floculación.

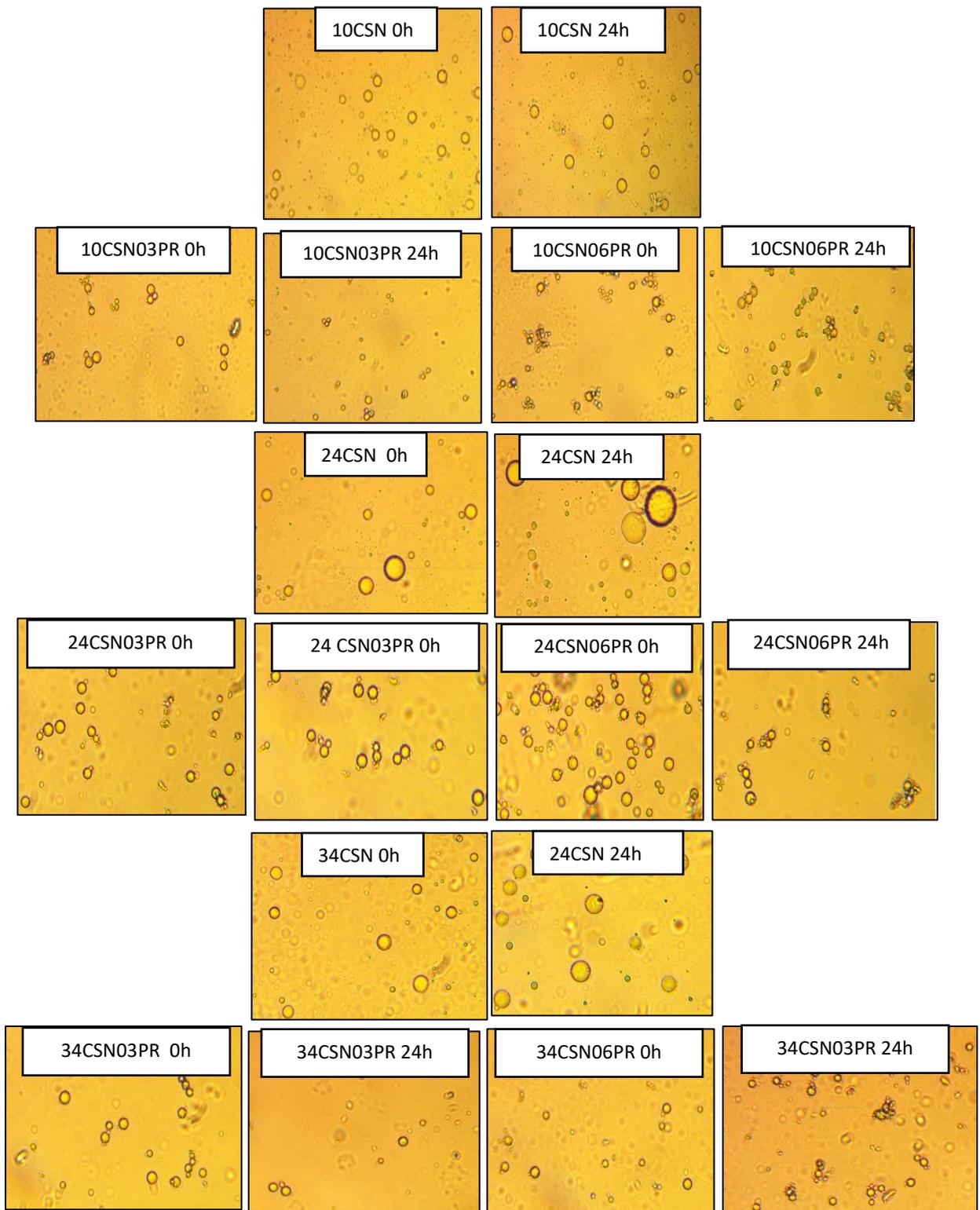


Figura 4.7. Fotografías del microscopio óptico de las emulsiones 10CSN, 10CSN03PR, 10CSN06PR, 24CSN, 24CSN03PR, 24CSN06PR, 34CSN, 34CSN03PR y 34CSN06PR a las 0 y 24h.

Al añadir CSN (10CSN, 24CSN y 34CSN), el tamaño de las gotas aumentó con respecto a las emulsiones con proteína (03PR y 0PR). Al igual que con las emulsiones con pectina, al añadir proteína el tamaño de las gotas disminuyó, siendo más grandes a medida que hay más proporción de CSN en la emulsión.

En las Figuras 4.8 (emulsiones con pectina) y 4.9 (emulsiones con CSN) se presentan las distribuciones del volumen de aceite en función del tamaño de gota de todas las emulsiones preparadas. En la gráfica de cada emulsión se encuentra representada la distribución de tamaño a tiempo cero (inmediatamente después de preparación) y a las 24h de su elaboración.

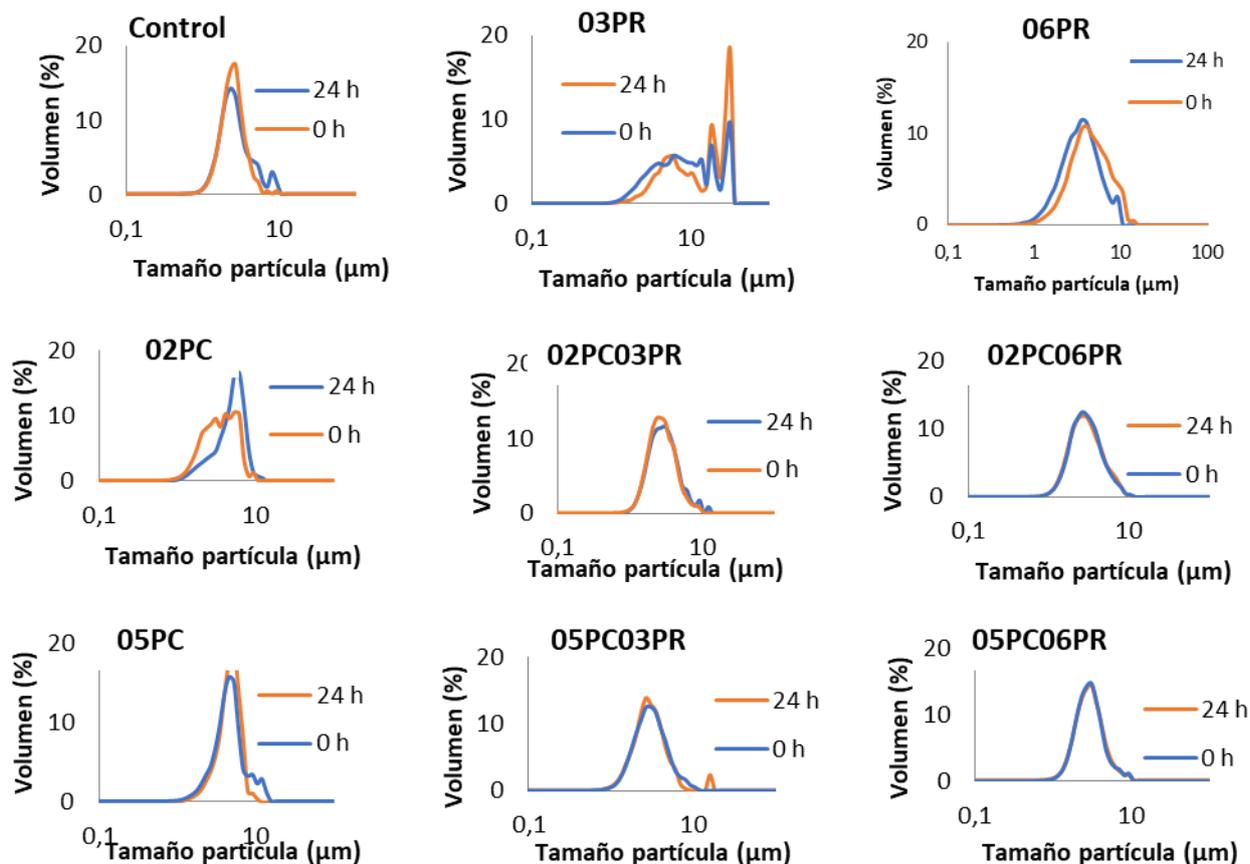


Figura 4.8. Distribución del tamaño de partícula a tiempo 0 y 24 h de la emulsión control, 03PR, 06PR, 02PC, 02PC03PR, 02PC06PR, 05PC, 05PC03PR y 05PC06PR

La emulsión control es la emulsión que presentó la mediana de tamaño de las gotas más pequeña. Sin embargo, resultó ser inestable con el tiempo exhibiendo la distribución a las 24 h, un hombro a ~ 10 µm. En cuanto a las emulsiones con proteína (03PR y 06PR), la distribución del tamaño de gotas se desplazó hacia la derecha, mostrando el aumento de dicho tamaño, también presentaron floculación y a su vez, las gotas aumentaron de tamaño con el tiempo. No obstante, aumentando el contenido en proteína se obtuvieron emulsiones con medianas de tamaño menores.

Al preparar emulsiones con pectinas (02PC) no se observó floculación, pero el tamaño de gota fue superior al de las gotas de la emulsión 06PR. Además, resultó ser muy inestable con el tiempo. Al añadir proteína a la anterior emulsión, la distribución del tamaño de gotas se desplazó hacia la izquierda en comparación con la muestra control, y presentó mucho más estabilidad con el tiempo, siendo la emulsión 02PC06PR la más estable.

Al añadir mayor cantidad de pectina (05PC), el d50 disminuyó y fue más estable con el tiempo. Al añadir proteína, la distribución del tamaño de gota se desplazó ligeramente hacia la izquierda, disminuyendo dicho tamaño. Además, resultaron ser más estables con el tiempo, siendo la emulsión de 0,5pc0,6pr la que presentó mayor estabilidad. Si comparamos las emulsiones preparadas con pectina y proteína (02PC03PR, 02PC06PR, 05PC03PR y 05PC06PR), las que se formularon con mayor cantidad de proteína fueron las que mostraron mayor estabilidad con el tiempo y siendo el tamaño de gota de las cuatro emulsiones, muy similar. Además, las emulsiones 02PC06PR y 05PC06PR mostraron una distribución del tamaño de gota monomodal.

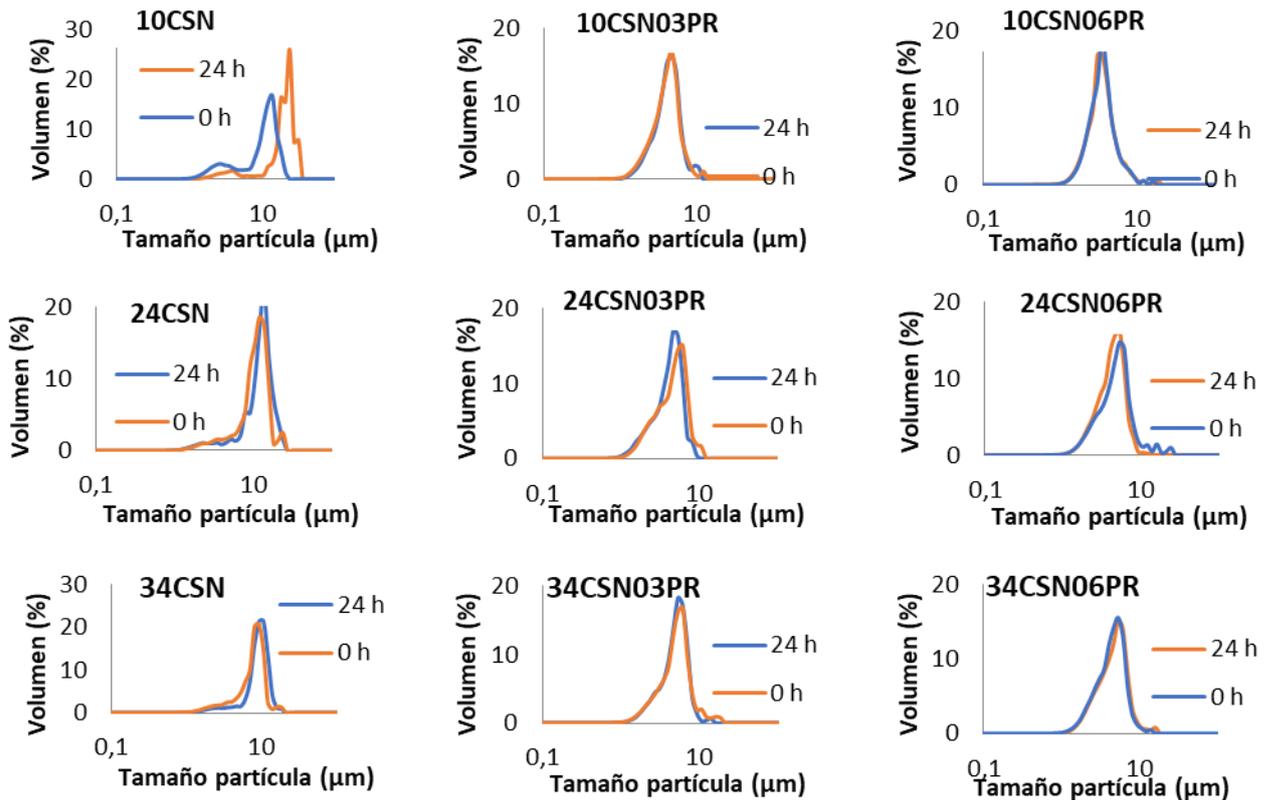


Figura 4.9. Distribución del tamaño de partícula a tiempo 0 y 24 h de la emulsión 10CSN, 10CSN03PR, 10CSN06PR, 24CSN, 24CSN03PR, 24CSN06PR, 34CSN03PR y 34CSN06PR

En cuanto a las emulsiones preparadas con CSN (10CSN y 24CSN), éstas no presentaron flóculos, pero se observaron gotas grandes y que aumentaron de tamaño con el tiempo. Al añadir proteína, el tamaño de partícula disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ), pero siguió observándose floculación (10CSN03PR, 10CSN06PR, 24CSN03PR y 24CSN06PR) y estos flóculos fueron más grandes cuando se aumentó la cantidad de proteína. No obstante, las cuatro emulsiones de proteína fueron más estables con el tiempo que la emulsión solo con 1% de CSN.

Al preparar las emulsiones con mayor cantidad de CSN (3,4%), disminuyó el tamaño de gota y aumentó la estabilidad con el tiempo. Al añadir proteína, el tamaño de gota disminuyó considerablemente, siendo similar a la distribución de tamaño de gota de las emulsiones con menor CSN y proteína. No obstante, las emulsiones 34CSN03PR y 34CSN06PR presentaron menos flóculos.

En las Figuras 4.10 ( $d_{50}$ ) y 4.11 (span) se representa el diámetro mediano ( $d_{50}$ ) y el span, inmediatamente después de la preparación y tras 24 h, de todas las emulsiones preparadas. Un percentil es una medida de posición usada en estadística para indicar el valor debajo del cual se encuentran un porcentaje de elementos dentro de un grupo.

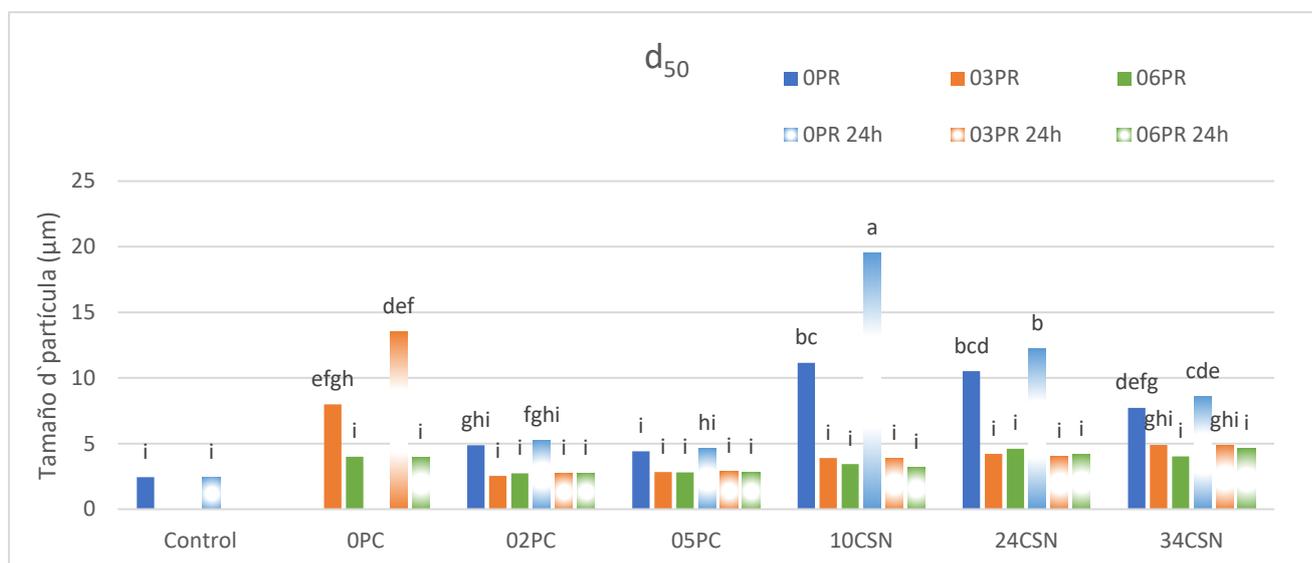


Figura 4.10. Representación del  $d_{50}$  a  $t = 0$  h y  $t = 24$  h de todas las emulsiones. Letras diferentes indican diferencias significativas  $p < 0,05$

Por lo que respecta al tamaño medio de gota, la emulsión con mayor mediana de partícula fue la 10CSN (11,14  $\mu\text{m}$ ), seguida de las emulsiones 24CSN (10,51  $\mu\text{m}$ ) y O3PR (8,00  $\mu\text{m}$ ). Por otra parte, la emulsión O2PCO3PR fue la que presentó un menor valor de  $d_{50}$  (2,53  $\mu\text{m}$ ). Con el tiempo, estos valores aumentaron (19,53  $\mu\text{m}$  en 10CSN, 12,21  $\mu\text{m}$  en 24CSN y 13,5  $\mu\text{m}$  O3PR) y el de la emulsión O2PCO3PR se mantuvo prácticamente constante (2,71  $\mu\text{m}$ ).

Se puede observar que en general, se obtuvo una disminución del tamaño de las gotas al combinar pectinas o CSN con proteína. Esto probablemente se deba a la formación de los complejos polisacáridos-proteínas que rodean las gotas más efectivamente que cuando estos compuestos se encuentran solos, por lo tanto, son capaces de producir gotas más pequeñas durante la homogenización. No obstante, también se observó un aumento de los flóculos al añadir proteína, especialmente en las emulsiones preparadas con CSN, esto probablemente se deba a que las proteínas bajan la carga eléctrica, acercando el potencial Z a cero, las emulsiones con un potencial Z cercano a cero tienen a flocular porque hay poca repulsión electrostática entre las gotas (Ozturk et al., 2015).

La floculación más baja se observó en las emulsiones con pectinas en comparación con aquellas preparadas con CSN; esto probablemente se deba al hecho de que no toda la pectina presente en el CSN se solubilizó en la emulsión, así como sí lo hizo la pectina comercial purificada. Otro aspecto que considerar es la posible presencia de una pequeña cantidad de proteína en el CSN, que podría afectar a las características de la emulsión.

En la Figura 4.12 se pueden observar los resultados obtenidos para el span de las emulsiones. Todas presentaron valores similares de span excepto la emulsión 03PR que presentó un valor de span significativamente ( $p < 0,05$ ) más alto que el resto de las muestras. Esto se debe a que esta emulsión presento gotas de tamaños muy diversos ( $0,1 - 28,2 \mu\text{m}$ ) y, por lo tanto, una distribución más amplia.

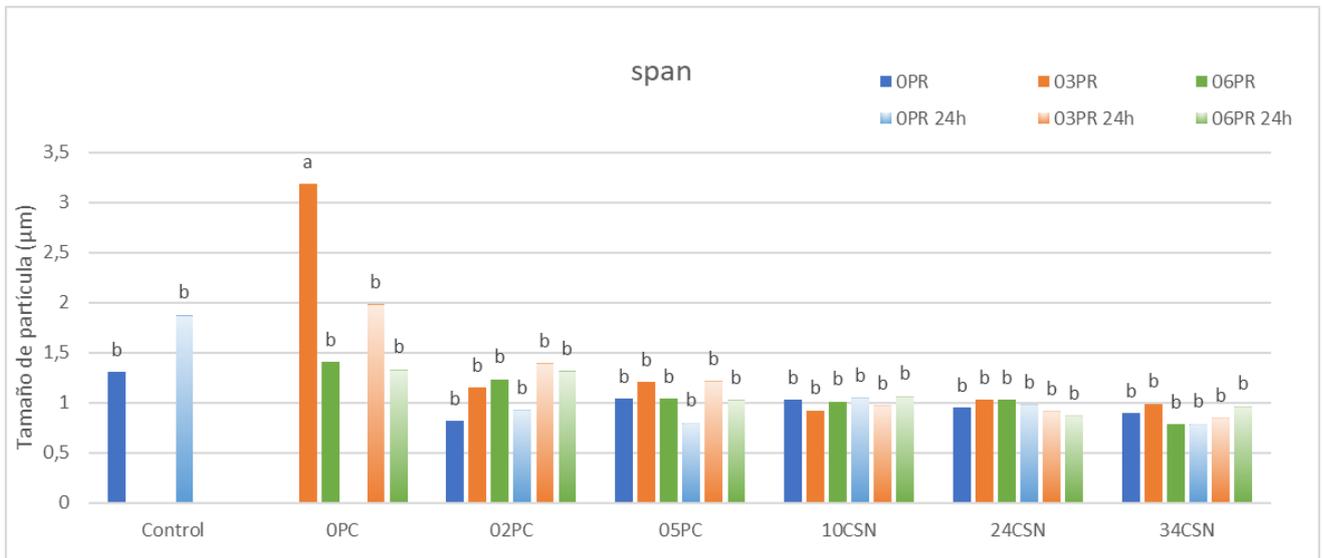


Figura 4.11. Representación del span a  $t = 0 \text{ h}$  y  $t = 24 \text{ h}$  de todas las emulsiones. Letras diferentes indican diferencias significativas  $p < 0,05$

#### 4.4.5 Análisis de color

Finalmente, de todas las emulsiones se analizó el color siguiendo la misma metodología que con las pectinas y el concentrado del subproducto de naranja. En la Tabla 4.10 se presentan las diferencias de color de cada emulsión tomando como referencia la emulsión control.

Tabla 4.10 Diferencias de color de las diferentes emulsiones con la emulsión control. Letras diferentes indican diferencias significativas  $p < 0,05$

Emulsión	$\Delta E$
03PR	$3,1 \pm 0,6^g$
06PR	$0,4 \pm 0,1^h$
02PC	$11,2 \pm 0,7^f$
02PC03PR	$0,49 \pm 0,02^h$
02PC06PR	$0,5 \pm 0,6^h$
05PC	$2,8 \pm 0,4^g$
05PC03PR	$2,87 \pm 0,06^g$
05PC06PR	$3,2 \pm 0,3^g$
1CSN	$40 \pm 1^d$
1CSN03PR	$31,6 \pm 0,8^e$
1CSN06PR	$43 \pm 23^e$
24CSN	$54,7 \pm 0,3^c$
24CSN03PR	$41,30 \pm 0,06^d$
24CSN06PR	$40,7 \pm 0,4^d$
34CSN	$60 \pm 2^a$
34CSN03PR	$55 \pm 1^c$
34CSN06PR	$57,4 \pm 0,5^b$

Como se puede observar, la diferencia de color fue mayor en las emulsiones preparadas con CSN debido a su color natural, alcanzándose valores de  $\Delta E$  de entre 31 y 60 unidades, dependiendo de la formulación.

## 5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha realizado un estudio sobre el uso de un concentrado del subproducto de naranja (CSN) y de pectinas, como ingredientes en la formulación de emulsiones estables para su uso en la microencapsulación de aceite mediante secado por atomización. A partir de los resultados obtenidos se han podido extraer las siguientes conclusiones:

En cuanto a la comparación entre las pectinas extraídas del concentrado del subproducto de naranja:

- El color de las pectinas extraídas fue indicativo de la extracción de pigmentos orgánicos junto a las pectinas.
- Las pectinas ( $275 \pm 24$  mg de ácidos urónicos/g pectina b.s) y el CSN ( $149 \pm 6$  mg ácidos urónicos/g CSN b.s) son ricos en ácidos urónicos, lo que indica que la fibra del CSN es una fuente rica en pectinas.
- De acuerdo con el grado de esterificación metílico (GME), la pectina comercial ( $48 \pm 2$  %) y el CSN ( $35,9 \pm 0,5$ ) se clasificaron como de bajo metoxilo mientras que las extraídas a partir del subproducto de naranja, de alto metoxilo ( $95 \pm 3$  %). No obstante, el elevado GME de estas últimas puede indicar que no se consiguió extraer pectinas puras.
- El CSN mostró una capacidad antioxidante considerable, mientras que en las pectinas fue casi inexistente, llegando a ser no detectable mediante el método ABTS.

En cuanto a las características de las emulsiones formuladas:

- La sustitución del emulgente comercial por pectinas o CSN, le confirió a la emulsión una diferencia de viscosidad significativa solo en los porcentajes más elevados de pectina y CSN.
- Todas las emulsiones presentaron valores de potencial zeta negativos excepto las emulsiones preparadas con proteína. Al añadir pectina o CSN el valor de potencial cambió a negativo debido a que la pectina se encuentra cargada negativamente y, por lo tanto, el CSN también.
- Las emulsiones preparadas únicamente con proteína de soja presentaron gotas de aceite grandes y una elevada floculación, especialmente la que contenía la menor cantidad de este material (0,3 % proteína).
- Las emulsiones preparadas con 0,5 % de pectina presentaron gran estabilidad según el índice de cremosidad y en general se observó poca variación en el tamaño de las gotas al cabo de 24h, especialmente cuando se combinó con proteína. Sin embargo, la elevada viscosidad de estas muestras (entre 240 y 292 cP), podría dificultar su secado por atomización por problemas técnicos durante el bombeo en determinados equipos.
- De manera similar, las emulsiones producidas con la cantidad más alta de CSN (3,4 %) presentaron gran estabilidad, pero valores altos de viscosidad (entre 205-250 cP).
- Las combinaciones de un 0,2 % de pectinas o CSN (1 y 2.4 %) con proteína resultaron interesante pues se obtuvieron gotas pequeñas y mejor estabilidad que el en la muestra control según el índice de cremosidad y la variación del tamaño de las gotas, y presentaron muy poca floculación sin aumentar demasiado la viscosidad. Además, el CSN aporta compuestos antioxidantes a la emulsión que podrían

proteger al aceite frente a la oxidación en posteriores procesos como el secado por pulverización.

- Las emulsiones preparadas con una combinación de CSN y proteína presentaron mayor floculación que las preparadas con pectina comercial y proteína. Se deberían llevar a cabo estudios posteriores con el objetivo de disminuir la floculación mediante técnicas de homogenización, por ejemplo, asistidas por ultrasonidos.

Por tanto, se puede concluir que es posible la revalorización de subproductos del zumo de naranja como fuente de pectinas y/o concentrado de pectinas y otros compuestos antioxidantes. Estos materiales podrían ser utilizados en la formulación de emulsiones estables de aceite en agua, que, según sus características, podrían resultar adecuadas para la microencapsulación de aceite mediante secado por pulverización. Esta última afirmación debería ser demostrada en futuros trabajos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alihosseini, F. (2016). Plant-based compounds for antimicrobial textiles. In *Antimicrobial Textiles*, 155-195
- Agoda-Tandjawa, G., Durant, S., Gaillard, C., Garnier, C., & Doublier, J.L. (2012). Properties of cellulose/pectins composites: Implication for structural and mechanical properties of cell wall. *Carbohydrate Polymers*, 90, 1081-1091.
- AOAC (1997). Official method of analysis. Association of Official Analytical Chemistry, Arlington, USA.
- AOAC Official Method 991.43 Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fibre in Foods
- Arnous, A., & Meyer, A. S. (2009). Quantitative Prediction of Cell Wall Polysaccharide Composition in Grape (*Vitis vinifera* L.) and Apple (*Malus domestica*) Skins from Acid Hydrolysis Monosaccharide Profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3611–3619.
- Bambeni, T., Tayengwa, T., Chikwanha, O.C., Manley, M., Gouws, P.A., Marais, J., Fawole, O.A, & Mapiye, C. (2021). Biopreservative efficacy of grape (*Vitis vinifera*) and clementine mandarin orange (*Citrus reticulata*) by-product extracts in raw ground beef patties. *Meat Science*, 181, 108609.
- Badaró, R., Valle-Vargas, M.F., Quintero-Gamero, G., Quintanilla-Carvajal, M.X., & Alean, J. (2021). Encapsulation of citrulline extract from watermelon (*Citrus lanatus*) by-product using spray drying. *Powder Technology*, 385, 455-465.
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54(2), 484–489.
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J.-L & Agnely, F. (2012). Protein, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *International journal of pharmaceutics*, 436, 359-378.
- BUCHI, 2010. Buchi information bulletin
- Caffall, K. H., & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1879–1900.
- Castejón, N., Luna, P., & Señoráns, F.J (2021). Microencapsulation by spray drying of omega-3 lipids extracted from oilseeds and microalgae: Effect on polyunsaturated fatty acid composition. *LWT*, 148, 111789.
- Constenla, D., Ponce, A. G., & Lozano, J. E. (2002). Effect of Pomace Drying on Apple Pectin. *LWT - Food Science and Technology*, 35(3), 216–221.
- Corrêa-Ferreira, M.L., Batista Viudes, E., Melillo de Magalhaes, P., Paixao de Santana Filho, A., Lanzi Sasaki, G., Pacheco, A.C & Oliveira Petkowicz, C.L (2019). Changes in the composition and structure of cell wall polysaccharides from *Artemisia annua* in response to salt stress. *Carbohydrate Research*, 483, 107753
- Crizel, T.M., Jablonski, A., Oliveira Rios, A., Rech, R., & Flôres, S.H (2013). Dietary fiber from orange by-products as a potential fat replacer. *LWT-Food Science and Technology*, 53, 9-14.

- Das, I., & Arora, A (2021), Kinetics and mechanistic models of solid-liquid extraction of pectin using advance green techniques- a review. *Food Hydrocolloids*, 120, 106931.
- Dickson, E. (2010). Flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81, 120-140.
- España. Directiva 2006/11/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 5 de abril de 2006, relativa a los residuos. [Internet], *Boletín Oficial del Estado*, 27 de abril de 2006.
- España. Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. [Internet], *Boletín Oficial del Estado*, 29 de julio de 2011.
- España. Atlas Big, Mapas y estadísticas del mundo y las regiones. [Internet]
- FAO, 2009. Food and Agriculture Organization Pectins – Monograph 7
- FAO, 2019
- Fishman, M. L., Chau, H. K., Qi, P. X., Hotchkiss, A. T., Garcia, R. A., & Cooke, P. H. (2015). Characterization of the global structure of low methoxyl pectin in solution. *Food Hydrocolloids*, 46, 153–159.
- Freire-Rodríguez, M.J. Tesis doctoral: Desarrollo de emulsiones dobles y emulsiones dobles gelificadas como análogos de grasa y su aplicación en productos cárnicos funcionales. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de alimentos. Universidad Complutense de Madrid, Madrid (España).
- Freitas Santos, P.D., Vieira Rubio, F.T., da Silva, M.P., Pinho, L.S., & Favaro-Trindades, C.S. (2021). Microencapsulation of carotenoid-rich materials: A review. *Food Research International*, 147, 110571.
- Garau, M.C., Simal, S., Rosselló, C., & Femenia, A. (2007). Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v Canoneta) by-products. *Food Chemistry*, 104, 1014-1024.
- Gharsallaoui, A., Roudart, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. In *Food Research International*, 40, 1107-1121.
- Ghasemi, S., Mahdi Jafari, S., Assadpour, E., & Khomeiri, M. (2017). Production of pectin-whey protein nano-complexes as carriers of orange peel oil. *Carbohydrate Polymers*, 177, 369-377.
- González-Centeno, M.R. (2013). Tesis doctoral: Caracterización de los subproductos de la industria vitivinícola como fuente de fibra dietética y compuestos fenólicos. Uso de lo ultrasonidos de potencia para la extracción de la fracción fenólica. In, Departamento de Química. Universidad de las Islas Baleares, Palma de Mallorca (España).
- Hu, W., Chen, S., Wu, D., Zhu, K., & Ye, X (2021). Manosonication assisted extraction and characterization of pectin from different citrus peel wastes. *Food Hydrocolloids*, 212, 106952.
- Hosseini, S.S., Khodaiyan, F., Kazemi, M., & Najara, Z. (2019). Optimization and characterization of pectin extracted from sour orange peel by ultrasound assisted method. *Internal Journal of Biological Macromolecules*, 135, 621-629.

- Ibarz, A., & Barbosa-Cánovas (2005). Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos. Ed. Mundi-Prensa Libros.
- Janiszewska, E., Jedlinska, A. & Witrowa-Rajchert, D. (2015). Effect of homogenization parameters on selected physical properties of lemon aroma powder. *Food Bioprod. Process*, 94, 405-413
- Kaderides, K., & Goula, A.M. (2017). Developments and characterization of a new encapsulating agent from orange juice by-product. *Food Research International*, 100, 612-622.
- Karrar, E., Ali Mahdi, A., Sheth, S., Mohamed Ahmed, I.A., Faisal Manzoor, M., Wei, W., & Wang, X (2021). Effect of maltodextrin combination with gum Arabic and whey protein isolate of the microencapsulation of gurun seed oil using a spray-drying method. *International Journal of Biological Macromolecules*, 171, 208-216.
- Kaya, M., Sousa, A.G., Crépeau, M.-J., Sørensen, S.O., & Ralet, M.-C (2014a). Characterization of citrus pectin simples extracted under different conditions: influence of acid and pH of extraction. *Annals of Botany*, 114(6), 1319-26.
- Kaya, M., Sousa, A.G., Crépeau, M.-J., Sørensen, S.O., & Ralet, M.-C (2014b). Characterization of citrus pectin simples extracted under different conditions: influence of acid and pH of extraction. *Anaals of Botany*, 114(6), 156-166.
- Khodayari, A., Thielemans, W., Hirn, U., Van Vuure, A.W., & Seveno, D. (2021). Cellulose-hemicellulose interactions – A nanoscale view. *Carbohydrate Polymers*, 270,118364.
- Kurita, O., Fujjwara, T., & Yamazaki, E. (2008). Characterization of pectin extracted from citrus peel in the presence of citric acid. *Carbohydrate Polymers*, 74, 725-730.
- Loi, C.C., Eyres, G.T., & Birch, E.J. (2019). Effect of milk protein composition on physicochemical properties, creaming stability and volatile profile of a protein-stabilised oil-in-water emulsion. *Food Research International*, 120, 83-91.
- Manrique, G. D., & Lajolo, F. M. (2002). FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 25(1), 99–107.
- Maravić, N., Šereš, Z., Nikolić, I., Dokić, P., Kertész & Dokić, L. (2019). Emulsion stabilizing capacity of sugar beet fibers compared to sugar beet pectic and octenyl succinate modified maltodextrin in the production of O/W emulsions: individual and combined impact. *LWT – Food Science and Tecnnology*, 108, 392 – 399.
- Martínez-Ramos, T., Benedito-Fort, J., James Watson, N., Ruiz-López, I.I., Che-Galicia, G & Corona-Jiménez, E. (2020). *Food and Bioproducts Processing*, 122, 41-54.
- Ministerio para la transición ecológica y el reto demográfico ([www.miteco.gob.es](http://www.miteco.gob.es))
- Muñoz-García, J., Alfaro-Rodríguez, M.C & Zapata, I (2007). Avances en la formulación de emulsiones, *Grasas y aceites*, 58, 64-73.
- Noello, C., Carvalho, A.G.S., Silva, V.M., & Hubinger, M.D. (2016). *Food Research International*, 90, 549-557.
- Okino-Delgado, C.H., & Francisco Fleuri, L. (2014). Obtaining lipases from by-products of orange juice processing. *Food Chemistry*, 163, 103-107.

- Patience, N.A., Schieppati, D., & Boffito, B.C. (2021). Continuous and pulsed ultrasound pectin extraction from navel orange peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 73, 105480.
- Pinelo, M., Sineiro, J., & Núñez, M.J. (2006). Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grape by-products. *Journal of Food Engineering*, 77, 57-63.
- McClements, D.J., & Ekin Gumus, C. (2016). Natural emulsifiers – Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloid and Interface Science*, 234, 3-26.
- Qaseem, M.F., Shaheen, H., & Wu, A (2021). Cell wall hemicellulose for sustainable industrial utilization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 144, 110996.
- Reichembach, L.H., & Oliveira Petkowicz, C.L (2021). Pectins from alternative sources and uses beyond sweets and jellies: an overview. *Food Hydrocolloids*, 118, 106824.
- Ren, J-N., Hou, Y.Y., Fan, G., Zhang, L.L., Li, X., Yin, K., & Pan, S.Y. (2019). Extraction of orange pectin based on the interaction between sodium caseinate and pectin. *Food Chemistry*, 283, 265-274.
- Robins, M.M. (2000). Emulsions – creaming phenomena. *Colloid & Interface Science*, 5, 265-272.
- Ruan, Q., Yang, X., Zeng, L., & Qi, J. (2019). Physical and tribological properties of high internal phase emulsions based on citrus fibers and corn peptides. *Food Hydrocolloids*, 95, 53-61.
- Serfert, Y., Schröder, J., Mescher, A., Laackmann, J., Rätzke, K., Shaikh, M.Q., Gaukel, V., Moritz, H.U., Schuchmann, H.P., Walzel, P., Drusch, S & Schwarz, K. (2013). Spray drying behaviour and functionality of emulsions with  $\beta$ -lactoglobulin/pectin interfacial complexes. *Food Hydrocolloids*, 31, 438-445.
- Silva, N.C., Arroyo Benites, E., & Morales Gomero, J.C. (2008). Extracción y caracterización de pectinas obtenidas a partir de frutos de la biodiversidad peruana. *Ingeniería Industrial*, 26, 175-199.
- Su, D.L., Li, P.J., Young Quek, S., Huang, Z.Q., Yuan, Y.J., Li, G.Y., & Shan, Y. (2019). Efficient extraction and characterization of pectin from orange peel by a combined surfactant and microwave assisted process. *Food Chemistry*, 286, 1.7.
- Sun, Z., Yan, X., Xiao, Y., Hu, L., Eggersdorfer, M., Chen, D., Yang, Z., & Wqutz, D.A. (2021). Pickering emulsions stabilized by colloidal surfactants: Role of solid particles. *Particuology*.
- Tonon, R.V., Grosso, C.R.F., & Hubinger, M.D. (2011). Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying, *Food Research International*, 44, 282-289.
- Turchiuli, C., Jimenez Munguia, M.T., Hernandez Sanchez, M., Cortes Ferre, H., & Dumoulin, E (2014). Use of different supports for oil encapsulation in powder by spray drying. *Powder Technology*, 255, 103-108.
- Umaña, M., Eim, V., Garau, C., Rosselló, C., & Simal, S. (2020). Ultrasound-assisted extraction of ergosterol and antioxidant components from mushroom by-products and the attainment of a  $\beta$ -glucan rich residue. *Food Chemistry*, 332, 127390.

- Umaña, M.M., Dalmau, M.E., Eim, V.S., Femenia, A., & Rosselló, C. (2019). Effects of acoustic power and pH on pectin-enriched extracts obtained from citrus by-products. Modelling of the extraction process. *Wiley Online Library*.
- Umaña, M., Turchiuli, C., Rosselló, C., & Simal, S. (2020). Addition of a mushroom by-product in oil-in-water emulsions for the microencapsulation of sunflower oil by spray drying. *Food Chemistry*, 323, 128429.
- Venzon, S. S., Canteri, M. H. G., Granato, D., Demczuk, B., Maciel, G. M., Stafussa, A. P., & Haminiuk, C. W. I. (2015). Physicochemical properties of modified citrus pectins extracted from orange pomace. *Journal of Food Science and Technology*, 52(7), 4102–4112.
- Wang, C., Qiu, W.Y., Chen, T.T., & Yan, J.K. (2021). Effects of structural and conformational characteristics of citrus pectin on its functional properties. *Food Chemistry*, 339, 128064.
- Wang, Wenjun., Ma, X., Xu, Y., Cao, Y., Jiang, Z., Ding, T., Ye, X & Liu, D (2015). Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: Optimization and comparison with the conventional method. *Food Chemistry*, 178, 106-114.
- Wiacek, A & Chibowski, E. (1999). Zeta potential, effective diameter and multimodal size distribution in oil/water emulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 159, 253-261.
- Williats, W.G.T., Knox, J.P., & Mikkelsen, J.D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Food Science and Technology*, 17, 97-104.
- Yang, H., Yi, N., Zhao, S., Xiang, Z., Faisal Qaseem, M., Zheng, B., Li, H., Feng, J.X., & Wu, Ai-Min, (2021). Characterization of hemicellulose in Cassava (*Manihot esculenta Krantz*) stem during xylogenesis. *Carbohydrate Polymers*, 264, 118038.
- Yu, H., Liu, R., Shen, D., Wu, Z., & Huang, Y. (2008). Arrangement of cellulose microfibrils in the wheat straw cell wall. *Carbohydrate Polymers*, 72, 122-127.
- Zanella, K., & Taranto, O. P. (2015). Influence of the drying operating conditions on the chemical characteristics of the citric acid extracted pectins from “pera” sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) albedo and flavedo. *Journal of Food Engineering*, 166, 111–118.
- Zegada Franco, V.Y. (2015). Extracción de pectina de residuos de cáscara de naranja por hidrólisis ácida asistida por microondas (HMO). *Investigación y Desarrollo*, 1, 65-76.
- Zhang, W.-N., Zhang, H.-L., Lu, C.-Q., Luo, J.-P., & Zha, X.-Q. (2016b). A new kinetic model of ultrasound assisted extraction of polysaccharides from Chinese chive. *Food Chemistry*, 212, 274–281.