

Extracción, Caracterización y Evaluación de las Propiedades Emulsificantes de Fosfolípidos
Presentes en el Grano de *Theobroma cacao* L.

Deisy Giraldo Dávila

Trabajo de Investigación Para Optar al título de Magíster en Química

Director

Marianny Yajaira Combariza M., Química Ph.D.

Codirector

Cristian Blanco Tirado, Químico Ph.D.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Maestría en Química

Bucaramanga

2020

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	12
1. Objetivos	15
1.1 Objetivo General	15
1.2 Objetivos Específicos.....	15
3. MARCO TEÓRICO.....	16
3.1 Producción de Cacao en Colombia y el mundo.....	16
2.2 El cacao y sus componentes	18
2.3 Caracterización de fosfolípidos.....	21
2.3.1 Cromatografía.	21
2.3.2 Espectrometría de masas (MS).....	22
2.3.3 Resonancia magnética nuclear (RMN)	25
2.2 Emulsiones.....	27
3. Extracción y caracterización de los pls contenidos en granos de <i>Theobroma cacao</i> l. (VAR. CCN 51).....	29
3.1 introducción.....	29
3.2 Metodología	33
3.3 Resultados y Discusión.....	36
4. Evaluación de las propiedades emulsificantes de pls contenidos en granos de <i>theobroma cacao</i> l.....	52

4.1 Introducción	52
4.2 Metodología	58
<u>4.3</u> Discusión de Resultados	62
5. Conclusiones	79
Referencias bibliográficas	81

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1 <i>Asignación en el espectro de masas MALDI-TOF de TAGs presentes en las fracciones FL, F1, F2, and AG, respectivamente.....</i>	48
Tabla 2 <i>Asignación en el espectro de masas MALDI-TOF de PLs presentes en la sub-fracción F3, LS, LG y PC, respectivamente.....</i>	51
Tabla 3 <i>Mezclas de emulsificantes utilizadas para la determinación de HLB.....</i>	62
Tabla 4 <i>Valores de HLB calculados para LS, LG y PLs de cacao..</i>	76

Lista de Figuras y Esquemas

<i>Figura 1.</i> Estructura química de los principales componentes de la fracción lipídica del grano de cacao.....	21
<i>Figura 2.</i> Estructura química de fosfolípidos.....	22
<i>Figura 3.</i> Esquema de la técnica de ionización por desorción láser/ MALDI-TOF.....	25
<i>Figura 4.</i> Esquema general del fundamento de RMN.....	27
<i>Figura 5.</i> Emulsiones formadas por la adición de un emulsificante anfifílico.....	30
<i>Figura 6.</i> a. Proceso de extracción e identificación de fracciones enriquecidas en fosfolípidos presentes en granos de cacao, b. espectros UV-Vis (200-800 nm) AG, F3, LS y LG, respectivamente.....	40
<i>Figura 7.</i> Cromatogramas obtenidos por medio de HPLC con a. detector UV-Vis b. detector de índice de refracción, para las fracciones obtenidas mediante extracción Soxhlet y cromatografía en columna (FL, F1, F2 and F3) comparado con lecitinas de soya (LS), lecitina de girasol (LG) y aceite comercial de girasol (AG).....	43
<i>Figura 8.</i> Preparación y análisis de muestras usando espectrometría de masas MALDI-TOF.....	45

<i>Figura 9.</i> Espectro MALDI-TOF de las fracciones enriquecidas en TAGs: fracción lipídica (FL), sub-fracción F1, sub-fracción F2 y aceite de girasol (AG), al lado izquierdo espectros de masas en el rango m/z 400-1000, en frente patrones isotópicos para los TAGs más abundantes.....	47
<i>Figure 10.</i> Espectro MALDI-TOF de las fracciones enriquecidas en PLs: Sub-fracción F3, lecitina de soya (LS), lecitina de girasol (LG) y L- α - fosfatidilcolina (PC), al lado izquierdo espectros de masas en el rango m/z 400-1000, en frente patrones isotópicos para los PLs más abundantes.....	50
<i>Figure 11.</i> Espectros RMN- ^{31}P de lecitina de soya y lecitina de girasol, usando como estándar tributilfosfato (TBP).....	53
<i>Figure 12.</i> Espectro RMN- ^{31}P de extracto PLs del grano de cacao.....	54
<i>Figura 13.</i> Preparación de emulsiones modelo.....	64
<i>Figura 14.</i> Proceso de extracción de PLs de manteca de cacao mediante desgomado ácido.....	67
<i>Figura 15.</i> Espectro de masas MALDI-TOF de fracción de PLs obtenidos del desgomado ácido de la manteca de cacao.....	68
<i>Figura 16.</i> Ángulos de contacto de lecitina de soya, lecitina de girasol y extracto de PLs.....	70
<i>Figura 17.</i> Escala HLB para emulsificantes.....	72
<i>Figura 18.</i> a. Principio de operación de las mediciones de transmisión y retrodispersión. Diferentes procesos termodinámicos de desestabilización de emulsiones b. emulsión estable, d. coalescencia/floculación, d. cremado, e. sedimentación.....	73

<i>Figura 19.</i> Perfiles de retrodispersión (Δ BS) de emulsiones más estables (60:40 aceite/agua) e inestables (80:20) con LS como emulsificante.	76
<i>Figura 20.</i> Emulsiones w/o 60:40, 70:30 y 80:20 aceite/agua con lecitina de soya al 1% 2% y 3% m/m.....	78
<i>Figura 21.</i> Resultados de estabilidad usando MLS de Emulsiones w/o con extracto de PLs de granos de cacao.....	80
<i>Figura 22.</i> Resultados de estabilidad usando MLS de Emulsiones w/o con cocoa deslipificada.....	81
 <i>Esquema 1.</i> Reacciones involucradas en el proceso de desgomado ácido de manteca de cacao.....	 66

Lista de Abreviaturas

CC	Cromatografía en columna
CCN51	Colección castro naranjal 51
CTeI	Ciencia Tecnología e Información
CUBO	Mezcla de trietilamina, dimetiformoamida e hidrocloreuro de guanidinio
DAG	Diacilglicérido
ESI	Ionización por electrospray
Fedecacao	Federación nacional del cacao
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
ICCO	Organización internacional de café y cacao
IPA	Isopropanol
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPE	Lisofosfatidiletanolamina
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por una matriz
MS	Espectrometría de masas
<i>n</i> -C ₇	Heptano
o/w	Aceite en agua
PA	Ácido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina

PG	Fosfatidilglicerol
PI	Fosfatidilinositol
PL/PLs	Fosfolípido/Fosfolípidos
POP	Glicerol-1,3-dipalmitato-2-oleato
POS	Glicerol-1-dipalmitato-2-oleato-3-estearato
RMN	Resonancia magnética nuclear
SOS	Glicerol-1,3-diestarato-2-oleato
TAG	Triacilglicérido
TBP	Tributilfosfato
TLC	Cromatografía en capa fina
TOF	Analizador de tiempo de vuelo
w/o	Agua en aceite

Resumen

Título: Extracción, Caracterización y Evaluación de las Propiedades Emulsificantes de Fosfolípidos Presentes en el Grano de *Theobroma cacao* L.^{1*}

Autor: Deisy Giraldo Dávila**

Palabras claves: Fosfolípido, emulsificante, espectrometría de masas, HPLC..

Descripción: Los fosfolípidos (PLs) constituyen una amplia familia de compuestos anfifílicos estructuralmente comprendidos por una molécula de glicerol a la cual se unen dos ácidos grasos y un grupo fosfato. En esta investigación, se extrajeron PLs del grano de *Theobroma cacao* L. usando extracción S/L seguida por un fraccionamiento en cromatografía en columna. Se identificaron las fracciones enriquecidas en PLs por medio de análisis comparativos de estas con lecitinas comerciales usando cromatografía de alta eficiencia. Las fracciones obtenidas fueron caracterizadas usando MS MALDI-TOF para su identificación y RMN-31P para la cuantificación de las diferentes familias de PLs. Los resultados de HPLC-RID y UV-Vis muestran la similitud en los tiempos de retención de lecitinas comerciales, de la sub-fracción F3 y del estándar de L- α -PC, esta similitud fue corroborada en los análisis MALDI-TOF en donde se observaron cationes radicales y aductos de Na⁺ de diferentes PC y LPC en dichas muestras. Por otro lado, los análisis RMN-31P permitieron determinar el porcentaje y clases de de PLs contenidos en las lecitinas, particularmente la F3 contiene las siguientes familias de PLs: PA (12%), PG (13%), PI (20%), LPC (26%) y PC (29%). Finalmente, se procedió a la formación de emulsiones modelo para determinar las propiedades emulsificantes de los extractos de PLs obtenidos de granos de cacao.

¹ *Trabajo de grado.

**Facultad de Ciencias, Escuela de Química

Director: Marianny Yajaira combariza M., Química Ph.D.

Codirector: Cristian Blanco Tirado, Químico Ph.D.

Abstract

Title: Extraction, Characterization and Evaluation of the Emulsifying Properties of Phospholipids

Present in the *Theobroma cacao* L. Bean.^{1*}

Author: Deisy Giraldo Dávila**

Keywords: Phospholipid emulsifier, mass spectrometry, HPLC.

Description: Phospholipids (PLs) are natural amphiphilic molecules found in the cell membranes of animals, plants, and microbial species. These molecules constitute a broad family with a glycerol-like backbone linked to a hydrophilic head and a lipophilic tail. There is growing demand for natural ingredients to formulate ‘clean label’ products, particularly in the food and cosmetics industries. This trend encourages research in alternative sources of surface-active ingredients such as PLs from cacao beans. In this work, we explore the performance of PLs, isolated from Colombian cacao beans, as surface-active compounds for w/o emulsion formation. LPC (16:0), LPC (18:1), PE (18:1, 18:0), PC (18:2, 16:0), PC (18:1, 16:0), and PC (18:1, 18:0) were observed by MALDI-TOF MS as the main components in PL extracts from *Theobroma cacao* L beans. NMR-31P was used to quantify PLs in commercial soybean and sunflower lecithin samples, as well as in cocoa beans extracts. We also HLB values and contact angle. Finally, the emulsifying properties of the various PLs, were tested by preparing w/o emulsions using PL-free sunflower oil and distilled water. NIR spectroscopy measurements were used to test emulsion stability.

¹ *Trabajo de grado.

**Facultad de Ciencias, Escuela de Química

Director: Marianny Yajaira combariza M., Química Ph.D.

Codirector: Cristian Blanco Tirado, Químico Ph.D.

Introducción

La calidad del grano de *Theobroma Cacao* L. está ligada a diversos factores como el tipo del árbol de cacao, la edad de la planta, país de origen y del procesamiento de poscosecha (procesos de desgranado, fermentación, etc.) a los cuales se someten los frutos.(Gardea et al., 2018; Lima, Almeida, Rob Nout, & Zwietering, 2011) En términos generales, el grano de cacao está conformado por almidones, fibra cruda, proteínas, minerales, metil xantinas (teobromina, cafeína), antioxidantes, y en mayor proporción una mezcla de grasas conocidas comúnmente como manteca de cacao. Dentro de la fracción lipídica de la semilla de cacao se encuentran compuestos como los diacilglicéridos (DAG), triacilglicéridos (TAG) como componentes mayoritarios y en menor proporción esteroides (particularmente metilesteroides, desmetilesteroides), triterpenos, vitamina E (β -tocoferol, α -tocoferol y γ -tocoferol), ácidos grasos libres y fosfolípidos (PLs). Este último grupo de compuestos está conformado por una amplia familia de moléculas con una cadena carbonada de glicerol sustituida por dos ácidos grasos y un grupo fosfato unido por enlace fosfodiéster a diferentes grupos como la colina y la etanolamina. Dentro de los PLs más conocidos están la fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG) y ácido fosfatídico (PA).(Afoakwa, Quao, Takrama, Budu, & Saalia, 2013; Gardea et al., 2018; L, Nguyen, & Nguyen, 2017) Este grupo de moléculas, que se encuentran en el grano de cacao en un porcentaje aproximado del 0,4% (p/p), presentan características anfifílicas que les permiten actuar como surfactantes/emulsificantes debido a la presencia del grupo fosfato y las cadenas alquílicas de los ácidos grasos que sustituyen al glicerol. Las industrias alimenticia y cosmética utilizan los PLs, provenientes principalmente de granos de soya y de semillas de girasol (comercialmente denominados lecitinas), como emulsificantes en múltiples

aplicaciones.(Killian & Coupland, 2012; Marto, White, Seldomridge, & Marshall, 1995; van Nieuwenhuyzen, 2010; Van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008)

En Colombia, según cifras del tercer censo nacional agropecuario realizado por el DANE, la producción de cacao alcanza un 1.2% de la producción de grano a nivel mundial. El departamento con mayor producción de grano seco de *Theobroma cacao* L. es Santander, con ~30% de la producción nacional, concentrada principalmente en la zona de los municipios de El Carmen y San Vicente de Chucurí.(Cód, n.d.) El cacao Santandereano se conoce, no solo por la cantidad producida, sino también por su alta calidad. En este aspecto, Fedecacao (Federación Nacional de Cacaoteros) reporta que en el año 2017 se presentó un importante aumento en las exportaciones a países como México, Holanda, Italia y Malasia; mientras las importaciones disminuyeron (93%) en el período 2011-2017,(“informe de gestión año 2017 del fondo de estabilización de precios del cacao – fep cacao,” 2018) lo que demuestra que el uso de esta materia prima en la industria chocolatera nacional principalmente en el área de confitería está incrementando.

Sin embargo, la cadena productiva de grano de cacao en la región nororiental de Colombia se caracteriza por un escaso aprovechamiento de sus potenciales capacidades productivas ya que un alto porcentaje del grano producido es comercializado como materia prima. Para el desarrollo de la industria chocolatera en la región es necesario realizar investigaciones enfocadas en la generación de nuevos productos, con valor agregado, derivados del grano. En la actualidad los grupos GIFTEX y CEIAM de la UIS, ejecutan el proyecto de regalías desarrollo de nuevos procesos y productos para la valorización de mucilagos y granos de cacao del departamento de santander (BPIN 2016000100046), que tiene como objetivo valorizar la biomasa derivada del fruto

del cacao. Dentro de este marco se ubica esta investigación, que tiene como objetivo estudiar la composición y propiedades interfaciales de PLs aislados de manteca de cacao. En la actualidad el estudio de los PLs derivados de los granos de cacao está muy limitado, lo cual crea un nicho de oportunidad pues estos compuestos pueden tener uso potencial en la industria de alimentos y cosmética, particularmente en la formulación de emulsiones.(J. Gould, Garcia-Garcia, & Wolf, 2016; van Nieuwenhuyzen, 2010)

En este trabajo de investigación se reportan las características composicionales (cuali- y cuantitativas) y las propiedades emulsificantes para la estabilización de emulsiones w/o (agua en aceite) de los PLs aislados del grano de *Theobroma cacao* L. (Var. CCN 51). En el capítulo I se expone el marco conceptual que incluye técnicas y métodos usados para el desarrollo de este proyecto. La extracción y caracterización de los PLs está contenida en el capítulo II, donde se consignan los resultados de rendimientos de extracción S/L (Soxhlet) de PLs, cromatografía en columna y HPLC, además de ensayos de caracterización/cuantificación con espectrometría de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (RMN). Finalmente, en el capítulo III se reporta la evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los PLs presentes en el grano de cacao (Var. CCN51- Colección Castro Naranjal 51), como estabilizadores de emulsiones w/o. De esta forma se establece la potencialidad de estos materiales como emulsificantes naturales y, eventualmente, como nuevos productos que incrementen el valor agregado del grano de cacao en Santander.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Extraer, cuantificar y caracterizar fosfolípidos del grano de Theobroma Cacao L. y evaluar sus propiedades emulsificantes.

1.2 Objetivos Específicos

Implementar metodologías para la extracción, cuantificación y caracterización de los fosfolípidos presentes en granos de cacao (clon CCN51).

Evaluar las propiedades emulsificantes de los fosfolípidos y de material deslipificado (cocoa) aislados de granos de granos de cacao (clon CCN51) y compararlas con productos comerciales (lecitina de soya y girasol).

3. Marco teórico

3.1 Producción de Cacao en Colombia y el mundo

La demanda mundial de cacao, impulsada principalmente por la industria de confitería, pasó de 1.0 millón de toneladas a un estimado de 4.3 millones de toneladas durante el período 1961–2014, lo cual representa una tasa de crecimiento anual compuesta del 2.7 %. En los años 2014 - 2016 se experimentó una preocupante disminución de 286 mil toneladas en la producción mundial de cacao; mientras para el período 2016 - 2018 la producción aumentó a 4.7 millones de toneladas, lo que significó un aumento de 19% (767 mil toneladas adicionales), según la ICCO (*International Coffee and Cocoa Organization*). (“ICCO - Production of Cocoa Beans,” n.d.) África es el continente con mayor producción de cacao, con una cosecha de 3.49 millones de toneladas proyectadas para finales del presente año proveniente de países como Costa de Marfil, Camerún, Ghana y Nigeria. En segundo lugar, con aproximadamente 750 mil toneladas de cacao se encuentra el continente americano con Brasil, Ecuador, Perú y Colombia como principales representantes de este sector. (“ICCO - Production of Cocoa Beans,” n.d.) Colombia ocupa el décimo puesto en la producción mundial de grano de cacao con 55.000 toneladas/año (1.2 %). (Gardea et al., 2018; Informe de gestión año 2017 del fondo de estabilización de precios del cacao – fep cacao, 2018)

Según reportes recientes de Fedecacao, entre los años 2011 y 2018 se observó un aumento del 62% en la producción de cacao en el país. Por otra parte, de acuerdo con el tercer censo nacional agropecuario realizado por el DANE, el departamento con mayor participación en la producción de cacao en grano seco fue Santander con el 25.1 %, seguido por Nariño y Arauca con el 8.4% y

7.9% respectivamente.(Cód, n.d.) El cacao colombiano se considera internacionalmente como fino de aroma, y gracias a su excelente calidad las exportaciones han aumentado considerablemente en los últimos años, pasando de 5000 toneladas en 2010 a aproximadamente 12.000 toneladas en el 2017. Esta materia prima es enviada a países como México, Holanda, Italia, España y Malasia que en conjunto suman más del 86% del total de las exportaciones de cacao en Colombia.(informe de gestión año 2017 del fondo de estabilización de precios del cacao – fep cacao, 2018) Por el contrario, las importaciones de grano de cacao por parte de la industria nacional han disminuido de manera considerable pasando de 6819 toneladas en el año 2010 a 488 toneladas en el año 2017 lo que representa una disminución en la importación de grano de cacao del 92.8% por parte de importantes empresas como Casa Luker y Compañía Nacional de Chocolates. (Informe de gestión año 2017 del fondo de estabilización de precios del cacao – fep cacao, 2018) Estas cifras muestran sin duda alguna el crecimiento en la producción de grano de cacao con calidad de exportación, lo cual ha aumentado la compra también a nivel interno. Sin embargo, estas estadísticas también indican que la cadena productiva del cacao en Colombia se caracteriza por un escaso aprovechamiento de sus potenciales capacidades de conversión del grano de cacao a nivel nacional, pues la mayor parte del grano seco y fermentado es exportado. Esta debilidad está en parte fomentada por la limitada aplicación de estrategias basadas en CTel (Ciencia Tecnología e Innovación) que fortalezcan la cadena de valor del cacao y beneficien positivamente a los actores involucrados, particularmente en términos socio-económicos.

2.2 El cacao y sus componentes

El género *Theobroma* (familia Sterculiaceae) está conformado por 22 especies, de las cuales la especie *Theobroma cacao* L., es comercialmente la más importante, debido al valor de sus semillas, (Lima et al., 2011) comúnmente conocidas como granos de cacao (principal materia prima en la industria chocolatera). La calidad y composición química de los granos de cacao dependen de la especie, las prácticas agrícolas (cuidados durante el crecimiento de los árboles, condiciones climáticas, maduración y cosecha del fruto) y el procesamiento poscosecha (apertura de la mazorca, fermentación del grano, secado y tostado). (Benjamin Caballero, 2003; Lima et al., 2011) De forma general, el grano de cacao se compone de: agua, grasas, proteínas, fibra, almidones, antioxidantes, metil xantinas (teobromina, cafeína) y minerales (Na, K, Ca, Fe, P, Mn, Cu, Zn, Se, etc.). (Afoakwa et al., 2013; Lima et al., 2011; Torres-Moreno, Torrecasana, Salas-Salvadó, & Blanch, 2015)

La grasa del grano de cacao, comúnmente denominada manteca de cacao, está compuesta principalmente por triacilglicéridos (TAGs) particularmente POP (glicerol-1,3-dipalmitato-2-oleato), POS (glicerol-1-dipalmitato-2-oleato-3-estearato) y SOS (glicerol-1,3-diesterato-2-oleato) que alcanzan entre 92 y 96% p/p del contenido total de esta fracción lipídica (Figura 1). En menor proporción se encuentran los esteroides (metilesteroides, desmetilesteroides y triterpenos), vitamina E (β -tocoferol, α -tocoferol y γ -tocoferol), ácidos grasos (ácido esteárico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido linoléico), y PLs. (Jahurul et al., 2013; Lima et al., 2011; Siouffi, 2000; Su-Jia, Dong, & Shi-Chao, 2013; Torres-Moreno et al., 2015)

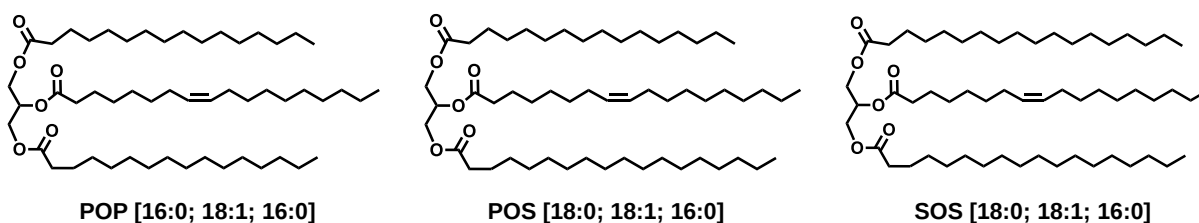


Figura 1. Estructura química de los principales componentes de la fracción lípida del grano de cacao.

Los PLs son una amplia familia de compuestos anfifílicos conformados por una molécula de glicerol a la cual se unen dos ácidos grasos (R' y R'') y un grupo fosfato. Este último, mediante enlace fosfodiéster, se une a moléculas como la colina, serina o etanolamina para formar diferentes familias de PLs conocidas como fosfatidilcolinas (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA) y en menores proporciones lisofosfatidilcolina (LPC) (Figura 2). (Fuchs et al., 2009; Petković et al., 2001; J. Schiller et al., 2004) Los ácidos grasos que hacen parte de la estructura de los fosfolípidos son en su mayoría el ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1) y ácido linoleico (C18:2).

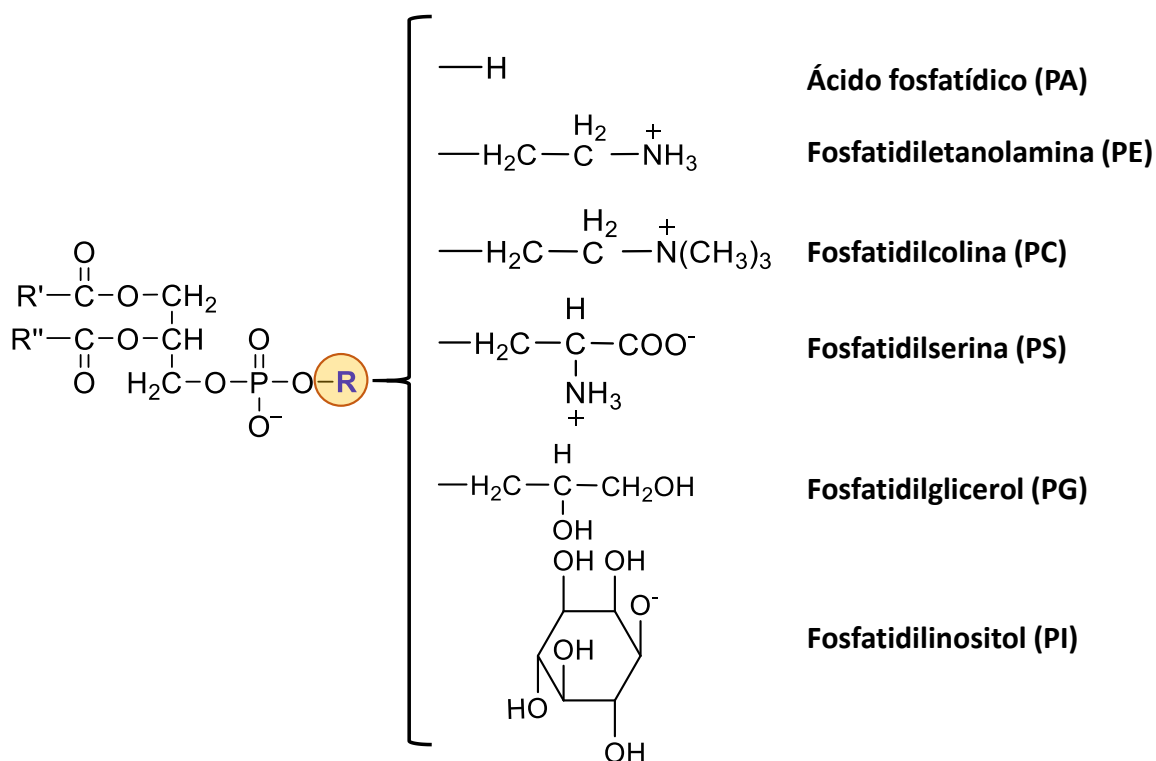


Figura 2. Estructura química de fosfolípidos.

Las mezclas de PLs, conocidas comercialmente como lecitinas, se usan comúnmente como emulsificantes en procesos industriales de alimentos y cosméticos y se extraen principalmente de semillas de soya, girasol y colza. (Benjamin Caballero, 2003; Lima et al., 2011; Ontiveros et al., 2014; Torres-Moreno et al., 2015; van Nieuwenhuyzen, 2010; Van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008) Las lecitinas vegetales contienen predominantemente PC, PE, PI, PA y cantidades menores de LPC y otros PLs de glicerol con ácidos grasos complejos. Debido a la importancia de esta familia de compuestos existe abundante información en la literatura científica sobre métodos de aislamiento, análisis, purificación y caracterización de lecitinas; estos últimos, en su mayoría, orientados a determinar propiedades emulsificantes. (Cremonini, Laghi, & Placucci, 2004; J. M. Gould, Furse, & Wolf, 2016; Lima et al., 2011; van Nieuwenhuyzen, 2010)

2.3 Caracterización de fosfolípidos

Para el análisis cualitativo y cuantitativo de PLs es indispensable establecer técnicas de extracción eficientes que, acopladas con métodos de caracterización adecuados, permitan su identificación y cuantificación. Las técnicas analíticas más usadas para el análisis de PLs son: cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía en columna (CC), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS). (Cremonini et al., 2004; J. M. Gould et al., 2016; Olga, Casals, Andr, Izquierdo-pulido, & Lamuela-ravent, 2003; J. Schiller et al., 2004; van Nieuwenhuyzen, 2010)

2.3.1 Cromatografía. Múltiples técnicas cromatográficas han sido usadas para el análisis de PLs. Por ejemplo, la cromatografía en capa delgada (TLC) permite la separación eficiente de este tipo de compuestos, esta técnica de separación acoplada a técnicas como espectrometría masas MALDI ha permitido su identificación de manera rápida y eficiente. (Fuchs, Schiller, Süß, Schürenberg, & Suckau, 2007) A pesar de su practicidad con este método de separación se obtienen cantidades muy pequeñas de PLs que no permiten la realización de mediciones adicionales como, por ejemplo, el estudio de la formación de emulsiones. Por otro lado, la cromatografía líquida de alta eficiencia con diferentes fases estacionarias como fase normal y reversa (sílica, diol, amino C8, C18) y variadas series elutrópicas (MeOH, CHCl₃, ACN, EtOH, IPA, etc.) (Separation, 2006; Siouffi, 2000; Van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008) se han utilizado para fraccionar muestras complejas y/o estándares de PLs. La naturaleza anfifílica de estos compuestos permite su separación bajo diversas condiciones operacionales en HPLC, lo que hace de esta técnica una excelente opción para su estudio.

2.3.2 Espectrometría de masas (MS): espectrometría de masas es una poderosa herramienta, en términos de sensibilidad, especificidad, rango dinámico y precisión, para el análisis cualitativo y semicuantitativo de mezclas complejas de PLs, incluidos los glicerofosfolípidos y la esfingomielina.(Fuchs et al., 2009, 2007; Larsen, Thingholm, Jensen, Roepstorff, & Jørgensen, 2005; Petković et al., 2001; Raffaelli & Saba, 2003; J. Schiller et al., 2004; Tobergte & Curtis, 2013) Los métodos más reportados en la literatura para el análisis de lípidos y PLs son ionización por electrospray (ESI) e ionización desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), acopladas con varios analizadores. Particularmente, el desarrollo de analizadores de masas de alta resolución ha aumentado enormemente la aplicación de la MS para el análisis de lípidos en general, incluyendo los PLs.(Fuchs et al., 2007; Jürgen H. Gross., 2004; Kim, Wang, & Ma, 1994; Pulfer & Murphy, 2003)

La técnica MALDI, es particularmente ventajosa para el análisis de PLs. En MALDI se emplea un compuesto orgánico con propiedades fotofísicas particulares (*e.g.* alta absorptividad molar en UV, potencial de ionización, afinidad protónica, cristalización, entre otras) como matriz. El analito de interés se co-cristaliza con la matriz y la mezcla se irradia con radiación láser (comúnmente de Nd:YAG $\lambda = 355$ nm) como se observa en la Figura 3. El proceso de ionización en MALDI involucra dos etapas: inicialmente se forman iones primarios de la matriz y seguidamente ocurren reacciones de transferencia de carga (protones, cationes o electrones) con el analito neutro, en fase gaseosa.(Merchant & Weinberger, 2000) Una vez formados, los iones de la matriz y el analito pasan al analizador para ser separados de acuerdo con su relación *masa/carga* (m/z). (Jürgen H. Gross, 2010) En el analizador de tiempo de vuelo (TOF, *Time Of Flight*) todos los iones emitidos por la fuente adquieren la misma energía cinética al interactuar con un campo eléctrico uniforme;

sin embargo, los tiempos de llegada al detector dependen de la masa del ion, de tal forma que los más ligeros llegan antes que los más pesados (Figura 3).

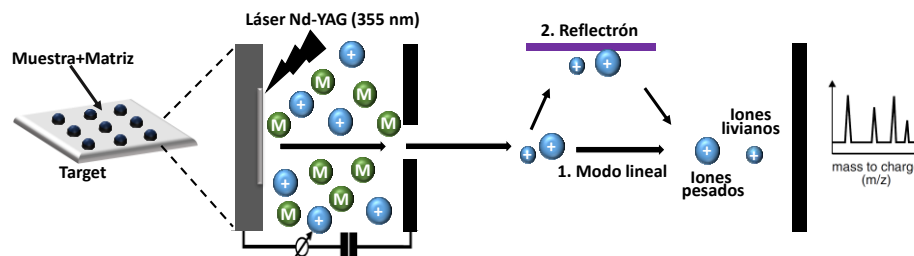


Figura 3. Esquema de la técnica de ionización por desorción láser/ MALDI-TOF.

Desde el punto de vista composicional, los PLs contienen cadenas variables de ácidos grasos que van desde el mirístico -completamente saturado (14: 0)- hasta el docosahexaenoico -altamente insaturado (22: 6).(Fuchs et al., 2007; J Schiller et al., 1999) Esta variabilidad hace que los componentes individuales de la mezcla de PLs difieran considerablemente entre sí, en polaridad, hidrofobicidad y propiedades de absorción. Considerando que en el análisis cromatográfico (HPLC) la detección se basa principalmente en espectroscopía UV, el análisis de PLs mediante esta técnica se complica en algunos casos y como consecuencia comúnmente se observa la co-elución de compuestos.(Fuchs et al., 2009, 2007; J. Schiller et al., 2004) Por esta razón, la espectrometría de masas es una alternativa interesante para el análisis de PLs, particularmente con la técnica de ionización MALDI que tiene alta tolerancia a las impurezas de la muestra (por ejemplo, sales, otros compuestos orgánicos) en comparación con otros métodos de caracterización. Adicionalmente, la sensibilidad de la técnica permite detectar cantidades muy pequeñas del analito (fentomoles) y requiere mínimas cantidades de muestra. Todas estas ventajas de la espectrometría de masas MALDI-TOF hacen de este método una herramienta muy conveniente para el análisis de muestras de origen biológico, en particular, de PLs.

En MALDI, los descriptores analíticos de un espectro de masas como relación señal/ruido (S/N), resolución, energía umbral del láser y sobrevivencia del ión molecular dependen en gran medida de las propiedades fisicoquímicas de la matriz y el analito. Para el análisis de fosfolípidos se han usado diversas matrices como: 2,5-ácido dihidroxibenzoico (DHB), α -ácido hidroxicinámico, ácido sinapínico, 6,7-dihidroxicumarina y *para*-nitroanilina, entre otras. El DHB, particularmente, se destaca como una matriz apropiada para el análisis de PLs. (Larsen et al., 2005; Jürgen Schiller et al., 2007) A pesar de las ventajas de la espectrometría de masas MALDI-TOF, en relación con identificación y caracterización de mezclas complejas de PLs, la cuantificación por este método es un factor limitante debido principalmente a las diferencias en las eficiencias de ionización y a la baja reproducibilidad espectro-a-espectro de la técnica. Para asegurar una buena caracterización cuantitativa de PLs presentes en el cacao, de acuerdo con diversos reportes de literatura, la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) es una buena opción.

2.3.3 Resonancia magnética nuclear (RMN): El fenómeno de resonancia se presenta debido a que ciertos núcleos, como el ^1H , ^{13}C , ^{31}P , se comportan como pequeños imanes. El fósforo es un elemento monoisotópico (^{31}P), con distribución esférica de la carga y espín de $1/2$ al cual se asocia un momento magnético μ . Esta es una cantidad vectorial, que para el ^{31}P tiene dos posibles orientaciones representadas por los valores del número de espín: $+1/2$ y $-1/2$. En presencia de un campo magnético externo, el ^{31}P presenta una distribución de espines con dos posibles orientaciones: en el mismo sentido del campo magnético y en sentido contrario (Figura 4). (Cremonini et al., 2004; London & Feigenson, 1979; Van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008)

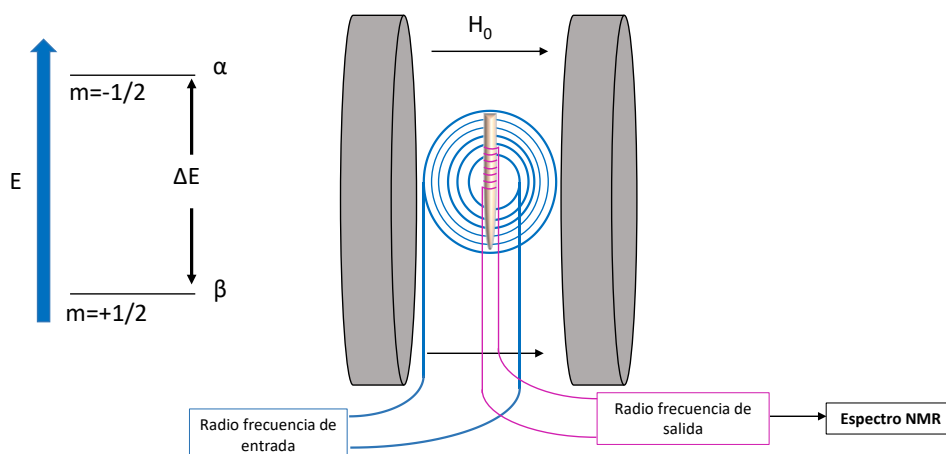


Figura 4. Esquema general del fundamento de RMN.

La población distribuida entre los estados α y β obedece la ley de distribución de Boltzman, con un pequeño exceso en el estado β de menor energía. La diferencia de energía entre estos dos estados es muy pequeña y corresponde al rango de la radiofrecuencia ($\Delta E = h\nu$); por lo tanto, al irradiar los núcleos que fueron sometidos al campo magnético externo con una fuente de radio frecuencia, ocurrirá una inversión de la población (esto sucede cuando hay coincidencia entre la energía de la

radiación y la diferencia de energía ΔE de los dos estados). Luego de la excitación, los núcleos se relajan y regresan a su estado inicial emitiendo energía en el rango de la radiofrecuencia que se detecta y finalmente se traduce en un espectro, en el cual el eje x corresponde a la intensidad de la señal detectada y el eje y al desplazamiento químico δ que conforma una escala unificada de variaciones de frecuencia y de magnitud del campo y cada valor de δ será particular para cada núcleo de ^{31}P dependiendo del entorno químico que cada uno posea, permitiendo así diferenciar e identificar las diferentes familias de PLs mencionados anteriormente.(Cremonini et al., 2004; London & Feigenson, 1979; Pretsch, Bühlmann, & Badertscher, 2005; Van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008)

La cuantificación de las mezclas de PLs por resonancia magnética nuclear de fósforo (^{31}P RMN) tiene ventajas sobre la HPLC y MS debido a que la cuantificación de ^{31}P en PLs se realiza analizando directamente la fracción lipídica y solamente los compuestos que tienen al menos un átomo de fósforo son detectables en el espectro de ^{31}P RMN de modo que no existen interferencias por otros lípidos. Además, siempre que el espectro de ^{31}P RMN se haya realizado en concentraciones conocidas exactas, el área integrada bajo la curva de cada pico es directamente proporcional a la concentración del PL respectivo. Para la cuantificación de compuestos por RMN es necesario el uso de un compuesto de referencia; según la literatura, el tributilfosfato (TBP) ha sido usado para este fin con resultados eficientes en la cuantificación de este tipo de compuestos.(Cremonini et al., 2004; Edzes, Teerlink, Knaap, & Valk, 1992; London & Feigenson, 1979; Rouser, Siakotos, & Fleischer, 1966; Sotirhos, Herslöf, & Kenne, 1986; Van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008) Otro aspecto que se debe tener en cuenta durante la toma del espectro RMN de los PLs es el uso de un buen solvente que difunda las resonancias de fósforo del

PL en el rango más amplio posible, al mismo tiempo que mantenga el ancho de las señales al mínimo. Esto generalmente no se puede lograr con solventes orgánicos puros, en su lugar, debido a la formación de agregados de PLs, la mezcla de solventes denominada CUBO (dimetilformamida (DMF), trietilamina (TEA) e hidrocloreuro de guanidinio (GH⁺)) es reportado por diversos investigadores para dicho fin.

2.2 Emulsiones

Dos líquidos originalmente inmiscibles pueden formar una mezcla con cierta homogeneidad llamada emulsión gracias a la adición de un surfactante o emulsificante. Los surfactantes facilitan la formación de emulsiones mediante la reducción de la tensión interfacial y contribuyen a su estabilidad contrarrestando mecanismos de inestabilidad termodinámica como: coalescencia, cremado y floculación. Las emulsiones clásicas se dividen en dos grupos: o/w (agua en aceite) y w/o (aceite en agua) (Figura 5); las emulsiones o/w, particularmente, tienen aceite como fracción líquida dispersa y agua como fase continua. Este tipo de emulsiones se encuentran en una variedad considerable de alimentos, incluyendo sopas, aderezos para ensaladas, mayonesa, salsas, la mayoría de los productos lácteos y chocolates.(McCLmenets, 2010) En los alimentos, los agentes emulsionantes típicos son las proteínas anfifílicas y los surfactantes como la lecitina. Esta última, es una mezcla compleja de colina, ácidos grasos, glicerol, glicolípidos, triglicéridos y principalmente PLs como la fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico. La lecitina, particularmente de soya o girasol, es utilizada ampliamente en los productos derivados de chocolate para reducir la tensión interfacial entre la manteca de cacao y las partículas no grasas.(Van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008)

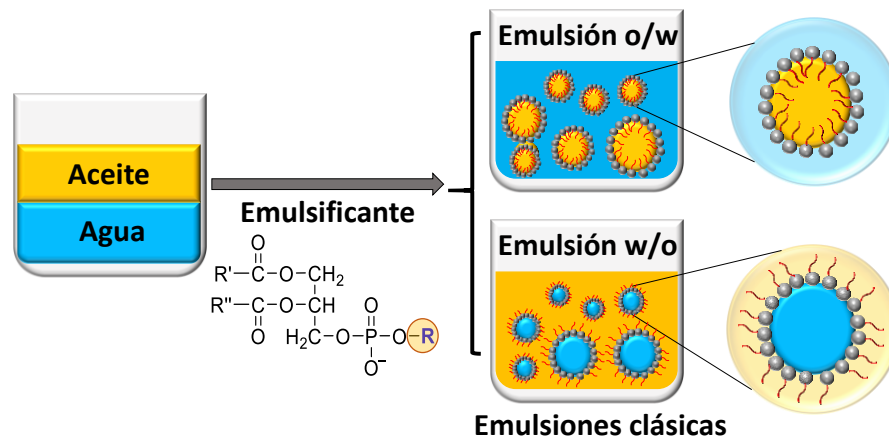


Figura 5. Emulsiones formadas por la adición de un emulsificante anfifílico.

3. Extracción y Caracterización de los PLs Contenidos en Granos de *Theobroma cacao* L. (Var. CCN 51)

3.1 Introducción

La manteca de cacao conforma la fracción más abundante en el grano de cacao (45-57 %). Esta fracción está compuesta por triacilglicéridos (TAG), particularmente por POP (glicerol-1,3-dipalmitato-2-oleato), POS (glicerol-1-dipalmitato-2-oleato-3-estearato) y SOS (glicerol-1,3-diestearato-2-oleato). Estos compuestos alcanzan entre 92 y 96% p/p de la composición total de la manteca de cacao. En menor proporción se encuentran los esteroides (metilesteroides, desmetilesteroides y triterpenos), vitamina E (β -tocoferol, α -tocoferol y γ -tocoferol), ácidos grasos libres (ácido esteárico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido linoléico), y fosfolípidos (PLs). (Jahurul et al., 2013; Lima et al., 2011; Siouffi, 2000; Su-Jia et al., 2013; Torres-Moreno et al., 2015)

El interés en el análisis PLs aumenta continuamente debido a sus propiedades anfifílicas que les permiten su uso como emulsificantes naturales. (Katepalli, 2014; Marto et al., 1995; Parsons, Keeney, & Patton, 1969; Su-Jia et al., 2013; Van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008) Las mezclas de PLs, distribuidas comercialmente como lecitinas, son extraídas actualmente de semillas de soya, girasol y canola y se usan como emulsificantes en procesos industriales de formulación de alimentos, cosméticos, y fármacos, entre otros. (Benjamin Caballero, 2003; Lima et al., 2011; Ontiveros et al., 2014; Torres-Moreno et al., 2015; van Nieuwenhuyzen, 2010; Van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008) Las lecitinas vegetales comerciales contienen predominantemente PC, PE, PI, PA y cantidades menores de LPC y otros PLs de glicerol con ácidos grasos complejos. Estas moléculas han sido considerablemente estudiadas desde los 60's.

En general, se reportan diferentes técnicas para su análisis como la cromatografía en columna, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), cromatografía de placa delgada (TLC), espectrometría de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (RMN). (Fuchs et al., 2007; Knochenmuss, 2014; Parsons et al., 1969; Pulfer & Murphy, 2003; J. Schiller et al., 2004; Jürgen Schiller et al., 2007)

En esta línea, Parsons y colaboradores fraccionaron los lípidos presentes en tres variedades comunes de grano de cacao provenientes de Costa Rica, Ghana y Brasil, en compuestos neutros, glicolípidos y PLs. Esta última fracción, correspondiente al 30% de la mezcla total, se sometió a cromatografía en capa fina bidimensional encontrándose LPC, PC, PE y PI como componentes principales. Finalmente, se determinó que del 36 al 40% p/p de los PLs presentes en los granos de cacao corresponden a fosfatidilcolina. (Parsons et al., 1969) Por su parte, Larsen *et al.* diseñaron un procedimiento de enriquecimiento selectivo de péptidos fosforilados usando microcolumnas de TiO_2 y péptidos en ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), este procedimiento fue extendido por Calvano *et al.* para el análisis de PLs contenidos en productos lácteos y estándares de PLs. En ambas investigaciones se concluyó que la inclusión de DHB aumentó drásticamente la selectividad del enriquecimiento de compuestos fosforilados usando como fase estacionaria TiO_2 , dicha selectividad fue atribuida a la competencia entre el DHB y compuestos no fosforilados por los sitios de unión activos en la fase estacionaria. (Calvano, Jensen, & Zambonin, 2009; Larsen et al., 2005)

La espectrometría de masas es una poderosa herramienta en términos de sensibilidad, especificidad y precisión, para el análisis cualitativo y semicuantitativo de mezclas complejas de PLs. (Fuchs et al., 2009, 2007; Larsen et al., 2005; Petković et al., 2001; Raffaelli & Saba, 2003; J.

Schiller et al., 2004; Tobergte & Curtis, 2013) Diversos autores muestran resultados eficientes en el análisis de PLs en concentraciones incluso en el orden de los nanogramos.(Fuchs et al., 2009, 2007; Li, Gross, & Hsu, 2005; J. Schiller et al., 2004; Jürgen Schiller et al., 2007) Los métodos más reportados en la literatura para el análisis de lípidos y PLs son ionización por electrospray (ESI) y ionización desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), acopladas a varios analizadores de media y alta resolución.(Fuchs et al., 2007; Jürgen H. Gross., 2004; Kim et al., 1994; Pulfer & Murphy, 2003)

En este aspecto, Yong Kim *et al.* Obtuvieron PLs a partir de una mezcla estándar de lípidos, usando HPLC en fase reversa. Este extracto fue analizado usando una fuente de ionización por ESI en modo ion positivo y se observaron en el espectro señales correspondientes a especies moleculares protonadas, donde la PC fue la más abundante seguida de la PE y la PS.(Kim et al., 1994) Fuchs *et al.* presentan resultados similares del análisis de una mezcla de PLs usando MALDI-MS, en este caso el extracto fue aislado de la yema de huevo usando HPTLC (CHCl_3 , CH_3OH , etanol, agua y trietilamina (35:35:7:35 v/v)), al igual que en el anterior reporte se detectaron mayoritariamente PC y PE, y con abundancias menores LPC, LPE, PS y PI.(Fuchs et al., 2007)

Por otro lado, Schiller y colaboradores usaron también MALDI-MS para el análisis de fosfatidilcolinas, con ácido 1,5-dihidroxibenzoico como matriz orgánica, detectándose iones moleculares correspondientes a la familia de las PCs con diferentes ácidos grasos como sustituyentes (palmítico, oleico, esteárico, etc.).(J Schiller et al., 1999) Usando también espectrometría de masas MALDI acoplada a un analizador TOF, Marijana Petkovic *et al.* reportan

iones moleculares de los productos de digestión con fosfolipasa A₂ de mezclas provenientes de tejidos y células vegetales, se observaron PC, LPC, PS, PE, y PI antes y después de la digestión. Adicionalmente se concluyó que las señales de la PC y la LPC impidieron la detección de otros PLs presentes en algunas de las mezclas analizadas incluso si estos PLs están presentes en cantidades comparables. (Petković et al., 2001)

Teniendo en cuenta que el uso de una matriz orgánica eficiente que asista adecuadamente el proceso de ionización de los PLs es crucial para la detección de estas biomoléculas mediante MALDI-MS, las matrices mayormente usadas para este fin son: ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), ácido sinapínico, para nitro anilina (PNA). (J. Schiller et al., 2004) En este campo el DHB se presenta como la matriz más eficiente en el análisis de PLs siendo reportado por diversos autores con resultados de buena calidad en términos de abundancia y resolución de las señales en el espectro de masas. (Larsen et al., 2005; Li et al., 2005; Jürgen Schiller et al., 2007)

Por su parte, la RMN de ³¹P es una técnica utilizada para el análisis cuantitativo de PLs en muestras complejas con eficientes resultados, debido a la alta selectividad del método y a la alta abundancia de este isótopo del fósforo ³¹P (100%). (Cremonini et al., 2004; Edzes et al., 1992; J. M. Gould et al., 2016; London & Feigenson, 1979; Rouser et al., 1966; Sotirhos et al., 1986; Van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008) Usando esta técnica, Cremonini *et al.* cuantificaron PL y LPL (lisofosfolípidos) en 10 muestras de lecitina comercial con una mezcla de solventes conformada por dimetilformamida, trietilamina e hidrocloreuro de guanidinio denominada CUBO, estos autores reportan a campo alto con un desplazamiento químico de 0.0 ppm PC, hacia campo bajo también

se observaron señales correspondientes a PDE (*N-N* fosfatidiletanolamina), LPC, PE, PI, PG y finalmente el PA a campo más bajo.(Cremonini et al., 2004)

En este trabajo presentamos una completa caracterización de TAGs y PLs provenientes de granos de cacao colombianos (Var. CCN51). Inicialmente se realizó la extracción L/S de las grasas del grano seco de cacao usando un montaje Soxhlet, seguidamente se hizo un proceso de pre-enriquecimiento con cromatografía de columna usando SiO₂ como fase estacionaria. La identificación de fracciones enriquecidas en PLs se realizó usando HPLC en fase normal con dos detectores UV-VIS y RI. Posteriormente se realizó la caracterización molecular usando espectrometría de masas MALDI con un analizador TOF y finalmente para la cuantificación de PLs presentes en las mezclas se tomó ventaja de la selectividad de la técnica RMN-³¹P. Este completo protocolo de caracterización provee la información composicional cuali- y cuantitativa necesaria para interpretar el comportamiento de las fracciones de PLs en procesos de formulación y análisis de estabilidad de emulsiones, tal y como se muestra en el Capítulo III.

3.2 Metodología

Materiales y reactivos

Cloroformo (CHCl₃), metanol (MeOH), tetrahidrofurano (THF), *n*-hexano, acetonitrilo (ACN), 2,5 ácido dihidroxibenzoico (DHB), hidrocloreuro de guanidinio, ácido trifluoroacético (TFA), heptano (*n*-C₇), isopropanol (IPA), tributilfosfato (TBP), trietilamina (TEA), dimetilformamida (DMF), hidrocloreuro de guanidinio (GH⁺), L- α - fosfatidilcolinas proveniente del grano de soya (>99 %), ácido- α -4 cianohidroxicinámico (α -CHCA), bradiquinina, bombesina y sustrato de renina fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). Todos los reactivos son grado

analítico (99.5 %). La sílica gel (SiO_2 con tamaño de poro de 60 Å y partículas de 60-200 mesh) fue adquirida en Merck Millipore (Darmstadt, Germany). Los granos de cacao (Var. CCN51) fueron suministrados por Nextcoa SAS y las lecitinas de soya, de girasol y el aceite de girasol empleados como referencias se adquirieron comercialmente.

Extracción de los fosfolípidos del grano de Theobroma cacao L (var CCN51).

Para la extracción de la manteca de cacao 20 g de granos de cacao (*Theobroma cacao* L var. CCN51) macerados se introdujeron en un dedal de celulosa que fue puesto en un equipo de extracción Soxhlet utilizando 300 mL de una mezcla de cloroformo/metanol ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1 (% v/v)) como solventes de recirculación durante 12 horas, la fracción lipídica (FL) se obtuvo luego de rotoevaporar a sequedad la mezcla de solvente, el porcentaje de manteca extraído fue de 8 ± 0.5 g. Esta fracción se llevó a un proceso de pre-enriquecimiento en fosfolípidos usando una columna en fase normal de 2x15 cm con ~300 g de sílica gel (SiO_2 con tamaño de poro de 60 Å y partículas de 60-200 mesh) como fase estacionaria y una serie eluotrópica conformada por CHCl_3 (~200 mL), seguido de acetona (~200 mL) y finalmente metanol (~200 mL), la sub-fracciones obtenidas fueron rotuladas como F1, F2 y F3, con porcentajes de recuperación frente a la fracción FL del 34%, 58% y 2%, respectivamente; el 6% de material restante quedó retenido en la sílica.

Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detectores UV y RI

Tanto la fracción lipídica completa (FL) como las sub-fracciones F1, F2 y F3 se analizaron por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) usando una columna de fase normal (Apex cyano 5u, New Road, Hengoed, Mid Glam, CF8 8AU). Inicialmente, se realizaron los ensayos usando un detector UV ($\lambda = 210$ nm) con fase móvil heptano/isopropanol ($n\text{-C}_7/\text{IPA}$) en una proporción

(98:2 % v/v) y flujo de 0.7 mL/min, las muestras se prepararon a una concentración de 10 mg/mL y el volumen inyectado en cada ensayo fue de 10 µL. Bajo las mismas condiciones se realizaron ensayos usando un detector de índice de refracción (RID), las muestras se inyectaron con una concentración de 20 mg/mL. También fueron analizadas muestras comerciales de lecitinas de soya (LS), lecitina de girasol (LG), aceite de girasol (AG) y el estándar de L- α - fosfatidilcolina (> 99%).

Preparación de muestras para espectrometría de masas MALDI-TOF

La fracción lipídica completa (FL), las sub-fracciones (F1, F2, F3), muestras comerciales de lecitinas de soya y de girasol, aceite de girasol y L- α - fosfatidilcolina (> 99%) se sometieron a análisis por espectrometría de masas en un instrumento MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) equipado con un láser de Nd:YAG (355 nm). Las muestras fueron analizadas usando 1 mg/mL de cada fracción diluidos en una mezcla THF:MeOH (1:1) (Solución 1). Como matriz de transferencia catiónica se usó el DHB, se preparó una solución saturada en una mezcla ACN:H₂O (1:1) +1% de ácido trifluoracético (TFA) (Solución 2). Se tomaron 10 µL de solución 1 y 2, la mezcla se llevó al vórtex a 700 rpm durante 30 minutos. Finalmente, se colocó 1 µL de cada mezcla matriz:analito en el portamuestra metálico. Se obtuvieron espectros en el rango de masas desde m/z 400 a 1000. El analizador de tiempo de vuelo (TOF) operó en modo reflectrón positivo. Como mezcla de calibración se usaron clusters de α -CHCA y una mezcla de péptidos estándar: bradiquinina, bombesina y sustrato de renina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

Preparación de muestras para cuantificación de PLs por RMN ³¹P

20 mg de cada muestra con contenido de PLs fue disuelta en una mezcla de solventes denominada CUBO reportada anteriormente por Cremonini *et al.*, (Cremonini et al., 2004) esta

mezcla está conformada por DMF (76% v/v), TEA (24% v/v) e hidrocloreuro de guanidinio (100 mg por cada mL de mezcla), cada muestra diluida se sometió a ultrasonido durante 30 minutos. La concentración de PLs en las muestras se determinó por medio de curvas de calibración con adición de estándar a partir de soluciones de PLs (LS, LG, F3) disueltas en CUBO a las cuales se les adicionó 0, 0.25, 0.50, 0.75 y 1 μ L de TBP (99% v/v), respectivamente. Los espectros de RMN fueron obtenidos en un equipo Bruker Avance III spectrometer el cual fue operado bajo las siguientes condiciones: SW 40760 Hz, SI 32 k, PW 10 μ s, AQ 0.8 s, NS 512. Para el procesamiento de los datos de RMN se usó el software MestreNova 19.2.5.

3.3 Resultados y Discusión

El proceso de extracción de fosfolípidos provenientes de una fracción lipídica del grano de cacao es mostrado en el esquema de la figura 6, en donde se contempla como primer paso la obtención de la fracción lipídica usando una mezcla cloroformo/metanol (2:1) en un equipo de extracción Soxhlet en donde el porcentaje extraído corresponde al 40% del peso total del material de partida. Esta fracción, rotulada como FL, está compuesta por grasas conocidas comúnmente como manteca de cacao y contiene principalmente triacilglicéridos (TAG) en un porcentaje aproximado del 97%, y en menor proporción: esteroides, vitamina E, ácidos grasos libres, glicolípidos y fosfolípidos (PLs). La fracción FL fue posteriormente fraccionada usando cromatografía en columna con SiO₂ como fase estacionaria, de este proceso se obtuvieron tres fracciones usando acetona, cloroformo y metanol como solventes de elución, las mezclas recolectadas fueron rotuladas como F1, F2 y F3, con porcentajes de rendimiento del fraccionamiento del 34% 58% y 2% frente a la fracción FL, respectivamente (figura 6a). Debido

a la alta solubilidad que presentan los aceites y grasas vegetales en acetona y cloroformo se espera que las sub-fracciones F1 y F2 estén enriquecidas en TAGs mientras que la sub-fracción F3 está compuesta por la fracción lipídica de mayor polaridad entre los que se espera confirmar la presencia de diferentes familias de fosfolípidos, esto debido a la polaridad que le otorga a estos compuestos la presencia del grupo fosfato en su estructura química. Por su parte, la figura 6b muestra los espectros UV-Vis donde se puede observar la similitud en las banda de absorción máxima ~ 210 nm tanto para los TAGs (aceite de girasol-AG) como para las lecitinas comerciales (LS y LG) y la sub-fracción F3 lo cual influye directamente los resultados de los experimentos HPLC-UV-Vis que se muestran en este documento.

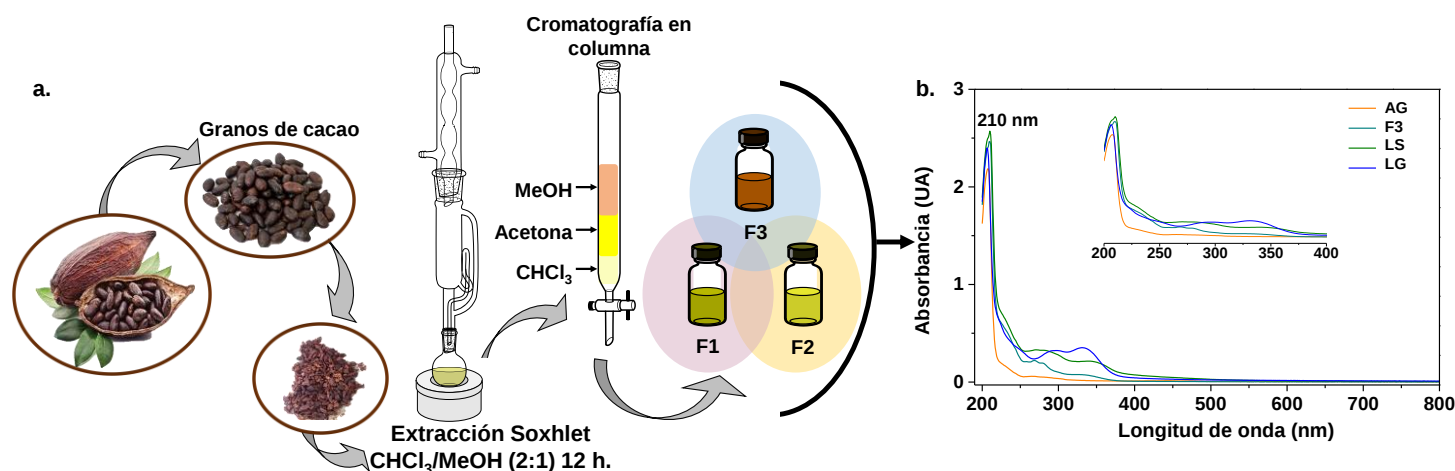


Figura 6. a. Proceso de extracción e identificación de fracciones enriquecidas en fosfolípidos presentes en granos de cacao, b. espectros UV-Vis AG, F3, LS y LG, respectivamente.

Cabe mencionar que en esta investigación se utilizaron lecitinas comerciales (de girasol y soya) como materiales de referencia para analizar los PLs de la manteca de cacao. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las lecitinas de soya y girasol no están compuestas solamente por PLs, pues como productos comerciales contienen además TAGs, PLs, carbohidratos, glicolípidos y carotenoides.(van Nieuwenhuyzen, 2010) Estas lecitinas, también llamadas fosfatidilcolinas, ampliamente usadas en la industria alimenticia como emulsificantes, contienen un alto porcentaje de TAGs pues se les adicionan aceites vegetales con el objetivo de disminuir la viscosidad del producto y facilitar su uso en formulaciones industriales.(van Nieuwenhuyzen, 2010) Por esta razón, antes de los análisis instrumentales las muestras de lecitinas comerciales fueron sometidas a cuatro lavados secuenciales con acetona, con el fin de eliminar la mayor cantidad de TAGs. El análisis gravimétrico de la fracción remanente de los lavados mostró que las lecitinas de soya y girasol contienen ~40% de compuestos no solubles en acetona correspondientes en su mayoría, según el proveedor, a PLs. La fracción de PLs aislada de las lecitinas de soya y girasol es la que se menciona, como lecitinas de soya (LG) y girasol (LG), en la caracterización usando HPLC y

espectrometría de masas mostradas en los siguientes experimentos como material de referencia para el análisis de los PLs presentes en la manteca de cacao.

Después de su aislamiento, la fracción lipídica (FL) y las sub-fracciones (F1, F2, F3) del grano de cacao fueron analizadas usando cromatografía de alta eficiencia (HPLC). En la Figura 7 se muestran los perfiles cromatográficos de las cuatro muestras, más los perfiles de muestras comerciales de aceite de girasol (AG), lecitina de soya (LS), lecitina de girasol (LG), y el estándar de L- α - fosfatidilcolinas (PC). Los resultados de la Figura 7a, correspondientes al detector UV-Vis, permitieron establecer que el proceso de separación de la fracción lipídica (FL) del grano de cacao mediante cromatografía en columna fue eficiente puesto que las sub-fracciones F1 y F2 difieren significativamente del perfil de la sub-fracción F3, y esta a su vez presenta gran similitud, tanto en los tiempos de retención como en la forma del pico cromatográfico, al de la lecitina de soya, lecitina de girasol y al estándar de L- α - fosfatidilcolina.

La longitud de onda de trabajo del detector UV-vis (λ 210 nm) en los análisis HPLC es muy cercana a la longitud de onda de corte (*cut-off*) de la fase móvil, por lo que los cromatogramas presentan una línea base elevada y con bastante ruido de fondo (Figura 7a). Por esta razón, las muestras también se sometieron a análisis HPLC usando un detector universal (índice de refracción, RID) con el fin de confirmar las observaciones hechas con el detector UV-vis. La figura 7b muestra que los perfiles cromatográficos HPLC-RID ofrecen resultados complementarios a los obtenidos con el detector UV-Vis. Inicialmente, con el pico cromatográfico alrededor de 5 minutos se confirma la presencia de TAGs en todas las muestras analizadas, excepto en la fracción F3 y en el estándar de fosfatidil colina. La señal correspondiente a los TAGs en la muestra FL está

ligeramente corrida a T_r más bajos que las demás, lo que indica interacciones más débiles con la fase estacionaria de la columna (sílica con grupos CN en la superficie), y más fuertes con la fase móvil apolar, debido a la naturaleza saturada de los TAGs presentes en la manteca de cacao, en comparación con TAGs provenientes de los aceites de soya y girasol que son más insaturados. También es de interés destacar que, a pesar de la limpieza con acetona de las muestras de lecitinas comerciales, aún hay TAGs remanentes en estas muestras.

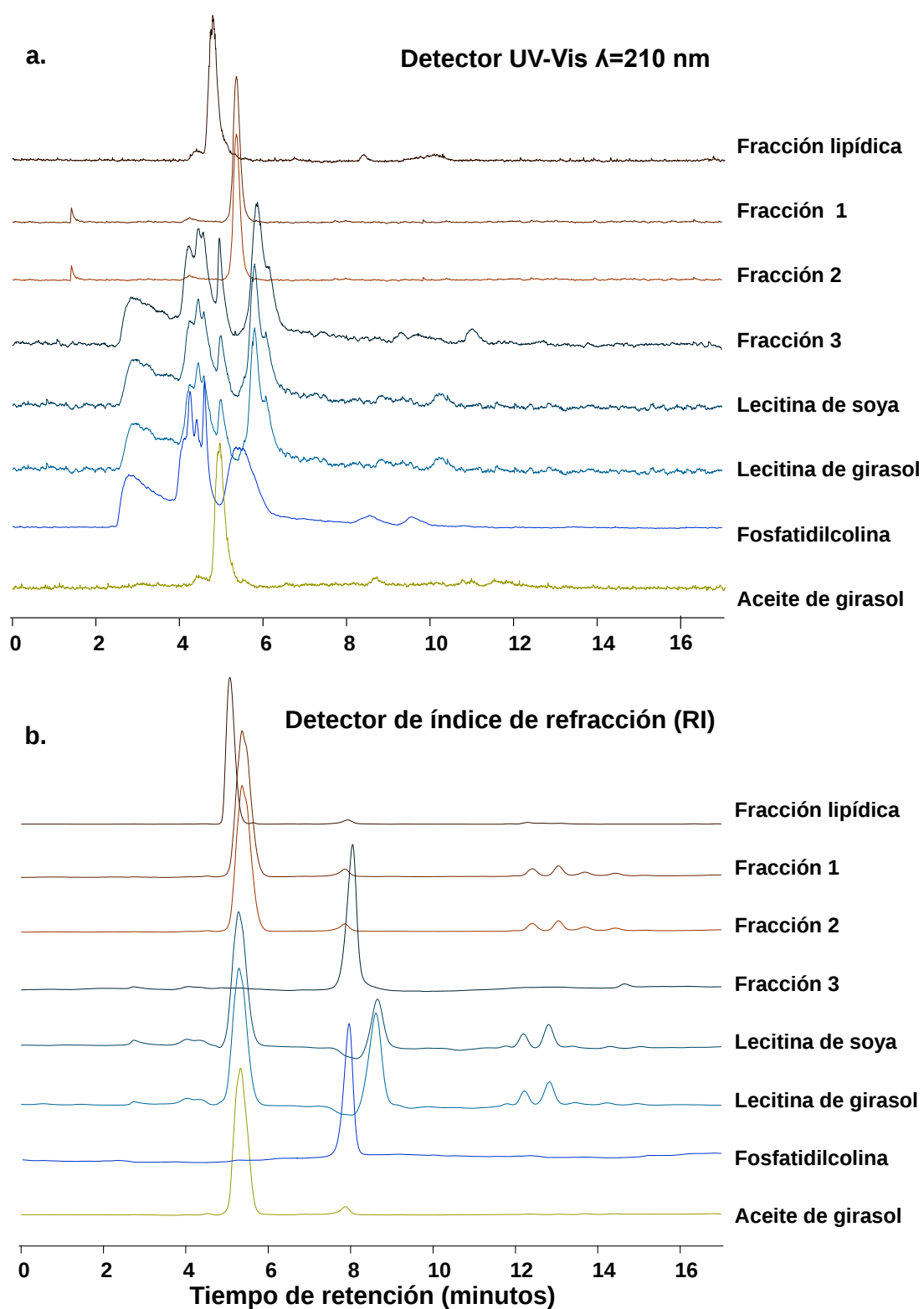


Figura 7. Cromatogramas obtenidos por medio de HPLC con **a.** detector UV-Vis **b.** detector de

índice de refracción, para las fracciones de manteca de cacao y fosfolípidos aisladas de granos de cacao mediante extracción Soxhlet (FL) y cromatografía en columna (F1, F2 and F3), se incluyen (por comparación) los análisis de las lecitinas de soya (LS), girasol (LG) y aceite comercial de girasol (AG) y el estándar de L- α - fosfatidilcolinas (PC).

Por otra parte, en la Figura 7b la señal alrededor de 8 minutos coincide entre la muestra F3, y el estándar de fosfatidilcolina, lo que corrobora la presencia de PLs en la fracción F3 proveniente de la manteca de cacao. Las muestras LS y LG también muestran señales correspondientes a PLs, pero corridas a T_r mayores que la del estándar de fosfatidilcolinas, este comportamiento indica una interacción preferencial de estos fosfolípidos con la fase estacionaria (polar) lo cual tiene sentido pues los lípidos presentes en los PLs provenientes de soya y girasol son más insaturados que los presentes en la sub-fracción F3 de la manteca de cacao. Estos análisis además de permitir la identificación de la fracción enriquecida en PLs también muestran la importancia del proceso de fraccionamiento ya que al comparar la fracción FL con las sub-fracciones se hace evidente que el proceso de pre-enriquecimiento usando cromatografía en columna es indispensable para poder observar PLs los cuales no son detectables en la fracción lipídica completa.

Análisis espectrométrico de PLs

Los análisis de HPLC, con los detectores UV-vis y RI, permitieron establecer que la fracción lipídica completa FL, y las sub-fracciones F1 y F2 aisladas del grano y la manteca de cacao, respectivamente, están enriquecidas en TAGs. También, que la sub-fracción F3 y las muestras LS y LG (lecitinas de soya y girasol a las que se les extrajeron los TAGs con lavados con acetona) están enriquecidas en PLs. Todas las muestras (enriquecidas en TAGs y PLs) fueron sometidas a

análisis por espectrometría de masas usando una fuente de ionización MALDI y un analizador de tiempo de vuelo (TOF), como matriz orgánica se usó el ácido 2,5 dihidroxibenzoico (DHB). El DHB se seleccionó debido a que ha sido ampliamente reportado para el análisis de biomoléculas con eficientes resultados en procesos de ionización por transferencia protónica y catiónica, incluyendo la ionización de PLs.(Petković et al., 2001; J. Schiller et al., 2004) El protocolo de análisis de PLs por la técnica MALDI-TOF se ilustra en la Figura 8.

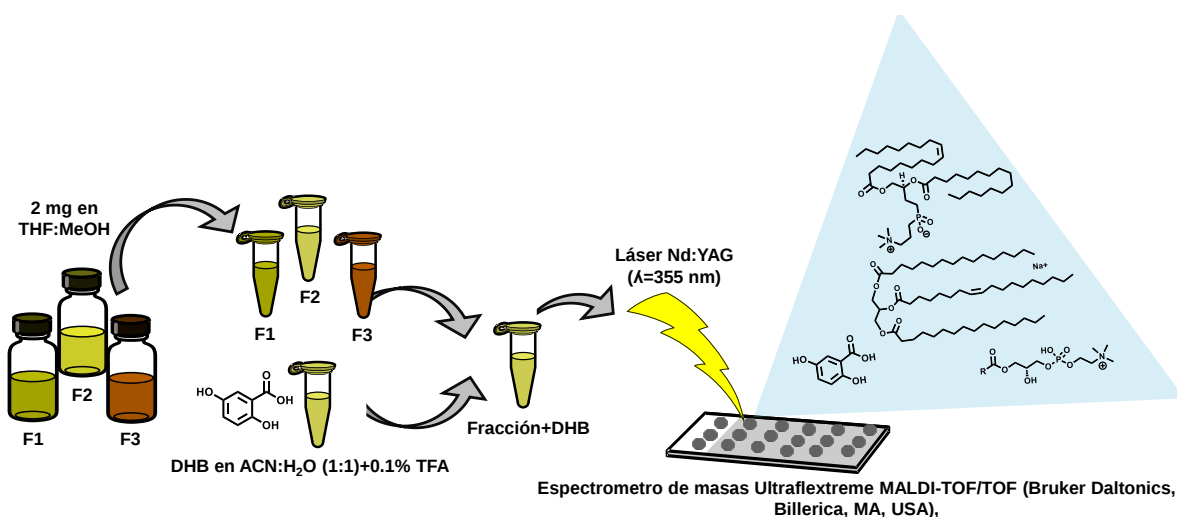


Figura 8. Preparación y análisis de muestras usando espectrometría de masas MALDI-TOF.

La Figura 9 muestra los espectros de masas MALDI-TOF para la fracción lipídica completa extraída de granos de cacao (FL), las sub-fracciones F1 y F2, y una muestra comercial de aceite de girasol. En todos los espectros, los iones observados corresponden a moléculas protonadas y a aductos de sodio, estos aductos son formados por procesos de transferencia catiónica, o preformados directamente en la solución por interacciones entre los abundantes átomos de oxígeno en TAGs y cationes de Na. Como se puede observar en la figura las fracciones FL, F1 y F2 se encuentran enriquecidas en TAGs como POP, POS y SOS. Por su parte, el aceite de girasol

muestra la presencia de TAGs conformados por ácidos grasos insaturados como OPL, OLL, OOL. Las señales correspondientes a los TAGs detectados en los espectros de masas se reportan en la Tabla 1. Adicionalmente, la Figura 9 muestra los patrones isotópicos para las fórmulas moleculares de las estructuras propuestas para las respectivas relaciones m/z analizadas en los espectros. Es importante resaltar que las abundancias de los iones detectados se encuentran en el orden de 10^4 para las señales alrededor de m/z 900.

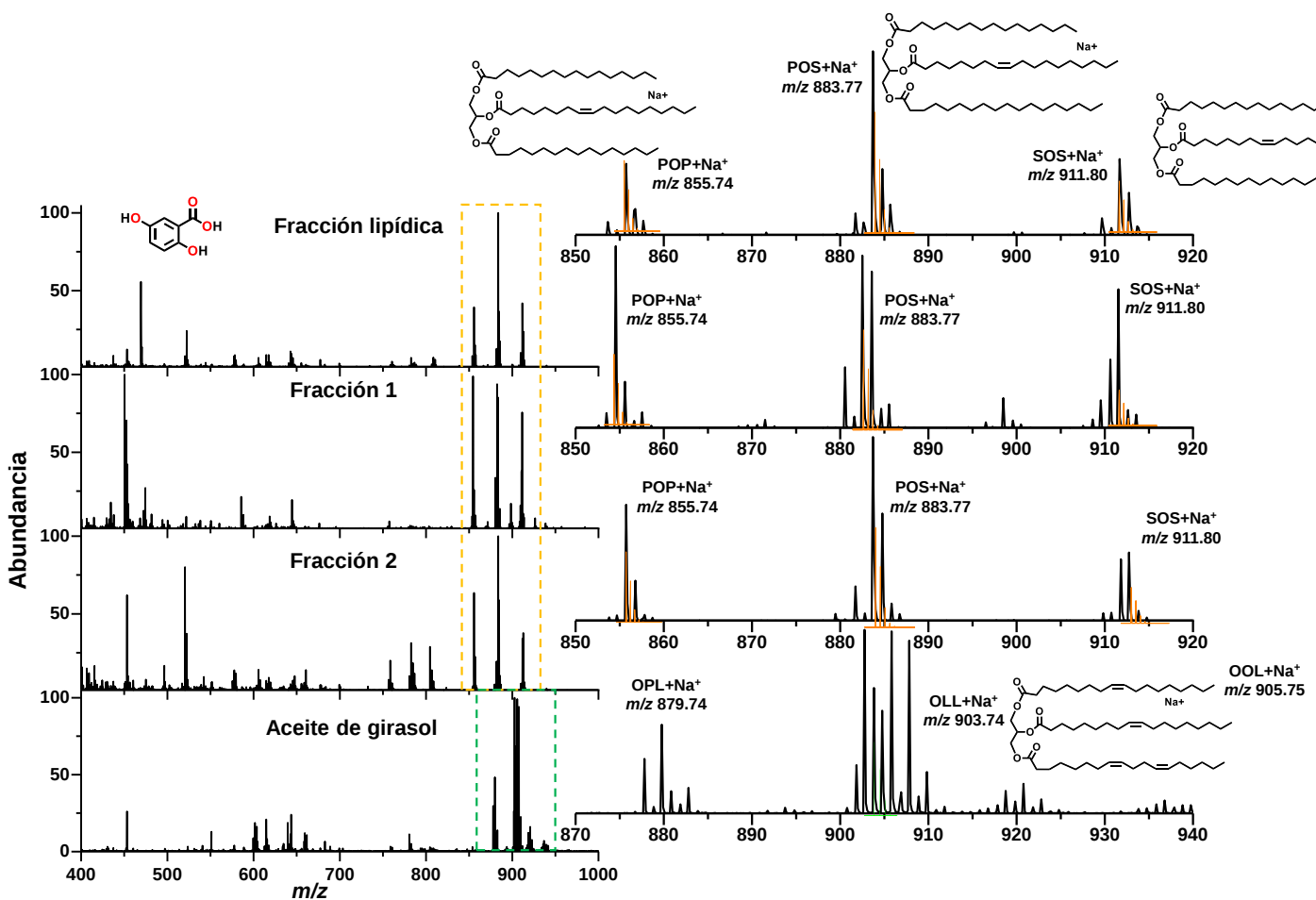


Figura 9. Espectro MALDI-TOF de las fracciones enriquecidas en TAGs: fracción lipídica (FL), sub-fracción F1, sub-fracción F2 y aceite de girasol (AG), al lado izquierdo espectros de masas en el rango m/z 400-1000, en frente patrones isotópicos para los TAGs más abundantes.

La Tabla 1 muestra las principales señales presentes en los espectros de masas MALDI correspondientes a TAGs, adicionalmente se reportan los tres ácidos grasos que los conforman, el número de átomos de carbonos y el número de insaturaciones que presenta cada molécula. Por ejemplo, el ion [POP (16:0, 18:1, 16:0)+Na⁺] corresponde al aducto de sodio del triacilglicérido conformado por dos residuos de ácido palmítico P y uno de ácido oleico O, estos ácidos grasos presentan 16 y 18 átomos de carbonos con 0 y 1 insaturación, respectivamente. Teniendo en cuenta la semejanza entre las estructuras de los diferentes TAGs detectados, sus eficiencias de ionización en MS también son similares. Estas similitudes permiten establecer que, y en concordancia con reportes de literatura, los tres TAGs más abundantes en manteca de cacao son POP, POS, SOS. Estos compuestos se detectaron en la muestra FL (fracción lipídica de los granos de cacao extraída con Soxhlet), y en las muestras F1, F2 que corresponden a la fracción apolar de lípidos eluidos en la columna de SiO₂. Adicionalmente, se confirma que los TAGs presentes en el aceite de girasol presentan ácidos grasos de mayor insaturación comparados con los presentes las fracciones de lípidos provenientes del grano de cacao.

Tabla 1
Asignación en el espectro de masas MALDI-TOF de TAGs presentes en las fracciones FL, F1, F2, and AG, respectivamente.

Ion	# Dobles enlaces	Masa exacta	Masa experimental	Error (ppm)	Fracción
[POP (16:0, 18:1, 16:0)+Na ⁺]	1	855.741	855.745	~4.7	FL, F1, F2
[POS (16:0, 18:1, 18:0)+Na ⁺]	1	883.772	883.777	~5.7	FL, F1, F2
[SOS (18:0, 18:1, 18:0)+Na ⁺]	1	911.803	911.808	~5.5	FL, F1, F2
[OPL (18:1, 16:0, 18:2)+Na ⁺]	3	879.741	879.743	2.3	AG
[OLL (18:1, 18:2, 18:2)+Na ⁺]	5	903.741	903.746	5.5	AG
[OOL (18:1, 18:1, 18:2)+Na ⁺]	4	905.756	905.758	2.2	AG
[OOO (18:1, 18:1, 18:1)+Na ⁺]	3	907.772	907.774	2.2	AG

En la Figura 10 se observan los espectros de masas de las fracciones que contienen PLs: sub-fracción F3, lecitina de soya (LS), lecitina de girasol (LG) y estándar de L- α -fosfatidilcolina (PC). Los espectros de masas muestran la presencia de señales entre $m/z \sim 400$ -850 correspondientes a diferentes grupos de fosfatidilcolinas y lisofosfatidilcolinas, tales como LPC (16:0), LPC (18:2), PC (18:2, 16:0), PC (18:1, 18:0), etc. La Figura 10 contiene también las estructuras de las fosfatidilcolinas más abundantes, junto con su patrón isotópico teórico calculado usando el software *Chemcalc* (Patiny, Luc; Borel, 2013), la coincidencia entre los patrones isotópicos teóricos y experimentales, permite asignar fórmulas moleculares a las señales del espectro de masas.

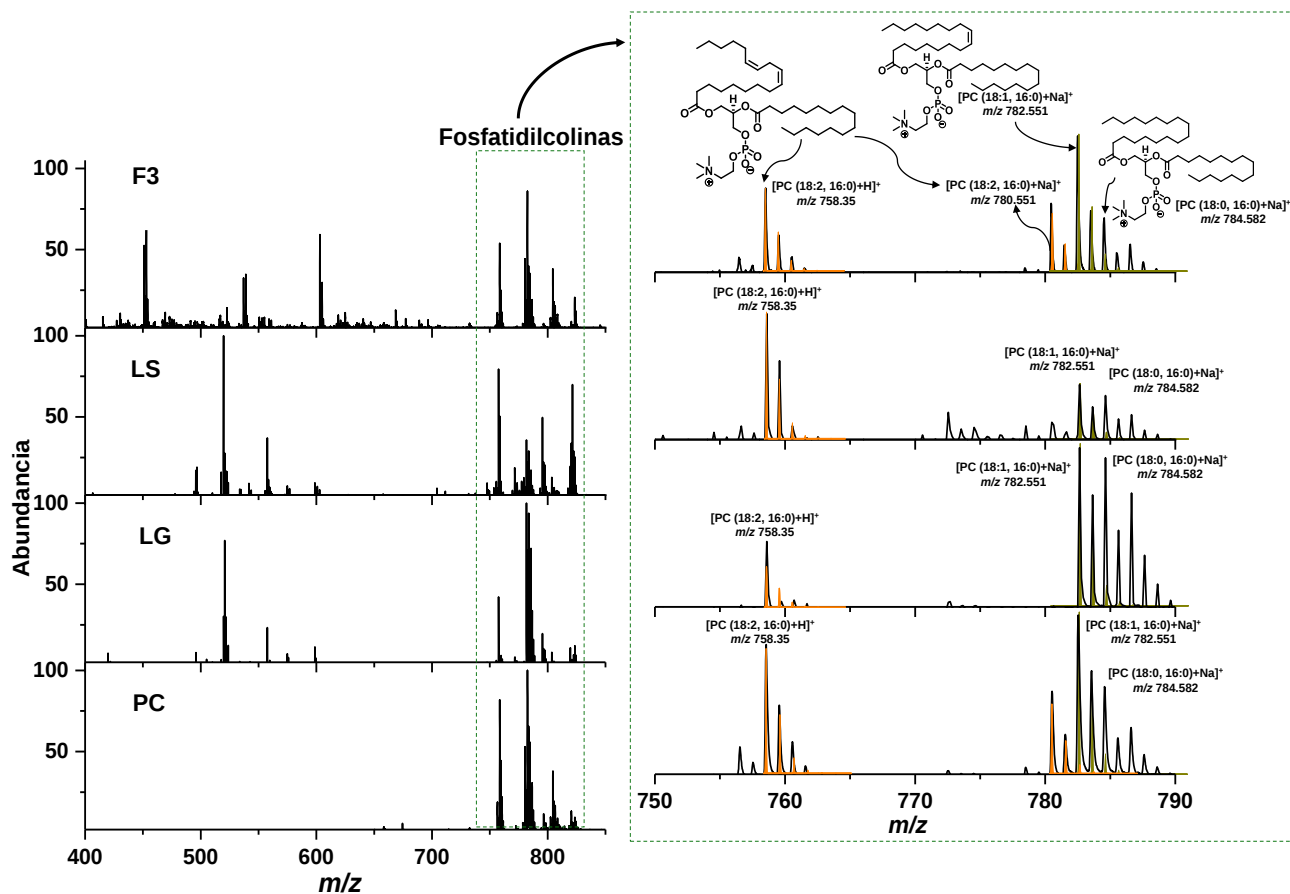


Figura 10. Espectro MALDI-TOF de las fracciones enriquecidas en PLs: fracción 3 (F3), lecitina de soya (LS), lecitina de girasol (LG) y L- α -fosfatidilcolina (PC), izq. espectros de masas en el rango m/z 400-1000, der. patrones isotópicos y estructuras de los PLs más abundantes.

Las señales correspondientes a PLs, asignadas según los espectros de masas, se encuentran reportadas en la Tabla 2 con sus respectivos errores. Las señales observadas corresponden a moléculas protonadas y aductos de sodio con errores en masas inferiores a 16 ppm. Las moléculas detectadas corresponden en su mayoría a fosfatidilcolinas las cuales se reportan según la abreviatura de la molécula unida al grupo fosfato; por ejemplo, PC (18:2, 16:0) hace referencia a un fosfolípido en donde los dos ácidos grasos presentes en la estructura corresponden a ácido linoleico y ácido palmítico y el grupo fosfato se encuentra enlazado a una molécula de colina. Este grupo de fosfolípidos llamados fosfatidilcolinas son reportados en diversos artículos como los PLs más abundantes en lecitinas. No se observan otros grupos de fosfolípidos, como fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilinositoles (PI), ácido fosfatídicos (PA), debido a su baja concentración en la muestra.(Petković et al., 2001)

Tabla 2

Asignación en el espectro de masas MALDI-TOF de PLs presentes en la sub-fracción F3, LS, LG y PC, respectivamente.

Ion	# Dobles enlaces	Masas exactas	Masas experimentales	Error (ppm)	Fracción
[LPC (16:0)+H ⁺]	0	496.339	496.331	16.1	F3, LS, LG
[LPC (18:1)+H ⁺]	1	522.355	522.350	9.6	F3, LS, LG
[PC (18:2, 16:0)+H ⁺]	2	758.569	758.565	5.3	F3, LS, LG, PC
[PC (18:1, 16:0)+H ⁺]	1	760.585	760.580	6.6	F3, LS, LG, PC
[PC (18:2, 16:0)+Na ⁺]	2	780.551	780.561	12.8	F3, LS, LG, PC
[PC (18:1, 16:0)+Na ⁺]	1	782.567	782.560	8.9	F3, LS, LG, PC
[PC (18:0, 18:0)+Na ⁺]	0	784.582	784.582	5.2	F3, LS, LG, PC
[PC (18:1, 18:0)+H ⁺]	1	788.616	788.619	3.8	F3, LS, LG, PC
[PC (18:0, 18:2)+H ⁺]	2	786.600	786.608	10.2	F3, LS, LG, PC
[PC (18:1, 18:0)+Na ⁺]	1	810.598	810.591	8.6	F3, LS, LG, PC

La cuantificación de PLs se realizó mediante resonancia magnética nuclear de fósforo (^{31}P RMN), es importante aclarar que estos experimentos se desarrollaron usando las lecitinas comerciales sin lavados con acetona y la sub-fracción F3 ya que estas fracciones no son solubles totalmente en las mezclas de solventes propuesta y la solubilidad mejora considerablemente usando las lecitinas sin previa purificación. Estas mediciones de RMN son de gran importancia debido a su selectividad por los núcleos de ^{31}P pues solo los compuestos que tienen átomos de fósforo se observan en el espectro. Por esta razón no existen interferencias por otros lípidos u otro tipo de compuestos presentes en las mezclas. La concentración de PLs en las muestras se determinó por medio de curvas con adición de estándar utilizando TBP como compuesto referencia. Las curvas de calibración se construyeron a partir de los datos de integración del área bajo la curva de las señales de PLs observadas en los espectros y de la concentración de TBP previamente conocida. Los desplazamientos químicos fueron asignados de acuerdo con Cremonini *et al.* (Cremonini et al., 2004), la señal correspondiente a la PC, a campo alto, se tomó como referencia con un valor de 0 ppm.

La Figura 11 muestra los espectros de RMN de ^{31}P de la lecitina de soya y el TBP añadido a diferentes concentraciones. La curva de calibración permitió establecer que la lecitina de soya y girasol comercial analizadas contienen un porcentaje del $27\pm 1.0\%$ y $24\pm 1.0\%$ de PLs, respectivamente. Estos valores están por debajo del porcentaje de compuestos insolubles en acetona que corresponde al $40\pm 2.0\%$ para ambas lecitinas. De esta forma se establece que el porcentaje de PLs en las lecitinas comerciales analizadas se encuentra por debajo del 40% puesto que los compuestos insolubles en acetona incluyen además de PLs, según reportes en la literatura, a carbohidratos, glicolípidos, y carotenoides, entre otros.

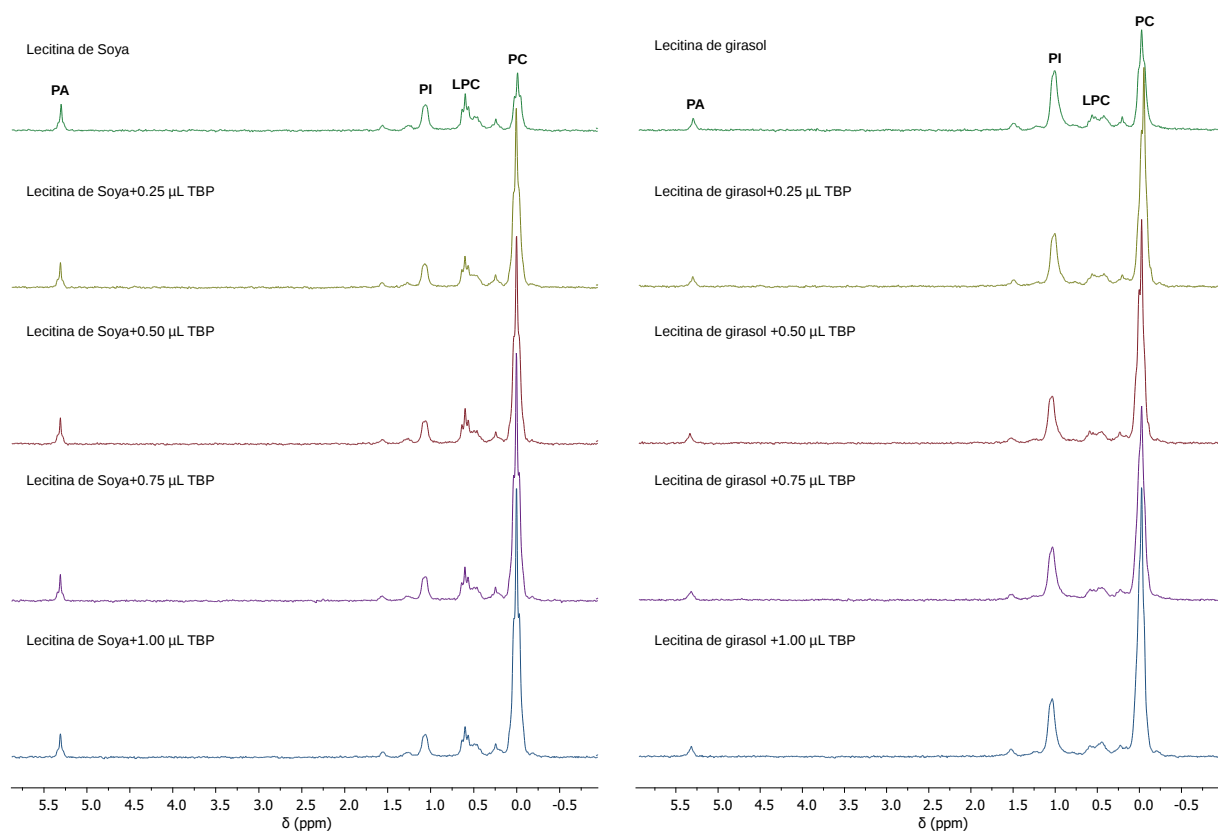


Figure 11. Espectros RMN- ^{31}P de lecitina de soya y lecitina de girasol, usando como estándar tributilfosfato (TBP).

En la Figura 12 se reportan los resultados obtenidos para la sub-fracción F3 en los análisis de ^{31}P -RMN, que complementan las conclusiones derivadas de los análisis de HPLC y espectrometría de masas. La ^{31}P -RMN muestra que la sub-fracción F3 contiene las siguientes familias de PLs: PA (12%), PG (13%), PI (20%), LPC (26%) y PC (29%), también se corrobora que la familia de PC son los compuestos de mayor abundancia en la muestra analizada.

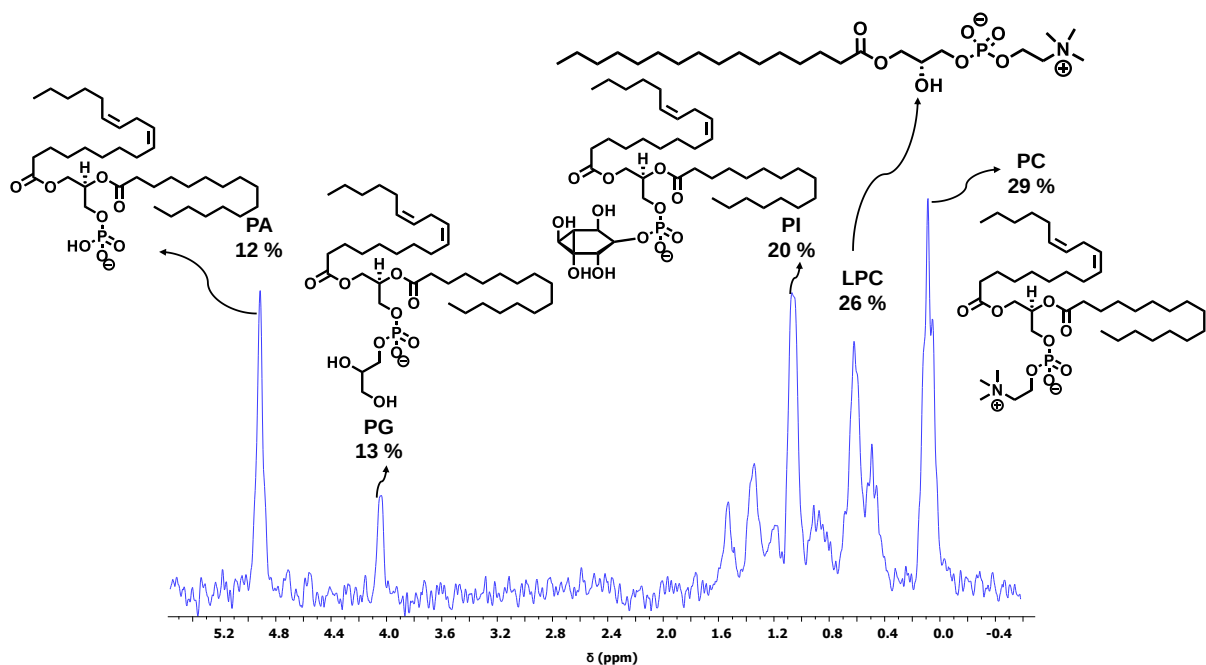


Figure 12. Espectro RMN- ^{31}P de extracto PLs del grano de cacao.

4. Evaluación de las propiedades emulsificantes de PLs contenidos en Granos de *Theobroma cacao* L.

4.1 Introducción

El estudio de la formación y la estabilidad de emulsiones son fundamental en el campo de los coloides y la ciencia interfacial debido a su gran aplicabilidad industrial. Una emulsión consiste en la mezcla de dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales se dispersa con cierta homogeneidad en el otro (en forma de gotas con ayuda de un emulsificante) de forma tal que es imposible detectar las fases dispersa y continua a simple vista. Las emulsiones de aceite y agua se pueden clasificar de acuerdo con la distribución espacial del aceite y la fase acuosa, de forma tal que la sustancia que forma gotas se denomina fase dispersa, discontinua o interna, mientras que la sustancia que forma el líquido circundante se llama fase continua o externa. Un sistema que consiste en gotas microscópicas de aceite dispersas en fase acuosa es llamado una emulsión de aceite en agua (o/w), por ejemplo, leche, crema, aderezos, mayonesa, bebidas, sopas y salsas. Por otra parte, productos como la margarina y la mantequilla son ejemplos de emulsiones agua en aceite (w/o) en donde las gotas de agua se encuentran dispersas en la fase oleosa.(Adamson & Gast, 1997; McClmenets, 2010; Tadros, 2005)

Los emulsificantes son moléculas o mezclas de moléculas anfifílicas, utilizadas para formular emulsiones estables, con capacidad de orientarse de acuerdo con las polaridades de las dos fases inmiscibles. Estructuralmente los surfactantes tienen una parte polar (hidrófila), con afinidad por fases acuosas, y una porción no polar (lipofílica) que puede interactuar con fases orgánicas (no

polares).(Cornier & Keck, n.d.; Santos, Trujillo-Cayado, Calero, Alfaro, & Muñoz, 2016; Sjöblom, 2001) Entre los emulsificantes más utilizados en la industria alimenticia se encuentran las lecitinas, que son mezclas complejas de fosfolípidos (PLs) y triacilglicéridos (TAGs) con pequeñas cantidades de carbohidratos, carotenoides, y glicolípidos. Las propiedades de actividad interfacial de los PLs dependen de características moleculares como tamaño del grupo polar y el tamaño y tipo/número de cadenas alifáticas. Estas características definen el parámetro de empaquetamiento (ϕ) que a su vez depende de área de superficie de las cabezas polares (a_0) y del volumen efectivo (V) ocupado por las colas polares de los PLs en la emulsión. En este sentido, las diferentes familias de PLs pueden formar una amplia gama de sistemas coloidales como micelas cilíndricas (lisofosfatidilcolinas), liposomas (fosfatidilcolinas), bicapas lipídicas (fosfatidiletaolaminas) y micelas invertidas (ácido fosfatídico). Consecuentemente, las propiedades de las emulsiones dependen intrínsecamente de las características moleculares y de la pureza de el/los compuestos emulsificantes.(Adamson & Gast, 1997; “Emulsions: making oil and water mix,” n.d.; Gunstone, 2008; Marti-Mestres & Nielloud, 2002; McClmenets, 2010) Las características interfaciales de un emulsificante pueden ser estudiadas mediante mediciones de ángulos de contactos (AC), cálculo del balance hidrofílico/lipofílico (HLB) y determinación de la concentración micelar crítica (CMC).

El ángulo de contacto, que mide el ángulo formado entre la superficie de un sólido y un líquido, depende de las fuerzas cohesivas del líquido y de las fuerzas adhesivas entre la superficie sólida y el líquido. El valor del ángulo de contacto (AC) permite inferir el tipo de fuerzas que prevalecen en el sistema y es una medida indirecta del grado de hidrofobicidad o hidrofiliidad del material sólido. Valores de AC entre 0° y 90°, con líquidos polares como el agua, indican alta mojabilidad

(superficies hidrofílicas), mientras valores entre 90° y 180° revelan baja mojabilidad (superficies hidrofóbicas). (Calderón-Vergara, Ovalle-Serrano, Blanco-Tirado, & Combariza, 2019; Kwok & Neumann, 1999; Zenkiewicz, 2007) Adicionalmente, mediante el cálculo de los AC de un sólido con varios líquidos de referencia es posible calcular el valor de la energía libre superficial (SFE) y de sus componentes polar y dispersiva. Estos parámetros son esenciales para el estudio de las propiedades interfaciales de sólidos como la adhesión y la mojabilidad. En esta línea, diversos investigadores han desarrollado metodologías para la determinación de SFE de diferentes materiales usando diferentes aproximaciones para resolver la ecuación de Young ($\gamma_s = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos \Theta$) en donde γ_{SL} es la SFE de la interfaz sólido-líquido y γ_s y γ_L es la SFE del sólido y del líquido, respectivamente y Θ el ángulo de contacto entre el sólido y el líquido. Esta ecuación describe las fuerzas en estado de equilibrio de las tensiones superficiales de las fases involucradas en la medición (gas, sólido, líquido). (Calderón-Vergara et al., 2019; Casillas-Ituarte & Allen, 2009; Zenkiewicz, 2007) Por ejemplo, Zenkiewicz *et al.* Muestra un estudio comparativo para la medición de SFE de diferentes sólidos usando 3 aproximaciones diferentes para la solucionar la ecuación de Young; estas aproximaciones corresponden a: Owens–Wendt (OW, conocido también como el método Kaelble), Oss–Chaudhury–Good (vOCG) y el método de Neuman, estos autores concluyen que los valores de SFE calculados con el uso de varios métodos presentan errores hasta del 21 % usando los métodos Neumann y vOCG mientras que entre la diferencia no supera el 3%, estos resultados permiten concluir que los errores encontrados no dependen solo de errores en las mediciones de AC sino también de los líquidos usados para determinar este valor. (Zenkiewicz, 2007) Combariza *et al.* también reporta el uso de otra aproximación matemática denominada Owens, Wendt, Rabel and Kaelble (OWKR) para la determinación de la SFE de materiales celulósicos antes y después de realizar modificaciones superficiales con grupos aminos, de esta

manera corroboran la hidrofobización que sufre la celulosa luego de modificarla con grupos aminos en la superficie.(Calderón-Vergara et al., 2019)

Es de gran utilidad determinar previamente las propiedades emulsificantes de una molécula anfifílica ya que de esto dependerá el tipo de emulsión o sistema coloidal que este tendrá la capacidad de formar, en este aspecto William Griffin presentó formalmente el concepto de HLB en un artículo publicado en el primer volumen del *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* donde afirmó: “*los emulsificantes consisten en una molécula que combina grupos hidrofílicos y lipofílicos y el equilibrio del tamaño y la fuerza de estos dos grupos opuestos se llama HLB. Por conveniencia, al saldo efectivo de estos grupos se le asigna un valor numérico*”. (Calderón-Vergara et al., 2019; Middleton, 1968; Ontiveros et al., 2014; Robbers, J.E; Bhatia, 1961; *The HLB Systema Time Saving guide to emulsifier selection*, 1980) Griffin asignó arbitrariamente valores de HLB teniendo en cuenta el grado de polaridad de los grupos funcionales de los surfactantes usados y estableció una escala de 1 a ~20, donde los valores bajos corresponden a compuestos lipófilos y a valores por encima de ~10 compuestos hidrofílicos. En particular, Orafidiya *et al.* calcularon los valores de HLB de aceites esenciales de eucalipto, lippia y menta (9.8, 12.1 y 12.3, respectivamente) en emulsiones preparadas con mezclas de emulsificantes de valores de HLB variables ya conocidos (span 80, tween 80).(Orafidiya & Oladimeji, 2002) Por otro lado, Calderon *et al.* hallaron el valor teórico de HLB para nanofibras de celulosa (TOCN) y nano fibras de celulosa oxidadas (TOCN-P) encontrando un aumento en el valor de 11.04 a 11.13 lo cual indica que el material adquirió mayor hidrofiliidad lo cual le otorga un comportamiento al material como emulsificante formador de emulsiones o/w según la escala de Griffin.(Calderón-Vergara et al., 2019) Adicionalmente, diversos autores han usado este concepto para determinar el grado de

hidrofobicidad/hidrofilicidad de materiales con resultados que apoyados en ensayos más técnicos han permitido confirmar la utilidad práctica de esta escala.(Middleton, 1968; Ontiveros et al., 2014; Pasquali, Sacco, & Bregni, 2009; Pasquali, Taurozzi, & Bregni, 2008; Robbers, J.E; Bhatia, 1961)

Como se discutió anteriormente, aunque las emulsiones son sistemas coloidales homogéneos a simple vista se pueden desestabilizar a través de diversos procesos termodinámicos como coalescencia, sedimentación, floculación, cremado, hasta la separación total o parcial de las fases acuosa/oleosa. Identificar el tipo de fenómeno dentro de los procesos de rompimiento de emulsiones es de gran importancia para el desarrollo de nuevos productos y para garantizar su estabilidad temporal, ante la humedad, y frente a cambios de temperatura y presión. Para el estudio de procesos de desestabilización de emulsiones en aplicaciones industriales existen diversos métodos en donde se destacan: separación gravitacional, dispersión dinámica de la luz (DLS), dispersión múltiple de la luz (MLS), resonancia magnética nuclear (RMN), dispersión de la luz electroforética (ELS), entre otros.(McClements, 2007) MLS, en particular, utiliza una fuente de infrarrojo cercano (NIR) ($\lambda=880$ nm) ampliamente usada en el estudio de la estabilidad de diversos sistemas coloidales, entre ellos emulsiones directas e inversas.(Dufour et al., 2010; Juyal, Ho, Yen, & Allenson, 2012; Kang, Guo, Fan, Meng, & Li, 2012; Zequan, Xue, & Qiang, 2014) Usando esta herramienta, Wanli Kang *et al.* estudiaron emulsiones sintéticas de crudos pesados con adición de un polímero y un surfactante comercial no mencionado, en donde gracias a los perfiles de cinética de estabilidad usando el BS de las mediciones, pudieron determinar que las emulsiones presentaron mayor estabilidad al aumentar la concentración de polímero/tensioactivo, en donde el polímero aporta elasticidad al sistema y el surfactante logra disminuir la tensión superficial de

manera eficiente.(Kang et al., 2011) Por otro lado, Santos *et al.* desarrollaron emulsiones a partir de N,N-dimetil decanamida (AMD-10)/D-limoneno y un surfactante no iónico derivado del grano de cacao (Levenol C-201TM) como surfactante para el potencial desarrollo de agroquímicos, los perfiles de luz retrodispersada o backscattering (BS) arrojados por los análisis MLS permitieron determinar que la presión adecuada para el proceso de microfluidización usado fue de 1034 bar, ya que bajo esta formulación se obtuvo una emulsión con ausencia de formación de cremado y una coalescencia baja.(Santos et al., 2016)

En resumen, este capítulo muestra los resultados de experimentos fisicoquímicos relacionados con la determinación de la capacidad emulsificante de PLs contenidos en granos de cacao (Var. CCN51). El extracto de PLs evaluado fue obtenido realizando un proceso de desgomado ácido de la manteca de cacao extraída originalmente mediante una extracción Soxhlet. La composición de los PLs producto del desgomado, por espectrometría de masas MALDI, es similar a la de la subfracción F3 reportada en el capítulo anterior. El extracto del desgomado ácido de la manteca de cacao y las lecitinas comerciales de soya y girasol se sometieron a ensayos para medir el valor de sus AC con respecto a agua y glicerol. También se evaluó el desempeño de estos materiales como emulsificantes en la formación y estabilidad de emulsiones modelo usando aceite de girasol, agua Tipo I. Los resultados de estabilidad permitieron demostrar la capacidad emulsificante de los extractos de PLs obtenidos de manteca de cacao son comparables con los resultados obtenidos usando lecitinas comerciales.

4.2 Metodología

Desgomado ácido de manteca de cacao

Para el proceso de desgomado ácido, a 100 g de manteca de cacao (obtenida por extracción Soxhlet (Hep-MeOH 2:1 v/v)) fundida a 70 °C se le agregaron 2 mL de una solución de ácido cítrico al 50 % p/p, la mezcla se sometió a agitación y calentamiento por 15 minutos y posteriormente se neutralizó usando una solución 0.1 M de NaOH hasta alcanzar un pH de 6.8. Luego, se adicionaron 5 mL de H₂O y se dejó en agitación durante 2 minutos para finalmente separar las fases por centrifugación a 5000 rpm 45 °C durante 30 minutos. La fase acuosa (sobrenadante) contiene el extracto de PLs. Este proceso es similar a los procesos patentados de purificación de aceites vegetales (soya, girasol, etc.) implementados en la industria para la eliminación de PLs y otros compuestos indeseables en el producto final.(4049686, 1985; 6441209 B1, 2002; WO2000034292A1, 2000)

Medición de ángulos de contacto

Las mediciones de ángulo de contacto (AC) se realizaron en un sistema de medición de ángulos de contacto Dataphysics OCA 15 EC, equipado con una cámara CCD video camera con una resolución de 752 x 582 megapíxeles y una jeringa dispensadora manual (MS) o electrónica ES/2-D. Como superficie sólida para depositar la muestra de PLs se utilizaron placas de vidrio las cuales fueron sometidas a un proceso de limpieza previa con una mezcla de H₂SO₄+H₂O₂ (3:1 v/v) durante media hora y se dejaron secar en un horno durante 24 horas a 40 °C. Posteriormente las muestras de lecitina de soya, lecitina de girasol y el extracto de PLs disueltas en Hep:IPA (98:2 v/v) a una concentración de 1 % p/v se pusieron sobre el vidrio utilizando el método *drop-casting*

para depositar una fina capa del material. Los ACs de las muestras se midieron con agua y glicerol, las imágenes obtenidas fueron procesadas usando el Software SCA 20.

Determinación de HLB

Este valor se determinó usando un método teórico y otro experimental propuesto por Griffin *et al.* Para la preparación de muestras se utilizaron dos emulsificantes industriales llamados Tween 80 y Span 80 con valor de HLB correspondientes a 15 y 4,3, se utilizaron diferentes proporciones de cada emulsificante para obtener valores de HLB intermedios (tabla 3). Posteriormente se prepararon emulsiones modelo usando 5% de emulsificantes usando cada una de las mezclas de preparadas a partir de Tween y Span. Por otro lado, se formaron emulsiones modelo usando las mismas condiciones anteriores usando LS, LG y PLs extraídos de granos de cacao.

Tabla 3

Mezclas de emulsificantes utilizadas para la determinación de HLB.

Muestra	Mezcla emulsificante		HLB calculado
	Span 80	Tween 80	
1	100%	-	4.30
2	87%	13%	5.69
3	68%	32%	7.72
4	48%	52%	9.86
5	28%	72%	12.00
6	6%	94%	14.35
7	-	100%	15.00

Preparación de emulsiones

Las emulsiones fueron preparadas usando aceite de girasol como fase oleosa, agua tipo I como fase acuosa y lecitina de soya/extracto de PLs como emulsificantes. Para asegurar la ausencia de PLs en la fase oleosa de la emulsión, se eliminaron las moléculas polares con actividad superficial

contenidas en el aceite comercial de girasol utilizando silicato de magnesio ($\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$, 4 % p/p) como adsorbente. La mezcla aceite: $\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$ se sometió a agitación en un vórtex a 800 rpm durante 30 minutos, el sólido con el contenido del materiales activos de superficie se eliminó por centrifugación a 2700 rpm 26 °C durante 30 minutos.

Las emulsiones modelo se prepararon utilizando diferentes proporciones de aceite/agua (60:40, 70:30 y 80:20) y de agente emulsionante (1 %, 2 % y 3 % p/p) (Figura 13). En todas las mezclas se utilizó azida de sodio NaN_3 (0.02 %) como agente antimicrobiano. Las mezclas aceite/agua/emulsificante se colocaron en un vial de 20 mL y se sometieron a radiación ultrasónica utilizando un generador de ultrasonido (Sonics Materials VCX-750-220, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) operado a una potencia de 750 Watts y frecuencia de 20 kHz, A:35 %, pulsos 5:5 segundos. El tipo de emulsión formada se estableció mediante ensayos de mojabilidad en agua y aceite. Todas las emulsiones preparadas se dispersaron fácilmente en aceite, por lo que se catalogan como w/o.

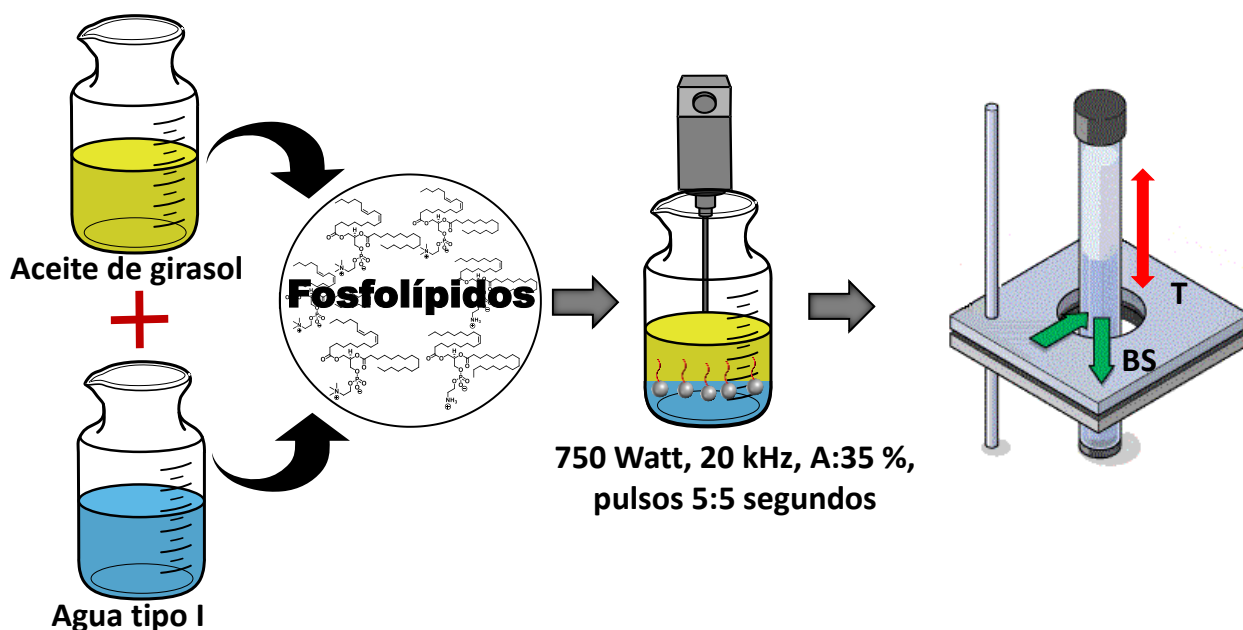


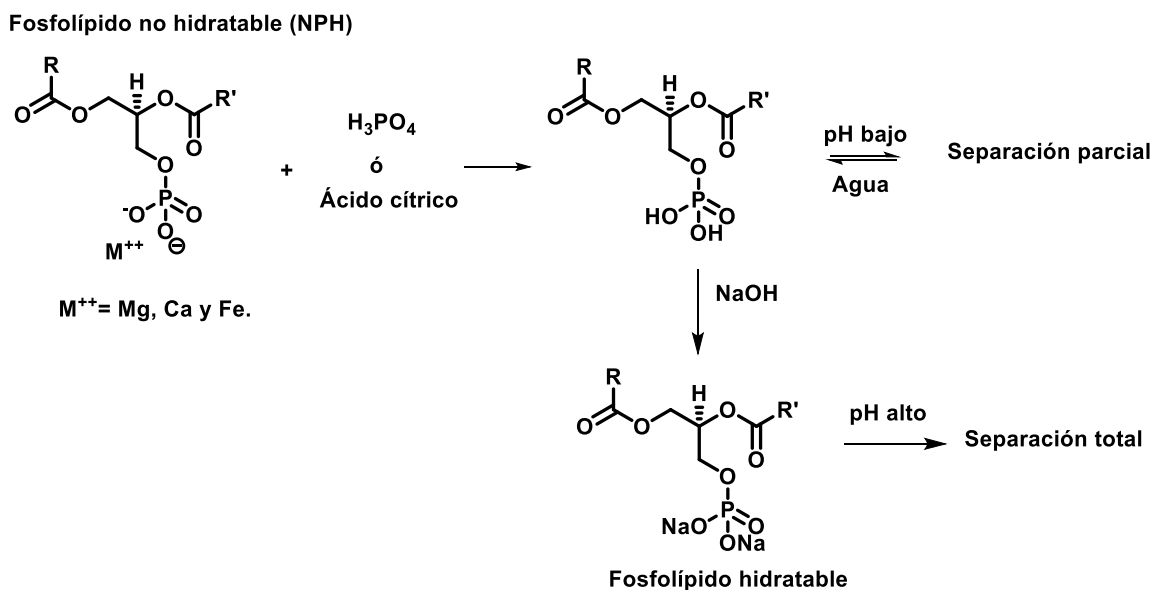
Figura 13. Preparación de emulsiones modelo.

Mediciones de estabilidad de emulsiones

Una vez formadas, las emulsiones se llevaron al equipo Turbiscan Lab instrument (Formulacion, L'Union, France) para seguir la dinámica del sistema durante 90 minutos; cada análisis se realizó por triplicado. Estos análisis permitieron obtener datos de estabilidad correspondientes a perfiles de transmitancia y retrodispersión en función del tiempo y de la altura del vial contenedor del sistema emulsificado, estos datos fueron graficados usando OriginPro 9.0 y son mostrados a continuación.

4.3 Discusión de Resultados

Los experimentos analíticos mostrados en el capítulo anterior indican la presencia y las características estructurales de fosfolípidos presentes en manteca de cacao proveniente del grano de la Var. CCN51 analizada, estos resultados dan lugar a una segunda etapa de análisis donde se hace necesario el uso de mayores cantidades de muestra para el desarrollo de los experimentos aquí planteados. Sin embargo, dichas cantidades no son suficientes ni eficientemente obtenidas mediante la metodología propuesta en el cap. II, esto debido al alto uso de solventes y de SiO₂. Por esta razón, en esta sección el extracto de PLs se obtuvo mediante un proceso de desgomado ácido de manteca de cacao tal y como se ilustra en la Figura 14. Este proceso consistió en fundir la manteca de cacao obtenida por prensado en la empresa *Nextcoa SAS*. Cuando el extracto lipídico obtenido fue fundido se obtuvo una “espuma o goma” en la parte superior del vial, que contiene PLs hidratables que suben a la interfaz aceite/aire (Figura 14, a y b). Normalmente, esta goma contiene ~ 90 % de los PLs presentes en los aceites vegetales extraídos industrialmente.(5166376, 1992; 5248799, 1993) Seguidamente, se adicionaron 2 mL de ácido cítrico (50% p/p) a la muestra de manteca fundida para convertir los fosfolípidos no hidratables (NPH) en moléculas con mayor solubilidad en agua, estos NPH corresponden a PLs parcialmente hidrolizados que se encuentran en forma de sales de Ca, Mg y Fe las cuales poseen mayor solubilidad en el aceite que en la fase acuosa, por lo tanto al adicionar el ácido se logra disociar al PL en a su forma ácida (ácido fosfatídico) y en una sal metálica (esquema 1).(4049686, 1985; 6426423 B1, 2002; 6441209 B1, 2002; 5166376, 1992)



Esquema 1. Reacciones involucradas en el proceso de desgomado ácido.(4049686, 1985)

Posteriormente, se realizó neutralización con NaOH en una concentración menor a la del ácido cítrico para evitar reacciones de saponificación indeseadas en el proceso (Figura 14c), con este proceso de neutralización se logra obtener sales de Na^+ con los PLs (fosfolípido hidratable) permitiendo que estas moléculas migren a la fase acuosa y puedan ser separadas de la manteca de cacao. Luego de que el sistema alcanzara un pH de 6.8 se procedió a añadir 5 mL de agua tipo I bajo agitación constante. La fase acuosa fue recuperada por centrifugación y liofilizada para obtener el extracto concentrado de PLs (Figura 14d).(4049686, 1985; 6426423 B1, 2002; 6441209 B1, 2002; WO2000034292A1, 2000; 5166376, 1992; 5248799, 1993) Este extracto fue también caracterizado usando espectrometría de masas MALDI para corroborar que su composición molecular fuese similar al de la sub-fracción F3 discutida en el capítulo anterior.

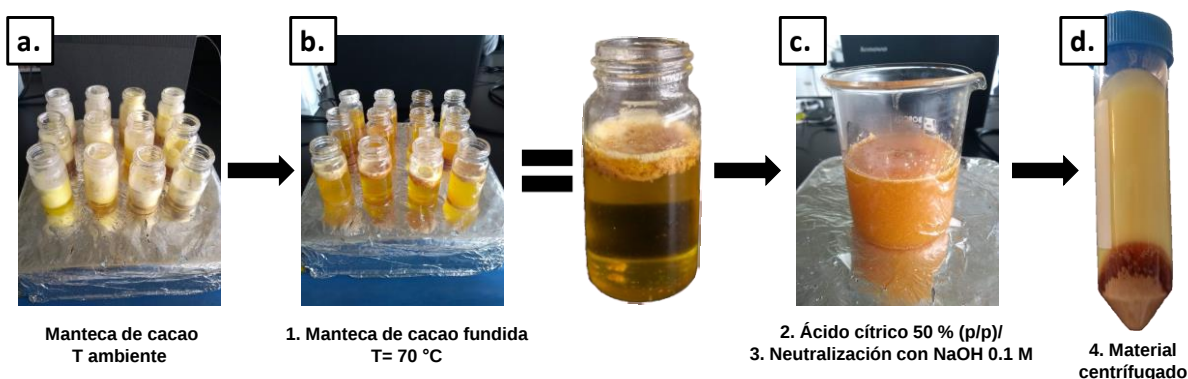
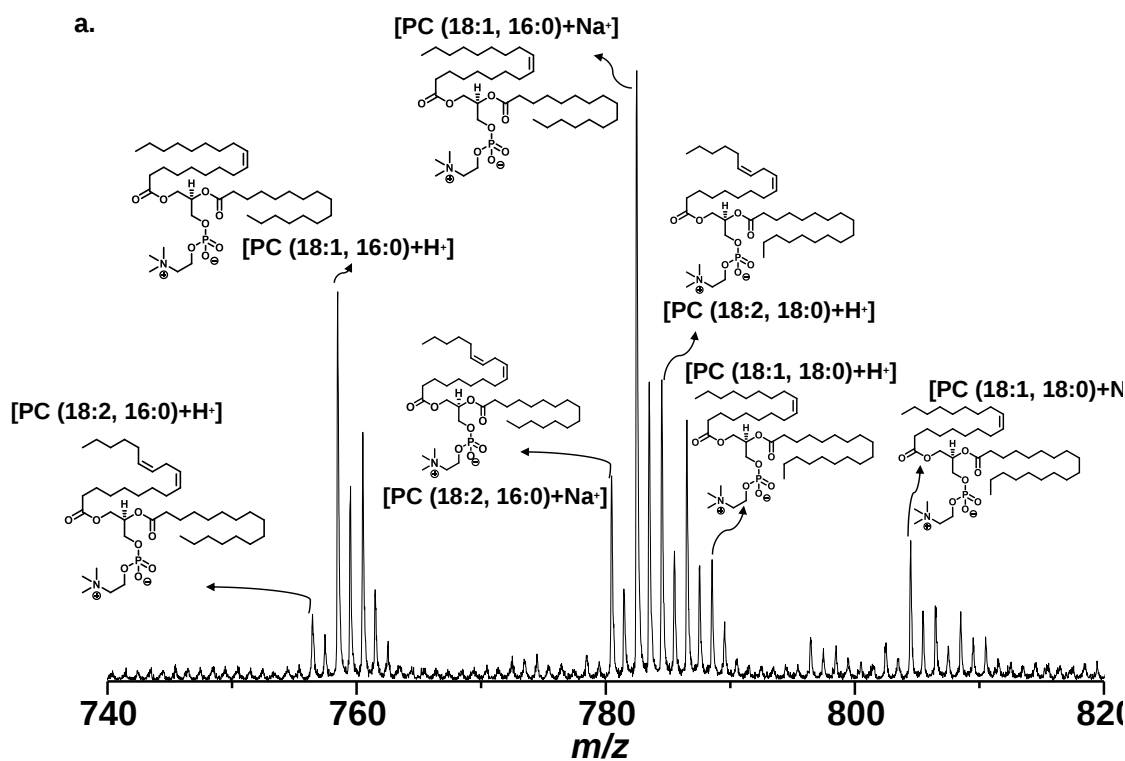


Figura 14. Proceso de extracción de PLs de una muestra de manteca de cacao, utilizando el método del desgomado ácido.

En la Figura 15a se observa el espectro de masas MALDI de la muestra de PLs obtenida mediante el método de desgomado, a partir de manteca de cacao. Adicionalmente la figura 15b muestra una tabla comparativa de los PLs observados tanto en la sub-fracción F3 descrita en el capítulo anterior como la fracción PLs obtenida por desgomado ácido. Estos análisis confirman que la composición molecular de las fracciones analizadas es idéntica teniendo en cuenta las señales observadas en el espectro de masas correspondientes a moléculas protonadas y aductos de sodio de PCs. De esta manera se procedió a realizar los experimentos mostrados a continuación usando la fracción de PLs obtenida mediante el proceso de desgomado garantizando la similitud de la composición química de las muestras comparadas.



b.

m/z	Fosfolípidos	Muestra	
		F3	Desgomado
496.339	$[LPC (16:0)+H^+]$	X	X
522.355	$[LPC (18:1)+H^+]$	X	X
758.569	$[PC (18:2, 16:0)+H^+]$	X	X
760.585	$[PC (18:1, 16:0)+H^+]$	X	X
780.551	$[PC (18:2, 16:0)+Na^+]$	X	X
782.567	$[PC (18:1, 16:0)+Na^+]$	X	X
784.582	$[PC (18:0, 18:0)+Na^+]$	X	X
788.616	$[PC (18:1, 18:0)+H^+]$	X	X
786.600	$[PC (18:0, 18:2)+H^+]$	X	X
810.598	$[PC (18:1, 18:0)+Na^+]$	X	X

Figura 15. a. Espectro de masas MALDI-TOF de fracción de PLs obtenidos del desgomado ácido de la manteca de cacao b. tabla de composición comparativa entre la subfracción-F3 y PLs obtenidos del desgomado ácido.

Es indispensable aclarar que las muestras analizadas en este capítulo corresponden a lecitinas comerciales completas sin proceso de purificación. Por lo tanto, una vez confirmada la identidad de los compuestos presentes en la fracción obtenida por desengomado de la manteca de cacao rotulada como PLs, se procedió a determinar sus propiedades fisicoquímicas. En esta línea, el ángulo de contacto es una medida del ángulo formado entre la superficie de un sólido y un líquido, éste depende de las fuerzas cohesivas del líquido y de las fuerzas adhesivas entre la superficie sólida y el líquido. El valor del ángulo de contacto (AC) permite inferir el tipo de fuerzas que prevalecen en el sistema analizado, siendo esto una medida indirecta del grado de hidrofobicidad o hidrofiliidad del sólido, en donde a valores entre 0° y 90° indica alta mojabilidad y a valores entre 90° y 180° baja mojabilidad de la superficie.(Calderón-Vergara et al., 2019). Estas mediciones se llevaron a cabo usando una superficie de vidrio la cual fue sometida a un proceso de limpieza con $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ en donde se eliminan residuos para posteriormente dispersar las muestras a analizar correspondientes a: lecitina de soya, lecitina de girasol y extracto de PLs del cacao, estas placas se dejaron secar a 40°C durante 24 horas.

Una vez preparadas las superficies con las muestras de interés se realizó la medición de ángulos de contacto estático usando dos líquidos de referencia H_2O y $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$. La Figura 16 muestra los ángulos de contactos de los líquidos mencionados sobre las películas de las muestras de interés (LS, LG y PLs). Las muestras LS y LG presentan gran similitud en los valores de AC correspondientes a 38.6, 23.4 y 76.9, 88.5 para agua y glicerol, respectivamente. Mientras que el extracto de PLs presenta valores mucho más elevados mostrando baja mojabilidad del líquido sobre la superficie. Estos resultados pueden deberse a diferentes razones, es importante recordar que el porcentaje de compuestos insolubles en acetona de las lecitinas comerciales fue de $\sim 40\%$,

mientras que para el extracto obtenido de granos de cacao fue del 29% indicando esto de manera indirecta que la muestra PLs obtenida mediante desgomado ácido presenta un menor contenido de las moléculas anfifílicas de interés. Adicionalmente, se debe tener en cuenta que los TAGs que están presentes en las muestras tratadas son de diferentes características estructurales, como se puede evidenciar en los resultados MALDI-TOF mostrados en el capítulo anterior, claramente se pudo distinguir que los TAGs presentes en aceites comerciales presentan mayor contenido de ácidos grasos insaturados, mientras que la manteca de cacao está enriquecida en ácidos grasos saturados lo cual influye drásticamente en las interacciones existentes en las mezclas. (Butt, Capella, Kappl, & Avogadro, 2005)

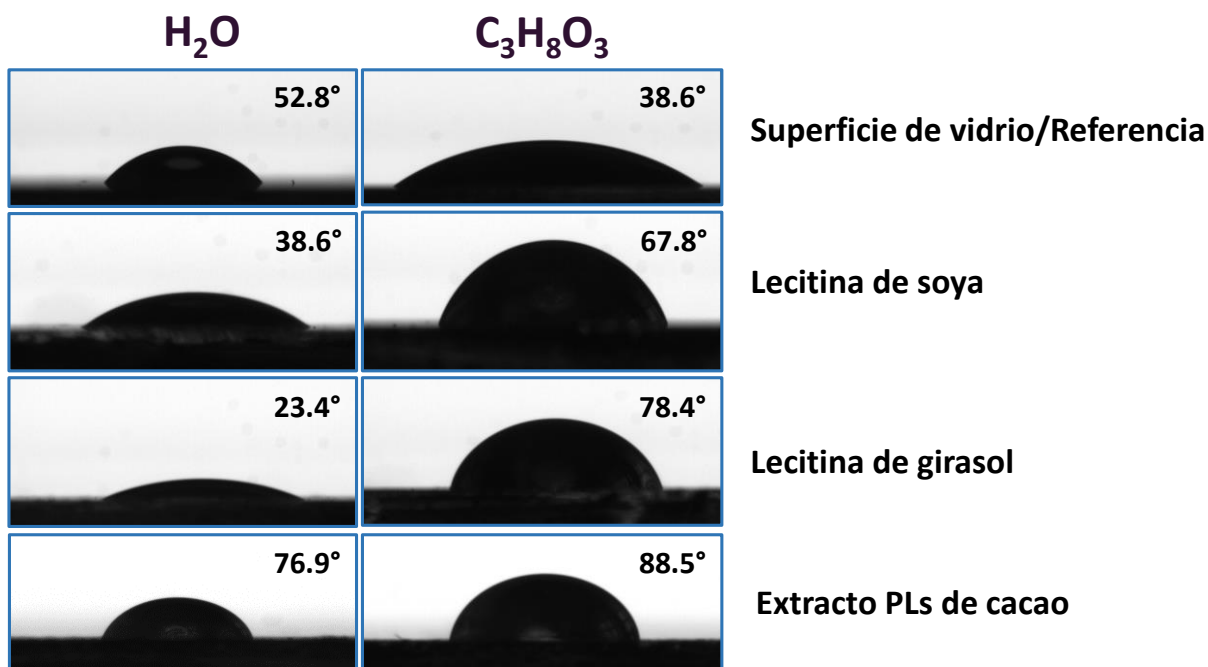


Figura 16. Ángulos de contacto de lecitina de soya (LS), lecitina de girasol (LG) y extracto de PLs de la manteca de cacao.

El valor de HLB fue determinado de manera teórica y experimental según el método de Griffin *et al.* que define una escala de 0 a 20, asignando valores bajos para compuestos hidrofóbicos y valores altos para compuestos hidrofílicos. Debido a que cada muestra se compone de varios compuestos, el cálculo de HLB se basó en una regla de mezclas en donde se multiplica fracciones másicas con el HLB de cada compuesto como se define a continuación:

$$HLB_k = \sum_i X_{ik} * HLB_i \quad \forall k \quad \text{Ec. 2}$$

Donde $k = \{LS, LG, LC\}$, X_{ik} es un parámetro que contiene la fracción másica de cada compuesto i en la muestra k , y HLB_i es el HLB de cada compuesto i calculado por el método de Griffin. Por otro lado, el método experimental usando la metodología anteriormente expuesta permitió determinar que el valor de HLB para los emulsificantes son $\sim 4,5$. Este valor fue corroborado por los cálculos teóricos en donde ambos métodos permiten inferir que los emulsificantes estudiados (LS, LG y PLs de cacao) corresponden a emulsificantes que pueden dar lugar a la formación de emulsiones w/o según la escala mostrada en la figura 17.

Tabla 4 Valores de HLB calculados para LS, LG y PLs de cacao.

Compuesto	HLB Teórico*	HLB Exp.
LS	4.14	$\sim 4,5$
LG	4.13	$\sim 4,5$
PLs cacao	3.92	$\sim 4,5$

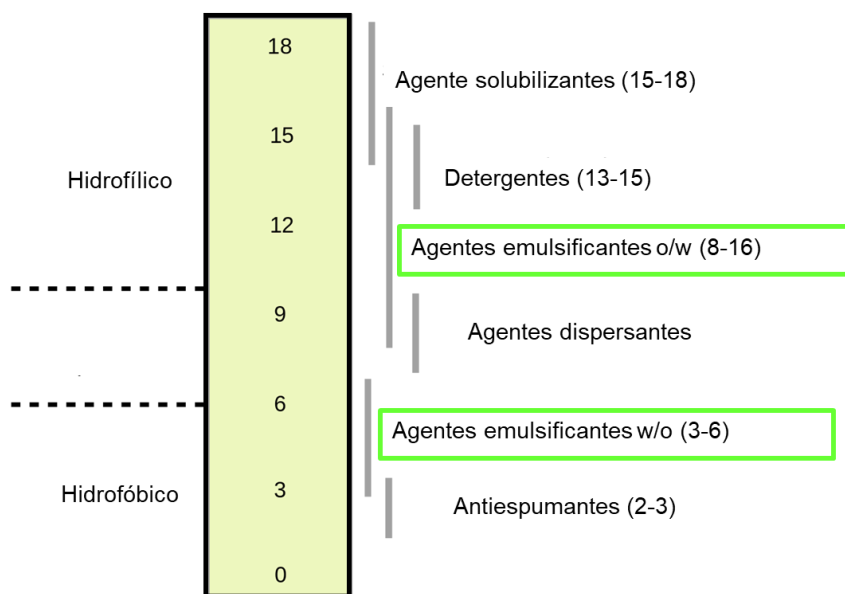


Figura 17. Escala de HLB para emulsificantes.

Evaluar la estabilidad de las emulsiones modelo es de gran importancia para establecer el papel de los extractos de PLs de manteca de cacao en la formación y estabilización de sistemas coloidales. Las mediciones de estabilidad de las emulsiones se realizaron en el Turbiscan Lab Instrument que utiliza dispersión múltiple de luz (MLS, *Multiple Light Scattering*) para determinar cambios en las propiedades de dispersión y transmisión de luz en muestras líquidas. La técnica utiliza una fuente de luz en el infrarrojo cercano (NIR, $\lambda=880$ nm) que interactúa con la muestra vía transmisión (en caso de muestras transparentes) o dispersión (en caso de muestras opacas). Los cambios en la intensidad de la radiación retrodispersada (BS) o transmitida (T) se monitorean por detectores ubicados en ángulos de 135° y 0° con respecto al vial que contiene la muestra, tal y como se muestra en la Figura 17 a. Los datos de dispersión o transmisión de radiación se adquieren en función del tiempo, de forma tal que mediante análisis estadístico es posible determinar propiedades de estabilidad cinética del sistema coloidal. Los posibles procesos fisicoquímicos de

desestabilización de emulsiones y sus perfiles cinéticos, en términos de cambios en la intensidad de la radiación retrodispersada %BS considerando que las emulsiones son sistemas opacos, se observan en la Figura 18.

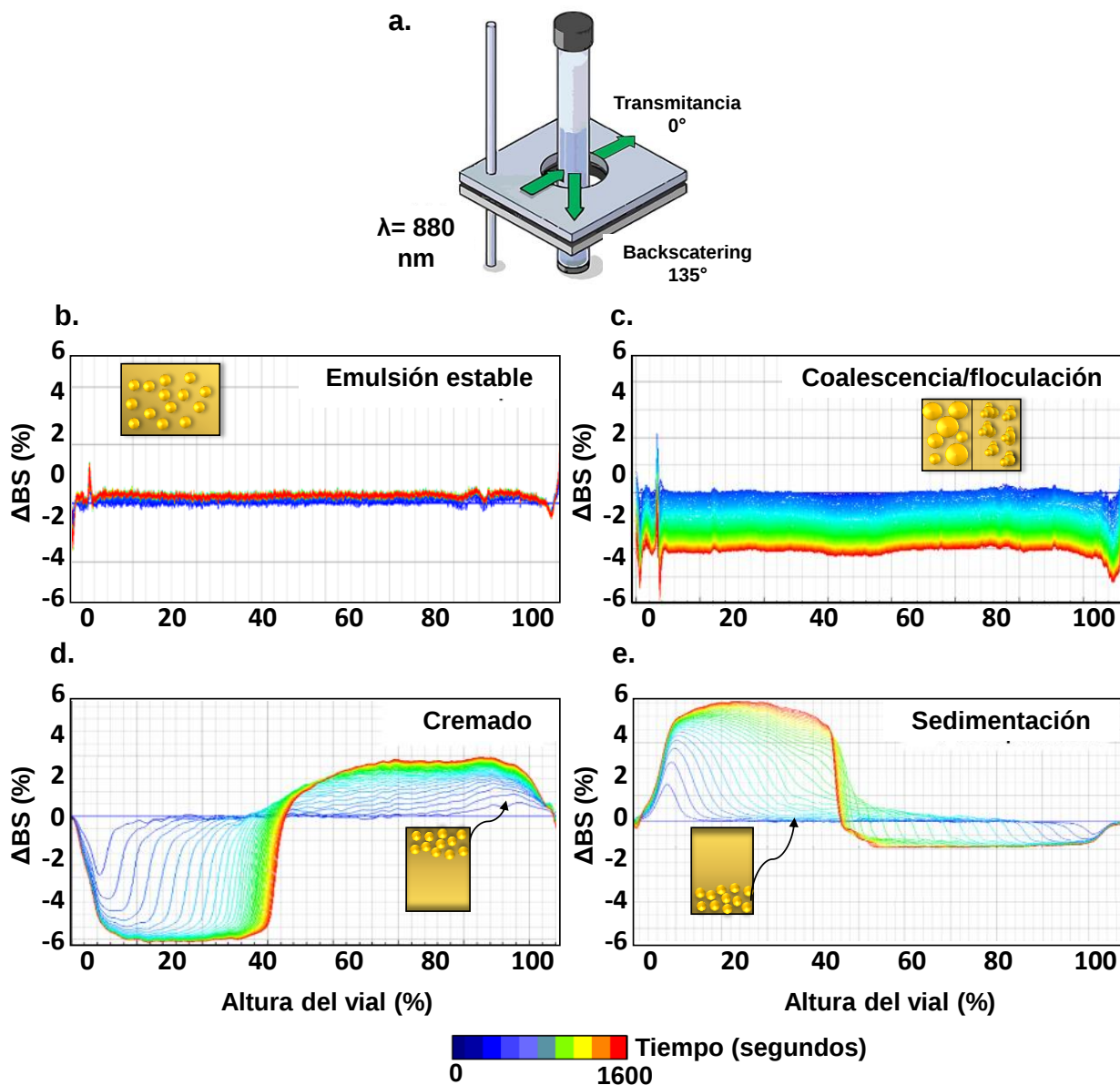


Figura 18. a. Principio de operación de las mediciones de transmisión y retrodispersión.

Diferentes procesos termodinámicos de desestabilización de emulsiones b. emulsión estable, d. coalescencia/floculación, d. cremado, e. sedimentación.

Los perfiles de ΔBS (%) proporcionan información acerca de los fenómenos de desestabilización que se presentan en el sistema coloidal estudiado. Las curvas de ΔBS (%), que se observan en la Figura 18, permiten determinar qué procesos termodinámicos desestabilizan el sistema en función del tiempo y de la altura del vial. La figura 18 muestra las diferencias que existen entre las curvas que describen una emulsión estable, figura 18b, en donde se ilustra un proceso sin variaciones en las curvas a lo largo de vial y al transcurrir el tiempo del análisis. Comparado esta emulsión estable con una emulsión que presenta aumento en el tamaño de partículas, como sucede en el caso del fenómeno de coalescencia y flocuación, estos procesos se evidencian en la variación del valor de BS en todo el vial a través del tiempo mostrando una curva similar a la mostrada en la figura 18c. Es importante resaltar que esta variación puede ser una disminución o aumento en función del tiempo y que esto depende si el tamaño inicial de las partículas es mayor o menor a la longitud de onda usada en la medición. Por otro lado, también se pueden observar fenómenos de cremado (figura 18d) en donde se presentan acumulación de partículas en la parte superior del vial en caso de que la fase dispersa (gotas) tengan una densidad más baja que la fase continua de la emulsión, esto hará que haya un aumento en el BS en la parte superior del vial y una disminución en la parte inferior debido al proceso de clarificación de la emulsión. Lo contrario sucede en los procesos de sedimentación en donde el aumento de BS se produce en la parte inferior del vial ya que la densidad de la fase dispersa es menor que la de la fase continua (emulsiones w/o). (Giraldo-Dávila, Chacón-Patiño, McKenna, Blanco-Tirado, & Combariza, 2017; Juyal et al., 2012; Kang et al., 2012; Mengual, 1999; Protocol, 2013b, 2013a; Zequan et al., 2014)

La Figura 19 muestra los perfiles de ΔBS para dos emulsiones, 60:40 y 80:20 aceite/agua con 1% y 3% de LS, respectivamente, que a simple vista presentan alta y baja estabilidad, con sus respectivos blancos de referencia. Blancos de referencia refiere a una mezcla de aceite/agua (en la proporción respectiva) más azida de sodio sin adición de emulsificante, estos blancos fueron sometidos a los mismos procesos de ultrasonido y parámetros de análisis en el Turbiscan descritos previamente para las demás muestras. En el caso de las emulsiones con una proporción 60:40, el blanco de referencia muestra procesos de coalescencia/floculación con valores de retrodispersión entre $-60 < BS < 20$ mostrando un marcado aumento de este parámetro en la zona de la interfaz ubicada entre el 20-40% de contenido del vial, es importante tener en cuenta que los procesos de floculación y coalescencia son claramente procesos termodinámicos diferentes, sin embargo MLS distingue solamente el aumento en el tamaño de partículas dispersas en la emulsión impidiendo identificar qué proceso está sucediendo exactamente. Por otro lado, la adición de emulsificante al sistema permitió la formación de una emulsión estable en donde se pueden observar pequeños procesos de sedimentación (zona superior del vial) y clarificación (zona inferior del vial) con valores bajos de BS comprendidos entre $-10 < \Delta BS < 3$ para las dos concentraciones evaluadas. Por su parte, el blanco de referencia para la proporción aceite/agua 80:20 presenta un comportamiento similar al blanco 60:40, pero con aumento de BS entre el 10-25% del contenido del vial y con rangos de retrodispersión entre $-60 < \Delta BS < 60$, la adición de emulsificante en ambas concentraciones del 1% y 3% muestran diversos procesos termodinámicos de inestabilidad a través del tiempo y a lo largo del contenido del vial correspondientes a fenómenos de coalescencia/floculación y sedimentación. Con estos resultados se puede confirmar que las emulsiones con mejores condiciones de estabilidad, teniendo en cuenta tanto los valores de índice

de inestabilidad como los perfiles de retrodispersión, corresponden a las emulsiones preparadas con proporción de aceite/agua de 60:40 con concentraciones de 1%, 2% y 3%.

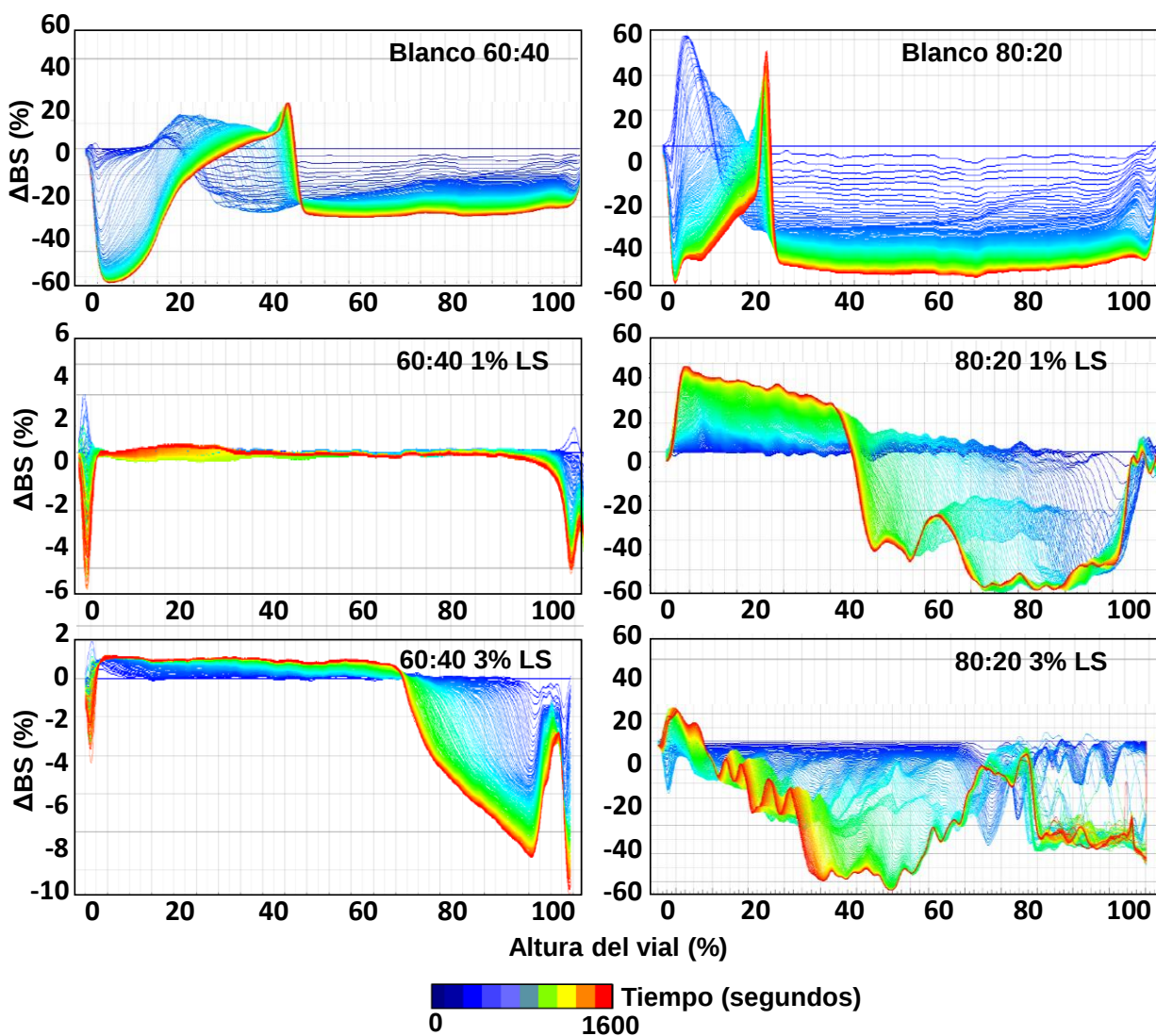


Figura 19. Perfiles de retrodispersión (ΔBS) de emulsiones más estables (60:40 aceite/agua) e inestables (80:20) con LS como emulsificante.

Por otra parte, el índice de inestabilidad (ecuación 1) es una forma adicional y conveniente para analizar la dinámica de los procesos de agregación y la estabilidad de las emulsiones. El I_i es un

parámetro estadístico derivado del análisis de variaciones en la intensidad de retrodispersión (BS_i) de la muestra dividido por el número de monitoreos realizados (n).

$$\text{índice de inestabilidad (Ii)} = \frac{\sum_0^n |BS_i - BS_{i-1}|}{n} \quad \text{Ec. 1}$$

La Figura 20 muestra el comportamiento de índice de inestabilidad de emulsiones aceite/agua 60:40, 70:30 y 80:20 con tres concentraciones diferentes de LS (1, 2 y 3 %). Los análisis de dispersibilidad de estas emulsiones demuestran que son del tipo w/o. Es importante resaltar que solo se pueden establecer comparaciones entre sistemas con un contenido de agua y aceite similar, ya que variaciones en los volúmenes de las fases pueden alterar los resultados en las mediciones. Como se puede observar la Figura 20a muestra que la LS de soya permite la formación de emulsiones estable durante el tiempo de medición (90 minutos) con índice de inestabilidad máximo alrededor de 4 para las tres concentraciones de emulsificante (1%, 2% y 3%). Por otro lado, la figura 20b (proporción 70:30 aceite/agua) muestra un comportamiento diferente en donde la cantidad de emulsificante usado sí influye en la estabilidad de las emulsiones mostrando un menor valor máximo en el índice de inestabilidad para la emulsión con 2% de LS, seguido de la emulsión con 3% y 1%, correspondientes a valores de 2, 5 y 12, respectivamente.

Podría intuitivamente pensarse que a mayor cantidad de emulsificante mayor será la estabilidad de la emulsión, pero por el contrario la emulsión con mayor cantidad de emulsificante no sigue este comportamiento, esto podría deberse a que parámetros como la concentración máxima a la cual posee alta eficiencia el emulsificante juega un papel importante en la estabilidad de emulsiones, esta medida es llamada concentración micelar crítica (CMC). La CMC es el punto a partir del cual

la concentración del emulsificante en la emulsión permite la formación de agregados micelares que pueden dar lugar a la desestabilización de la emulsión. (Dominguez, Fernandez, Gonzalez, Iglesias, & Montenegro, 1997) Por su parte, la figura 20c no muestra una tendencia que permita entender los fenómenos termodinámicos que sufre la emulsión entorno a la variación de emulsificante puesto que todas las emulsiones presentan un comportamiento mayor TSI que el blanco correspondiente a la línea negra, este comportamiento puede atribuirse a la baja cantidad de agua contenida en la emulsión presentandose fenómenos de agregación incluso al usar desde un 1% de LS.

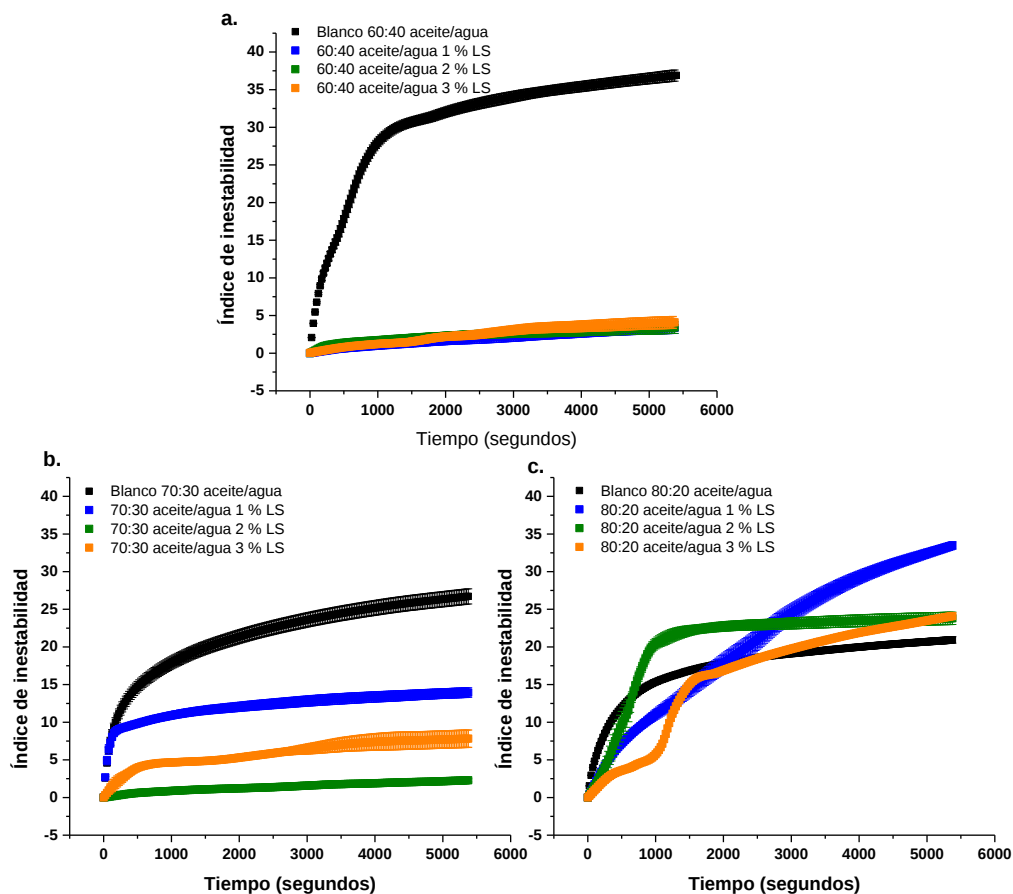


Figura 20. Emulsiones w/o 60:40, 70:30 y 80:20 aceite/agua con lecitina de soya al 1% 2% y 3% m/m.

Con toda la caracterización molecular establecida para los PLs contenidos en LS y en el extracto obtenido de granos de cacao, sumado a la evaluación en la actividad emulsificante de la LS en la formación de las emulsiones modelo mostradas se procedió a formar emulsiones con el extracto de PLs de interés bajo las mejores condiciones establecidas para las emulsiones formadas con LS correspondientes a la proporción agua aceite 60:40 y 1% y 3% de emulsificante. La figura 21 muestra los resultados obtenidos tanto en el comportamiento del índice de inestabilidad como para los perfiles de BS para emulsiones 60:40 aceite/agua y 1% y 3% con extracto de PLs como emulsificante. Las curvas de índice de inestabilidad vs tiempo, de ambas emulsiones con contenido de PLs, muestran una evidente estabilización con valores máximos de 3 y 7 respecto al blanco de referencia con un valor máximo de 37 durante los 90 minutos de las mediciones. Los perfiles de BS muestran también procesos de estabilización de las emulsiones gracias a la adición del extracto de PLs, con valores en un rango $-12 < \Delta BS < 12$ frente a valores entre $-60 < \Delta BS < 60$ del blanco de referencia.

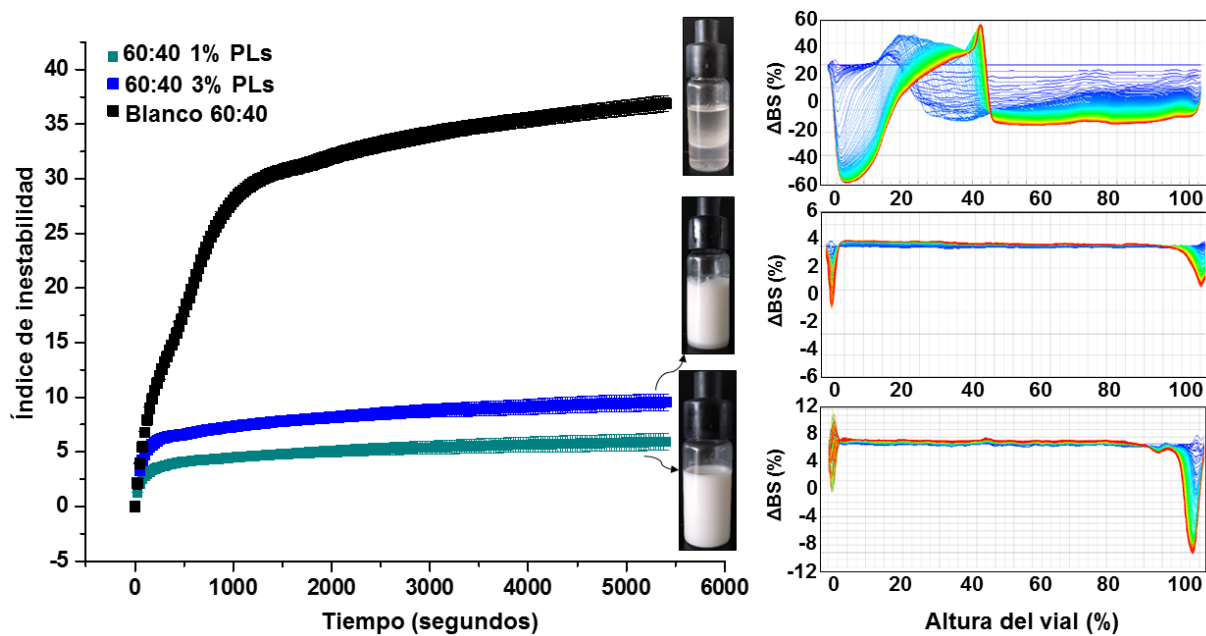


Figura 21. Resultados de estabilidad usando MLS de Emulsiones w/o con extracto de PLs de granos de cacao.

Finalmente, con el fin de determinar la posible actividad emulsificante del material sólido (cocoa) previamente deslipificado se realizaron ensayos preliminares mostrados en la figura 22, en donde se muestra que si existe un proceso de estabilización de emulsiones a través de emulsificación tipo pickering tanto en los valores con índice de inestabilidad como en los perfiles de BS. Sin embargo, es importante resaltar que los perfiles de BS refieren procesos inestabilización floculación y coalescencia con rangos $-15 < BS < 15$ siendo estos valores significativamente menores que los mostrados por el blanco de referencia mostrado en la línea punteada negra. Estos resultados iniciales permiten dar lugar al estudio a profundidad en la formación de emulsiones tipo pickering a partir de cocoa sin contenido de manteca de cacao.

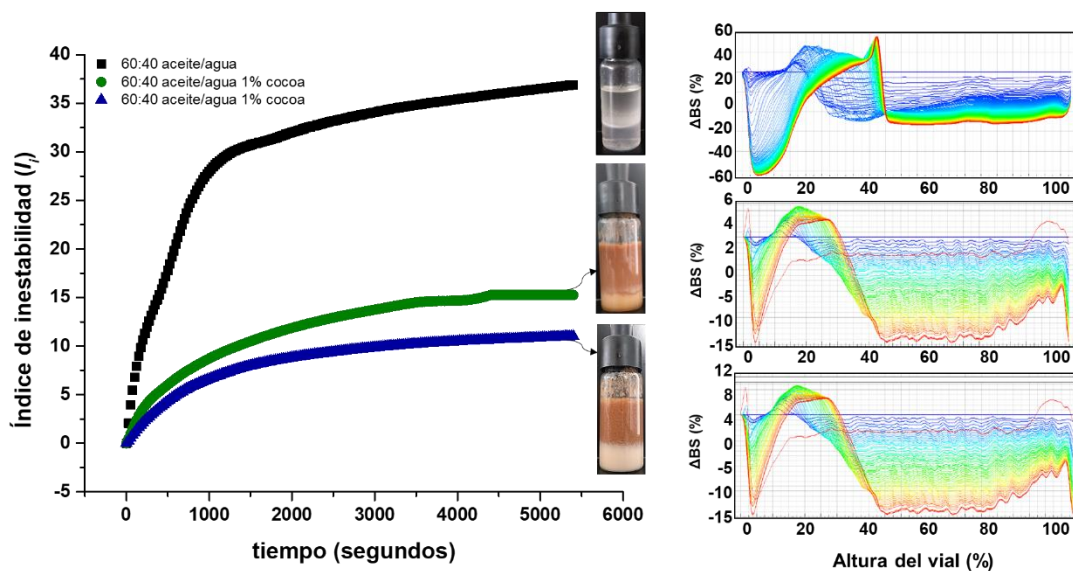


Figura 22. Resultados de estabilidad usando MLS de Emulsiones w/o con cocoa deslipificada.

5. Conclusiones

Los análisis de HPLC permitieron identificar las muestras enriquecidas en TAGs, correspondientes a las sub-fracción F1, F2 teniendo como referencia AG, y a la sub-fracción F3 con contenido de PLs con LS, LG y L- α - fosfatidilcolina como estándares comerciales y analítico, respectivamente. Los análisis MALDI-TOF y de ^{31}P -RMN determinaron que las familias más abundantes son las correspondientes a PC en las tres muestras principales estudiadas (LS, LG y PLs). Adicionalmente, los resultados de ^{31}P -RMN establecieron que las familias contenidas en la sub-fracción F3 corresponden a PA (12%), PG (13%), PI (20%), LPC (26%) y PC (29%), es importante resaltar que solo la subfracción F3 presenta contenido de PG en comparación con las lecitinas comerciales estudiadas. Por su parte, los análisis de estabilidad realizados en el Turbiscan permitieron determinar que las condiciones de mayor estabilidad para la formación de emulsiones w/o con LS fueron 60:40 aceite/agua con 1%, 2% y 3% de emulsificante comercial. Estas condiciones se replicaron usando el extracto de PLs obtenido de granos de cacao y los resultados mostraron que el extracto posee alta afectividad estabilizante de emulsiones w/o, tanto el índice de inestabilidad como los perfiles de BS evidenciaron el proceso de estabilización de las muestras frente a los blancos de referencia. En resumen, esta investigación permite concluir que los PLs contenidos en granos de *Theobroma cacao* L. (Var. CCN51) presentan una efectiva actividad emulsificante en la formación de emulsiones w/o, incluso este comportamiento es comparable al de las lecitinas de soya y girasol debido a la similitud en su composición química estructural de los PLs contenidos en estas mezclas. Los resultados mostrados en este trabajo de investigación permiten dar lugar a múltiples desarrollos en la línea de investigación de emulsificantes con el fin de eventualmente dar aplicaciones a estas moléculas anfifílicas en usos particulares como la

formulación de productos cosméticos basados en sistemas coloidales formados a partir de PLs presentes en granos de cacao colombiano.

Referencias Bibliográficas

- Adamson, A. W., & Gast, A. P. (Alice P. (1997). *Physical chemistry of surfaces*. Wiley. Retrieved from <https://www.scribd.com/doc/165286999/Adamson-and-Gast-Physical-Chemistry-of-Surfaces>
- Afoakwa, E. O., Quao, J., Takrama, J., Budu, A. S., & Saalia, F. K. (2013). Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, 50(6), 1097–1105. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0446-5>
- Benjamin Caballero, J. H. U. (Ed.). (2003). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Academic P). Baltimore, Maryland. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00330-8>
- Butt, H.-J., Capella, B., Kappl, M., & Avogadro, C. (2005). *Intermolecular and surface forces*. *Surface Science Reports* (Vol. 59).
- Calderón-Vergara, L. A., Ovalle-Serrano, S. A., Blanco-Tirado, C., & Combariza, M. Y. (2019). Influence of post-oxidation reactions on the physicochemical properties of TEMPO-oxidized cellulose nanofibers before and after amidation. *Cellulose*, 4. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02849-4>
- Calvano, C. D., Jensen, O. N., & Zambonin, C. G. (2009). Selective extraction of phospholipids from dairy products by micro-solid phase extraction based on titanium dioxide microcolumns followed by MALDI-TOF-MS analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(5), 1453–1461. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2812-y>
- Carl, B., & Brook, S. (1985). 4049686. [https://doi.org/10.1016/0375-6505\(85\)90011-2](https://doi.org/10.1016/0375-6505(85)90011-2)

- Casillas-Ituarte, N. N., & Allen, H. C. (2009). Water, chloroform, acetonitrile, and atrazine adsorption to the amorphous silica surface studied by vibrational sum frequency generation spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 483(1–3), 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2009.10.056>
- Cód. (n.d.). *3 er Censo Nacional Agropecuario censo nacional agropecuario décima entrega resultados-2014*. Retrieved from <https://www.dane.gov.co/files/CensoAgropecuario/entrega-definitiva/Boletin-10-produccion/10-Boletin.pdf>
- Copeland, Dick; Belcher, M. (2002). 6426423 B1.
- Copeland, Dick; Belcher, W. M. (2002). 6441209 B1.
- Cornier, J., & Keck, C. M. (n.d.). *Nanocosmetics*.
- Cremonini, M. A., Laghi, L., & Placucci, G. (2004). Investigation of commercial lecithin by 31P NMR in a ternary CUBO solvent. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 786–790. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1683>
- Dominguez, A., Fernandez, A., Gonzalez, N., Iglesias, E., & Montenegro, L. (1997). Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. *Journal of Chemical Education*, 74(10), 1227. <https://doi.org/10.1021/ed074p1227>
- Dufour, J., Calles, J. A., Marugán, J., Giménez-Aguirre, R., Peña, J. L., & Merino-García, D. (2010). Influence of hydrocarbon distribution in crude oil and residues on asphaltene stability. *Energy and Fuels*, 24, 2281–2286. <https://doi.org/10.1021/ef900934t>
- Edzes, H. T., Teerlink, T., Knaap, M. S. Van Der, & Valk, J. (1992). Analysis of phospholipids in brain tissue by 31P NMR at different compositions of the solvent system chloroform-methanol-water. *Magnetic Resonance in Medicine*, 26(1), 46–59. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910260106>

- Emulsions: making oil and water mix. (n.d.). Retrieved October 1, 2019, from <https://www.aocs.org/stay-informed/inform-magazine/featured-articles/emulsions-making-oil-and-water-mix-april-2014>
- Fuchs, B., Bischoff, A., Sü, R., Teuber, K., Schürenberg, M., Suckau, D., & Schiller, J. (2009). Phosphatidylcholines and -ethanolamines can be easily mistaken in phospholipid mixtures: A negative ion MALDI-TOF MS study with 9-aminoacridine as matrix and egg yolk as selected example. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(8), 2479–2487. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3032-1>
- Fuchs, B., Schiller, J., Süß, R., Schürenberg, M., & Suckau, D. (2007). A direct and simple method of coupling matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to thin-layer chromatography (TLC) for the analysis of phospholipids from egg yolk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 827–834. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1488-4>
- Gardea, A. A., García-bañuelos, M. L., Orozco-avitia, J. A., Sánchez-chávez, E., Sastré-flores, B., & Ávila-quezada, G. (2018). Cacao (*Theobroma cacao* L .), II, 921–939.
- Giraldo-Dávila, D., Chacón-Patiño, M. L., McKenna, A. M., Blanco-Tirado, C., & Combariza, M. Y. (2017). Correlations between molecular composition and the adsorption, aggregation and emulsifying behavior of Petrophase 2017 asphaltene and their TLC fractions. *Energy & Fuels*, acs.energyfuels.7b02859. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b02859>
- Gould, J., Garcia-Garcia, G., & Wolf, B. (2016). Pickering particles prepared from food waste. *Materials*, 9(9), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ma9090791>
- Gould, J. M., Furse, S., & Wolf, B. (2016). The Role of Endogenous Lipids in the Emulsifying Properties of Cocoa. *Frontiers in Chemistry*, 4, 1–8.

<https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00011>

Gross, Jürgen H. (2004). *Electrospray Ionization, en Mass Spectrometry*. (Springer, Ed.).

Gross, Jürgen H. (2010). *Mass spectrometry: a textbook*. Springer. Retrieved from https://books.google.com.co/books/about/Mass_Spectrometry.html?id=xHOQiaquq24C&redir_esc=y

Gunstone, F. D. (2008). *Phospholipid technology and applications*. (F. D. Gunstone, Ed.) (First Edit). Elsevier Science. Retrieved from https://books.google.com.co/books?id=_aSCLQAACAAJ&dq=phospholipids,+technology+and+applications+book&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwia3a6TpP7kAhUEjlkKHfTqCMoQ6AEIKjAA

ICCO - Production of Cocoa Beans. (n.d.). Retrieved September 18, 2018, from <https://www.icco.org/statistics/production-and-grindings/production.html>

informe de gestión año 2017 del fondo de estabilización de precios del cacao – fep cacao. (2018). retrieved august 20, 2018, from <http://www.fepcacao.com.co/wp-content/uploads/2018/05/informe-de-gestion-vigencia-2017-fepcacao.pdf>

Jahurul, M. H. A., Zaidul, I. S. M., Norulaini, N. A. N., Sahena, F., Jinap, S., Azmir, J., ... Mohd Omar, A. K. (2013). Cocoa butter fats and possibilities of substitution in food products concerning cocoa varieties, alternative sources, extraction methods, composition, and characteristics. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 467–476. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.09.024>

Juyal, P., Ho, V., Yen, A., & Allenson, S. J. (2012). Reversibility of asphaltene flocculation with chemicals. *Energy and Fuels*, 26, 2631–2640. <https://doi.org/10.1021/ef201389e>

Kang, W., Guo, L., Fan, H., Meng, L., & Li, Y. (2012). Flocculation, coalescence and migration

- of dispersed phase droplets and oil-water separation in heavy oil emulsion. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 81, 177–181.
<https://doi.org/10.1016/j.petrol.2011.12.011>
- Kang, W., Xu, B., Wang, Y., Li, Y., Shan, X., An, F., & Liu, J. (2011). Stability mechanism of W/O crude oil emulsion stabilized by polymer and surfactant. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 384, 555–560.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.05.017>
- Katepalli, H. (2014). Formation and stability of emulsions: effect of surfactant-particle interactions and particle shape, 1–70. Retrieved from http://digitalcommons.uri.edu/oa_diss
- Killian, L. A., & Coupland, J. N. (2012). Manufacture and Application of Water-in-Oil Emulsions to Induce the Aggregation of Sucrose Crystals in Oil: A Model for Melt-resistant Chocolate. *Food Biophysics*, 7(2), 124–131. <https://doi.org/10.1007/s11483-012-9249-0>
- Kim, H.-Y. Y., Wang, T.-C. L. C., & Ma, Y.-C. C. (1994). Liquid chromatography/Mass spectrometry of phospholipids using electrospray ionization. *Analytical Chemistry*, 66(22), 3977–3982. <https://doi.org/10.1021/ac00094a020>
- Knochenmuss, R. (2014). MALDI mechanisms: wavelength and matrix dependence of the coupled photophysical and chemical dynamics model. *Analyst*, 139, 147–156. Retrieved from <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3AN01446K>
- Kwok, D. Y., & Neumann, A. W. (1999). *Contact angle measurement and contact angle interpretation. Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 81).
[https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00087-6](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00087-6)
- Kyle, H. (2000). WO2000034292A1.
- L, T. C., Nguyen, V. T., & Nguyen, N. H. (2017). Proximate Composition , Extraction , and

- Purification of Theobromine from Cacao Pod Husk. *Technologies*, 5, 1–10.
<https://doi.org/10.3390/technologies5020014>
- Larsen, M. R., Thingholm, T. E., Jensen, O. N., Roepstorff, P., & Jørgensen, T. J. D. (2005). Highly Selective Enrichment of Phosphorylated Peptides from Peptide Mixtures Using Titanium Dioxide Microcolumns. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(7), 873–886.
<https://doi.org/10.1074/mcp.T500007-MCP200>
- Li, Y. L., Gross, M. L., & Hsu, F. F. (2005). Ionic-liquid matrices for improved analysis of phospholipids by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16(5), 679–682. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.01.017>
- Lima, Lí. J. R., Almeida, M. H., Rob Nout, M. J., & Zwietering, M. H. (2011). Theobroma cacao L., “the food of the gods”: Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(8), 731–761. <https://doi.org/10.1080/10408391003799913>
- London, E., & Feigenson, G. W. (1979). Phosphorus NMR analysis of phospholipids in detergents. *Journal of Lipid Research*, 20(3), 408–412. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36440>
- Maebashi, N., Tamaki, A., & Abstracts, C. (1992). 5166376.
- Marti-Mestres, G., & Nielloud, F. (2002). Emulsions in Health Care Applications—An Overview. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23(1–3), 419–439.
<https://doi.org/10.1080/01932690208984214>
- Marto, J. A., White, F. M., Seldomridge, S., & Marshall, A. G. (1995). Structural characterization of phospholipids by matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 67, 3979–3984.

<https://doi.org/10.1021/ac00117a025>

McClements, D. J. (2007). Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(7), 611–649.
<https://doi.org/10.1080/10408390701289292>

McClements, D. J. (2010). *Food Emulsions Principles, Practices, and Techniques*.
<https://doi.org/10.1201/9781420029581.ch9>

Mengual, O. (1999). TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, 50, 445–456.
[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00129-0)

Merchant, M., & Weinberger, S. R. (2000). Review Recent advancements in surface-enhanced laser desorption / ionization-time of flight-mass spectrometry Proteomics and 2-DE. *Review Literature And Arts Of The Americas*, 1164–1177.

Middleton, J. J. (1968). A Titration Method for the Determination of the HLB's of Emulsifiers. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 19, 129–136.

Olga, J., Casals, I., Andr, C., Izquierdo-pulido, M., & Lamuela-ravent, R. M. (2003). Liquid chromatographic / electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry*, 38, 35–42.
<https://doi.org/10.1002/jms.395>

Ontiveros, J. F., Pierlot, C., Catté, M., Molinier, V., Salager, J. L., & Aubry, J. M. (2014). A simple method to assess the hydrophilic lipophilic balance of food and cosmetic surfactants using the phase inversion temperature of C10E4/n-octane/water emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 458(1), 32–39.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.02.058>

- Orafidiya, L. O., & Oladimeji, F. A. (2002). Determination of the required HLB values of some essential oils. *International Journal of Pharmaceutics*, 237(1–2), 241–249.
[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00051-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00051-0)
- Parsons, J. G., Keeney, P. G., & Patton, S. (1969). Identification and Quantitative Analysis of Phospholipids in Cocoa Beans. *J. Food Sci.*, 34, 497–499.
- Pasquali, R. C., Sacco, N., & Bregni, C. (2009). The studies on Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB): Sixty years after William C. Griffin's Pioneer Work (1949-2009). *Latin American Journal of Pharmacy*, 28(2), 313–317. [https://doi.org/10.1016/S1383-7303\(00\)80016-2](https://doi.org/10.1016/S1383-7303(00)80016-2)
- Pasquali, R. C., Taurozzi, M. P., & Bregni, C. (2008). Some considerations about the hydrophilic-lipophilic balance system. *International Journal of Pharmaceutics*, 356(1–2), 44–51.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.12.034>
- Patents, W., Latest, I., Ch, S., Application, F., Data, P., Patents, W., ... Ch, S. (1993). 5248799.
- Patiny, Luc; Borel, A. (2013). ChemCalc: A Building Block for Tomorrow's Chemical Infrastructure. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53, 1223–1228. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ci300563h>
- Petković, M., Schiller, J., Müller, M., Benard, S., Reichl, S., Arnold, K., & Arnhold, J. (2001). Detection of individual phospholipids in lipid mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: Phosphatidylcholine prevents the detection of further species. *Analytical Biochemistry*, 289, 202–216.
<https://doi.org/10.1006/abio.2000.4926>
- Pretsch, E., Bühlmann, P., & Badertscher, M. (2005). *Structure Determination of Organic Compounds. Organic Chemistry: An Intermediate Text, Second*
<https://doi.org/10.1021/ar100041j>

- Protocol, M. (2013a). Using the Turbiscan Stability Index (TSI) to determine surfactant efficiency on emulsions stabilisation.
- Protocol, M. (2013b). Using the Turbiscan Stability Index to determine the Stability Diagram of a liquid dispersion, (1), 1–2.
- Pulfer, M., & Murphy, R. C. (2003). Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrometry Reviews*, 22, 332–364. <https://doi.org/10.1002/mas.10061>
- Raffaelli, A., & Saba, A. (2003). Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 22(5), 318–331. <https://doi.org/10.1002/mas.10060>
- Robbers, J.E; Bhatia, N. (1961). Technique for the Rapid Determination of HLB and Required-HLB Values. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 708–709.
- Rouser, G., Siakotos, A. N., & Fleischer, S. (1966). Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots. *Lipids*, 1(1), 85–86. <https://doi.org/10.1007/BF02668129>
- Santos, J., Trujillo-Cayado, L. A., Calero, N., Alfaro, M. C., & Muñoz, J. (2016). Development of eco-friendly emulsions produced by microfluidization technique. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 36, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.01.024>
- Schiller, J., Süß, R., Arnhold, J., Fuchs, B., Leßig, J., Müller, M., ... Arnold, K. (2004). Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Progress in Lipid Research*, 43, 449–488. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.08.001>
- Schiller, J, Arnhold, J., Benard, S., Muller, M., Reichl, S., & Arnold, K. (1999). Lipid analysis by matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry: A methodological approach. *Anal Biochem*, 267(1), 46–56. Retrieved from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9918654

Schiller, Jürgen, Süß, R., Fuchs, B., Müller, M., Petković, M., Zschörnig, O., & Waschipky, H. (2007). The suitability of different DHB isomers as matrices for the MALDI-TOF MS analysis of phospholipids: Which isomer for what purpose? *European Biophysics Journal*, 36(4–5), 517–527. <https://doi.org/10.1007/s00249-006-0090-6>

Separation, H. L. C. (2006). High-Performance Liquid Chromatography Separation and Purification of Cacao (*Theobroma cacao* L .) Procyanidins According to Degree of Polymerization Using a Diol Stationary Phase. *Journal of Africultural and Food Chemistry*, 54, 1571–1576.

Siouffi, A. M. (2000). Food Analysis by HPLC. *Food Analysis by HPLC*. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(93\)90020-G](https://doi.org/10.1016/0308-8146(93)90020-G)

Sjöblom, J. (2001). *Encyclopedic Handbook of Emulsion Technology*. *Encyclopedic Handbook of Emulsion Technology*. <https://doi.org/10.1201/9781420029581>

Sotirhos, N., Herslöf, B., & Kenne, L. (1986). Quantitative analysis of phospholipids by ³¹P-NMR. *Journal of Lipid Research*, 27(4), 386–392. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3459787>

Su-Jia, S., Dong, C., & Shi-Chao, X. (2013). The foaming abilities of surfactants in cocoa butter. *Journal of Food Process Engineering*, 36(4), 544–547. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12017>

Tadros, T. F. (2005). *Applied surfactants : principles and applications* (First Edit). Weinheim, Germany: Wiley-VCH. Retrieved from <https://www.wiley.com/en-us/Applied+Surfactants%3A+Principles+and+Applications-p-9783527306299>

The HLB Systema Time Saving guide to emulsifier selection. (1980) (ICI Amerin, Vol. 2).

<https://doi.org/10.1002/jsfa.6444>

Tobergte, D. R., & Curtis, S. (2013). *Mass spectrometry* (Springer, Vol. 53).

<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Torres-Moreno, M., Torrescasana, E., Salas-Salvadó, J., & Blanch, C. (2015). Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. *Food Chemistry*, 166, 125–132.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.141>

van Nieuwenhuyzen, W. (2010). Lecithin and Other Phospholipids. *Surfactants from Renewable Resources*, 191–212. <https://doi.org/10.1002/9780470686607.ch10>

Van Nieuwenhuyzen, W., & Tomás, M. C. (2008). Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 472–486.

<https://doi.org/10.1002/ejlt.200800041>

Zenkiewicz, M. (2007). Comparative study on the surface free energy of a solid calculated by different methods. *Polymer Testing*, 26(1), 14–19.

<https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2006.08.005>

Zequan, L. I. U., Xue, Y., & Qiang, Z. (2014). TURBISCAN : History , Development , Application to Colloids and Dispersions, 936, 1592–1596.

<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.936.1592>