

FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

Evaluación de las propiedades emulsificantes de mezclas de fosfolípidos aislados de *Theobroma cacao* L.

Laura Alejandra Paiba Arias

Trabajo de Grado para Optar el Título de Química

Directora:

Marianny Yajaira Combariza Montañez

Doctora en Química

Codirector:

Luis Miguel Díaz Sánchez

Máster en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2024



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

*Dedicado a mis padres,
mi vida, apoyo, fortaleza y razón de ser*



«La ciencia es una escuela de modestia, de valor intelectual y de tolerancia: muestra que el pensamiento es un proceso, que no hay gran hombre que no se haya equivocado, que no hay dogma que no se haya desmoronado ante el embate de los nuevos hechos.»

~ Ernesto Sábato.
Uno y El universo (1945).



Agradecimientos

A la Universidad Industrial de Santander, porque en sus hermosas instalaciones y excelente grupo de docentes, me brindó las herramientas necesarias para realizarme como profesional y poder seguir ahondando en mi otra pasión: los idiomas.

A la profesora Marianny, por haberme abierto las puertas del laboratorio del grupo de investigación GIFTEX-CEIAM, por la oportunidad que me brindó de llevar a cabo este proyecto. A ella y a Luis Miguel, por enseñarme y mejorar este trabajo desde su experticia, asesorías y orientaciones. A Deisy, por sus valiosos consejos y por dar la base para este proyecto. A Carlos por la ayuda especial con el microscopio óptico. A Luis Gabriel y el profesor Aldo por los análisis teóricos brindados, que complementan y robustecen los análisis experimentales aquí obtenidos.

A los evaluadores de este proyecto, el profe José Carlos y la profe Martha Daza, por dedicar su tiempo a analizar y mejorar este proyecto con sus preguntas y sugerencias desde su amplia experiencia.

A los profesores Enrique Mejía y Rafael Cabanzo del LEAM, por el préstamo del liofilizador y la sonda de ultrasonido que tanto requería.

Al CICAT, por el préstamo del microprocesador ultrasónico y permitirme estar en la toma de datos en el equipo de gota pendiente.

A Manuelito, que a pesar de vivir ocupado y ser el tormento de todo el mundo en el grupo de investigación para poderlo encontrar, siempre estuvo dispuesto a la ayuda de mil y un problemas que me encontré en el camino, e hizo lo que podía y más para colaborar, pudiendo por fin terminar este proyecto de investigación.

Ragazzo, Honeyggis, Dani, Valerito, Mercochis, Nata y Tefa, gracias por hacer lo imposible: Hacer nuestra tenebrosa escuela más colorida, divertida y llevadera. Gracias así mismo por aconsejarme más allá de los temas académicos y dejarme entrar con cada una de mis facetas y locuras en sus increíbles corazones.

A Fabi, el científico-cocinero más brillante, dedicado y multifacético, el cual tengo el honor de llamar amigo. Gracias por toda el apoyo y la ayuda, especialmente en los momentos más difíciles cuando nadie parecía poder ayudar.

A Mushulás, el mejor ser humano, junto a su mamá, mi otra madre. Gracias por las aventuras, la confianza, los abrazos reconfortantes y los cafés, esos mismos donde debatíamos de todo y no arreglábamos nada el mundo, pero a partir de la física, la química y nuestros puntos de vista fuera del común, lográbamos dejar lo negativo de lado y buscarle el lado más amable.

A mi otra madre, Stella, por cuidar de mí y brindarme un espacio en su hogar a lo largo de todos estos años, sin pedir nunca algo a cambio, se conformaba con que estuviese bien y feliz. Gracias por regresarme la fe en la humanidad.



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

A Yazzi, la filósofa que me ayuda a entender la vida y la enfermera que cuida las heridas de mi corazón con la curita sanadora de su amistad. A Lucci y nuestras tertulias, que son como ir a terapia. Gracias por ser una bendición de Dios.

A los amigos que estuvieron en un inicio y en el transcurso de mi carrera, pero que ya cumplieron su ciclo y están ahora iluminando otras vidas. Gracias por aportar su luz en mi sombrío camino.

A Lau, porque desde el colegio nuestra amistad y hermandad no cambia en lo más mínimo. En la distancia sabemos estar juntas, compartiendo los sube y bajas de nuestras vidas, con buen vino y musiquita.

A Maru, por brindarme tantas risas y hasta regaños, porque me quiere como una hermana y busca mi bienestar. Porque junto a mi sobri África, se ponen la 10, y a pesar de estar trasnochada, enferma o cansada, siempre está para mí. Por las trasnochadas en la universidad pasada y por ayudarme con la preparación de mi sustentación. Por ser ejemplo intachable de resiliencia y por todas las aventuras hacia el bus de nuestro geriátrico: la diversión.

A mis papás, por su amor que trasciende cualquier distancia, porque creyeron en mi perseverancia, me apoyaron en mi locura de dejar mi anterior carrera y cambiarme a una ciudad diferente para continuar con la construcción de mi sueño profesional, lejos de seres queridos, pero teniendo de cerca su amor y confiando en que yo podía con todo lo que soñaba y me proponía. Porque trabajaban como nadie para mantenerme, porque sufrieron conmigo cada batalla como si fueran propias, y de las que no les hablé y peleé en silencio, sé que también su sexto sentido las sentía. Porque me ayudaron a levantar cuando pensé que no podía más en cada una de esas veces en las que todo se me derrumbó. Porque gracias a sus oraciones encontré ángeles en mi camino que me ayudaron para superar cada obstáculo que se me interponía. Nunca podré saldar completamente la enorme deuda de tanto que han hecho y han dado por mí, anteponiéndome siempre a ustedes. Gracias a Dios por mis padres y su intercesión para que mi vida vaya bien y siga mejor.

A David, mi inefable serendipia, compañero de vida, soporte y polo a tierra. El que me da alas para alcanzar cada uno de mis sueños, me motiva para ser mejor cada día y poder seguir estando a su altura: Te admiro. Gracias por verme como me ves y recordarme lo que valgo y lo que soy cada que lo olvido. Por arriesgarte a dar saltos conmigo, donde hemos alcanzado logros como este, y conseguiremos el resto que nos quedan en nuestra lista de pendientes.

Gracias a mis errores, por fortalecer mi determinación y hacerme crecer como persona. Porque me recuerdan que por más edad que tengamos, seguimos siendo niños en constante aprendizaje.

Los atardeceres de la ciudad bonita, que me hacían olvidar todo por un momento, mientras me perdía en su sonrojada belleza.

Gracias infinitas a cada uno de ustedes, los que tatuaré siempre en mi corazón y mente, por su influencia intachable en mi vida y su innegable contribución a este éxito que hoy celebro: Nada es tan malo ni puede conmigo si ustedes están a mi lado. Gracias por ser mi red de apoyo, permitirme desahogarme para soltar cargas y poder continuar mi camino menos fatigada y acongojada. Gracias por celebrar mis avances, sin importar lo pequeños que estos fueran.



Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	15
1. Objetivos	17
1.1. Objetivo General	17
1.2. Objetivos Específicos.....	17
2. Marco Referencial.....	18
2.1. <i>Theobroma cacao</i> L.	18
2.2. Fosfolípidos.....	20
2.3. Emulsiones.....	24
2.4. Medición de estabilidad de emulsiones	28
2.5. Tensión interfacial	31
2.6. Antecedentes	34
3. Metodología	39
3.1. Desgomado ácido modificado de manteca de <i>Theobroma cacao</i> L.	39
3.2. Emulsiones a partir de extracto de PLs de cacao.	41
3.3. Caracterización de los fosfolípidos por espectrometría de masas MALDI-TOF.	42
3.4. Cálculo teórico de HLB.	43
3.5. Medición de estabilidad de emulsiones.	43
3.6. Prueba de la gota.	43
3.7. Microscopía óptica.....	44
3.8. Medición de la tensión interfacial.....	44
4. Resultados y Discusión.....	45
4.1. Extracción de fosfolípidos a partir de manteca de cacao del clon CCN51 utilizando el proceso de desgomado ácido.	45
4.2. Preparación de emulsiones a partir de extracto de fosfolípidos de <i>Theobroma cacao</i> L. clon CCN51 y caracterización de los extractos de PLs de cacao como agentes emulsificantes dentro de suspensiones coloidales basadas en agua/aceite utilizando retrodispersión NIR.	47
5. Conclusiones	65
6. Recomendaciones	66
7. Divulgación de Resultados	66
Referencias Bibliográficas	67



Lista de Figuras

Figura 1. Estructura química de los principales triglicéridos del grano de cacao.....	20
Figura 2. Estructura química de los fosfolípidos.	21
Figura 3. Esquema general de un análisis por espectrometría de masas MALDI.	22
Figura 4. Algunas matrices reportadas para el análisis en MALDI y bases orgánicas para matrices líquidas iónicas.....	23
Figura 5. Proceso de emulsificación con microprocesador ultrasónico como homogeneizador para formar emulsiones de tipo o/w o w/o.....	25
Figura 6. Principio de medición del Turbiscan.....	28
Figura 7. Fenómenos observados en el Turbiscan: (a) gráfica generada por el equipo, (b) sedimentación/clarificación, (c) cremado y (d) floculación/coalescencia.	30
Figura 8. Esquema del cálculo del valor de IFT con un tensiómetro de gota pendiente, iniciando con una imagen experimental cruda seguida de una solución ajustada obedeciendo al perfil de la ecuación de Young-Laplace, donde las anotaciones muestran las variables asociadas utilizadas en el perfil computacional para determinar el número de Bond y por tanto el valor de γ	33
Figura 9. Gráfica basada en la búsqueda realizada el 10 de mayo del 2024 en la base de datos Scopus (Elsevier) con la ecuación de búsqueda TITLE-ABS-KEY (phospholipids AND emulsion AND properties) que relaciona el número de artículos publicados con su respectivo año de publicación en el período 2000-2024.....	34
Figura 10. Gráfica basada en la búsqueda realizada el 10 de mayo del 2024 en la base de datos Scopus (Elsevier) con la ecuación de búsqueda TITLE-ABS-KEY (phospholipids AND emulsion AND properties) que relaciona el porcentaje de artículos publicados con las áreas de investigación respectivas en el período 2000-2024.....	35



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

Figura 11. Esquema metodológico seguido para el desarrollo del proyecto.	39
Figura 12. Procedimiento de extracción de los PLs de manteca de <i>T. cacao</i> L. por el proceso de desgomado ácido.....	40
Figura 13. Montaje experimental del equipo analizador de forma de gota pendiente utilizado en este proyecto.	45
Figura 14. Reacciones químicas involucradas en el proceso de desgomado ácido modificado. ..	47
Figura 15. Espectros de masas MALDI-TOF en modo de ionización positivo para los extractos enriquecidos de PLs liofilizados de manteca de cacao junto con algunos de los compuestos identificados y la comparación de algunos patrones isotópicos tanto teóricos como experimentales.	48
Figura 16. Espectros de masas MALDI-TOF medidos en modo negativo para los extractos enriquecidos de PLs liofilizados de manteca de cacao junto con algunos de los compuestos identificados y la comparación de algunos patrones isotópicos tanto teóricos como experimentales.	51
Figura 17. Representación de los resultados obtenidos de las emulsiones denominadas como blancos: En la parte superior, se encuentran las gráficas generadas por el Turbiscan del cambio en la retrodispersión, para la proporción 60:40 o-w (a la izquierda) y 70:30 o-w (a la derecha). Abajo a la izquierda, se hallan los índices de estabilidad del Turbiscan (cinética de desestabilización) de estas emulsiones. Abajo en la parte central, se puede visualizar un vial conteniendo un blanco (70:30 o-w) y su respectiva vista en un microscopio óptico a 400x. Abajo a la derecha, se observa una fotografía obtenida por el equipo analizador de forma de gota para el blanco 70:30 o-w.....	54
Figura 18. Representación de los resultados obtenidos de las emulsiones 60:40 o-w, utilizando diferentes proporciones de LG como surfactante: En la parte superior, se encuentran las gráficas	



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

generadas por el Turbiscan del cambio en BS: 0,5 %p/p (superior izquierda), 1 %p/p (superior derecha), 2 %p/p (debajo de 0,5%p/p) y 3 %p/p (debajo de 1%p/p). Abajo a la izquierda, se hallan los TSI (cinética de desestabilización) de estas emulsiones, y a su lado, se puede visualizar un vial conteniendo una emulsión de este tipo. 56

Figura 19. Representación de los resultados obtenidos de las emulsiones 70:30 o-w realizadas, utilizando diferentes proporciones de LG como surfactante: En la parte superior, se encuentran las gráficas generadas por el Turbiscan del cambio en la retrodispersión: 0,5 %p/p (superior izquierda), 1 %p/p (superior derecha), 2 %p/p (debajo de 0,5%p/p) y 3 %p/p (debajo de 1%p/p). Abajo a la izquierda, se hallan los índices de estabilidad del Turbiscan (cinética de desestabilización) de estas emulsiones. Abajo en la parte central, se puede visualizar un vial conteniendo una emulsión de este tipo y su respectiva vista en un microscopio óptico a 400x. Abajo a la derecha, se observa una fotografía obtenida por el equipo analizador de forma de gota para la emulsión 70:30 o-w con 3 %p/p de LG. 58

Figura 20. Representación de los resultados obtenidos de las emulsiones realizadas con extractos enriquecidos y purificados de PLs: En la parte superior, se encuentran las gráficas generadas por el Turbiscan del cambio en la retrodispersión para la proporción 70:30 o-w, con 1 %p/p (a la izquierda) y 3 %p/p (a la derecha). Abajo a la izquierda, se hallan los índices de estabilidad del Turbiscan (cinética de desestabilización) de estas emulsiones. Abajo en la parte central, se puede visualizar un vial conteniendo una emulsión de este tipo y su respectiva vista en un microscopio óptico a 400x. Abajo a la derecha, se observa una fotografía obtenida por el equipo analizador de forma de gota para el blanco 70:30 o-w con 3 % p/p de extractos enriquecidos y purificados de PLs. 61



Lista de Tablas

Tabla 1. Escala de HLB según Griffin.....	27
Tabla 2. Listado de las señales observadas en el espectro de masas MALDI-TOF de los extractos enriquecidos de PLs purificados y aislados de manteca de <i>Theobroma cacao</i> L. en modo positivo.....	50
Tabla 3. Listado de las señales observadas en el espectro de masas MALDI-TOF de los extractos enriquecidos de PLs purificados y aislados de manteca de <i>Theobroma cacao</i> L. en modo negativo.....	52



Lista de Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
AG	Ácidos grasos
BS	Retrodispersión
CCN51	Colección Castro Naranjal 51
CMC	Concentración micelar crítica
CUBO	Mezcla de dimetilformamida, trietilamina e hidrocloreuro de guanidinio
DHB	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
ESI	Ionización por electrospray
FEDECACAO	Federación Nacional de Cacaoteros
GMOs	Organismos Modificados Genéticamente
HLB	Balance Hidrofílico/Lipofílico
ICCO	Organización Internacional del Cacao
LG	Lecitina de girasol
MALDI	Ionización/desorción por láser asistida por una matriz
MeOH	Metanol
MS	Espectrometría de masas
NIR	Infrarrojo cercano
o/w	Aceite en agua
o-w	Aceite-agua
PA	Ácido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PI	Fosfatidilinositol
PLs	Fosfolípidos
POP	1,3-dipalmitoil-2-oleil-glicerol
POS	1-palmitoil-2-oleoil-3-esteroil-glicerol
PS	Fosfatidilserina
RMN	Resonancia magnético nuclear
SOS	1,3-distearoil-2-oleoil-glicerol
TAGs	Triglicéridos
TBP	Tributilfosfato
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TOF	Analizador de tiempo de vuelo
TSI	Índice de inestabilidad del Turbiscan
w/o	Agua en aceite



Resumen

Título: Evaluación de las propiedades emulsificantes de mezclas de fosfolípidos aislados de *Theobroma cacao* L.[§]

Autora: Laura Alejandra Paiba Arias^{§§}

Palabras Clave: Manteca de cacao, fenómenos interfaciales, mecanismos de estabilidad, lecitina, fosfolípidos, emulsión w/o.

Descripción: Los fosfolípidos (PLs) son los principales constituyentes de los surfactantes alimenticios comerciales como las lecitinas de soya y girasol. Estos compuestos se encuentran también en otras semillas oleosas como las del grano de *Theobroma cacao* L. En este proyecto se extrajeron y caracterizaron mezclas de PLs presentes en manteca de cacao mediante el método de desgomado ácido modificado. Los análisis moleculares por espectrometría de masas muestran similitudes entre la composición de PLs de granos de cacao con la de lecitinas comerciales. Los PLs detectados en mayor proporción incluyen fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilserina (PS). Las propiedades surfactantes de los PLs de grano de cacao se estudiaron y compararon con las de lecitina de girasol mediante la formación de emulsiones de aceite y agua asistidas por ultrasonido. Se desarrolló una emulsión estable compuesta de 70-30 % v/v aceite-agua, enriquecida con 3 % p/p de extractos purificados de PLs de manteca de cacao. Esta emulsión demostró poseer un tamaño de partícula promedio comparable al obtenido con lecitina de girasol, y significativamente más pequeño que el de la emulsión denominada como blanco. Además, exhibió una menor tensión interfacial y un índice de estabilidad (TSI) reducido, lo que sugiere una disminución en la separación de fases de las emulsiones. Estos hallazgos indican que los extractos enriquecidos de PLs obtenidos del grano de *T. cacao* L. pueden ser empleados eficazmente como emulsionantes w/o en la industria, brindando de esta manera un valor agregado al cacao.

[§] Trabajo de Grado

^{§§} Facultad de Ciencias, Escuela de Química.

Directora: Marianny Yajaira Combariza Montañez, Ph.D en Química.

Codirector: Luis Miguel Díaz Sánchez, M.Sc. en Química.



Abstract

Title: Evaluation of emulsifying properties of phospholipid isolated mixtures from *Theobroma cacao* L.[§]

Author: Laura Alejandra Paiba Arias^{§§}

Keywords: Cocoa butter, Interfacial phenomena, Stability mechanism, Lecithin, Phospholipids, w/o Emulsion.

Description: Phospholipids (PLs) are the main constituents of commercial food surfactants such as soybean and sunflower lecithins. These compounds are also found in other oily seeds, such as those of *Theobroma cacao* L. In this project, mixtures of PLs present in cocoa butter were extracted and characterized by the modified acid degumming method. Molecular analysis by mass spectrometry showed similarities between the composition of cocoa bean PLs and commercial lecithins. The PLs detected in higher proportion include phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidic acid (PA), and phosphatidylserine (PS). The surfactant properties of cocoa bean PLs were studied and compared with those of sunflower lecithin by ultrasound-assisted formation of oil-water emulsions. A stable emulsion composed of 70-30 %v/v oil-water, enriched with 3 %w/w of purified PLs extracts of cocoa butter, was developed. This emulsion proved to possess an average particle size comparable to that obtained with sunflower lecithin and significantly smaller than that of the emulsion named blank. In addition, it exhibited lower interfacial tension and a reduced stability index (TSI), suggesting a decrease in phase separation of the emulsions. These findings indicate that PL-enriched extracts obtained from *T. cacao* L. beans can be effectively employed as w/o emulsifiers in the industry, thus providing added value to cocoa.

[§] Degree Work

^{§§} Faculty of Sciences, Chemistry School.

Director: Marianny Yajaira Combariza Montañez, Ph.D in Chemistry.

Codirector: Luis Miguel Díaz Sánchez, M.Sc. in Chemistry.



Introducción

La especie *Theobroma cacao* L. (cacao), nombrada científicamente por el sueco Carl Nilsson Linnæus en el siglo XVIII (Cinar et al., 2021; Delgado-Ospina et al., 2021), es nativa de Suramérica y crece en promedio 5 m de altura, con frutos de 10-30 cm de largo y 7-10 cm de ancho (Caligiani et al., 2015). Existen tres cultivares principales de *Theobroma cacao*: Criollo, Forastero y Trinitario. Independientemente del cultivar, los frutos de cacao son la única parte del cultivo con valor económico porque a partir de ellos se producen los granos de cacao (Caligiani et al., 2015).

El uso del cacao como materia prima está en constante expansión. África es el mayor productor mundial de cacao, representando el 73 % de la producción mundial (Arvelo et al., 2017; Millena et al., 2023). Suramérica aporta el 17 %, ocupando Colombia el cuarto lugar, por detrás de Ecuador, Brasil y Perú, siendo el departamento de Santander el mayor contribuidor, con el 42 % de la producción total nacional de cacao (Arvelo et al., 2017; United States Department of Agriculture - USDA, 2022; Vergara-Mendoza et al., 2022).

Los granos de cacao contienen grasas, carbohidratos, proteínas, vitaminas, minerales, polifenoles y metilxantinas (Borja Fajardo et al., 2022). El componente más abundante del grano de cacao es la manteca, que oscila entre el 50-58 % del peso seco del grano. Debido a sus propiedades fisicoquímicas, la manteca de cacao se utiliza ampliamente en la industria cosmética, farmacéutica y alimenticia. Conformada por más del 97 % de glicerolípidos del tipo triacilgliceroles (TAGs), la manteca de cacao también contiene di/monoglicéridos, glicolípidos y fosfolípidos (PLs). La distribución de estos componentes en la manteca depende de factores como la variedad del cacao, la edad del cultivo, esquema de fertilización, madurez del fruto y las condiciones ambientales (Borja Fajardo et al., 2022; Codini et al., 2014).



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

Las lecitinas son emulsificantes cuyo componente mayoritario son los fosfolípidos y se utilizan ampliamente en la industria, especialmente la lecitina de soya y de girasol (Topuz et al., 2021). Los PLs son moléculas anfifílicas, conformadas por un esqueleto de glicerol unido a dos ácidos grasos (cola lipofílica) y una fracción de ácido fosfórico, -grupo fosfato- (cabeza hidrofílica polar), que puede ir unido a otro grupo, como en la colina o etanolamina (McClements & Gumus, 2016; Perazzo et al., 2021; van Nieuwenhuyzen, 2010).

Debido a la creciente demanda de productos comerciales que contienen estos emulsificantes, en especial la proveniente de granos de soja (que representa más del 90 % de los productos a base de lecitina vegetal), muchas de estas provienen de cultivos modificados genéticamente (GMOs) (Robert et al., 2020). Estas lecitinas procedentes de GMOs tienen baja trazabilidad y pueden tener efectos adversos para la salud humana, generar plagas resistentes, contaminar la genética de cultivos naturales y consecuentemente, ocasionar la pérdida de biodiversidad (A. Li et al., 2024). Estas preocupaciones han generado una conciencia para desarrollar fuentes alternativas

Teniendo en cuenta que, el desarrollo de nuevos productos con alto valor agregado a base de cacao es un área con alto potencial en nuestro país, en este proyecto de investigación se determina la composición de PLs extraídos de granos de *T. cacao* (clon CCN51), utilizando espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) MALDI, y se evalúan sus propiedades surfactantes en emulsiones de agua en aceite (w/o).



1. Objetivos

1.1. Objetivo General

Evaluar las propiedades emulsificantes de fosfolípidos aislados a partir de *Theobroma cacao* L. clon CCN51.

1.2. Objetivos Específicos

- Extraer fosfolípidos a partir de manteca de cacao del clon CCN51 utilizando el proceso de desgomado ácido.
- Preparar emulsiones a partir de extracto de fosfolípidos de *Theobroma cacao* L. clon CCN51.
- Caracterizar los extractos de fosfolípidos de cacao como agentes emulsificantes dentro de suspensiones coloidales basadas en agua/aceite utilizando retrodispersión NIR.



2. Marco Referencial

2.1. *Theobroma cacao* L.

Fruto tropical considerado el “alimento de los dioses” por los mayas y árbol de nombre científico *Thebroma cacao* L. (cacao), otorgado por Carl Nilsson Linnæus en el siglo XVIII. En la actualidad, es uno de los cultivos nativos de Suramérica más importantes debido a que sus granos son la materia prima para fabricar chocolate (Delgado-Ospina et al., 2021; Millena et al., 2023).

Los tres cultivares principales del cacao son: Criollo, Forastero y Trinitario. El Criollo representa el 7-10 % de la producción mundial y se encuentra mayoritariamente en Colombia, Ecuador, Venezuela y Perú. El cultivar Criollo, es famoso por su alta calidad y ha sido designado por la Organización Internacional del Cacao (ICCO) como "fino" y "de sabor" (Delgado-Ospina et al., 2021). El Forastero, representa cerca del 95 % del total de la producción mundial, debido a su alta productividad y resistencia tanto a enfermedades como a plagas; es cultivado mayoritariamente en África y Brasil y es reconocido por tener un sabor fuerte, y poco aromático. El Trinitario, es una hibridación natural entre el Criollo y el Forastero, se encuentra principalmente en Trinidad y Tobago, sus cultivos son resistentes y produce un cacao “de sabor”. Cabe mencionar que la calidad del cacao también está sujeta a otros factores y no solo se limita a la variedad de semilla; adicionalmente, existen subvariantes de los tres cultivares principales a las que se les denominan clones (Borja Fajardo et al., 2022).

Del fruto del cacao se pueden comercializar: las cáscaras, los nibs (fragmentos de granos de cacao tostados), el licor (pasta resultante después de moler los nibs). Asimismo, la torta (masa sólida proveniente del prensado del licor, generalmente alcalinizado), la cocoa (polvo derivado de pulverizar la torta), la manteca (procedente del prensado del licor, generalmente alcalinizado) y el chocolate (combinación de azúcar, nibs, masa, manteca y lecitina) (Caligiani et al., 2015).



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

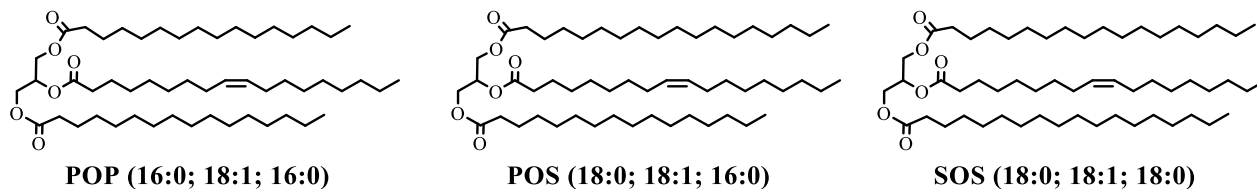
La manteca de cacao, fuente de los fosfolípidos que se extraerán en este proyecto, corresponde aproximadamente a la mitad de la masa del grano de cacao, es fundamental en la producción del chocolate e influye en su valor comercial dentro de la industria de la confitería. Lo anterior, debido a que la manteca constituye cerca de una tercera parte de las barras de chocolate y es la responsable de su dureza y la rápida fusión al entrar en contacto con la boca. Adicionalmente, el aporte de brillo y la determinación de la vida útil de este producto también se deben a la manteca de cacao (Codini et al., 2014; Kindlein et al., 2018). La composición de la manteca depende de factores como la variedad del cacao, la edad del cultivo, la madurez de la mazorca y las condiciones ambientales. La manteca mayoritariamente está constituida por glicerolípidos, principalmente TAGs, aunque también contiene minoritariamente di/monoglicéridos, fosfolípidos (PLs) y glicolípidos (Codini et al., 2014).

Los ácidos grasos saturados más importantes que contiene el cacao son el ácido palmítico (C18:0) y el ácido esteárico (C16:0), que representan el 38 % y el 29 %, respectivamente, del total de ácidos grasos (Arruda & Dimick, 1991; Codini et al., 2014; Servent et al., 2018). Por otro lado, entre los ácidos grasos insaturados se encuentran el ácido oleico (C18:1) y el ácido linoleico (C18:2), que representan el 28 % y el 2 % (Arruda & Dimick, 1991; Codini et al., 2014; Servent et al., 2018). Los principales triglicéridos (TAG) presentes en el grano de cacao son el 1,3-dipalmitoil-2-oleil-glicerol (POP), 1-palmitoil-2-oleoil-3-esteroil-glicerol (POS) y 1,3-distearoil-2-oleoil-glicerol (SOS) (véase **Figura 1**). El resto de los componentes del grano son carbohidratos, fibra, micronutrientes, polifenoles, azúcares y ácidos (acético, cítrico, láctico y oxálico, entre otros) (Caligiani et al., 2015; Servent et al., 2018).



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES**Figura 1.**

Estructura química de los principales triglicéridos del grano de cacao.

**2.2. Fosfolípidos**

Estructuralmente, los fosfolípidos se conforman por un glicerol, dos ácidos grasos y un grupo fosfato esterificado a una molécula orgánica como la colina, etanolamina, inositol, etc. Los fosfolípidos son lípidos polares que se encuentran en las paredes celulares y cumplen una función de protección, aunque también ayudan en funciones digestivas, metabólicas y cognitivas. Los ácidos grasos dentro del fosfolípido son la parte lipofílica, mientras que el grupo fosfato y los sustituyentes que pueda tener enlazados forman la parte hidrofílica, por lo que se puede establecer que son moléculas anfifílicas y con alto potencial emulsificador (Frank, 2013), razón por la que se eligieron surfactantes de este proyecto de investigación. Los principales PLs (**Figura 2**) son los pertenecientes a las familias de la fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilglicerol (PG) (McClements & Gumus, 2016; Perazzo et al., 2021). Los fosfolípidos son los componentes mayoritarios de surfactantes vegetales y animales, comercialmente conocidos como lecitinas, y de acuerdo con cuál familia se encuentre en mayor cantidad, pueden favorecer emulsiones o/w o w/o.

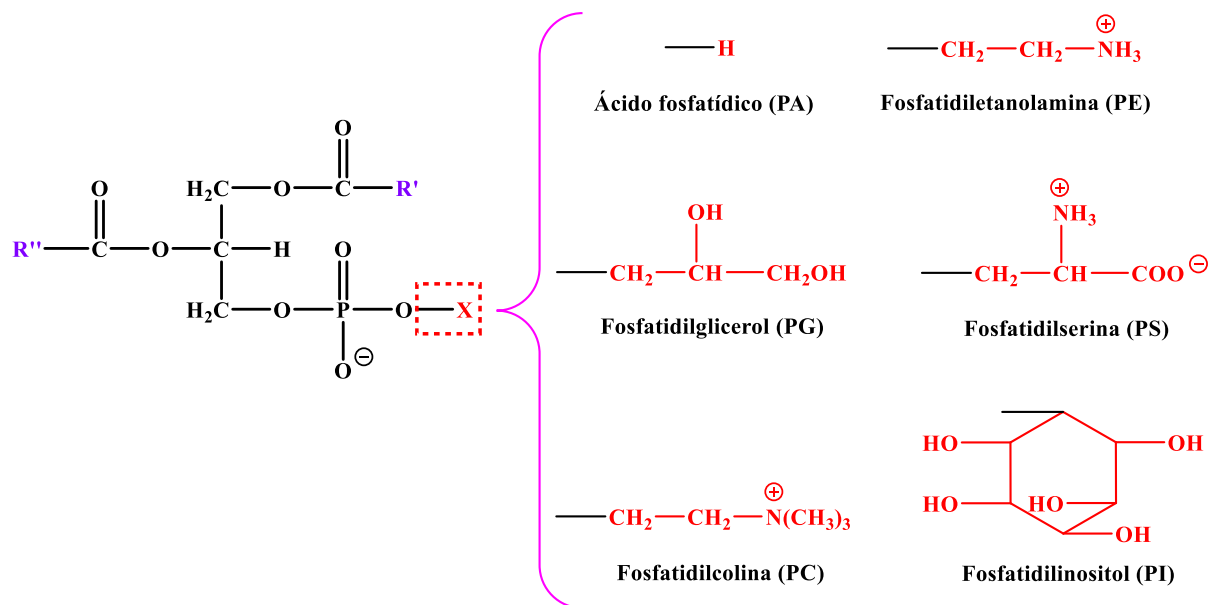
Las interacciones de los PLs dentro de una emulsión con la fase oleosa son más fuertes si hay una alta semejanza entre la longitud y saturación de las cadenas de los ácidos grasos, así mismo

FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

incrementa su solubilidad, conllevando una menor reducción de la tensión interfacial y una emulsificación no tan efectiva (A. Li et al., 2024).

Figura 2.

Estructura química de los fosfolípidos.



Nota. Adaptado de Schiller et al., 2004.

Una de las técnicas analíticas más utilizadas para la caracterización de los PLs es la espectrometría de masas (MS). Esta involucra la ionización de especies moleculares o atómicas, separación y detección de los iones formados, permitiendo determinar la relación masa/carga (m/z) del analito y su distribución isotópica. De acuerdo con la resolución empleada, puede ser suficiente para establecer la fórmula molecular del compuesto analizado (Gachumi et al., 2020; Y. L. Li et al., 2005).

La selección del método de ionización en MS depende de las muestras y de la aplicación. En el caso del análisis de mezclas de fosfolípidos, se requiere una técnica de ionización suave,

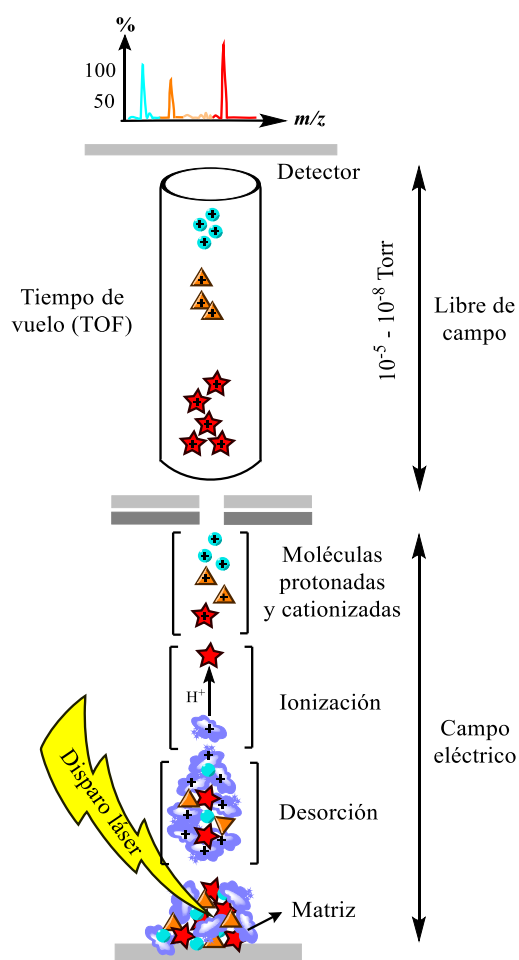


FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

como *electrospray* (ESI, por sus siglas en inglés) o ionización/desorción por láser asistida por matriz (MALDI, por sus siglas en inglés) que permita preservar los analitos de interés (El-Aneed et al., 2009; Karas et al., 1987). Sin embargo, MALDI es preferente sobre ESI debido a que tiene una alta tolerancia de impurezas en la muestra (Schiller et al., 2004) y, por ende, es la que se utilizará en este caso para caracterizar los extractos purificados de PLs de *Theobroma cacao* L.

Figura 3.

Esquema general de un análisis por espectrometría de masas MALDI.



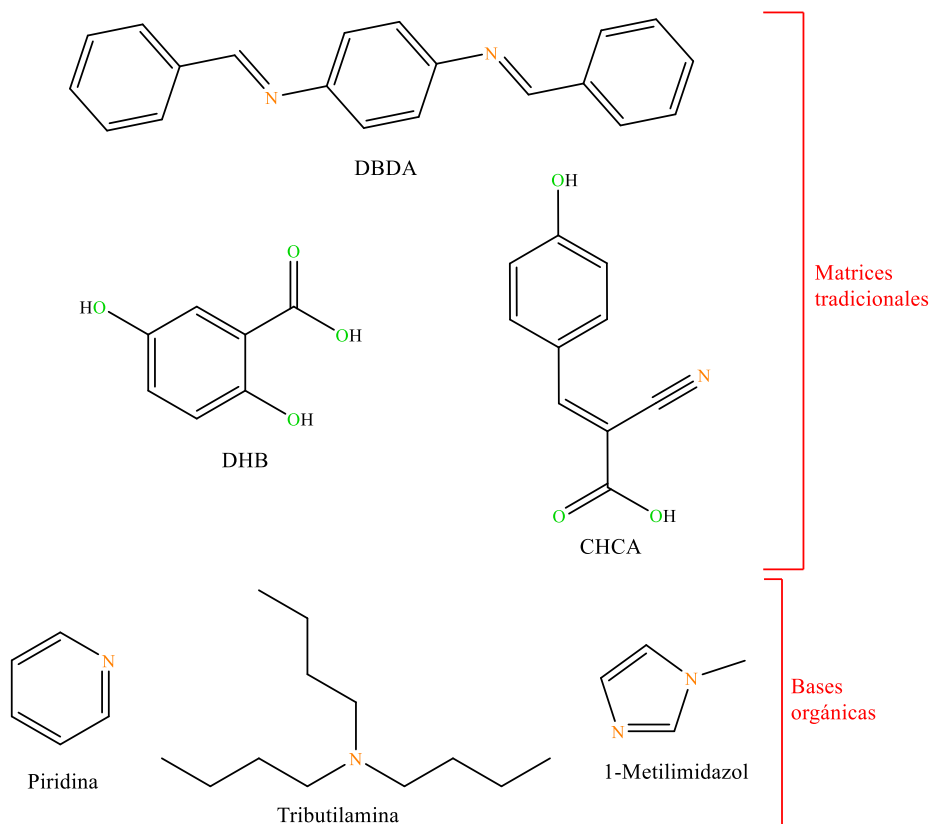
La técnica de ionización MALDI (**Figura 3**) involucra una matriz, generalmente un compuesto orgánico de bajo peso molecular que funciona como mediador para la absorción de

FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

radiación proveniente del láser, y es deseable que produzca señales en una ventana espectral diferente a la del analito deseado. La matriz debe cocrystalizar con los analitos y tener alta absorptividad molar en la longitud de onda de emisión del láser (Nd:YAG, $\lambda = 355$ nm). Algunas de las matrices más utilizadas para el análisis de PLs, tanto en modo positivo como negativo, son el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) y matrices líquidas iónicas que incorporan cantidades equimolares de un ácido y una base orgánica, ver **Figura 4** (Calvano, de Ceglie, et al., 2012; Y. L. Li et al., 2005; Shanta et al., 2011). La matriz que se utilizará en la caracterización por MALDI de los extractos de PLs de *T. cacao* L será DHB.

Figura 4.

Algunas matrices reportadas para el análisis en MALDI y bases orgánicas para matrices líquidas iónicas.



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

La energía del láser hace que se generen posteriormente iones primarios de la matriz, acompañados de reacciones de transferencia de protones, cationes y electrones (este último debido a su complejidad es el menos explorado) (Calvano et al., 2017; Karas et al., 1987). Los iones formados varían su velocidad dependiendo de la masa que posean, haciendo que, al dejarlos a la deriva en una región libre de campo, se facilite su separación de acuerdo con su tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés), para ser finalmente detectados de acuerdo con su relación m/z (Gross, 2017; Skoog et al., 2014). Una de las bases de datos más utilizada en la caracterización de los PLs es LIPID MASS (Sud et al., 2007), la cual también será utilizada acá.

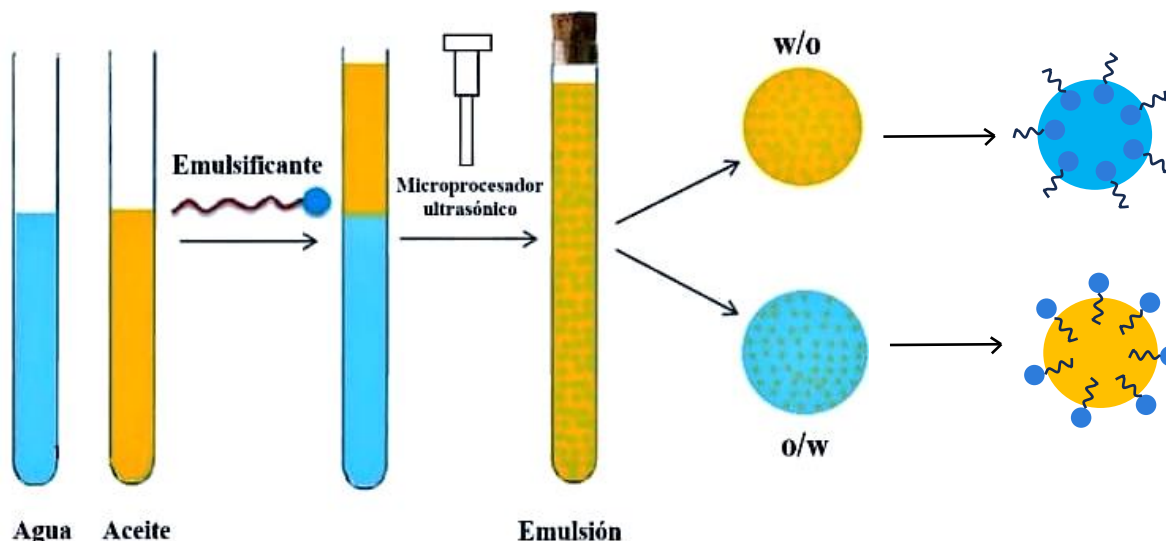
2.3. Emulsiones

Una fase líquida se puede dispersar en forma de gotas (fase dispersa o interna) dentro de otra fase líquida (fase continua o externa) inmisible (Dammak et al., 2020), formando un sistema coloidal disperso. En el caso de las emulsiones estudiadas en este proyecto, la fase dispersa será el agua y la continua, el aceite de girasol. Las emulsiones pueden ser clásicamente de tipo agua en aceite (w/o) (y que son las más relevantes en esta investigación), donde la fase continua es el aceite, o de tipo aceite en agua (o/w), siendo la fase continua el agua (McClements & Gumus, 2016; Xia et al., 2022), ilustradas en la **Figura 5**. El estudio de la estabilidad de las emulsiones se basa no sólo en las propiedades químicas de la emulsión sino también en el surfactante y la interfaz aceite-agua, ya que es indispensable que el surfactante tenga afinidad por ambas fases a usar en la emulsión y pueda ayudar en la reducción de la tensión interfacial entre las fases para disminuir los fenómenos de inestabilidad que se pueden generar (Wang et al., 2021).



Figura 5.

Proceso de emulsificación con microprocesador ultrasónico como homogeneizador para formar emulsiones de tipo o/w o w/o.



Desde el punto de vista termodinámico, este proceso no es espontáneo. Existe una tendencia natural en estos líquidos inmiscibles a separarse con el tiempo, buscando minimizar su área interfacial. Sin embargo, bajo ciertas condiciones fisicoquímicas, es posible lograr que estos líquidos, aunque sean termodinámicamente inestables, se vuelvan estables cinéticamente. Esto se logra formando una emulsión mediante la adición de un surfactante adecuado o una mezcla de ellos, lo cual reduce la tensión interfacial (Di Bari, 2015).

Los compuestos emulsionantes desempeñan dos funciones clave en la producción de emulsiones: inducen la formación de finas gotas de la fase dispersa durante la homogeneización y mejoran la estabilidad de las gotas una vez formadas (McClements & Gumus, 2016), papel que desempeñarán en este proyecto los PLs extraídos de la manteca de cacao. Normalmente los emulsionantes tienen densidades menores a uno de los líquidos que se usarán en la formulación y mayor al otro. Esta característica, es lo que les permite ayudar a combinar estos líquidos que



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

normalmente no se mezclarían entre sí (McClements, 2010; Tamang et al., 2022; Ushikubo & Cunha, 2014).

Los surfactantes son ampliamente utilizados en procesos industriales (alimentos, detergentes, productos farmacéuticos y de aseo personal, cosméticos, pinturas, productos agrícolas, entre otros) (Topuz et al., 2021) y pueden ser naturales o sintéticos, donde las opciones naturales son preferibles ya que los sintéticos tienen baja biodegradabilidad y alta asociación a problemas de salud (Dammak et al., 2020). Entre los emulsionantes naturales se encuentran las proteínas anfifílicas, los polisacáridos, y por supuesto, las lecitinas (principalmente compuestas de fosfolípidos del tipo PC, PE, PI y PA) (McClements & Gumus, 2016).

Las lecitinas son comúnmente aisladas de soya, huevos, leche, semillas de girasol, entre otros (Topuz et al., 2021), y pueden reducir en gran medida la tensión superficial entre el agua y el aceite, permitiendo así que el agua y el aceite formen una emulsión uniforme y estable. Debido a la presencia de diferentes grupos polares en su "cabeza", los fosfolípidos en las lecitinas presentan diversas propiedades de actividad interfacial. Por ejemplo, lecitinas con alto contenido en PC tienden a formar emulsiones o/w, mientras que las que tienen alto contenido en PE y PI favorecen la formación de emulsiones w/o (McClements & Gumus, 2016).

Un concepto importante en las emulsiones es el Balance Lipofílico-Hidrofílico (HLB, por sus siglas en inglés), que determina el tipo de emulsión que se generará a partir de la ecuación general de Griffin (**Ecuación 1**), donde M es el peso molecular del surfactante y M_w es el peso molecular del grupo hidrófilo (Griffin, 1949; Pasquali et al., 2009; Yamashita et al., 2017).

El Balance Lipofílico-Hidrofílico también puede ser calculado a partir de la ecuación de Davie, la ecuación de Kawakami, entre algunas otras, pero en general todas las ecuaciones tienen en cuenta el equilibrio entre el tamaño y la fuerza de los grupos hidrófilos y lipófilos de una



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

molécula de emulsificante (Yamashita et al., 2017). Asimismo, existe otra ecuación en la que se suman los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos del surfactante, en los PLs en el caso de este proyecto, y se asocian con su respectiva abundancia, pero no se tienen en cuenta sus pesos moleculares (Bergenståhl & Quiroga, 2008).

$$HLB = 20 \left(\frac{M_w}{M} \right) \quad \text{Ecuación 1}$$

Los valores de HLB para un surfactante pueden oscilar entre 0 y 18 (**Tabla 1**), los compuestos anfifílicos con valor de HLB entre 3 y 8 son óptimos para estabilizar emulsiones de tipo w/o, mientras que en el rango de 8 a 16 estabilizan emulsiones o/w (Zheng et al., 2018). En otras palabras, un valor alto indica que el surfactante tiene mayor afinidad con el agua, mientras que uno bajo indica mayor afinidad por la fase oleosa (Dong et al., 2013; McClements, 2010; Yamashita et al., 2017). En lo que concierne a este proyecto, se determinará el valor para la mezcla de PLs extraída de la manteca de *T. cacao* L.

Tabla 1.

Escala de HLB según (Griffin, 1949).

Hidrofílicos (> 8)	↑ ↓	15-18	Solubilizantes
		13-16	Detergentes
8-16		Emulsificantes o/w	
6-8		Agentes humectantes	
Lipofílicos (< 8)		3-8	Emulsificantes w/o
		1,5-3	Agentes antiespumantes



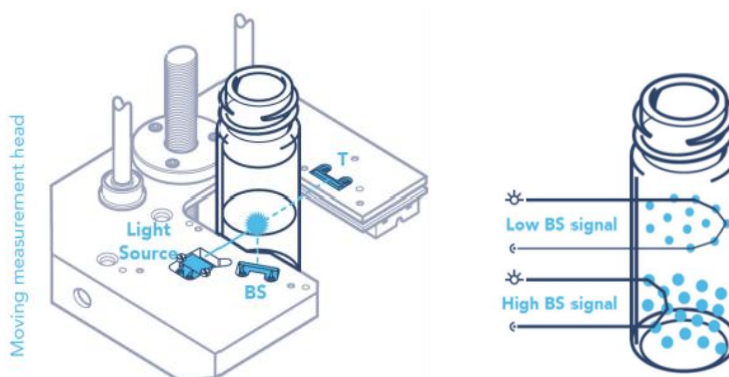
2.4. Medición de estabilidad de emulsiones

El equipo Turbiscan Lab es el ideal para estas mediciones y reiteradamente se reporta en análisis de este tipo, por lo cual fue el equipo que se eligió para realizar las mediciones de estabilidad de las emulsiones propuestas y realizadas en este proyecto de investigación. El Turbiscan se basa en el principio de la dispersión de luz múltiple estática (SMLS, por sus siglas en inglés) para determinar la estabilidad de dispersiones. Se compone de un diodo electroluminiscente con longitud de onda en el infrarrojo cercano (880 nm) que funciona como fuente de luz y de dos sensores ópticos síncronos que adquieren medidas cada 40 μm , demorando cada medición 20 s.

Uno de los sensores es de transmitancia (T), ubicado a 180° de la fuente de luz, que recolecta la intensidad de luz que pasa a través de la muestra, y el otro de retrodispersión (BS), ubicado a 45° de la fuente, que recolecta la intensidad de luz reflejada por las partículas de la emulsión, tal como se observa en la **Figura 6**.

Figura 6.

Principio de medición del Turbiscan.



Nota. Imagen tomada de Turbiscan LAB Uses Static Multiple Light Scattering (SMLS) to Detect Particle Migration and Size Variation in Liquid Dispersions.

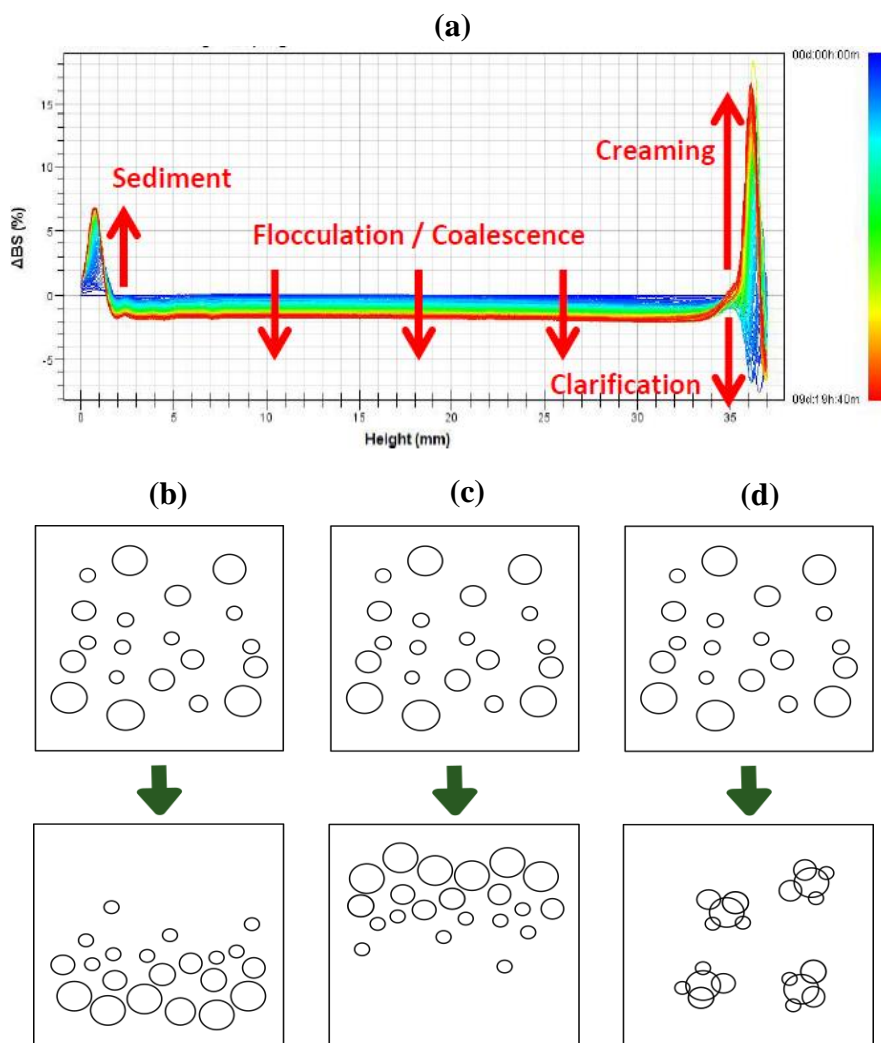
FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

El software del equipo genera gráficas (**Figura 7a**) que relacionan la altura del vial (i.e., eje horizontal), el tiempo (i.e., gradiente de color) y el diferencial de la luz retrodispersada o transmitida (i.e., eje vertical), así como lo veremos en este proyecto más adelante. Estas gráficas permiten analizar cualitativamente el comportamiento de la estabilidad dentro de emulsión mediante la observación de fenómenos reversibles de desestabilización, como la sedimentación (que conlleva también clarificación) (**Figura 7b**) y el cremado (**Figura 7c**), causados por una variación en la concentración de partículas e influenciados por la gravedad. Adicionalmente se pueden detectar fenómenos irreversibles, como la floculación y coalescencia (**Figura 7d**), ocasionados por el cambio del tamaño de las gotas (Turbiscan Quantitative Sample Ranking Fast Decision Making, N.D.; Turbiscan Time Saving Stability Ranking Objective). Todos estos fenómenos serán explicados más adelante cuando se presenten las mediciones de estabilidad de las emulsiones realizadas.



Figura 7.

Fenómenos observados en el Turbiscan: (a) gráfica generada por el equipo, (b) sedimentación/clarificación, (c) cremado y (d) floculación/coalescencia.



Nota. Imagen tomada de Dispersiones LAB.

Adicionalmente, la estabilidad puede determinarse cuantitativamente mediante una medida adimensional que el equipo calcula automáticamente conocida como el Índice de Estabilidad del Turbiscan (TSI, por sus siglas en inglés). Las mediciones se realizan en un lapso determinado de tiempo (t), a lo largo de la altura del vial (z) y en cada posición medida (h) (**Ecuación 2**).

$$TSI(t) = \frac{\Delta h}{z_{m\acute{a}x} - z_{m\acute{i}n}} \sum_{t_i=1}^{t_{m\acute{a}x}} \sum_{z_i=z_{m\acute{i}n}}^{z_{m\acute{a}x}} |(BS \text{ o } T)(t_i, z_i) - (BS \text{ o } T)(t_{i-1}, z_i)| \quad \text{Ecuaci3n 2.}$$

El TSI corresponde a la suma acumulativa de la diferencia de los escaneos de las desestabilizaciones detectadas por los sensores y tiene en cuenta 3nicamente los valores de transmitancia si la suma acumulativa de las desestabilizaciones detectadas por BS es menor al 0,2%. En caso de que T sea menor al 0,2%, entonces solo se tienen en cuenta los valores de retrodispersi3n, como lo ser3 para el caso de las emulsiones aqu3 realizadas.

Cuando el TSI tiende a cero, indica que la muestra es estable, pero contrariamente, si este valor es muy alto, la muestra es consecuentemente inestable. Esto simplifica la comparaci3n entre formulaciones sin tener que recurrir a tediosas observaciones visuales, que no siempre son confiables, ni a m3ltiples c3lculos complejos para poder elegir la mejor emulsi3n dentro de un grupo, como lo ser3 ac3 al comparar el blanco con la lecitina de girasol y el extracto enriquecido y purificado de PLs de *T. cacao* L.

2.5. Tensi3n interfacial

Las mol3culas cerca de esta interfaz experimentan diferentes interacciones en comparaci3n a otras equivalentes dentro del fluido a granel (Kronberg et al., 2014). La tensi3n interfacial (IFT o γ) es un concepto fundamental en la ciencia de coloides que se describe como la fuerza de atracci3n entre mol3culas presentes en la interfaz de dos fluidos inmiscibles que se encuentran en contacto. Tambi3n es definida como la medida de la energ3a requerida para aumentar el tama3o de la interfaz entre las dos fases, y se define como la energ3a de Gibbs por unidad de 3rea de la interfaz a una temperatura y presi3n espec3fica, expresada en fuerza por unidad de longitud, (i.e., mN/m o dina/cm) (Speight, 2020).



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

Estas interacciones presentes suelen ser fuerzas intermoleculares relacionadas con Van der Waals, enlaces de hidrógeno, Debye, Dipolo-Dipolo, Dipolo-Dipolo-Inducido-Dipolo y London, que pueden contribuir al comportamiento IFT (Miadonye et al., 2023). Sin embargo, en el estudio de la IFT o fenómenos interfaciales, como la interfaz aceite-agua, las principales fuerzas varían debido a la diferencia en la naturaleza de los líquidos y sus interacciones moleculares.

Las principales fuerzas involucradas entre sustancias polares y no polares son las adhesivas. Aunque las moléculas de aceite no forman enlaces de hidrógeno, las moléculas de agua sí lo hacen fácilmente entre sí y con cualquier otra molécula polar presente en el aceite, creando fuerzas de atracción que refuerzan las adhesivas, haciéndolas predominantes y fuertes (Fingas, 2017).

Otro tipo de interacción que contribuye al IFT en la formación de la fase inmisible es la interacción hidrofóbica, presenciándose este efecto por ejemplo cuando se introduce una sustancia hidrófoba en el agua, ya que esta altera o rompe la red de enlaces de hidrógenos, es decir la cohesión. Esta alteración conduce a la formación de una estructura ordenada localmente de moléculas de agua que rodean la sustancia hidrófoba, conduciendo a un aumento de IFT (Silverstein, 1998). Existen varias técnicas para la medición de la tensión interfacial, pero la más sencilla en cuanto instrumentación, que sea robusta y versátil, es el analizador de forma de gota, también conocido como tensiómetro de gota pendiente.

En este proyecto se utilizará el equipo analizador de gota pendiente para determinar la tensión interfacial entre el aceite de girasol refinado y el agua, con y sin presencia de surfactante. Inicialmente se ingresan los datos de las densidades de las fases utilizadas y posteriormente, una jeringa de vidrio con punta de acero en forma de u se carga con el fluido menos denso (aceite de girasol refinado), dejándose suspendida una gota. Se procede luego a calibrar la cámara para que



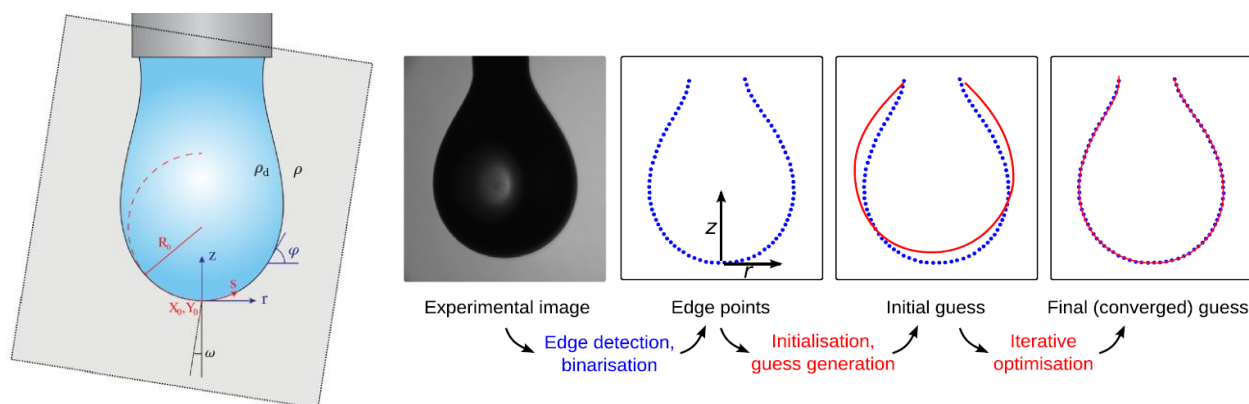
FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

enfoco la gota. Esta gota se equilibra con la fase de mayor densidad (agua) dentro de una celda de vidrio de borosilicato. Durante este proceso, se genera un equilibrio entre la deformación gravitacional de la gota (determinada por la aceleración gravitacional, g) y la fuerza restauradora (IFT, γ). Además, se consideran la diferencia de densidades entre los líquidos de las fases ($\Delta\rho$), el parámetro de forma (factor B) y el radio de la gota (R), buscando el perfil que mejor se ajuste a la forma de la gota (**Figura 8**), como el descrito por la ecuación de Young-Laplace (Berry et al., 2015), descrita a continuación:

$$\gamma = \frac{\Delta\rho g R^2}{B} \quad \text{Ecuación 3.}$$

Figura 8.

Esquema del cálculo del valor de IFT con un tensiómetro de gota pendiente, iniciando con una imagen experimental cruda seguida de una solución ajustada obedeciendo al perfil de la ecuación de Young-Laplace, donde las anotaciones muestran las variables asociadas utilizadas en el perfil computacional para determinar el número de Bond y por tanto el valor de γ .



Nota. Tomada de Berry et al., 2015.



2.6. Antecedentes

En la **Figura 9**, se muestra la gráfica obtenida al realizar una búsqueda el 10 de mayo del 2024, en el periodo de tiempo desde el año 2000 hasta el año 2024, base de datos *Scopus* (*Elsevier*), al utilizar la ecuación TITLE-ABS-KEY (*phospholipids AND emulsion AND properties*), lo que permite hacer una estimación del número de revisiones y artículos científicos publicados relacionados.

Figura 9.

Gráfica basada en la búsqueda realizada el 10 de mayo del 2024 en la base de datos *Scopus* (*Elsevier*) con la ecuación de búsqueda TITLE-ABS-KEY (*phospholipids AND emulsion AND properties*) que relaciona el número de artículos publicados con su respectivo año de publicación en el período 2000-2024.

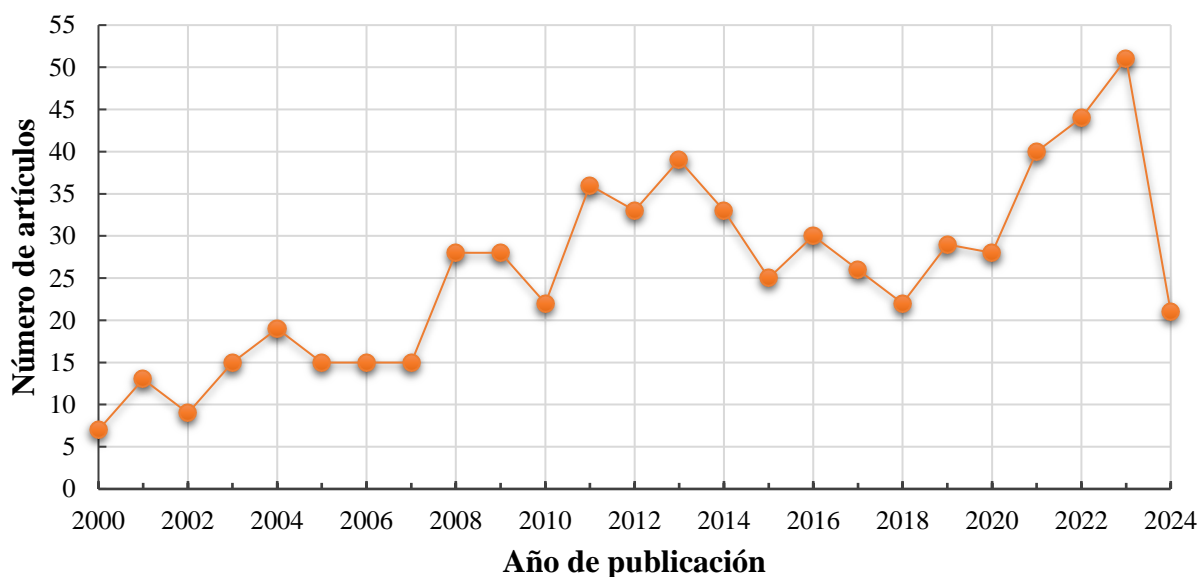
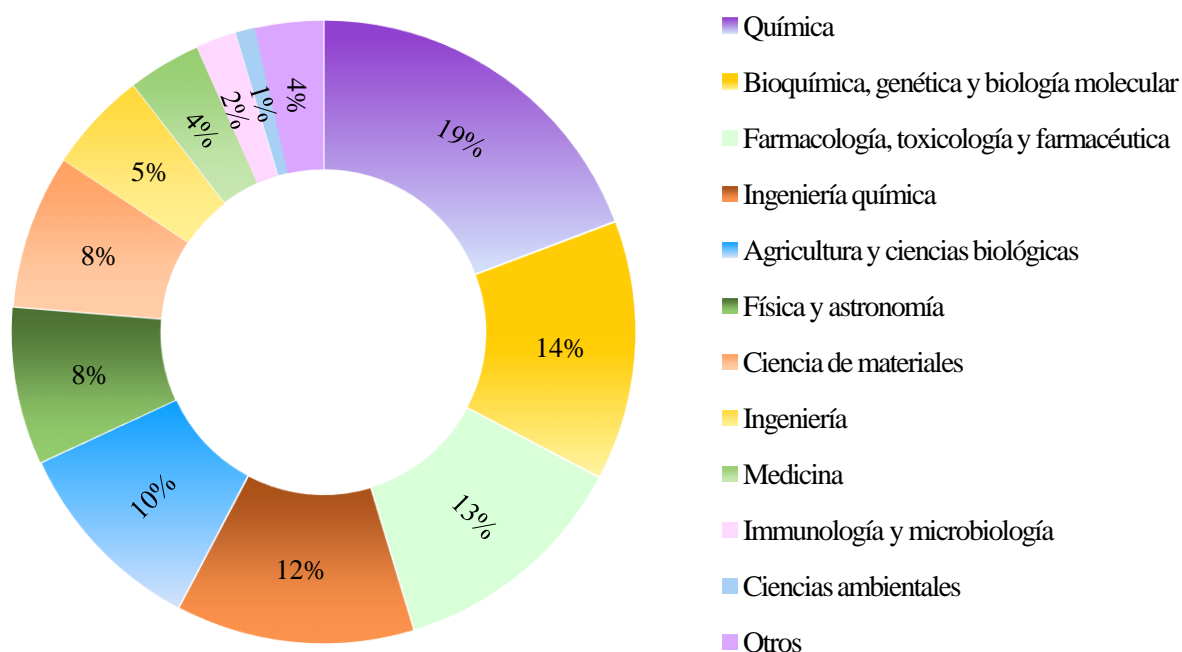


Figura 10.

Gráfica basada en la búsqueda realizada el 10 de mayo del 2024 en la base de datos Scopus (Elsevier) con la ecuación de búsqueda TITLE-ABS-KEY (phospholipids AND emulsion AND properties) que relaciona el porcentaje de artículos publicados con las áreas de investigación respectivas en el período 2000-2024.



De acuerdo con la revisión de la literatura (**Figura 10**) los fosfolípidos, han sido utilizados en diversos campos debido a sus propiedades emulsificantes (para mezclar y estabilizar aceites y agua en una emulsión), hidratantes, lubricantes, e incluso en algunas ocasiones también por sus propiedades antioxidantes (X. Li et al., 2019; Perazzo et al., 2021; Xia et al., 2022). Estas propiedades, y el hecho de que se puedan obtener de diferentes fuentes animales o vegetales (Bot et al., 2021; Topuz et al., 2021), hacen que los fosfolípidos sean muy atractivos para la investigación. Lo anterior, también se demuestra en el resultado de la búsqueda en *Scopus* (Elsevier), que arrojó un total de 643 artículos científicos en las áreas de investigación descritas



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

en la **Figura 10**. El número de artículos científicos publicados hasta el momento y sus áreas demuestra que es un campo de investigación de creciente interés científico. Los países que más han contribuido con documentos relacionados son China (121) y Estados Unidos (100), seguidos por Alemania (61) y Francia (58). La información disponible incluye métodos de extracción, caracterización, purificación de lecitinas, estudios sobre sus propiedades emulsificantes y otros beneficios para la salud, la belleza y la industria en general (Bot et al., 2021; Lima et al., 2011; Tamang et al., 2022; van Nieuwenhuyzen, 2010; Xie & Dunford, 2019).

Para caracterizar diferentes mezclas de fosfolípidos es indispensable que el método de extracción sea eficiente, independientemente de la técnica analítica utilizada. Entre los métodos de extracción reportados por diversos autores (Deffense, 2009; Erickson, 1995; O'Brien, 2008) se encuentran los desgomados: ácido, con agua, en seco, enzimático, EDTA, etc. Los desgomados se utilizan principalmente en la industria de aceites vegetales y tienen como finalidad remover las impurezas, en especial los fosfolípidos, generalmente conocidos como gomas, que debido a su estructura tienen propiedades emulsificantes, generando la pérdida de aceite durante el refinado (Deffense, 2009).

En el análisis de PLs las técnicas más reportadas son cromatografía de capa fina, cromatografía en columna, cromatografía líquida de alta eficiencia, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas (Calvano, de Ceglie, et al., 2012; Frank, 2013; Schiller et al., 2004; van Nieuwenhuyzen, 2010; Yang et al., 2017). Varios autores (Dong et al., 2013; Korte & Lee, 2014; X. Li et al., 2019; Schiller et al., 2007; Shanta et al., 2011) reportan que partiendo de diversas fuentes que poseen PLs, mediante MALDI ha sido posible la correcta identificación y análisis de mezclas complejas de estos pertenecientes a diferentes familias, utilizando DHB, CHCA, 9-aminoacridina (9-AA), líquidos iónicos o combinaciones binarias de estas como matrices MALDI,



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

tanto en modo positivo, como en modo negativo. Asimismo, los autores (Cremonini et al., 2004; Schiller et al., 2004; van Nieuwenhuyzen, 2010; Yang et al., 2017) indican que en el caso de un análisis cuantitativo de PLs, resonancia magnética nuclear (RMN), es la técnica más empleada, encontrando hasta 15 clases de fosfolípidos (incluyendo lisofosfolípidos).

Los fosfolípidos encontrados por (Arruda & Dimick, 1991) en cristales de semillas aislados de manteca de cacao proveniente de Costa de Marfil fueron doce veces más concentrados a comparación de la manteca de cacao original, y encontraron las siguientes familias: PG, PC, PE, PI, LPC, PS y PA.

Las lecitinas de origen vegetal más comercializadas proceden principalmente de soya, girasol, y canola, aunque existen otros cultivos oleaginosos de los que se pueden extraer (Bot et al., 2021; Ejike Ogbonna et al., 2021; Hu et al., 2020; Wang et al., 2021), como la semilla de peonía (Xia et al., 2022) o los granos de *T. cacao* L. (Giraldo et al., 2020). Las lecitinas de soya suelen estar modificadas genéticamente, lo que genera una aceptación limitada dentro de los consumidores, que prefieren elegir otros cultivos (Kindlein et al., 2018; A. Li et al., 2024; Robert et al., 2020). Generalmente los principales componentes de las lecitinas vegetales son PC, PE y PI, con una pequeña cantidad de PA, sin embargo, de acuerdo con el método de extracción utilizado esto puede variar (Dammak et al., 2020; Deffense, 2009; L. G. Pan et al., 2004).

Por otro lado, las lecitinas de origen animal (Dammak et al., 2020; Eckert et al., 2019; Wang et al., 2021) vienen primariamente de la yema de huevo, suero de queso y pescado (Topuz et al., 2021). La lecitina de huevo se constituye principalmente por PC, PE y PI (Eckert et al., 2019). Recientemente se reportó inclusive una lecitina extraída de insectos comestibles, como lo son las larvas de mosca soldado-negra y el gusano amarillo de la harina, rica en PC y PE (A. Li et al., 2024).



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

Los surfactantes con alta concentración en PC tienden a favorecer la formación de emulsiones o/w, mientras que PE y PI facilitan la formación de emulsiones w/o, pero si cualquiera de ellas interactúa con proteínas, pueden mejorar las propiedades emulsionantes de los PLs (McClements, 2010; van Nieuwenhuyzen, 2010).

Las emulsiones son fundamentales en muchos productos comerciales, no obstante, día a día los consumidores exigen que los productos sean más sostenibles y respetuosos con el medio ambiente, por lo que identificar diferentes alternativas para la obtención de compuestos activos de superficie es un área de creciente interés científico (Dammak et al., 2020; McClements & Gumus, 2016; Tamang et al., 2022; Wang et al., 2021).

Gould et al., 2016 a partir de estudios por RMN ³¹P sobre la composición cualitativa y cuantitativa fosfolípida de material deslipificado de cacao, lograron formar emulsiones o/w estables de grado alimenticio, sugiriendo que el material de cacao puede tener un nuevo y potencial uso, incentivando a las estrategias de fabricación de nuevos emulsionantes de calidad alimentaria. Adicionalmente, (Joseph et al., 2020) realizaron emulsiones de tipo Pickering a base de aceite de girasol y agua, que estabilizaron con polvos vegetales deslipificados y finamente molidos de cacao, torta de prensa de colza y cáscaras de altramuz.

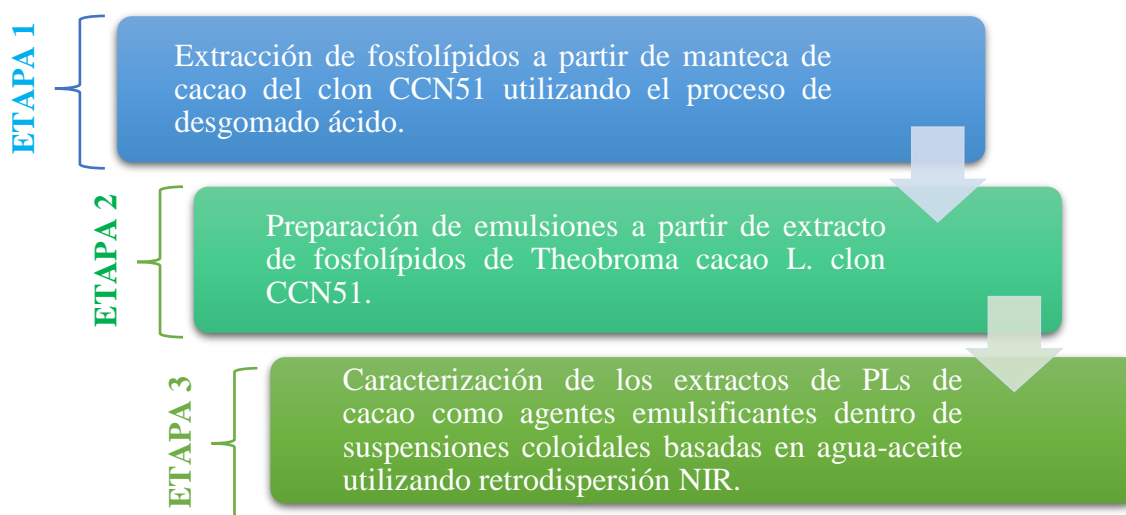


3. Metodología

El proyecto de investigación se realizó en tres etapas, siguiendo la metodología descrita en la siguiente imagen.

Figura 11.

Esquema metodológico seguido para el desarrollo del proyecto.



ETAPA 1: Extracción de fosfolípidos a partir de manteca de cacao del clon CCN51 utilizando el proceso de desgomado ácido.

3.1. Desgomado ácido modificado de manteca de *Theobroma cacao* L.

Se fundieron a aproximadamente 70 °C, 400 g de manteca de cacao (extraída por prensado de granos de cacao clon CCN51) a los cuales se le agregaron 8 mL de ácido cítrico 50 %p/p. La mezcla anterior se sometió a agitación y calentamiento (70 °C) durante 15 min, seguida de una neutralización con una solución 0,1 M de NaOH, hasta alcanzar un pH de 6,8.

Posteriormente, se adicionaron 20 mL de agua destilada, se agitó por 2 min y se envasó la mezcla resultante en tubos Falcon de 50 mL, para una consecutiva centrifugación en el equipo

FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

Hettich Universal 320 R (Hettich, Alemania) durante 30 min a 5000 rpm y con una temperatura de 39 °C. El sobrenadante (fase acuosa) se retiró cuidadosamente con una pipeta Pasteur, debido a que contenía la mezcla de fosfolípidos, y se trasvasó a tubos Falcon de 15 mL, llevándose a continuación a centrifugar por una segunda vez en el equipo Thermo Scientific Heraeus Labofuge 200 (Waltham, Estados Unidos) a 5000 rpm por 18 min a temperatura ambiente.

Los extractos de fosfolípidos obtenidos se colocaron en el ultracongelador a -80 °C por 24 horas. Finalmente, se liofilizaron en el equipo Biobase BK-FD10PT (Shandong, China) a ≤ 5 Pa y -80 °C durante 72 horas, para poder tener los extractos de PLs deshidratados y así evitar alteraciones en las proporciones de las emulsiones a realizar. El proceso realizado se puede observar en la **Figura 12**.

Figura 12.

*Procedimiento de extracción de los PLs de manteca de *T. cacao* L. por el proceso de desgomado ácido.*



ETAPA 2: Preparación de emulsiones a partir de extracto de fosfolípidos de *Theobroma cacao* L. clon CCN51.**3.2. Emulsiones a partir de extracto de PLs de cacao.**

Las emulsiones se prepararon utilizando aceite de girasol comercial como fase oleosa, agua tipo I como fase acuosa, y lecitina de girasol comercial o extracto liofilizado de PLs como emulsificante. Con el fin de garantizar que no se encontraran PLs en la fase oleosa, previo a la preparación de la emulsión, se eliminaron las moléculas polares con actividad superficial del aceite de girasol utilizando como adsorbente silicato de magnesio ($Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$, 4 %p/p), también conocido comercialmente como Florisil. Para lo anterior, se sometió la mezcla del aceite con el adsorbente a agitación en un vórtex por 30 minutos a 800 rpm, y posteriormente se llevó esta mezcla por 30 min a centrifugación a 2700 rpm y una temperatura de 26 °C.

En un vial de 57 mm (hasta la altura aproximada de 43-45 mm), se prepararon 20 mL de cada emulsión en proporciones volumétricas de aceite-agua (o-w) de 60:40 y 70:30. Se varió la cantidad de agente emulsionante, iniciando con 0 %p/p, seguida de 0,5 %p/p, 1 %p/p, 2 %p/p y 3%p/p. junto con azida de sodio (NaN_3 , 0,02 %p/v) como agente antimicrobiano. La mezcla resultante se llevó a un microprocesador ultrasónico VCX-750-220 (Sonics & Materials, Newtown, USA), con una potencia de 750 Watts, frecuencia de 20 kHz, amplitud de 20 %, temperatura ambiente y un tiempo de 15 min con pulsos de 5:5 segundos.



ETAPA 3: Caracterización de los extractos de fosfolípidos de cacao como agentes emulsificantes dentro de suspensiones coloidales basadas en agua/aceite utilizando retrodispersión NIR.

3.3. Caracterización de los fosfolípidos por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Inicialmente, se tomó 1 mg de los extractos enriquecidos de PLs liofilizados de manteca de cacao y se diluyeron en 1 mL de solución de THF:MeOH (1:1, v/v). La matriz de transferencia catiónica que se utilizó fue ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) 10 mg/mL, en una mezcla de ACN:H₂O (1:1, v/v) con 1% de ácido trifluoroacético (TFA). La proporción molar analito:matriz (A:M) que se preparó fue de 1:100. Luego, se depositó 1 µL de la mezcla matriz:analito sobre el *spot* del porta muestras (*target*) MALDI usando el método “*dried-droplet*”, el cual consistió en dejar caer una gota sobre el *spot* y dejar secar a temperatura ambiente antes de insertar el *target* en el espectrómetro de masas. Se depositaron tres *spots* de cada muestra, en la relación A:M anteriormente descrita.

Todos los ensayos de espectrometría de masas MALDI se realizaron en un espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF *Bruker Ultraflex* (Bruker Daltonics, Estados Unidos), provisto con un láser *Smart Beam* de Nd:YAG ($\lambda = 355$ nm), con frecuencia de 1 kHz, una salida máxima de energía aproximadamente de 85 µJ por disparo y un pulso de duración de 6 ns con ancho de *spot* de 10-100 µm. Los espectros de masas se adquirieron en el rango de m/z 100 a 1000 en modo reflectrón positivo y negativo, usando un voltaje de aceleración de 25 kV y “*pulsed ion extraction*” (PIE) de 100 ns.



3.4. Cálculo teórico de HLB.

El valor teórico de HLB para las emulsiones preparadas se determinó utilizando el método de Griffin (**Ecuación 1**) con apoyo del Grupo de Investigación In silico, de la Universidad de Sucre, Sincelejo, Sucre, Colombia. Además, para el cálculo del valor de HLB se consideraron datos reportados previamente por (Álvarez et al., 2013), los cuales permitieron realizar una comparación entre los valores de HLB de los PLs con los valores HLB de otras moléculas surfactante simuladas por dinámica molecular utilizando la biblioteca *ggplot2* y *R Studio* (versión 4.3.1) (Wickham, 2016).

3.5. Medición de estabilidad de emulsiones.

Para la medición de la estabilidad de las emulsiones se utilizó el equipo Turbiscan Lab (Formulacion, France) y el software Turbisoft-Lab (versión 2.0.0.33). Se monitoreó durante 90 minutos a 37,5 °C la dinámica del sistema de emulsiones una vez preparadas, recolectando mediciones cada minuto, con el fin de obtener perfiles de retrodispersión en función de la altura del vial que contenía las emulsiones y del tiempo (Giraldo-Dávila et al., 2018; Gris, 2015). Cabe mencionar que aquellas emulsiones que no contenían emulsificante se determinaron como blancos y que para cada una de las emulsiones generadas se hicieron dos réplicas, con el fin de determinar que tanto variaba la estabilidad en las mediciones realizadas.

3.6. Prueba de la gota.

Con el fin de determinar si las emulsiones modelo generadas eran o/w o w/o, se ajustó el procedimiento reportado por (Mahmoud et al., 2023). Se dejó caer una gota de la emulsión sobre un vaso de precipitado de 5 mL con agua destilada, y otra sobre uno que contenía aceite refinado



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

de girasol. Si la gota de emulsión se dispersa en el agua y no en el aceite, la emulsión es de tipo o/w, y viceversa.

3.7. Microscopía óptica.

Para obtener información cualitativa sobre la uniformidad de las emulsiones preparadas, se utilizó un microscopio óptico BX53 (Olympus, Japón) con 0,2 μL de la emulsión. Los ensayos en microscopía óptica permiten determinar el estado de agregación en el que se encuentran las emulsiones analizadas, para estos ensayos se evaluó el blanco, junto con las emulsiones preparadas a partir de lecitina de girasol y del extracto purificado enriquecido de fosfolípidos. Se observaron las emulsiones mencionadas una vez preparadas, y se tomaron fotografías para posteriormente determinar el tamaño promedio de las gotas que hacen parte de la emulsión por medio del programa de procesamiento de dominio público (Abràmoff et al., 2004).

3.8. Medición de la tensión interfacial.

Se midió la IFT de las emulsiones modelo generadas (70:30 o-w con 3 %p/p de emulsificante, junto con su respectivo blanco) utilizando un equipo analizador de forma de gota DSA25E (Krüss, Alemania). Para cada una de las mediciones se dispuso de una celda de vidrio de borosilicato de 2,5 x 2,5 x 2,5 cm^3 que se llenó con la fase de mayor densidad (agua). Seguidamente, una jeringa de borosilicato de 500 μL de capacidad con aguja de acero en forma de U (diámetro externo de 1 mm) se llenó con la fase menos densa (aceite solo para el blanco, y aceite mezclado con el respectivo emulsificante para las otras emulsiones) (ver **Figura 13**). Para cada una de las muestras, se inyectaron 3 gotas y se realizó la medición de IFT siguiendo el modelo Young-Laplace (Cortés et al., 2013; Gris, 2015). Todas las mediciones se hicieron manteniendo

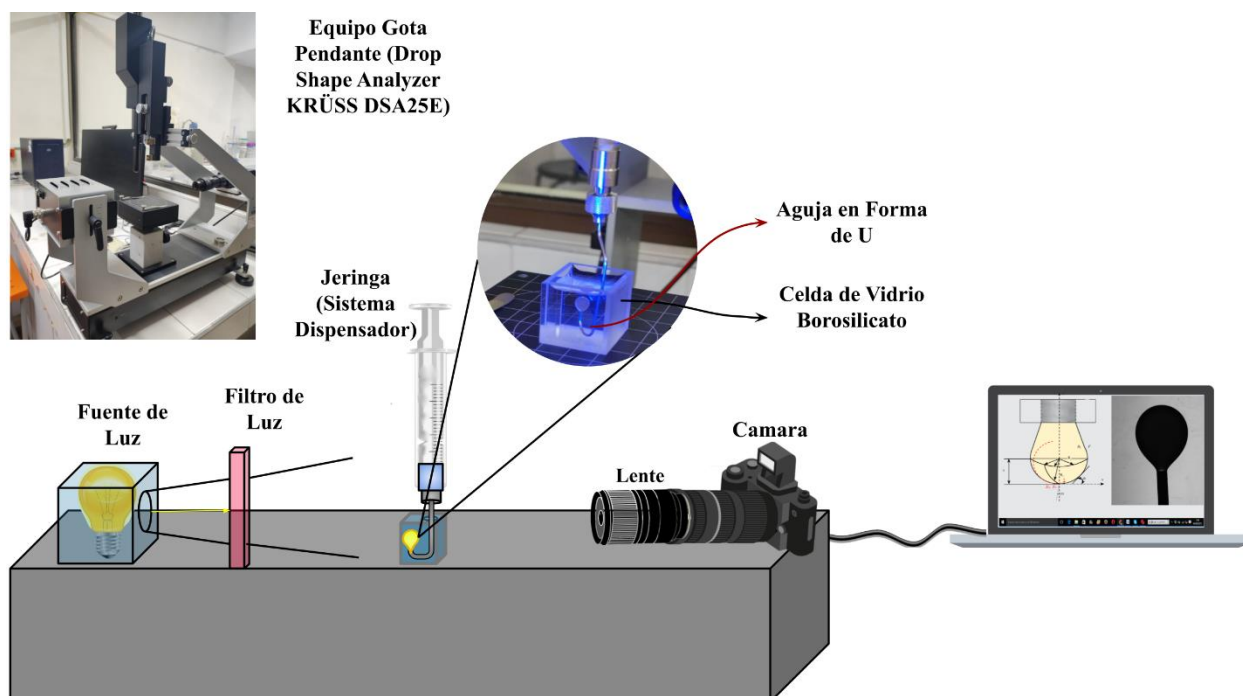


FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

temperatura ambiente, aproximadamente de 25 °C, y se recopiló el registro fotográfico que proporcionó el equipo.

Figura 13.

Montaje experimental del equipo analizador de forma de gota pendiente utilizado en este proyecto.



Nota. Ilustración realizada por el Grupo de Investigación In silico, de la Universidad de Sucre, Sincelejo, Sucre, Colombia.

4. Resultados y Discusión

4.1. Extracción de fosfolípidos a partir de manteca de cacao del clon CCN51 utilizando el proceso de desgomado ácido.

Para obtener el extracto enriquecido de PLs se llevó a cabo el proceso de desgomado ácido modificado de la manteca de cacao de la **Figura 14**, el cual es un proceso industrializado para la

FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

remoción de impurezas de los aceites, entre ellas los fosfolípidos, debido a que afectan negativamente las propiedades físicas y químicas de estos (i.e., generando oscurecimiento y asentamiento durante el almacenamiento) (Chew et al., 2017; O'Brien, 2008). Fue indispensable que la manteca estuviera completamente líquida, lo cual se garantizó manteniendo una temperatura entre 70 °C y 80 °C, para garantizar las interacciones con los reactivos.

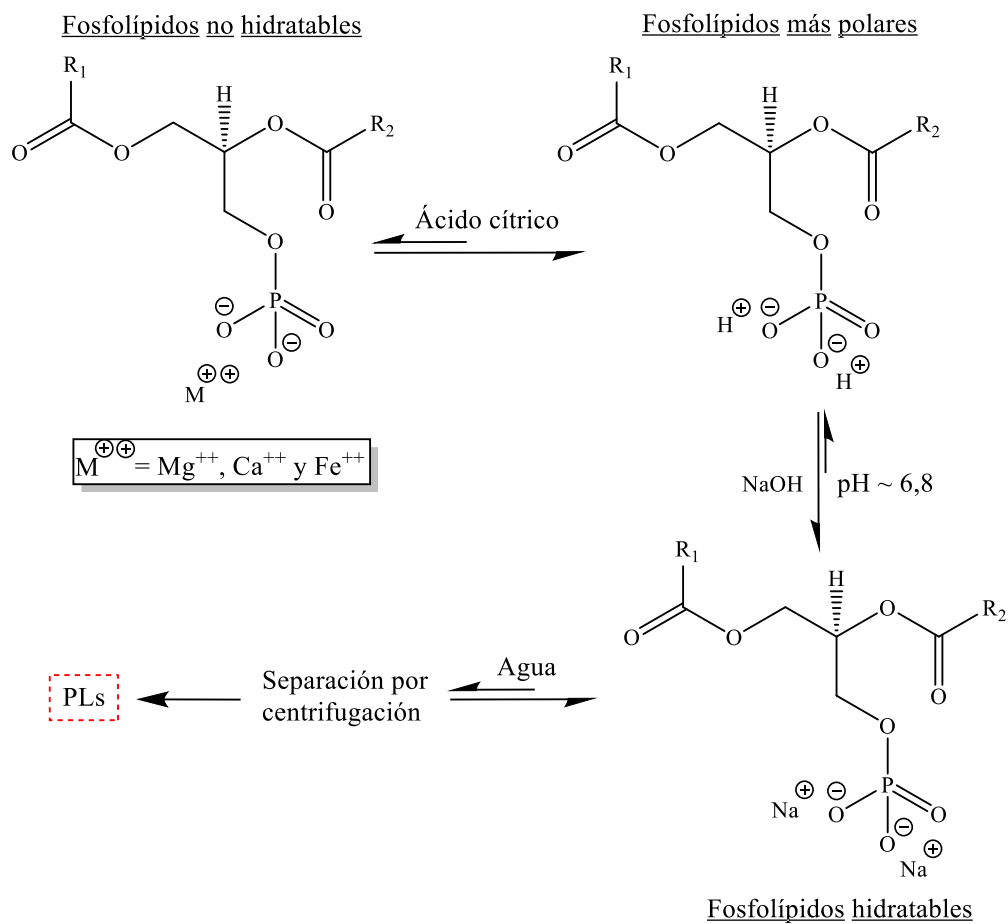
Seguido a ello, a la manteca fundida se le agregó ácido cítrico con el fin de protonar ligeramente los fosfolípidos no hidratables (sales de Ca, Fe y Mg de ácidos fosfatídicos), haciéndolos más polares y solubles en agua. Luego, con NaOH se incrementa el pH hasta 6,8, sin exceder este valor para evitar saponificación, y convertir los fosfolípidos en sales de sodio que son hidratables. Los PLs migran a la fase acuosa y posteriormente se puedan separar fácilmente de la manteca mediante centrifugación. Las reacciones descritas anteriormente (Deffense, 2009), que se llevaron a cabo en el proceso de desgomado ácido modificado de la manteca de cacao, se pueden visualizar en la **Figura 14**.

En total se desgomaron 7,6312 kg de manteca de cacao, de los cuales se obtuvieron 36,6 g de extracto enriquecido de diferentes familias de PLs, correspondiendo a un rendimiento de 0,48 %. Para garantizar un mayor enriquecimiento de PLs en el extracto adquirido por el desgomado, y eliminar los posibles TAGs remanentes después del desgomado, se realizó la purificación del extracto crudo mediante múltiples lavados con acetona fría, debido a que los PLs son insolubles en acetona. Se obtuvo un rendimiento de 27,95 % a partir de los extractos crudos adquiridos del desgomado (36,6 g), y de 0,13 % a partir de la manteca de cacao (7,6312 kg). Esos rendimientos coinciden con la información reportada por (Codini et al., 2014) en la manteca de cacao.



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES**Figura 14.**

Reacciones químicas involucradas en el proceso de desgomado ácido modificado.



4.2. Preparación de emulsiones a partir de extracto de fosfolípidos de *Theobroma cacao* L. clon CCN51 y caracterización de los extractos de PLs de cacao como agentes emulsificantes dentro de suspensiones coloidales basadas en agua/aceite utilizando retrodispersión NIR.

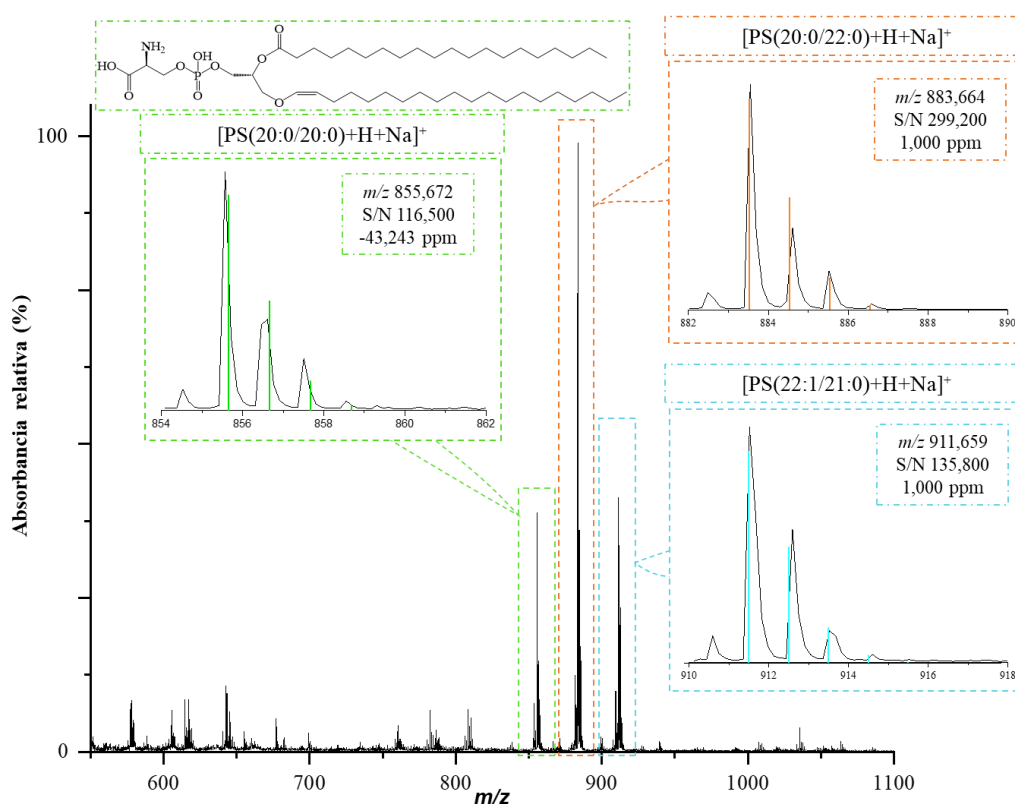
Se realizaron mediciones por espectrometría de masas MALDI-TOF en modo de ionización positivo y negativo, **Figura 15**, con el fin de conocer la composición molecular de los extractos purificados obtenidos. La matriz seleccionada para los ensayos fue DHB, ampliamente

FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

reportada en la literatura para el análisis de biomoléculas como PLs (Petkovic et al., 2009; Schiller et al., 2004a), además de que causa poca fragmentación (Calvano, De Ceglie, et al., 2012).

Figura 15.

Espectros de masas MALDI-TOF en modo de ionización positivo para los extractos enriquecidos de PLs liofilizados de manteca de cacao junto con algunos de los compuestos identificados y la comparación de algunos patrones isotópicos tanto teóricos como experimentales.



Con la ayuda de la base de datos LIPID MASS (Sud et al., 2007), teniendo en cuentas los ácidos grasos más abundantes en la manteca de cacao según lo reportado por varios autores (Arruda & Dimick, 1991; Servent et al., 2018) (ácido linoléico, oléico, palmítico y esteárico), y las cargas netas de las diferentes familias de PLs (ilustradas en la **Figura 2**), se hicieron las respectivas asignaciones de las señales. Los análisis se realizaron utilizando la ventana espectral

FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

entre m/z 550-1100, debido a reportes previos de la literatura (Calvano et al., 2009). Además, en este rango m/z típicamente no se detectan señales propias de la matriz MALDI utilizada, DHB. En total, se identificaron ocho PLs en modo positivo (**Figura 15**). Las moléculas de PC son zwitteriones (poseen una carga positiva y otra negativa) (Xie, 2018), y al tener una carga neta neutra requerían de un protón o un catión, por lo que en la literatura (Fuchs et al., 2007, 2009) esta familia de PLs en la lecitina de huevo se reportan como $[M + H]^+$ y $[M + Na]^+$, encontrados en este proyecto de la misma manera. Las moléculas que corresponden a la familia PS poseen en su cabeza polar dos cargas, una positiva y otra negativa, mientras que en su cola hidrofóbica posee una carga negativa, haciendo que sea indispensable un protón que neutralice la carga negativa de la molécula y un catión que la cargue positivamente, reportadas así por varios autores (Fuchs et al., 2007; Schiller et al., 1999, 2004). Por lo anterior, las moléculas pertenecientes a la familia PS también se reportan en este proyecto como especies monocargadas $[M + H + Na]^+$. Todas las moléculas se formaron por transferencia protónica (de la matriz orgánica) o catiónica (debido a la presencia de metales alcalinos, como el sodio, presentes en todas las muestras biológicas) (Pulfer & Murphy, 2003). En la **Tabla 2** se reporta la lista de los iones observados y su posible identificación. Los patrones isotópicos teóricos se calcularon con el software Chemcalc (Patiny & Borel, 2013), permitiendo visualizar la coincidencia con los patrones experimentales. Además, los valores calculados de exactitud en la masa fueron menores que 100 en todos los casos, lo cual tiene relación con la resolución del analizador tiempo de vuelo utilizado en los ensayos. La composición molecular encontrada en estos extractos se comparó con trabajos previos del grupo de investigación (Giraldo et al., 2020) y fue similar.



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES**Tabla 2.**

Listado de las señales observadas en el espectro de masas MALDI-TOF de los extractos enriquecidos de PLs purificados y aislados de manteca de *Theobroma cacao* L. en modo positivo.

	Familia	Fórmula	Masa monoisotópica	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+H+Na] ⁺	m/z experimental	Exactitud en masa (ppm)
1	PC	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	759,577	760,585			760,520	85,461
2	PC	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	759,577		782,567		782,534	42,169
3	PC	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	785,593		808,583		808,498	105,122
4	PS	C ₄₆ H ₈₈ NO ₉ P	829,619			853,617	853,603	16,401
5	PS	C ₄₆ H ₉₀ NO ₉ P	831,635			855,635	855,672	-43,243
6	PS	C ₄₈ H ₉₄ NO ₉ P	859,666			883,664	883,664	1,000
7	PS	C ₄₉ H ₉₂ NO ₁₀ P	885,645			909,643	909,643	1,000
8	PS	C ₄₉ H ₉₄ NO ₁₀ P	887,661			911,659	911,659	1,000

Asimismo, se adquirió un espectro en modo de iones negativos, en el cual se analizó la ventana espectral entre m/z 550-1.000, identificando 12 compuestos de diversas familias de PLs (PA, PE, PI, PS y PG). El número de compuestos detectados en modo negativo fue mayor que el número de compuestos detectados en modo positivo, quizás debido a la carga neta negativa presente en la mayoría de las familias de PLs en la manteca de cacao (PA, PG, PS y PI) (ver **Figura 2**). En el caso de la familia PE, que posee una carga neta neutra, las especies químicas detectadas (**Tabla 3**) corresponden a moléculas que perdieron un protón y se encuentran cargadas negativamente de la forma $[M - H]^-$, mientras que, en el resto de las familias (PA, PG, PS y PI), las moléculas se encontraban con una carga neta negativa, permitiendo visualizarlas del modo $[M]^-$. Estas moléculas provenientes de diversas fuentes (animales y vegetales) fueron reportadas igualmente por varios autores (Fuchs et al., 2007; Petkovic et al., 2009; Pulfer & Murphy, 2003).



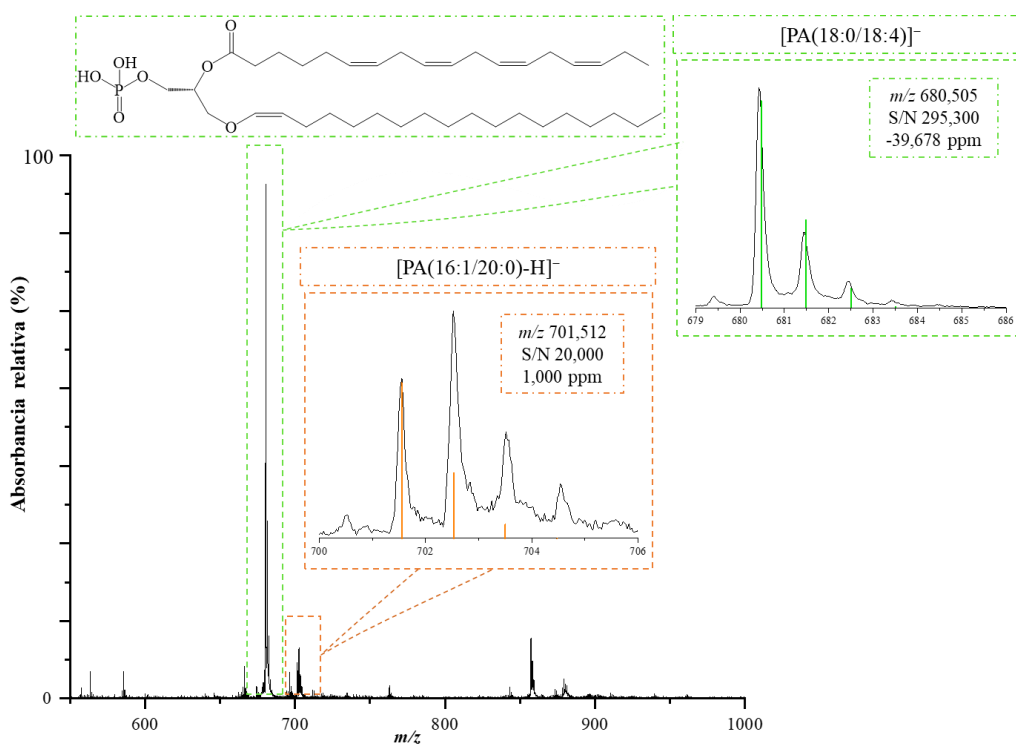
FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

Los patrones isotópicos teóricos coincidieron con los patrones experimentales calculados, con errores de exactitud en las masas menores a 82 ppm.

En el caso de la señal en m/z 701,512, el patrón isotópico de la señal $M + 1$ no coincide con la abundancia relativa de la señal del espectro. Esto puede deberse a que está ocurriendo una superposición con otras señales detectadas.

Figura 16.

Espectros de masas MALDI-TOF medidos en modo negativo para los extractos enriquecidos de PLs liofilizados de manteca de cacao junto con algunos de los compuestos identificados y la comparación de algunos patrones isotópicos tanto teóricos como experimentales.



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES**Tabla 3.**

Listado de las señales observadas en el espectro de masas MALDI-TOF de los extractos enriquecidos de PLs purificados y aislados de manteca de *Theobroma cacao* L. en modo negativo.

	Familia	Fórmula	Masa monoisotópica	[M] ⁻	[M-H] ⁻	m/z experimental	Exactitud en la masa (ppm)
1	PS	C ₃₄ H ₆₈ NO ₉ P	665,463	665,463		665,474	-16,530
2	PG	C ₃₄ H ₆₇ O ₁₀ P	666,447	666,447		666,473	-38,713
3	PE	C ₃₆ H ₇₀ NO ₈ P	675,483		674,476	674,474	2,965
4	PA	C ₃₉ H ₆₉ O ₇ P	680,478	680,478		680,505	-39,678
5	PA	C ₃₉ H ₆₇ O ₈ P	694,457	694,457		694,491	-48,959
6	PE	C ₃₉ H ₇₂ NO ₇ P	697,504		696,497	696,493	4,307
7	PA	C ₃₉ H ₇₅ O ₈ P	702,519		701,512	701,512	1,000
8	PE	C ₃₈ H ₇₄ NO ₈ P	703,515		702,507	702,502	7,117
9	PA	C ₄₁ H ₇₇ O ₇ P	712,540		711,532	711,487	63,244
10	PE	C ₄₃ H ₇₄ NO ₈ P	763,515		762,507	762,569	-81,311
11	PI	C ₄₄ H ₇₅ O ₁₃ P	842,494	842,494		842,492	2,374
12	PI	C ₄₅ H ₇₇ O ₁₃ P	856,510	856,510		856,444	77,057

Para comprender el papel de los emulsificantes, en especial el de los extractos enriquecidos de PLs en la formación de las emulsiones, se homogeneizaron diferentes mezclas de aceite y agua en un microprocesador ultrasónico con una sonda de titanio, para lograr una mejor dispersión de los componentes de la emulsión (Modarres-Gheisari et al., 2019; Taha et al., 2020; Tal-Figiel, 2007; Zhou et al., 2022). Tomando como referencia estudios previos del Grupo de Investigación (Giraldo et al., 2020), se midieron las estabilidades de las emulsiones preparadas realizando dos réplicas de cada una de ellas, para un total de 36 emulsiones. Es importante destacar que, al ser opacas las emulsiones generadas en este proyecto, únicamente se tuvieron en cuenta los valores de



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

retrodispersión (Δ BS), y que la disminución de este porcentaje en la zona baja o alta del vial indica migración de partículas, mientras que en la zona media representa un incremento del tamaño medio de las partículas. Hay que tener en cuenta que se realizaron ensayos de microscopía óptica y mediciones de tensión interfacial, únicamente para las emulsiones más estables de cada una de las proporciones o-w realizadas (la mejor emulsión del blanco, la mejor con surfactante comercial y la mejor con extractos enriquecidos de PLs).

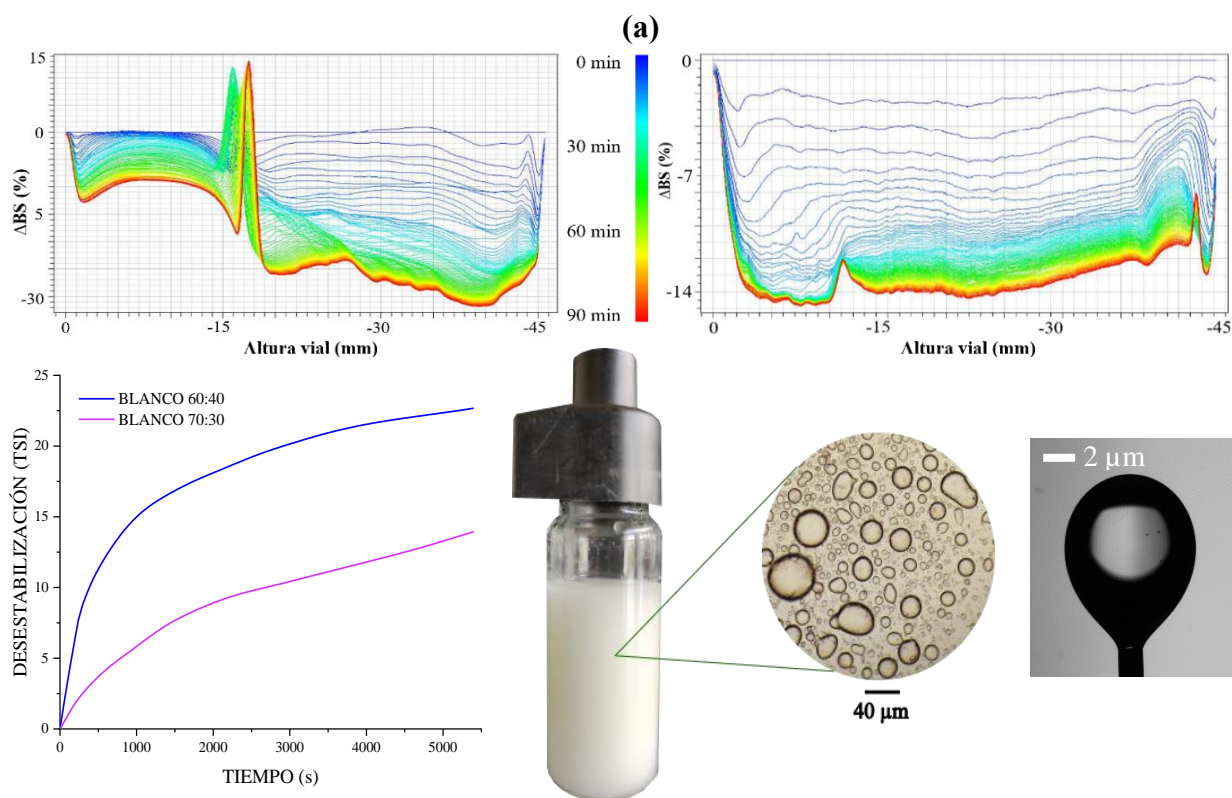
Inicialmente se evaluaron los blancos, ilustrados en la **Figura 17**, de los cuales se realizaron dos proporciones (60:40 o-w, y 70:30 o-w). El valor de TSI medido para la mezcla 60:40 o/w fue de 22,68, y presentó fenómenos de desestabilización en el rango de Δ BS entre -32 % y 13 %. Se pudieron observar dos zonas de coalescencia/floculación con una clara división al transcurrir el tiempo de la medición: en la parte baja del vial (0-14 mm) se acumuló fase acuosa, de 14-19 mm se pudo diferenciar un cambio de fase, con presencia de algunas partículas de agua dispersas en aceite, y en la parte alta (> 19 mm) se acumuló principalmente fase oleosa. Por el contrario, para la mezcla 70:30 o/w se obtuvo un menor valor de TSI, resultado obtenido también por otros autores (Y. Pan et al., 2021), aunque también se presentaron fenómenos de coalescencia y floculación, representados en valores de Δ BS negativos, entre -15 % y 0 %.

Con la finalidad de obtener información cualitativa sobre la uniformidad de las mezclas en las emulsiones, se procedió a obtener imágenes ópticas capturadas en un microscopio óptico. En el caso del blanco 70:30 o-w, se observó que predominaron tamaños de partículas de diámetro $\approx 32,4 \mu\text{m} \pm 15,8 \mu\text{m}$ sin uniformidad, que se encontraban muy cercanas entre ellas, lo que ocasionó que se unieran varias partículas rápidamente, tal como mostraron los datos obtenidos en el Turbiscan, debido a que no había presencia alguna de surfactante que impidiera la rápida unión de las gotas.



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES**Figura 17.**

Representación de los resultados obtenidos de las emulsiones denominadas como blancos: En la parte superior, se encuentran las gráficas generadas por el Turbiscan del cambio en la retrodispersión, para la proporción 60:40 o-w (a la izquierda) y 70:30 o-w (a la derecha). Abajo a la izquierda, se hallan los índices de estabilidad del Turbiscan (cinética de desestabilización) de estas emulsiones. Abajo en la parte central, se puede visualizar un vial conteniendo un blanco (70:30 o-w) y su respectiva vista en un microscopio óptico a 400x. Abajo a la derecha, se observa una fotografía obtenida por el equipo analizador de forma de gota para el blanco 70:30 o-w.



La proporción utilizada para la medición de IFT (**Figura 14**) fue 70:30 o-w, pero antes de realizar las mediciones, se determinaron las densidades de las fases utilizadas para las emulsiones, siendo la del aceite 0,9189 g/mL, la del agua 0,9978 g/mL y la de la mezcla de estas en proporción

FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

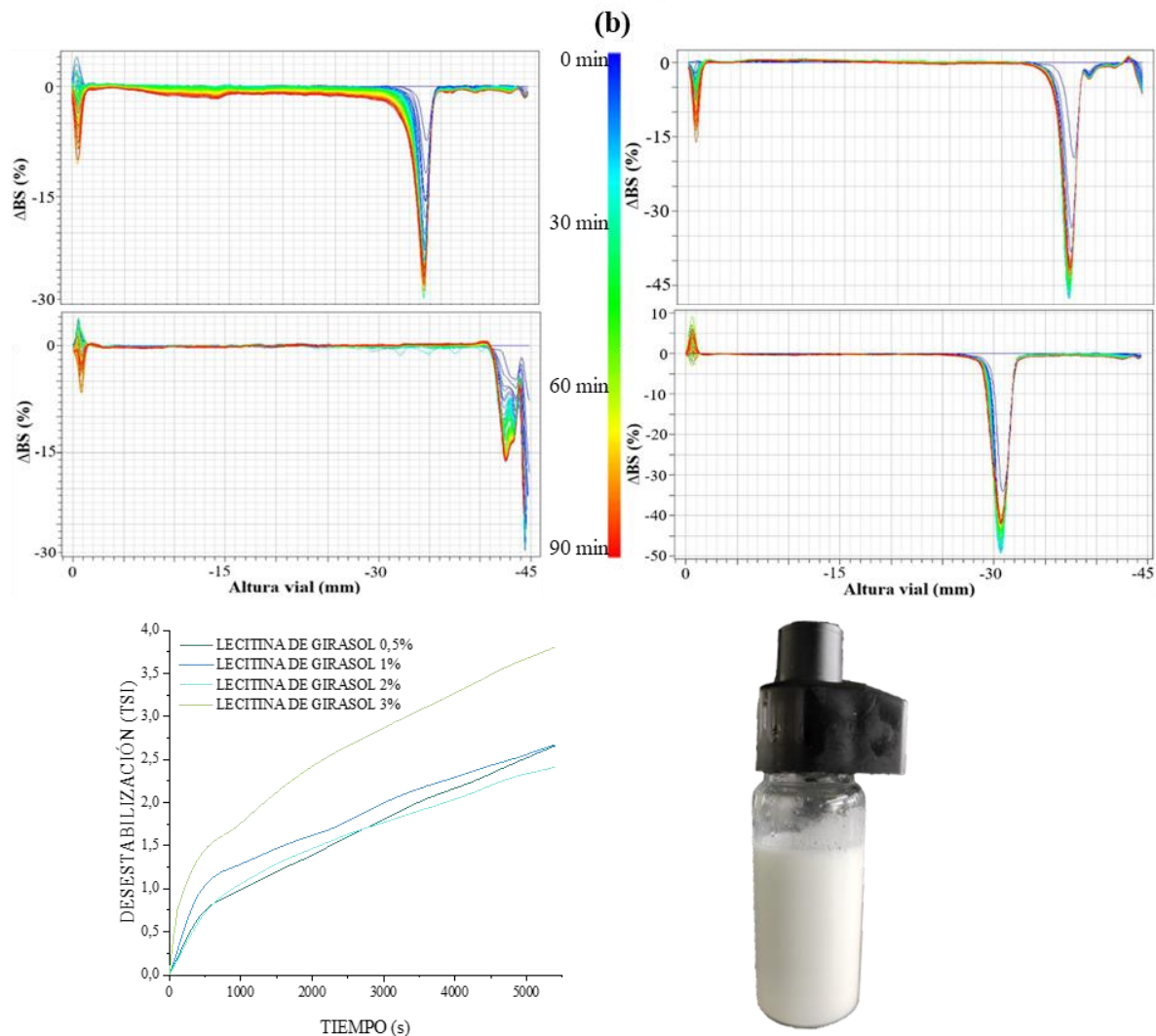
70:30 o-w de 0,9466 g/mL. Los volúmenes de gota inyectados del blanco fueron de 87,1 μL , 86,2 μL y 88,1 μL , generando una IFT promedio de $25,5 \text{ mN/m} \pm 0,1 \text{ mN/m}$, concordando con los valores obtenidos por otros autores (Bhatluri et al., 2015).

Después de tener los resultados de las emulsiones aceite-agua sin adición de emulsificante, se procedieron a evaluar emulsiones utilizando un surfactante comercial, como lo es la lecitina de girasol.



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES**Figura 18.**

Representación de los resultados obtenidos de las emulsiones 60:40 o-w, utilizando diferentes proporciones de LG como surfactante: En la parte superior, se encuentran las gráficas generadas por el Turbiscan del cambio en BS: 0,5 %p/p (superior izquierda), 1 %p/p (superior derecha), 2 %p/p (debajo de 0,5 %p/p) y 3 %p/p (debajo de 1 %p/p). Abajo a la izquierda, se hallan los TSI (cinética de desestabilización) de estas emulsiones, y a su lado, se puede visualizar un vial conteniendo una emulsión de este tipo.



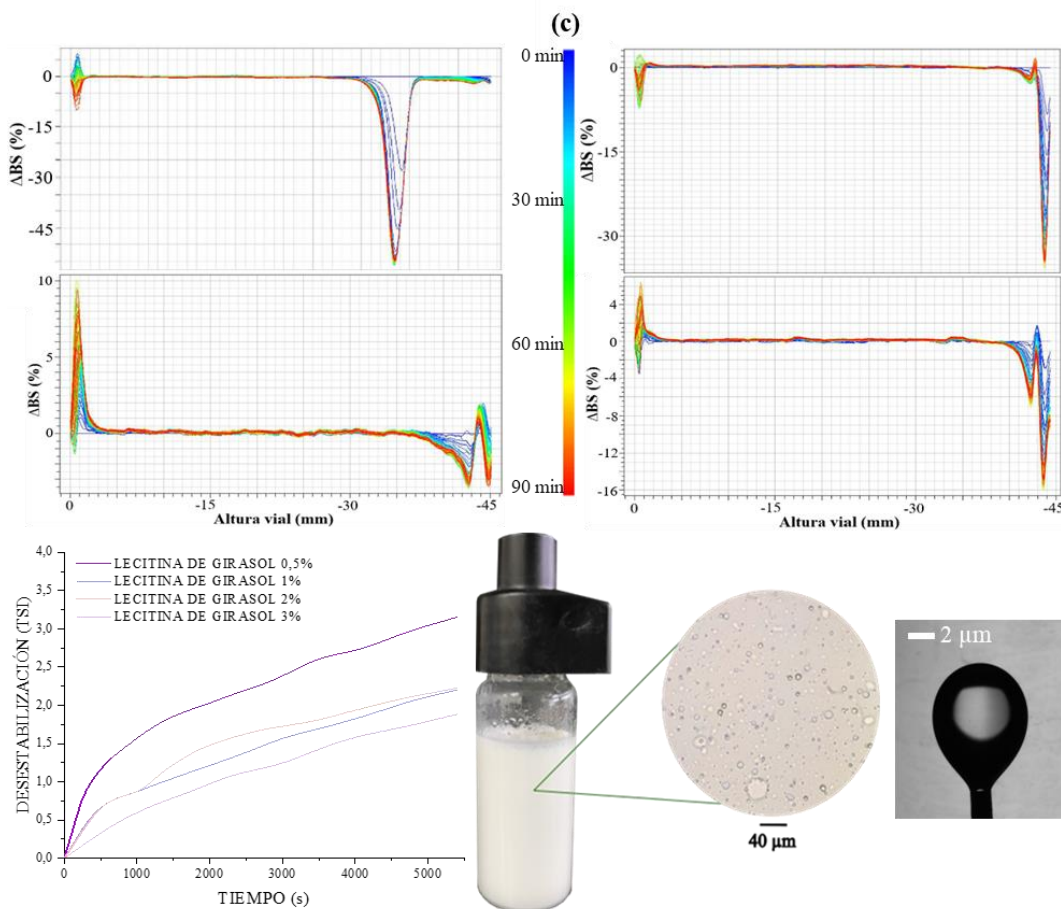
FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

En el caso de estas emulsiones (**Figura 18**), en el caso de las mezclas 60:40 o-w, la emulsión con 0,5 %p/p registró un TSI de 2,65, rompiendo su estabilidad por sedimentación, clarificación y floculación/coalescencia en un rango de Δ BS entre -29 % y 4 %, con fase oleosa a partir de la altura de 35 mm. El TSI de la emulsión con 1 %p/p de emulsificante fue de 2,68 en el rango de Δ BS entre aproximadamente -47 % y 1 %, que presentó mayoritariamente clarificación, además de algo de floculación en la zona alta del vial (> 38 mm), donde preponderó igualmente la fase oleosa. La emulsión preparada con 2 %p/p tuvo un TSI de 2,41, presentando sedimentación y clarificación en el rango de Δ BS entre -29 % y 4 %, con una transición muy uniforme, revelando de esta manera que no había rompimiento evidente de la emulsión y la estabilidad era bastante buena. El valor del TSI para el caso de las emulsiones con 3 %p/p de surfactante fue de 3,80 en un rango de Δ BS entre -50 % y 10 %, con fenómenos de sedimentación, clarificación y presencia de mayor fase oleosa a partir de los 32 mm de altura del vial y aparición de una leve floculación/coalescencia.



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES**Figura 19.**

Representación de los resultados obtenidos de las emulsiones 70:30 o-w realizadas, utilizando diferentes proporciones de LG como surfactante: En la parte superior, se encuentran las gráficas generadas por el Turbiscan del cambio en la retrodispersión: 0,5 %p/p (superior izquierda), 1 %p/p (superior derecha), 2 %p/p (debajo de 0,5 %p/p) y 3 %p/p (debajo de 1 %p/p). Abajo a la izquierda, se hallan los índices de estabilidad del Turbiscan (cinética de desestabilización) de estas emulsiones. Abajo en la parte central, se puede visualizar un vial conteniendo una emulsión de este tipo y su respectiva vista en un microscopio óptico a 400x. Abajo a la derecha, se observa una fotografía obtenida por el equipo analizador de forma de gota para la emulsión 70:30 o-w con 3 %p/p de LG.



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

Para la mezcla 70/30 o-w con LG (**Figura 19**), el TSI de la formulación con 0,5 %p/p fue de 3,16, siendo inestabilizada por sedimentación y clarificación en un rango de Δ BS entre aproximadamente -55 % y 5 %. Esta emulsión presentó un evidente cambio de fase al transcurrir 90 minutos y algo de floculación/coalescencia en esa transformación: a partir de los 36 mm de altura del vial la fase predominante fue la oleosa. En 1 %p/p, se presentó un TSI de 2,20, desestabilizándose por sedimentación y clarificación en un rango de Δ BS entre -36 % y 2 %, pero con una transición uniforme entre ambos fenómenos, lo que revelaba que no había rompimiento evidente de la emulsión y esta era estable. El TSI para la de 2 %p/p fue de 2,23, inestabilizándose por fenómenos pronunciados de sedimentación y clarificación dentro de un rango de Δ BS entre -3,5 % y 10 %, con una transición mayoritariamente uniforme, pero con algo de floculación/coalescencia. Por último, la más estable fue la que contenía 3 %p/p, teniendo un TSI de 1,88, presentando sedimentación y clarificación como fenómenos de inestabilidad dentro de un rango de Δ BS entre -16 % y 6 %, pero con una transición mayoritariamente uniforme. Todos estos resultados fueron similares a los encontrados por (L. G. Pan et al., 2004).

En el ensayo de microscopía óptica, se reparó en que el tamaño de partícula era de diámetro $\approx 4,3 \mu\text{m} \pm 2,8 \mu\text{m}$, no varió tanto y dentro de la muestra las partículas se ubicaban de manera muy uniforme, bastante distanciadas a comparación de las otras dos emulsiones. Para la medición de la tensión interfacial de la emulsión con LG, se utilizó la realizada con 3 %p/p. Los volúmenes de gota fueron de 60,0 μL , 57,5 μL y 57,5 μL , produciendo una IFT promedio de 17,6 mN/m $\pm 0,2$ mN/m. Con los resultados obtenidos por el equipo analizador de forma de gota, fue posible asumir que en la LG hubo suficientes moléculas para proporcionar una rápida y completa cobertura de las gotas de fase dispersa, lo que redujo la IFT, permitió una mayor separación entre



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

gotas y una mejor emulsificación, tal como mostraron los resultados del Turbiscan, impidiendo la coalescencia mediante la estabilización estérica interfacial.

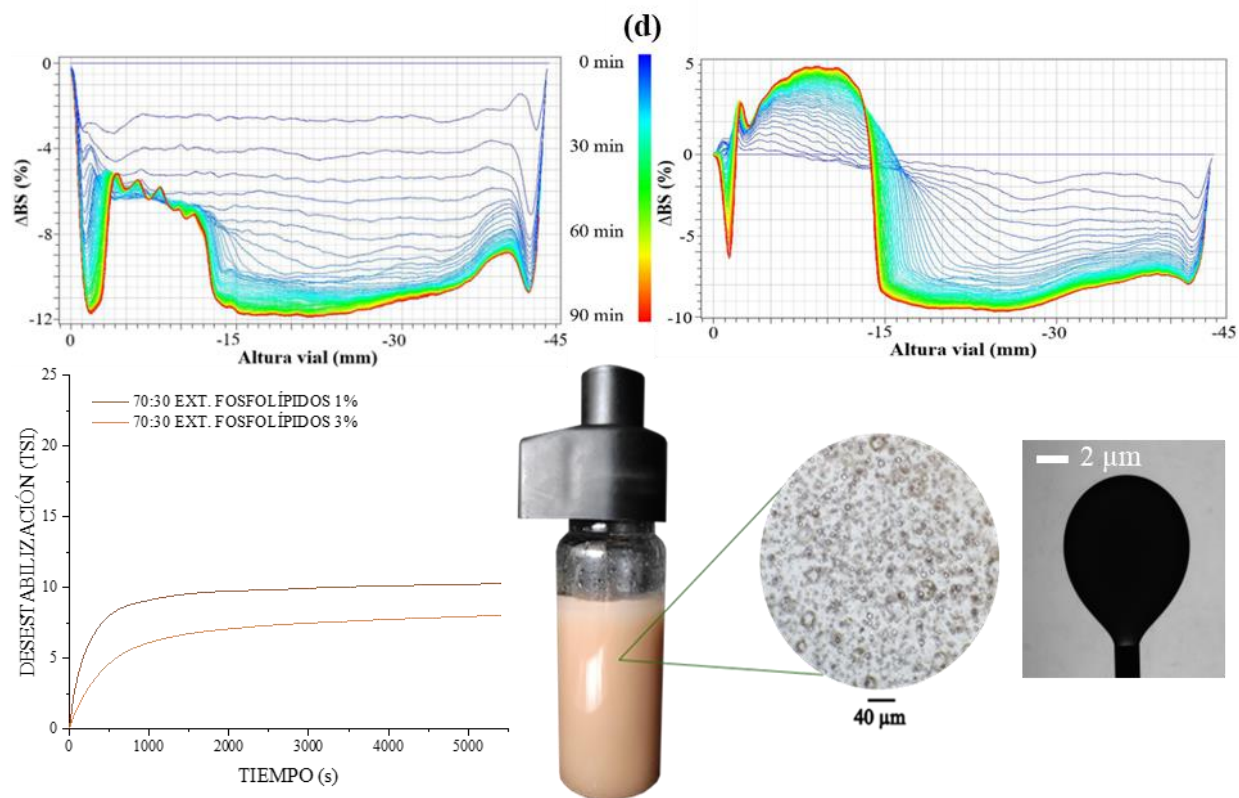
Considerando las observaciones anteriores, se procedió a evaluar las emulsiones que contenían extractos enriquecidos de PLs. Para estas emulsiones solo se realizaron las dos mejores proporciones encontradas con la lecitina comercial (70:30 o-w con 1 %p/p y 3 %p/p), debido a que el rendimiento de extracción de PLs a partir de la manteca de cacao es solo el 0,13% (10,20 g) y es necesario hacer múltiples mediciones de estabilidad.

La emulsión de 1 %p/p con extractos enriquecidos de PLs mostró TSI de 10,30 en el rango negativo de Δ BS entre -12 % y 0 %, presentando floculación/coalescencia, mientras que en la de 3 %p/p el TSI fue de 8,04. Esta última se desestabilizó por sedimentación, clarificación y floculación/coalescencia en rango de Δ BS entre -10 % y 5,5 %. En el ensayo de microscopía óptica, se evidenció mayoritariamente un tamaño de partícula de diámetro $\approx 6,7 \mu\text{m} \pm 2,8 \mu\text{m}$, algo uniforme y distanciadas entre sí, sin embargo, en las capas del fondo de la imagen se percibió coalescencia, que puede deberse a que la velocidad de adsorción del surfactante no pudo haber sido tan rápida y por ende no se alcanzó a generar una estabilización más fuerte y duradera (Zhang et al., 2022). En la **Figura 20** se muestran los resultados de los análisis realizados para estas emulsiones. Los volúmenes inyectados en el equipo analizador de forma de gota fueron 76,3 μL , 76,6 μL , y 77,8 μL , generando una IFT promedio de $22,6 \text{ mN/m} \pm 0,2 \text{ mN/m}$ para este tipo de emulsión.



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES**Figura 20.**

Representación de los resultados obtenidos de las emulsiones realizadas con extractos enriquecidos y purificados de PLs: En la parte superior, se encuentran las gráficas generadas por el Turbiscan del cambio en la retrodispersión para la proporción 70:30 o-w, con 1 %p/p (a la izquierda) y 3 %p/p (a la derecha). Abajo a la izquierda, se hallan los índices de estabilidad del Turbiscan (cinética de desestabilización) de estas emulsiones. Abajo en la parte central, se puede visualizar un vial conteniendo una emulsión de este tipo y su respectiva vista en un microscopio óptico a 400x. Abajo a la derecha, se observa una fotografía obtenida por el equipo analizador de forma de gota para el blanco 70:30 o-w con 3 %p/p de extractos enriquecidos y purificados de PLs.



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

Para saber si eran emulsiones de tipo o/w o w/o, se realizó la prueba de la gota, que consistió en verter un par de gotas de cada emulsión modelo (con surfactante) en un recipiente que contuviera agua y otras en uno que contuviera aceite (las mismas fases utilizadas en las emulsiones). Ambas emulsiones, tanto la que tenía LG como extractos enriquecidos de PLs, se dispersaron en aceite, confirmando la afinidad de este con la fase continua de las emulsiones, indicando de esta manera que eran emulsiones de tipo w/o. Adicionalmente, se ratificó con esta prueba que el emulsificante utilizado para cada una de ellas poseía un HLB bajo (3-6), (correspondiente compuestos surfactantes que estabilizan emulsiones de este tipo, ver **Tabla 1**), resultado obtenido de igual manera en los cálculos teóricos realizados con el uso de la ecuación de Griffin (**Ecuación 1**), donde para los extractos de PLs el HLB fue de 4,93 y de 4,38 para LG.

Conforme a los resultados anteriormente descritos en las gráficas obtenidas por el Turbiscan y los ensayos por microscopía óptica para todas las emulsiones, se pudo percibir que acorde lo que menciona (McClements, 2010; McClements & Gumus, 2016), las dispersiones con partículas pequeñas (generalmente con forma esférica) fueron en términos generales mucho más estables que las que poseían partículas grandes, a razón de que eso impedía unirse rápidamente a otras del mismo tipo y asentarse, teniendo consecuencias directas sobre su separabilidad. Para evitar la separación de fases, las emulsiones se estabilizan cinéticamente (en un estado conocido como metaestable), aunque sigan siendo sistemas termodinámicamente inestables. Con la adición de emulsionantes adecuados, como la lecitina de girasol o los extractos enriquecidos de PLs para este proyecto, se redujo el área de contacto entre las fases hidro y lipofílica, ya que era desfavorable, donde las interacciones estéricas y/o la carga superficial impidieron la coalescencia, mediante la formación de una capa protectora de estas moléculas anfifílicas que rodeaban las gotas



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

de fase dispersa, con el objetivo de minimizar el área interfacial entre las fases, reduciendo la IFT, tal como lo reportado también por (McClements, 2016; McClements & Gumus, 2016).

En el caso de las emulsiones con extracto enriquecido de PLs, la IFT y el TSI disminuyeron en menor medida que al utilizar la LG, pero más que en el caso de los blancos, indicando que estos extractos no eran tan buenos retrasando la coalescencia. Esto pudo deberse a que la emulsión con extractos enriquecidos de PLs de manteca de cacao quizás requería una mayor concentración de surfactante dentro de la interfaz. Estos factores concuerdan de igual manera con los ensayos de microscopía óptica, en donde el mayor tamaño de gota observado fue el del blanco y el menor el de LG. Así mismo se pudo ver una relación directa de IFT con el volumen inyectado para que las gotas estuvieran en equilibrio con el ajuste del perfil teórico, donde entre mayor era la IFT, mayor era el volumen requerido para romper este equilibrio entre fases, y así mismo era difícil lograr una buena homogeneización.

Además, puede haber impurezas o problemas experimentales al obtener el extracto enriquecido de PLs que pudieron ocasionar las variaciones de concentración de zwitteriones, específicamente PC y PE, con una proporción más alta de PLs no solubles (como PI, PA, PG y PS), ocasionando una emulsión parcialmente estable en función del método de extracción empleado, en este caso del desgomado ácido modificado para la extracción de los PLs, tal como lo demostraron (Lem Van Nieuwenhuyzen, 1981; Srinuan et al., 2020; van Nieuwenhuyzen, 2010). El método utilizado para refinar el aceite es otro factor decisivo, ya que (Ho & Chow, 2000) informan que con refinamientos químicos se alcanzan valores más altos de IFT, reducciones de actividades interfaciales y mayor pureza que con los métodos físicos. Pueden atribuirse inclusive otros factores desfavorables para la estabilidad al fruto del cacao, debido a que la concentración o variación de familias de PLs pueden exhibir variabilidad debido a sus diversos orígenes botánicos



FOSFOLÍPIDOS DE *T. CACAO* L. COMO SURFACTANTES

y, dada su naturaleza inherente, están sujetas a la influencia modificadora de los elementos ambientales, incluidas las condiciones climáticas y los factores edáficos, variando así la composición de los extractos enriquecidos de PLs de especie a individuo. Estos factores externos también ejercen un impacto en la constitución molecular general de la lecitina (Gould et al., 2016; Kindlein et al., 2018; Parsons et al., 1969).

Al usar el extracto enriquecido de PLs en las emulsiones agua-aceite hubo una reducción en la IFT, la estabilidad y el tamaño de partícula, sin embargo, se podría alcanzar una mayor reducción de estos valores si se aumenta la concentración inicial de este extracto enriquecido de PLs, e incluso, al combinarlo con otros surfactantes se puede alcanzar una mayor eficiencia. Lecitinas más concentradas, e incluso con la adición de otros surfactantes adecuados y efectivos, pueden alcanzar valores más bajos en los ensayos aquí descritos, mejorando así la estabilidad de la emulsión deseada.



5. Conclusiones

En este proyecto de investigación fue posible extraer 0,13 % de PLs enriquecidos y purificados a partir de manteca de cacao del clon CCN51, encontrándose mediante análisis de MALDI-TOF, en modo positivo y negativo, varios compuestos pertenecientes a seis familias de fosfolípidos: PI, PS, PA, PE, PC y PG. Sin embargo, debido al tipo de extracción realizada y a los procesos que se le realizan industrialmente, pueden existir impurezas y diversos factores que pudieron influir en la concentración de PLs extraídos de una fuente natural como esta. Al realizar emulsiones con extractos enriquecidos de PLs de manteca de *T. cacao* L. como surfactante, se encontró que la relación 70:30 v/v o-w con 3 %p/p de emulsificante fue la más estable. Esto se evidenció mediante los datos de Δ BS y TSI, adquiridos por el Turbiscan. La efectividad y eficacia de estos extractos como estabilizantes en las emulsiones w/o superaron a los blancos de referencia. Adicionalmente, el desempeño de los PLs de cacao fue comparable al de las lecitinas comerciales, como la de girasol. La tensión interfacial entre las fases también se redujo, disminuyendo el área de contacto, mejorando la eficiencia para reducir las interacciones interfaciales entre ambos fluidos inmiscibles en la interfaz o-w. Todo esto permite dar continuación a múltiples investigaciones para desarrollar emulsiones w/o, necesarias en los diversos campos de la industria, con origen natural y amigable al medio ambiente, aportando un extra a los usos del cacao, en especial del colombiano.



6. Recomendaciones

Se sugiere explorar las mismas emulsiones, o más, variando el tipo de aceite, el tiempo y modo de emulsificación, pero extrayendo los PLs de la manteca de cacao con otros procesos de desgomado, como el enzimático, ya que este evita de manera favorable la pérdida de PLs no hidratables. Se recomienda realizar análisis de RMN de sólidos para determinar la concentración de cada fosfolípido presente en la muestra. Adicionalmente, realizar emulsiones con los PLs que se encuentran en la cocoa puede dar resultados óptimos, ya que es posible que se encuentren en mayores proporciones o posea mayor cantidad de PC. Combinar diferentes tipos de surfactantes también es una buena elección para encontrar mejores resultados en la estabilidad de diversas emulsiones, y que puedan tener un menor costo de fabricación, generando de esta manera una nueva oportunidad de ingresos para el sector agroindustrial. Así mismo, llevando más allá esta investigación, se propone buscar qué otras fuentes naturales pueden ser potenciales surfactantes.

7. Divulgación de Resultados

Los resultados obtenidos en el presente proyecto de investigación serán divulgados en el libro entregado a la escuela de Química, de la Universidad Industrial de Santander. Además, los resultados del presente trabajo, junto con el estudio computacional de la interfaz w/o realizados por el Grupo de Investigación In silico de la Universidad de Sucre, fueron aprobados para la 72nd *ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, que se realizará en California, EE. UU., y en un manuscrito para posterior publicación en una revista científica internacional.



Referencias Bibliográficas

- Abràmoff, M., Magalhães, P., & Ram, S. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*.
- Álvarez, M., Macías, A., Núñez, V., Garcés, N., Castro, H., & Álvarez, O. (2013). Molecular dynamics approach to investigate the coupling of the hydrophilic–lipophilic balance with the configuration distribution function in biosurfactant-based emulsions. *Journal of Molecular Modeling*, 12(19), 5539–5543.
- Arruda, D. H., & Dimick, P. S. (1991). Phospholipid Composition of Lipid Seed Crystal Isolates from Ivory Coast Cocoa Butter. *JAOCS*, 68(6), 385–390.
- Arvelo, M. A., González, D., Delgado, T., Maroto, S., & Montoya, P. (2017). *CACAO EN AMÉRICA*.
- Bergenståhl, B., & Quiroga, C. (2008). Rheological behavior of amylopectin and β -lactoglobulin phase-segregated aqueous system. *Carbohydrate Polymers*, 3(74), 358–365.
- Berry, J. D., Neeson, M. J., Dagastine, R. R., Chan, D. Y. C., & Tabor, R. F. (2015). Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry. In *Journal of Colloid and Interface Science* (Vol. 454, pp. 226–237). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.05.012>
- Bhatluri, K. K., Chakraborty, S., Manna, M. S., Ghoshal, A. K., & Saha, P. (2015). Separation of toxic heavy metals from its aqueous solution using environmentally benign vegetable oil as liquid membrane. *RSC Advances*, 107(5), 88331–88338.
- Borja Fajardo, J. G., Horta Tellez, H. B., Peñaloza Atuesta, G. C., Sandoval Aldana, A. P., & Mendez Arteaga, J. J. (2022). Antioxidant activity, total polyphenol content and methylxantine ratio in four materials of *Theobroma cacao* L. from Tolima, Colombia. *Heliyon*, 8(5). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09402>
- Bot, F., Cossuta, D., & O’Mahony, J. A. (2021). Inter-relationships between composition, physicochemical properties and functionality of lecithin ingredients. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 111, pp. 261–270). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.028>
- Caligiani, A., Marseglia, A., & Palla, G. (2015). Cocoa: Production, Chemistry, and Use. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 185–190). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00177-X>
- Calvano, C. D., de Ceglie, C., D’Accolti, L., & Zambonin, C. G. (2012). MALDI-TOF mass spectrometry detection of extra-virgin olive oil adulteration with hazelnut oil by analysis



- of phospholipids using an ionic liquid as matrix and extraction solvent. *Food Chemistry*, 134(2), 1192–1198. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.154>
- 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>
- Calvano, C. D., Ventura, G., Trotta, M., Bianco, G., Cataldi, T. R. I., & Palmisano, F. (2017). Electron-Transfer Secondary Reaction Matrices for MALDI MS Analysis of Bacteriochlorophyll a in *Rhodobacter sphaeroides* and Its Zinc and Copper Analogue Pigments. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28(1), 125–135. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1514-x>
- Chew, S. C., Tan, C. P., & Nyam, K. L. (2017). Optimization of degumming parameters in chemical refining process to reduce phosphorus contents in kenaf seed oil. *Separation and Purification Technology*, 188, 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.07.049>
- Cinar, Z. Ö., Atanassova, M., Tumer, T. B., Caruso, G., Antika, G., Sharma, S., Sharifi-Rad, J., & Pezzani, R. (2021). Cocoa and cocoa bean shells role in human health: An updated review. In *Journal of Food Composition and Analysis* (Vol. 103). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104115>
- Codini, M., Díaz Vélez, F., Ghirardi, M., & Villavicencio, I. (2014). *OBTENCIÓN Y UTILIZACIÓN DE LA MANTECA DE CACAO*.
- Cortés, A., Ibarra, L., & Aguilar, A. (2013). *Estudios de tensión superficial e interfacial en sistemas agua-surfactante-aceite utilizando la técnica de gota pendiente* [Maestría]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- 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(8), 786–790. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1683>
- Dammak, I., Sobral, P. J. do A., Aquino, A., Neves, M. A. das, & Conte-Junior, C. A. (2020). Nanoemulsions: Using emulsifiers from natural sources replacing synthetic ones—A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(5), 2721–2746. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12606>
- Deffense, E. (2009). From organic chemistry to fat and oil chemistry*. *Oilseeds & Fats Crops and Lipids*, 16(1), 14–24. <https://doi.org/10.1684/ocl.2009.0238>
- Delgado-Ospina, J., Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. Á., Martuscelli, M., & Chaves-López, C. (2021). Bioactive compounds and



- techno-functional properties of high-fiber co-products of the cacao agro-industrial chain. *Heliyon*, 7(4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06799>
- Di Bari, V. (2015). *Large deformation and crystallisation properties of process optimised cocoa butter emulsions*.
- Dispersiones LAB*. (n.d.).
- Dong, W., Shen, Q., Baibado, J. T., Liang, Y., Wang, P., Huang, Y., Zhang, Z., Wang, Y., & Cheung, H. Y. (2013). Phospholipid analyses by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry using 1,5-diaminonaphthalene as matrix. *International Journal of Mass Spectrometry*, 343–344, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2013.04.004>
- Eckert, E., Zambrowicz, A., Bobak, Ł., Zabłocka, A., Chrzanowska, J., & Trziszka, T. (2019). Production and Identification of Biologically Active Peptides Derived from By-product of Hen Egg-Yolk Phospholipid Extraction. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 25(2), 669–680. <https://doi.org/10.1007/s10989-018-9713-x>
- Ejike Ogbonna, K., Victor Agu, C., Okonkwo, C. C., Tochukwu Ughamba, K., Akor, J., & Njoku, O. U. (2021). Use of Spondias Mombin fruit pulp as a substrate for biosurfactant production. *Bioengineered*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1853391>
- El-Aneed, A., Cohen, A., & Banoub, J. (2009). Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. In *Applied Spectroscopy Reviews* (Vol. 44, Issue 3, pp. 210–230). <https://doi.org/10.1080/05704920902717872>
- Erickson, D. R. (1995). Degumming and Lecithin Processing and Utilization. In *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization* (pp. 174–183). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-935315-63-9.50014-0>
- Fingas, M. (2017). Polar Compounds in Oils and Their Aquatic Toxicity. *International Oil Spill Conference Proceedings*.
- Frank, A. W. (2013). Phospholipids. In *Chemistry of Plant Phosphorus Compounds* (pp. 159–304). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407194-0.00004-4>
- 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(3), 827–834. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1488-4>
- Gachumi, G., Purves, R. W., Hopf, C., & El-Aneed, A. (2020). Fast Quantification without Conventional Chromatography, the Growing Power of Mass Spectrometry. In *Analytical Chemistry* (Vol. 92, Issue 13, pp. 8628–8637). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00877>
- Giraldo, D., Combariza, M. Y., & Blanco, C. (2020). *Extracción, caracterización y evaluación de las propiedades emulsificantes de fosfolípidos presentes en el grano de Theobroma cacao L.* [Magíster en química]. Universidad Industrial de Santander.
- Giraldo-Dávila, D., Chacón-Patiño, M. L., McKenna, A. M., Blanco-Tirado, C., & Combariza, M. Y. (2018). Correlations between Molecular Composition and Adsorption, Aggregation, and Emulsifying Behaviors of PetroPhase 2017 Asphaltenes and Their Thin-Layer Chromatography Fractions. *Energy and Fuels*, 32(3), 2769–2780. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b02859>
- Gould, J. M., Furse, S., & Wolf, B. (2016). The role of endogenous lipids in the emulsifying properties of cocoa. *Frontiers in Chemistry*, 4(MAR). <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00011>
- Griffin, W. C. (1949). CLASSIFICATION OF SURFACE-ACTIVE AGENTS. *Journal of Cosmetic Science*, 1, 311–326.
- Gris, C. (2015). *Estudio de emulsiones altamente concentradas de tipo W/O: relación entre tamaño de gota y propiedades* [Doctorado, Universitat de Barcelona]. www.tdx.cat
- Gross, J. H. (2017). *Mass Spectrometry* (3rd ed.). Springer International Publish.
- Ho, C. C., & Chow, M. C. (2000). The effect of the refining process on the interfacial properties of palm oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(2), 191–199.
- Hu, W., Liu, P., Liu, G., & Lu, X. (2020). Recovered *Camellia oleifera* lecithin by acid and enzymatic oil-degumming: chemical composition and emulsifying properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(8), 3008–3018. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14566>
- Joseph, C., Savoie, R., Harscoat-Schiavo, C., Pintori, D., Faure, C., & Leal-Calderon, F. (2020). *Pickering emulsions stabilized by various plant materials: Cocoa, rapeseed press cake and lupin hulls.*
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., & Hillenkamp, F. (1987). MATRIX-ASSISTED ULTRAVIOLET LASER DESORPTION OF NON-VOLATILE COMPOUNDS. In *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* (Vol. 78).
- Kindlein, M., Elts, E., & Briesen, H. (2018). Phospholipids in chocolate: Structural insights and mechanistic explanations of rheological behavior by coarse-grained molecular



- dynamics simulations. *Journal of Food Engineering*, 228, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.02.014>
- Korte, A. R., & Lee, Y. J. (2014). MALDI-MS analysis and imaging of small molecule metabolites with 1,5-diaminonaphthalene (DAN). *Journal of Mass Spectrometry*, 49(8), 737–741. <https://doi.org/10.1002/jms.3400>
- Kronberg, B., Holmberg, K., & Lindman, B. (2014). Surface and Interfacial Tension. *Surface Chemistry of Surfactants and Polymers*, 231–249.
- Lem Van Nieuwenhuyzen, W. L. (1981). The Industrial Uses of Special Lecithins: A Review. *JAACS*, 886–889.
- Li, A., Dewettinck, K., Verheust, Y., Van de Walle, D., Raes, K., Diehl, B., & Tzompa-Sosa, D. A. (2024). Edible insects as a novel source of lecithin: Extraction and lipid characterization of black soldier fly larvae and yellow mealworm. *Food Chemistry*, 452. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139391>
- Li, X., Nakayama, K., Goto, T., Akamatsu, S., Shimizu, K., Ogawa, O., & Inoue, T. (2019). Comparative evaluation of the extraction and analysis of urinary phospholipids and lysophospholipids using MALDI-TOF/MS. *Chemistry and Physics of Lipids*, 223. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.104787>
- 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>
- Mahmoud, A. A., AL-Dogail, A. S., Gajbhiye, R. N., & AlSultan, A. S. (2023). Development of Emulsified Acid System using Organoclays. *Society of Petroleum Engineers - Gas and Oil Technology Showcase and Conference, GOTS 2023*. <https://doi.org/10.2118/214149-MS>
- McClements, D. J. (2010). Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 241–269. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100722>
- McClements, D. J. (2016). *Food emulsions: principles, practices, and techniques* (Third). Taylor & Francis Group.
- McClements, D. J., & Gumus, C. E. (2016). Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical



- basis of functional performance. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 234, pp. 3–26). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.03.002>
- Miadonye, A., Irwin, D. J. G., & Amadu, M. (2023). Effect of Polar Hydrocarbon Contents on Oil–Water Interfacial Tension and Implications for Recent Observations in Smart Water Flooding Oil Recovery Schemes. *ACS Omega*, *10*(8).
- Millena, C. G., Balonzo, A. R. R., Rentoy, J. R., Ruivivar, S. S., & Bobiles, S. C. (2023). Effect of fermentation stages on the nutritional and mineral bioavailability of cacao beans (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, *115*. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104886>
- Modarres-Gheisari, S. M. M., Gavagsaz-Ghoachani, R., Malaki, M., Safarpour, P., & Zandi, M. (2019). Ultrasonic nano-emulsification – A review. In *Ultrasonics Sonochemistry* (Vol. 52, pp. 88–105). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.11.005>
- O'Brien, R. D. (2008). Soybean Oil Purification. In *Soybeans: Chemistry, Production, Processing, and Utilization* (pp. 377–408). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-64-6.50015-9>
- Pan, L. G., Tomás M. C., & Añón M. C. (2004). Oil-in-Water Emulsions Formulated with Sunflower Lecithins: Vesivle Formation and Stability. *JAOCS*, *81*(J10697), 241–244.
- Pan, Y., Xu, Y., Zhu, L., Liu, X., Zhao, G., Wang, S., Yang, L., Ma, T., & Liu, H. (2021). Stability and rheological properties of water-in-oil (W/O) emulsions prepared with a soyasaponin-PGPR system. *Future Foods*, *4*. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100096>
- Parsons, J. G., Keeney, P. G., & Patton, S. (1969). Identification and Quantitative Analysis of Phospholipids in Cocoa Beans. *Journal of Food Science*, *34*(6), 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.
- Patiny, L., & Borel, A. (2013). ChemCalc: A building block for tomorrow's chemical infrastructure. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *53*(5), 1223–1228. <https://doi.org/10.1021/ci300563h>
- Perazzo, A., Gallier, S., Liuzzi, R., Guido, S., & Caserta, S. (2021). Quantitative methods to detect phospholipids at the oil-water interface. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 290). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102392>
- Petkovic, M., Schiller, J., Müller, M., Süß, R., Arnold, K., & Arnhold, J. (2009). Detection of Adducts with Matrix Clusters in the Positive and Negative Ion Mode MALDI-TOF Mass Spectra of Phospholipids. *Z. Naturforsch*, *64*(b), 331–334. <http://znaturforsch.com>



- Pulfer, M., & Murphy, R. C. (2003). Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrometry Reviews*, 22(5), 332–364. <https://doi.org/10.1002/mas.10061>
- Robert, C., Couédelo, L., Vaysse, C., & Michalski, M. C. (2020). Vegetable lecithins: A review of their compositional diversity, impact on lipid metabolism and potential in cardiometabolic disease prevention. In *Biochimie* (Vol. 169, pp. 121–132). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.11.017>
- Schiller, J., Arnhold, J., Benard, S., Mü, M., Reichl, S., & Arnold, K. (1999). *Lipid Analysis by Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Mass Spectrometry: A Methodological Approach*. <http://www.idealibrary.com>
- Schiller, J., Süß, R., Arnhold, J., Fuchs, B., Leßig, J., Müller, M., Petković, M., Spalteholz, H., Zschörnig, O., & Arnold, K. (2004). Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. In *Progress in Lipid Research* (Vol. 43, Issue 5, pp. 449–488). <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.08.001>
- Schiller, J., 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>
- Servent, A., Boulanger, R., Davrieux, F., Pinot, M. N., Tardan, E., Forestier-Chiron, N., & Hue, C. (2018). Assessment of cocoa (*Theobroma cacao* L.) butter content and composition throughout fermentations. *Food Research International*, 107, 675–682. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.070>
- Shanta, S. R., Zhou, L. H., Park, Y. S., Kim, Y. H., Kim, Y., & Kim, K. P. (2011). Binary matrix for MALDI imaging mass spectrometry of phospholipids in both ion modes. *Analytical Chemistry*, 83(4), 1252–1259. <https://doi.org/10.1021/ac1029659>
- Silverstein, T. P. (1998). The Real Reason Why Oil and Water Don't Mix. *Journal of Chemical Education*, 1(75), 116.
- Skoog, D., Holler, J., & Crouch, S. (2014). *Skoog - Fundamentals of Analytical Chemistry 9th c2014 solutions SSM*.
- Speight, J. (2020). Analysis of oil from tight formations. *Shale Oil and Gas Production Processes*, 519–571.
- Srinuan, C., Kritsunankul, O., & Singanusong, R. (2020). Effect of extraction conditions on lecithin from rice bran gum and soybean gum. *RSU International Research Conference*.
- Sud, M., Fahy, E., Cotter, D., Brown, A., Dennis, E. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., Raetz, C. R. H., Russell, D. W., & Subramaniam, S. (2007). LMSD: LIPID MAPS



- structure database. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL. 1).
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl838>
- Taha, A., Ahmed, E., Ismaiel, A., Ashokkumar, M., Xu, X., Pan, S., & Hu, H. (2020). Ultrasonic emulsification: An overview on the preparation of different emulsifiers-stabilized emulsions. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 105, pp. 363–377). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.024>
- Tal-Figiel, B. (2007). The formation of stable W/O, O/W, W/O/W cosmetic emulsions in an ultrasonic field. *Chemical Engineering Research and Design*, 85(5 A), 730–734. <https://doi.org/10.1205/cherd06199>
- Tamang, N., Shrestha, P., Khadka, B., Mondal, M. H., Saha, B., & Bhattarai, A. (2022). A review of biopolymers' utility as emulsion stabilizers. In *Polymers* (Vol. 14, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym14010127>
- Topuz, O. K., Aygün, T., Alp, A. C., Yatmaz, H. A., Torun, M., & Yerlikaya, P. (2021). Characterization and emulsifying properties of aquatic lecithins isolated from processing discard of rainbow trout fish and its eggs. *Food Chemistry*, 339. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128103>
- Turbiscan LAB uses Static Multiple Light Scattering (SMLS) to detect particle migration and size variation in liquid dispersions.* (n.d.). www.formulacion.com
- TURBISCAN QUANTITATIVE SAMPLE RANKING FAST DECISION MAKING.* (n.d.). www.formulacion.com
- TURBISCAN Time saving Stability ranking Objective.* (n.d.). www.formulacion.com
- United States Department of Agriculture - USDA. (2022). *The Colombian Cacao Industry*.
- Ushikubo, F. Y., & Cunha, R. L. (2014). Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions. *Food Hydrocolloids*, 34, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.016>
- van Nieuwenhuyzen, W. (2010). Lecithin and Other Phospholipids. In *Surfactants from Renewable Resources* (pp. 191–212). John Wiley and Sons. <https://doi.org/10.1002/9780470686607.ch10>
- Vergara-Mendoza, M., Martínez, G. R., Blanco-Tirado, C., & Combariza, M. Y. (2022). Mass Balance and Compositional Analysis of Biomass Outputs from Cacao Fruits. *Molecules*, 27(12). <https://doi.org/10.3390/molecules27123717>
- Wang, M., Yan, W., Zhou, Y., Fan, L., Liu, Y., & Li, J. (2021). Progress in the application of lecithins in water-in-oil emulsions. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 118, pp. 388–398). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.10.019>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*.



- Xia, Z. W., Zhang, J. G., Ni, Z. J., Zhang, F., Thakur, K., Hu, F., & Wei, Z. J. (2022). Functional and emulsification characteristics of phospholipids and derived o/w emulsions from peony seed meal. *Food Chemistry*, 389. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133112>
- Xie, M. (2018). Phospholipids. In *Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 214–217). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21597-7>
- Xie, M., & Dunford, N. T. (2019). Fractionating of canola lecithin from acid degumming and its effect. *Food Chemistry*, 300. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125217>
- Yamashita, Y., Miyahara, R., & Sakamoto, K. (2017). Emulsion and emulsification technology. *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*, 489–506.
- Yang, Y., Hiserodt, R., & Li, J. (2017). Rapid Identification and Relative Quantification of the Phospholipid Composition in Commercial Lecithins by 31P NMR. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94(7), 885–892. <https://doi.org/10.1007/s11746-017-2992-0>
- Zhang, L., Wang, K., An, H., Su, Y., Zhang, W., Li, G., & Yang, X. (2022). Testing and Evaluation of the Emulsifying Properties of Compound Oil Displacement Agents. *ACS Omega*, 7(33), 29406–29414. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c03653>
- Zheng, L., Cao, C., Li, R.-Y., Cao, L.-D., Zhou, Z.-L., Li, M., & Huang, Q.-L. (2018). Preparation and characterization of water-in-oil emulsions of isoprothiolane. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 537, 399–410.
- Zhou, L., Zhang, W., Wang, J., Zhang, R., & Zhang, J. (2022). Comparison of oil-in-water emulsions prepared by ultrasound, high-pressure homogenization and high-speed homogenization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 82. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105885>

