

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D' ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Escuela Técnica Superior  
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

## ***OBTENCIÓN DE EMULSIONES DE ALTA FASE INTERNA MEDIANTE LA VALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA DE ZUMO DE CÍTRICOS***

TRABAJO FINAL DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

CURSO ACADÉMICO: 2020-2021

Alumna: Marina Castillo Hernández

Tutora: M<sup>a</sup> Isabel Hernando Hernando

Cotutora: M<sup>a</sup> Desamparados Quiles Chuliá

Directora experimental: Joana Martínez Martí

Valencia, España. Junio 2021.

**Título:** Obtención de emulsiones de alta fase interna mediante la valorización de subproductos de la industria de zumo de cítricos.

**Resumen:**

Los subproductos de cítricos presentan compuestos interesantes para la industria alimentaria, entre los que cabe destacar la celulosa y la pectina por su carácter estabilizante y emulsionante. Esto podría resultar interesante para su uso en la obtención de emulsiones de alta fase interna o de alta concentración (HIPEs). Los HIPEs son sistemas que poseen un volumen de fase interna superior a 0,74 y se caracterizan por tener alta viscosidad y un comportamiento reológico viscoelástico. El objetivo general de este trabajo es obtener HIPEs con los subproductos de la industria de zumo de cítricos. Estas emulsiones, además de ser una opción para revalorizar los subproductos de la industria de los zumos cítricos, podrían ser empleadas, en la formulación de alimentos, como alternativa a las grasas plásticas.

En este proyecto se prepararon HIPEs con diferentes % de bagazo de cítrico (CP) y de aislado de proteína de guisante (PPI) y se caracterizaron mediante la medida de distintos parámetros: color, % de pérdida de aceite, comportamiento reológico y microestructura. Todas las emulsiones presentaron un color amarillo pálido, la luminosidad se vio afectada por el % de PPI, y el parámetro  $b^*$ , el croma y la tonalidad se vieron afectados por el % de CP. El % de pérdida de aceite, y con ello, la estabilidad de las emulsiones se vio muy mejorado con la incorporación de un 0,5% de PPI. Todas las emulsiones presentaron un comportamiento viscoelástico, lo que resulta típico de las HIPEs, presentando un comportamiento más elástico que viscoso a bajos esfuerzos y revirtiéndose esto a altos esfuerzos. Este comportamiento viscoelástico se vio afectado tanto por el % de CP como por el % de PPI. La viscosidad aparente se vio aumentada a partir de un 0,5% de PPI. Se observaron diferencias en la microestructura de las diferentes emulsiones, presentando las de un mayor % de CP y un mayor % de PPI un alto grado de estructuración.

**Palabras clave:** HIPE, bagazo, proteína de guisante, color, pérdida de aceite, comportamiento reológico, microestructura.

**Títol:** Obtenció d'emulsions d'alta fase interna mitjançant la valorització de subproductes de la indústria de suc de cítrics.

**Resum:**

Els subproductes de cítrics presenten compostos interessants per a la indústria alimentària, entre els quals cal destacar la cel·lulosa i la pectina pel seu caràcter estabilitzant i emulsionant. Açò podria resultar interessant per al seu ús en l'obtenció d'emulsions d'alta fase interna o d'alta concentració (HIEs). Les emulsions són sistemes que posseïxen un volum de fase interna superior a 0,74 i es caracteritzen per tindre alta viscositat i un comportament reològic viscoelàstic. Estes emulsions, a més de ser una opció per a revalorar els subproductes de la indústria dels suc de cítrics, podrien ser utilitzades, en la formulació d'aliments, com a alternativa als greixos plàstics.

En este projecte es van preparar HIEs amb diferents % de bagàs de cítric (CP) i d'aïllat de proteïna de pèsol (PPI) i es van caracteritzar per mitjà de la mesura de diferents paràmetres: color, % de pèrdua d'oli, comportament reològic i microestructura. Totes les emulsions van presentar un color groc pàl·lid, la lluminositat es va veure afectada pel % de PPI, i el paràmetre  $b^*$ , el cromà i la tonalitat es van veure afectats pel % de CP. El % de pèrdua d'oli, i amb això, l'estabilitat de les emulsions es va veure molt millorada amb la incorporació d'un 0,5% de PPI. Totes les emulsions van presentar un comportament viscoelàstic, la qual cosa resulta típic de les HIEs, presentant un comportament més elàstic que viscos a baixos esforços i revertint-se açò a alts esforços. Aquest comportament viscoelàstic es va veure afectat tant pel % de CP com pel % de PPI. La viscositat aparent es va veure augmentada a partir d'un 0,5% de PPI. Es van observar diferències significatives a la microestructura de les diferents emulsions, presentant les d'un major % de CP i un major % de PPI un alt grau d'estructuració.

**Paraules claus:** HIE, bagàs, proteïna de pèsol, pèrdua d'oli, comportament reològic, microestructura.

**Title:** Obtention of high internal phase emulsions through the recovery of by-products from the citrus juice industry

**Abstract:**

Citrus by-products present interesting compounds for the food-industry, as cellulose and pectin, due to their stabilizing and emulsifying nature. This could be interesting for its use in obtaining high internal phase emulsions (HIPEs). HIPEs are systems with an internal phase volume higher than 0,74 and characterized by a high viscosity and a viscoelastic rheological behavior. These emulsions could be used as an alternative to plastic fats. The aim of this project is to obtain HIPEs using by-products from the citrus juice industry.

In this project, HIPEs with different % of citrus pomace (CP) and pea protein (PPI) were prepared, and the emulsions obtained were characterized by measuring different parameters: color, oil loss %, rheological behavior and microstructure. All the emulsions presented a pale yellow color, the luminosity was affected by the % of PPI, and parameter  $b^*$ , chroma and hue angle were affected by the % of CP. The oil loss % and the stability of the emulsions were improved when 0,5% PPI was used. All the emulsions presented a viscoelastic behavior, typical of HIPEs, presenting a more elastic than viscous behavior at low stresses, and a more viscous than elastic behavior at high stresses. The viscoelastic behavior was affected by both, CP % and PPI %. And viscosity was improved with 0,5% PPI. Some differences were observed in the microstructure of the different emulsions, and a high degree of structuring was observed in those formulated with high % of CP % and PPI.

**Keywords:** HIPE, pomace, pea protein, color, oil loss, rheological behavior, microstructure.

Alumna: Dña. Marina Castillo Hernández

Valencia, junio 2021

Prof. Dña. M<sup>a</sup> Isabel Hernando Hernando

Prof. Dña. María Desamparados Quiles Chuliá

Directora experimental: Dña. Joana Martínez Martí

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría utilizar estas líneas para agradecer a todas esas personas que han hecho posible la realización de este trabajo y que lo han hecho un poco más fácil.

Gracias a mis tutoras, Isabel y Amparo, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por su esfuerzo y dedicación, y por tener siempre una sonrisa y unas palabras de ánimo. Gracias a Joana, mi directora experimental, por guiarme, por dedicarme su tiempo, por sus consejos y por depositar su confianza en mí.

A mis amigas y compañeras de clase, Gema, Patricia, Virginia y Bárbara, por el apoyo que me han dado durante estos cuatro años, y a mis amigos Javi, José, Miguel Ángel, Olga, Carla y Marco, por aguantarme en mis peores momentos y animarme siempre a seguir adelante.

A mi familia, en especial a mis padres, por brindarme la oportunidad de estudiar, por confiar tanto en mí y por su apoyo incondicional.

# ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.	LOS CÍTRICOS Y SUS SUBPRODUCTOS .....	1
1.2.	PROPIEDADES DE ALGUNOS COMPUESTOS PRESENTES EN LOS SUBPRODUCTOS DE LOS CÍTRICOS .....	2
1.3.	GRASAS PLÁSTICAS .....	3
1.4.	EMULSIONES DE ALTA CONCENTRACIÓN (HIPES) .....	5
2.	OBJETIVOS.....	8
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	9
3.1.	MATERIALES .....	9
3.1.	MÉTODOS.....	9
3.1.1.	<i>Preparación del bagazo</i> .....	9
3.1.2.	<i>Preparación de las emulsiones</i> .....	10
3.1.3.	<i>Caracterización de las emulsiones</i> .....	11
3.1.3.1.	<i>Color</i> .....	11
3.1.3.2.	<i>% Pérdida de aceite</i> .....	12
3.1.3.3.	<i>Reología</i> .....	12
3.1.3.4.	<i>Microestructura</i> .....	13
3.1.4.	<i>Análisis estadístico</i> .....	13
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....	14
4.1.	PREPARACIÓN DE LAS EMULSIONES.....	14
4.2.	COLOR.....	15
4.3.	% PÉRDIDA DE ACEITE .....	18
4.4.	REOLOGÍA.....	19
4.5.	MICROESTRUCTURA .....	25
5.	CONCLUSIONES.....	29
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapamundi con coordenadas geográficas .....	1
<b>Figura 2.</b> Proceso de interesterificación (Husum et al., 2004). .....	4
<b>Figura 3.</b> Imagen CLSM de HIPE con 85% de aceite (Jiao et al.,2018).....	5
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática del mecanismo propuesto de estabilización de emulsiones por parte de biopolímeros. ....	6
<b>Figura 5.</b> Espacio de color CIELAB ( Talens, 2017).....	11
<b>Figura 6.</b> Emulsiones elaboradas con diferentes concentraciones de CP y PPI. A: 0,75% CP-0% PPI; B: 1% CP-0% PPI; C: 1,25% CP-0%PPI; D: 1,25% CP-0,25% PPI; E: 1,25% CP-0,5% PPI; F:1,25% CP-0,75% PPI; G:1,25% CP-1% PPI .....	14
<b>Figura 7.</b> Situación de las muestras en el espacio de color CIELab .....	16
<b>Figura 8.</b> Diferencia de color total ( $\Delta E^*$ ) entre las diferentes emulsiones con la emulsión A .....	17
<b>Figura 9.</b> % Pérdida de aceite de las diferentes emulsiones .....	18
<b>Figura 10.</b> Barrido de esfuerzo de las diferentes emulsiones .....	20
<b>Figura 11.</b> Barrido de frecuencia de las diferentes emulsiones (escala logarítmica) .....	21
<b>Figura 12.</b> Curva de flujo de las diferentes emulsiones (escala logarítmica en el eje Y). .....	23
<b>Figura 13.</b> Imágenes de microscopía de fluorescencia y microscopía en campo claro de los HIPEs obtenidos. Barra de escala 200 $\mu\text{m}$ . Aumentos 10x. A1, B1, C1, D1, E1, F1 y G1 imágenes en campo claro. A2, B2, C2, D2, E2, F2 y G2 aceite teñido con Nile Red (rojo) y biopolímeros con FITC (verde).....	26

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> HIPEs* con diferente % de CP y de PPI.....	10
<b>Tabla 2.</b> Coordenadas de color en el espacio CIEL*a*b* de las diferentes emulsiones.	15
<b>Tabla 3.</b> Valores del módulo elástico ( $G'$ ) y del módulo viscoso ( $G''$ ) para las diferentes muestras a una frecuencia de 1 Hz, 0.3 Pa y a 20°C.....	22
<b>Tabla 4.</b> Viscosidad aparente de las diferentes emulsiones a un gradiente de velocidad de $10\text{s}^{-1}$ y a 20°C.....	24

## ABREVIATURAS

CP: Citrus Pomace, bagazo de clementina, por sus siglas en inglés Citrus Pomace.

PPI: Aislado de proteína de guisante, por sus siglas en inglés Pea Protein Isolate.

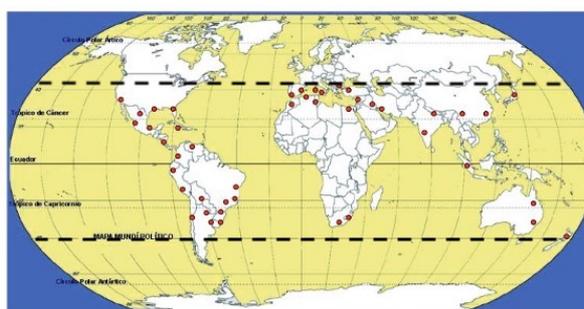
HIPE: Emulsión de alta fase interna, por sus siglas en inglés High Internal Phase Emulsion.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. LOS CÍTRICOS Y SUS SUBPRODUCTOS

Los cítricos son una de las principales frutas procesadas en el mundo. Las numerosas especies del género *Citrus* provienen de las zonas tropicales y subtropicales de Asia y del archipiélago malayo, desde allí se distribuyeron al resto de regiones del mundo donde hoy se cultivan. Los cítricos cultivados en el mundo se localizan entre los 40º de latitud norte y 40º de latitud sur (Figura 1), desde la orilla del mar hasta altitudes que sobrepasan los 1.000m (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021).



**Figura 1.** Mapamundi con coordenadas geográficas

Según los últimos datos, pertenecientes al año 2019, presentados en la FAOSTAT, la producción mundial de cítricos se situó casi en un total de 158 millones de toneladas. A nivel mundial España es el 5º productor mundial de cítricos, por detrás de Brasil, China, EE.UU. y México, y el 1º exportador mundial de cítricos en fresco. Según los datos de la FAOSTAT, la producción de cítricos en España en el año 2019 fue de aproximadamente 6 millones de toneladas, lo que representa casi un 4% de la producción mundial.

En España el límite máximo tolerable de altitud para el cultivo de cítricos es de 400 m y estos cultivos se localizan a lo largo de toda la costa levantina y parte de la atlántica, desde Tarragona hasta Huelva. Además, cabe destacar la producción de cítricos en la Comunidad Valenciana, con una producción cercana a los casi 3 millones de toneladas en la campaña de 2019/2020 (Generalitat Valenciana Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica, 2020).

El procesado de cítricos genera grandes cantidades de subproductos que habitualmente terminan en el campo agrícola o en el vertedero como desechos. En la industria del zumo de cítricos, los residuos sólidos (pueden representar hasta un 50% del fruto) que resultan de la extracción del zumo pueden ser un problema, ya que, pueden provocar la obstrucción del tanque de flotación y, además, pueden generar contaminación en las aguas residuales, siendo necesario un mayor tratamiento de este efluente o su disposición en vertederos, lo que resulta

costoso para la industria. Para minimizar estos problemas, algunas de las industrias de zumos más importantes utilizan estos residuos para alimentar al ganado, pero este proceso no resulta rentable (Cypriano et al., 2018).

Por todo ello, sería muy beneficioso encontrar nuevas estrategias de valorización de estos subproductos. Puesto que los subproductos derivados de los cítricos son ricos en azúcares solubles, proteínas, pectina, lignina, celulosa, hemicelulosa, y aceites esenciales (Marín et al., 2007), su uso podría ser de gran interés en la industria alimentaria.

## **1.2. PROPIEDADES DE ALGUNOS COMPUESTOS PRESENTES EN LOS SUBPRODUCTOS DE LOS CÍTRICOS**

Entre los compuestos presentes en los subproductos de los cítricos destacan, entre otros, la celulosa y la pectina.

La celulosa es un polisacárido que no es digerible por los humanos, lo que hace que no presente valor calórico, por lo que se ha convertido en un aliado de los alimentos dietéticos, presentando poder saciante. Por otro lado, es un polisacárido anfifílico y presenta una baja capacidad de disolución en agua. Se cree que el carácter anfifílico de la celulosa se debe a la organización cristalina que esta presenta, la celulosa tiene regiones tanto hidrófilas como hidrófobas que se humedecen preferentemente con las fases de agua y aceite, respectivamente. Este comportamiento anfifílico se evidencia por su capacidad de adsorberse en la interfase, entre el aceite y las disoluciones acuosas, evitando la coalescencia de las gotas de aceite, presentando por todo ello un carácter emulgente (Costa et al., 2019). Varios investigadores (Capron & Cathala, 2013; Kalashnikova et al., 2013) han demostrado la capacidad de las partículas de celulosa (celulosa nanocristalina sin modificar, obtenida por hidrólisis de las regiones amorfas de las fibras de celulosa) para autoensamblarse en las interfases aceite-agua y estabilizar las emulsiones de aceite en agua (O/W) sin necesitar la ayuda de tensoactivos. Además, la celulosa que no es adsorbida en la interfase se sitúa en la fase continua, mejorando la viscosidad y formando una red que atrapa las gotas de aceite, mejorando así la estabilidad de la emulsión, actuando en este caso como estabilizante. (Jia et al., 2015; Shen et al., 2016; Winuprasith & Suphantharika, 2015). Por ello, la celulosa puede actuar tanto como emulsionante, situándose en la interfase, como estabilizante, cuando no es adsorbida en la interfase, situándose en este caso en la fase continua.

La pectina es un polisacárido natural y uno de los constituyentes mayoritarios de la pared estructural de las células vegetales. Las pectinas se utilizan principalmente por sus capacidades gelificantes y estabilizantes (Leroux et al., 2003). Además, presentan propiedades emulsionantes y resulta interesante el uso de la pectina como agente emulsionante en diversas aplicaciones, como emulsiones de aceites minerales y vegetales y en mayonesas (Chang et al.,

2017). Concretamente, la pectina de cítricos puede reducir la tensión interfacial entre una fase oleosa y una fase acuosa por lo que puede ser de gran provecho para la preparación de emulsiones. Se cree que las propiedades emulsionantes observadas en la pectina de cítricos se deben a los residuos de proteínas presentes dentro de la pectina (Leroux et al., 2003). Respecto a su capacidad estabilizante, la pectina también desempeña un papel destacable, ya que aumenta la viscosidad al aumentar la interacción entre partículas y reducir la separación entre fases (Fei et al., 2021).

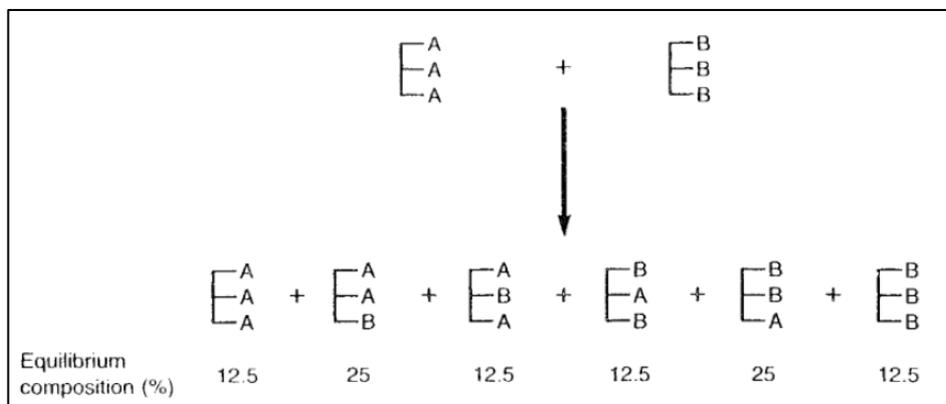
Por tanto, una de las opciones para valorizar los subproductos de los cítricos podría ser utilizarlos para obtener emulsiones, debido a las propiedades emulsionantes y estabilizantes que algunos de sus componentes presentan. Con la obtención de estas emulsiones se podría reemplazar a las grasas plásticas en los alimentos.

### 1.3. GRASAS PLÁSTICAS

Las grasas plásticas son un tipo de grasas que se caracterizan por poseer unos atributos físicos específicos. Estas grasas proporcionan a los alimentos propiedades de textura deseables, sensación agradable en la boca al ser ingeridos, integridad estructural y permiten aumentar su vida útil; por estas propiedades son muy empleadas en industrias de fritura, confitería, panadería y bollería (Khatoon & Reddy, 2005). Las grasas plásticas son grasas saturadas, contienen ácidos grasos saturados que presentan un elevado empaquetamiento y punto de fusión por lo que a temperatura ambiente son sólidas (Jennings & Akoh, 2010). Estas grasas constan de dos fases, cristales de grasa sólida y aceite líquido, y su dureza depende de la relación de cristales sólidos y de aceite líquido y del tamaño y la forma del cristal (Remig et al., 2010). Las grasas plásticas son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria debido a sus propiedades físicas. Para que los aceites vegetales, que son líquidos a temperatura ambiente y poseen un elevado contenido en ácidos grasos insaturados, pasen a ser grasas plásticas han de sufrir una transformación. Los procesos más utilizados para llevar a cabo esta transformación son la hidrogenación y la interesterificación (Jeyarani & Reddy, 2003).

La hidrogenación consiste en la adición de hidrógeno a un compuesto orgánico particular. Por medio de la hidrogenación, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) se pueden convertir en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) o en ácidos grasos saturados (SFA). Los MUFA y PUFA son generalmente inestables, pero cuando estos se hidrogenan dejan de serlo (Ganguly & Pierce, 2015). El proceso de hidrogenación se utiliza para mejorar la estabilidad oxidativa de los aceites (hidrogenando algunos de los dobles enlaces a saturados) y para obtener grasas plásticas a partir de estos (facilitando su uso en la industria alimentaria) (Remig et al., 2010). Este proceso de hidrogenación presenta un problema, y es que durante el proceso se forman una cierta cantidad residual de ácidos grasos *trans*, y estos ácidos grasos contribuyen a varios problemas de salud, incluida la trombogénesis, que conduce a la enfermedad coronaria (Jeyarani & Reddy, 2003).

La interesterificación puede verse como un proceso más “natural” que la hidrogenación, porque no cambia la estructura de los grupos acilo en los glicéridos, sino que consiste en el cambio de la distribución original de los ácidos grasos entre los glicéridos de grasas o mezclas de grasas (Figura 2) (Husum et al., 2004). Esto afecta a la naturaleza física y al comportamiento de las grasas, pero no altera la estructura química de los ácidos grasos y no da lugar a la aparición de ácidos grasos *trans*, por lo que se ha convertido en un proceso alternativo para la producción de grasas plásticas, y el proceso puede llevarse a cabo química o enzimáticamente (Fattahi-Far et al., 2006). Pero estas tecnologías de procesos de interesterificación química o enzimática, utilizadas principalmente en países europeos, presentan ciertos inconvenientes, que se asocian principalmente con la eficiencia del rendimiento y el costo de los procesos (Jeyarani & Reddy, 2003).



**Figura 2.** Proceso de interesterificación (Husum et al., 2004). Siendo A una cadena de ácidos grasos insaturada y B una cadena de ácidos grasos saturada.

Muchos estudios han enfatizado los efectos adversos del exceso de consumo de grasas saturadas sobre la salud de los consumidores y su relación con las enfermedades cardiovasculares, debido a un aumento en la concentración de colesterol LDL (Siri-Tarino et al., 2010). La FDA (Food and Drug Administration) ha propuesto reducir la adición de grasas hidrogenadas en los alimentos procesados (Kwon, 2016). Otros estudios enfatizan los beneficios de incorporar ácidos grasos poliinsaturados en la dieta, por su efecto en el control de la inflamación del hipotálamo inducida por la obesidad (Cintra et al., 2012).

A pesar de todos estos efectos perjudiciales para la salud, la industria alimentaria sigue utilizando las grasas saturadas como ingredientes, ya que permiten aumentar el plazo de consumo, estabilizan el sabor de los alimentos y confieren unas características de textura únicas. Pero, estas grasas cada vez, presentan mayor rechazo por parte de los organismos reguladores y de los propios consumidores, por lo que es necesario encontrar alternativas saludables que permitan a su vez preservar la frescura y proporcionar una textura atractiva a los alimentos (Klonoff, 2007). La estructuración de aceites y grasas es considerada por la comunidad científica como una alternativa prometedora para el desarrollo de nuevos productos con un perfil

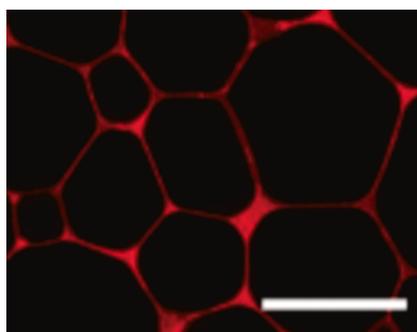
nutricional mejorado, sin grasas *trans*, con bajo contenido en grasas saturadas y alto en ácidos grasos poliinsaturados (Patel & Dewettinck, 2016). La estructuración del aceite líquido se puede realizar por diferentes métodos, uno de estos métodos consiste en la emulsificación (Vélez-Erazo et al., 2020).

#### 1.4. EMULSIONES DE ALTA CONCENTRACIÓN (HIPES)

Una emulsión es un tipo de sistema disperso constituido por la dispersión de dos o más fluidos no miscibles o fases líquidas (generalmente agua y aceite), en el que una de estas fases se encuentra distribuida en el seno de la otra, denominándose fase dispersa y fase continua, respectivamente (Cameron, 1996).

Las emulsiones se pueden clasificar convenientemente según la distribución espacial relativa de las fases oleosa y acuosa: por un lado, un sistema que consta de gotas de aceite dispersas en una fase acuosa se denomina emulsión de aceite en agua (O/W), como por ejemplo lo son la leche, la mayonesa y las salsas; por otro lado, un sistema que consta de gotas de agua dispersas en una fase oleosa se denomina emulsión de agua en aceite (W/O) como por ejemplo lo son la margarina y la mantequilla (McClements, 2016). Otra forma de clasificar las emulsiones es en función de la concentración de la fase interna que estas presentan, y se clasifican en emulsiones diluidas, emulsiones semidiluidas, emulsiones concentradas y emulsiones altamente concentradas. En las emulsiones altamente concentradas, también conocidas como HIPES, las gotas deformables se comprimen hasta poder llenar un volumen mayor que el de la fase interna (Derkach, 2010).

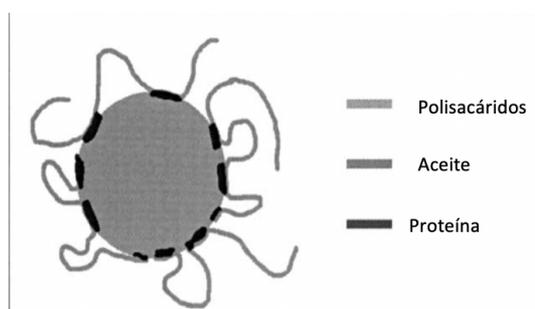
Las emulsiones de alta fase interna (HIPES) o de alta concentración son sistemas concentrados que poseen un gran volumen de fase interna o dispersa, la fracción de volumen ha de ser superior a 0,74, cifra que representa el volumen máximo que pueden ocupar varias esferas uniformes empaquetadas en un volumen dado de manera eficiente (Cameron, 1996). Al superar esta fracción de volumen, las gotas están empaquetadas tan fuertemente que pueden adoptar formas poligonales bajo algunas condiciones (Dai et al., 2019), presentando paredes relativamente uniformes (Figura 3) (Jiao et al., 2018).



**Figura 3.** Imagen CLSM de HIPE con 85% de aceite (Jiao et al., 2018)

La estructura de estas emulsiones es similar a una espuma convencional gas-líquido de bajo contenido líquido, y da lugar a varias propiedades atractivas para su uso que incluyen altas viscosidades y un comportamiento reológico viscoelástico. Al igual que las emulsiones diluidas, las HIPEs son cinética y termodinámicamente inestables; sin embargo, es posible preparar sistemas metaestables que no muestren cambios en las propiedades o apariencia durante largos períodos de tiempo. Aún así, hay que tener en cuenta que hay muchos factores que afectan a la estabilidad de las emulsiones de alta fase interna, incluida la naturaleza del tensoactivo, la concentración, la naturaleza de la fase continua, la temperatura, el pH y la presencia de sales en la fase acuosa. Se han postulado tres propiedades que un emulsionante debe poseer para proporcionar estabilidad en las HIPEs: debe disminuir la tensión interfacial entre las fases de agua y aceite, debe formar una película interfacial y debe adsorberse rápidamente en la interfaz. Las HIPEs se forman generalmente con la adición cuidadosa de la fase interna a una solución de surfactante en la fase externa, bajo constante agitación (Cameron, 1996).

Para obtener emulsiones de alta fase interna estables resulta interesante el uso de proteínas y polisacáridos como estructurantes, debido a sus propiedades emulsionantes y estabilizantes, respectivamente (Vélez-Erazo et al.,2020). Las proteínas tienen actividad superficial debido a la coexistencia de restos de amino y carboxilo en sus moléculas, y, por lo tanto, esto les permite situarse en la interfase y estabilizar las emulsiones de aceite en agua (Sun, 2018). Además, las proteínas contienen aminoácidos anfifílicos que también juegan un papel importante en la adsorción de las proteínas en la interfase (Hung et al., 2013). Por otro lado, al situarse las proteínas en la interfase, los polisacáridos en estas condiciones pueden desempeñar un papel como agentes espesantes (Figura 4) debido a su naturaleza hidrófila, y mejorar así aún más el rendimiento estabilizador de las proteínas (Sun, 2018). Los guisantes son una de las especies de legumbres con el % de proteína más elevado, presentando así capacidad emulsionante, por lo que la proteína de guisante resulta una buena opción para la obtención de una emulsión de alta concentración (Vélez-Erazo et al.,2020). Por otro lado, el propio bagazo de cítricos podría aportar una cantidad significativa de polisacáridos como la celulosa y la pectina, que en ausencia de proteína actuarían como emulsionantes y estabilizantes y en presencia de proteína actuarían principalmente como estabilizantes.



**Figura 4.** Representación esquemática del mecanismo propuesto de estabilización de emulsiones por parte de biopolímeros.

Las HIPEs presentan texturas semisólidas, y pueden usarse para obtener características reológicas o de estabilidad deseables en los alimentos. Tienden a actuar como sólidos elásticos por debajo de una tensión aplicada crítica y como líquidos viscosos por encima de esta tensión, y sus viscosidades disminuyen al aumentar el esfuerzo cortante. Debido a estos atributos de textura únicos, actualmente las HIPEs se están explorando para diversas aplicaciones alimentarias como por ejemplo sustitutas de las mayonesas y reemplazantes de la grasa en el chocolate (Gao et al., 2021), lo que abre una posibilidad para su uso en un futuro como sustitutas a las grasas plásticas.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es obtener emulsiones de alta concentración (HIPes) utilizando los subproductos de la industria de zumo de cítricos.

Los objetivos secundarios son:

- Valorizar los subproductos (bagazo) que se generan en la elaboración de zumos procedentes de frutos cítricos, concretamente clementina.
- Desarrollar emulsiones de alta concentración capaces de sustituir a las grasas plásticas en la formulación de los alimentos
- Estudiar el efecto que tiene la concentración de bagazo de clementina (CP) y del aislado de proteína de guisante (PPI) en el color, pérdida de aceite, reología y estructura de las diferentes emulsiones.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. MATERIALES

El bagazo de clementina (CP) empleado en el presente estudio fue donado por la empresa “Zumos valencianos del mediterráneo S.L.”.

El aislado de proteína de guisante (PPI) fue obtenido de la empresa HSN Network Ltd. Eden Point (Granada, España).

El aceite de girasol fue adquirido en un supermercado local de la ciudad de Valencia.

### 3.1. MÉTODOS

#### 3.1.1. Preparación del bagazo

Para preparar las emulsiones, se obtuvo a partir del bagazo de clementina un polvo. Para ello, el bagazo se sometió al siguiente tratamiento:

- 1) Se trituró el bagazo de clementina en una picadora emulsionadora Eurofred del modelo CUP 8 Tr (Barcelona, España) durante 10 min.
- 2) El bagazo triturado se centrifugó en una centrifuga SORVALL SUPER T21 (Ramsey, MN, USA) a 11.000 rpm, durante 10 min y a 15°C y se retiró el sobrenadante.
- 3) El residuo sólido se secó en una estufa P selecta VACIOTEM-T (Barcelona, España) a 40°C y a -0,7 bar hasta peso constante.
- 4) El residuo sólido seco se trituró en una picadora Moulinex (Alençon, Francia) 20 + 20 pulsos de un segundo para evitar el recalentamiento de la muestra.
- 5) El triturado se molió en un molino con camisa de agua refrigerante M20 de IKA (Staufen, Alemania) durante 10 min a intervalos de 2 min.
- 6) El polvo obtenido se envasó con un 80% de vacío en una máquina de vacío EDESA (Granollers, Barcelona, España) y se almacenó a temperatura ambiente en un desecador hasta su uso.

### 3.1.2. Preparación de las emulsiones

Se elaboraron 7 emulsiones con diferentes concentraciones de bagazo de clementina (CP) y de aislado de proteína de guisante (PPI) (Tabla 1) para poder valorar posteriormente algunas características de dichas emulsiones. Todas las emulsiones se elaboraron con una proporción de O/W de 80/20.

**Tabla 1.** HIPEs\* con diferente % de CP y de PPI

\* A cada HIPE se le asignó una letra en función de su % de CP y de PPI.

		PPI (%)				
		0	0,25	0,5	0,75	1,00
CP (%)	0,75	A				
	1	B				
	1,25	C	D	E	F	G

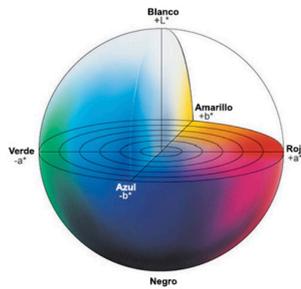
Para elaborar las emulsiones se siguió el siguiente procedimiento:

- 1) Se preparó la fase acuosa, que representa el 20% de la emulsión. Para ello, en un vaso de precipitados se mezcló la cantidad correspondiente de bagazo de clementina, de aislado de proteína de guisante (en caso de ser requerida) y de agua destilada (las cantidades varían según la emulsión que se desee preparar).
- 2) Se dejó la fase acuosa en agitación durante 2 h, para hidratar el bagazo de clementina y el aislado de proteína de guisante.
- 3) Se preparó la fase grasa, que representa el 80% de la emulsión. Para ello se pesó en un vaso de precipitados la cantidad correspondiente de aceite de girasol.
- 4) Se preparó la emulsión en el Ultraturrax T18 de IKA (Staufen, Alemania):
  - a. Se homogeneizó la fase acuosa a 8.000 rpm durante unos 30 s
  - b. Se subió la velocidad a 14.000 rpm y se fue añadiendo la fase grasa poco a poco cada 15 s
  - c. Una vez ya se hubo añadido toda la fase grasa, se homogeneizó la mezcla a 16.000 rpm durante 30 s.
- 5) Se guardó la emulsión en refrigeración a 4°C para su posterior análisis.

### 3.1.3. Caracterización de las emulsiones

#### 3.1.3.1. Color

Para realizar la medida del color se utilizó un colorímetro CHROMA METER CR-400/410 Konika Minolta (Chiyoda, Tokio, Japón) equipado con un iluminante C y un observador estándar de 2º. Antes de las mediciones de color, el instrumento se calibró utilizando una placa de calibración blanca proporcionada por el fabricante. Se trabajó en el espacio CIEL\*a\*b\* (Figura 5), que es un sistema cartesiano formado por 3 ejes, un eje vertical (L\*) y dos ejes horizontales (a\* y b\*). Además, también se analizó la pureza (C\*) y la tonalidad (h\*) (Talens, 2017).



**Figura 5.** Espacio de color CIELAB ( Talens, 2017)

La muestra se introdujo en una placa Petri STERIPLAN de 40x12 mm y se realizó la medida del color sobre un fondo blanco, obteniendo así todos los parámetros citados anteriormente (L\*, a\*, b\*, C\* y h\*). Cada muestra se analizó por triplicado.

Una vez obtenidos todos los valores de L\*, a\*, b\*, C\* y h\* para cada muestra, se calculó la diferencia de color entre las muestras con la Ecuación 1, utilizando la emulsión A como muestra de referencia.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^2) + (\Delta a^2) + (\Delta b^2)} \quad (\text{Ec. 1})$$

Dependiendo de la  $\Delta E^*$  obtenida (Bodart et al., 2008), las diferencias de color pueden ser o no apreciadas por el ojo humano:

- \*  $\Delta E^* < 1$ ; las diferencias de color no son apreciadas por el ojo humano.
- \*  $1 < \Delta E^* < 3$ ; las diferencias de color no son distinguidas por el ojo humano
- \*  $\Delta E^* > 3$ ; las diferencias de color se observan por el ojo humano

### 3.1.3.2. % Pérdida de aceite

Pasadas 24h tras la preparación de la emulsión, se dispusieron alícuotas de aproximadamente 1g en un Eppendorf de 1,5 mL. El análisis de la pérdida de aceite se midió centrifugando las muestras en una centrifuga 5415R Eppendorf (Hamburgo, Alemania) a 2.400 rpm durante 60 min a 25°C (Wijaya et al., 2017). Tras la centrifugación se eliminó el aceite libre y se pesó la muestra sin aceite libre. La pérdida de aceite se determinó a partir de la Ecuación 2. Cada muestra se analizó por triplicado.

$$\% \text{ Pérdida de aceite} = \frac{(m_2 - m_3)}{(m_2 - m_1)} \times 100 \quad (\text{Ec.2})$$

*Donde m1 es la masa inicial del Eppendorf, m2 es la masa inicial de la muestra y el Eppendorf y m3 es la masa del Eppendorf con la muestra después de la centrifugación sin aceite libre.*

### 3.1.3.3. Reología

Para el estudio del comportamiento reológico de las HIPes, se utilizó un reómetro rotacional (Kinexus Pro +, Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido) equipado con una placa Peltier. Se realizaron una serie de pruebas a 20°C con una geometría de placa paralela ( $\phi = 40 \text{ mm}$ ) y un espesor (GAP) de 1000  $\mu\text{m}$ .

En primer lugar, con el objetivo de determinar el intervalo de viscoelasticidad lineal (LVR), se realizó un ensayo oscilatorio de barrido de esfuerzo de 0,01 a 100 Pascales (Pa), a una frecuencia de 1 Hz. Posteriormente se realizó un barrido de frecuencia de 0,1 a 10 Hz, a un esfuerzo constante dentro del LVR (0,3 Pa). En ambos barridos se registró el módulo elástico o de almacenamiento ( $G'$ ) y el módulo viscoso o de pérdida ( $G''$ ), así como el factor de pérdida ( $\tan \delta$ ) calculado a través de la ecuación 3.

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (\text{Ec. 3})$$

Por último, se realizó una curva de flujo, aplicando un barrido de gradiente de velocidad creciente de 0,1 a 100  $\text{s}^{-1}$  durante 3 minutos registrándose la viscosidad aparente ( $\eta$ ).

Todas las medidas se realizaron por triplicado.

#### 3.1.3.4. *Microestructura*

Se estudió la microestructura de las diferentes emulsiones por microscopía óptica de campo claro y microscopía de fluorescencia. Para ello se utilizó un microscopio LEICA DM5000 (Wetzlar, Alemania).

Para estudiar las muestras por microscopía óptica de campo claro, se depositó una porción de la muestra sobre un portaobjetos de vidrio y sin teñir se cubrió con un cubreobjetos. Para estudiar las muestras por fluorescencia, se tomó una alícuota y se situó sobre un portaobjetos de vidrio. A continuación, se añadieron 16  $\mu$ L del agente de tinción específico para grasas Nile Red al 0,01% y se dejó actuar durante 5 min. Pasado este tiempo, se añadieron 16  $\mu$ L del agente de tinción FITC al 0,1%, que tiñe biopolímeros, como proteínas y polisacáridos, y se dejó actuar otros 5 min. Las muestras se cubrieron con un cubreobjetos y se observaron en el microscopio. Para ello, se utilizó un filtro N21 ( $\lambda_{ex}$  = 515-560 nm,  $\lambda_{em}$  = 590 nm) para el Nile Red y un filtro GFP ( $\lambda_{ex}$  = 470/40 nm,  $\lambda_{em}$  = 525/50 nm) para el FITC.

Todas las muestras se visualizaron utilizando lentes de objetivo 10x. Las imágenes se capturaron y almacenaron a 1024 x 1024 píxeles utilizando el programa para la captación de imágenes.

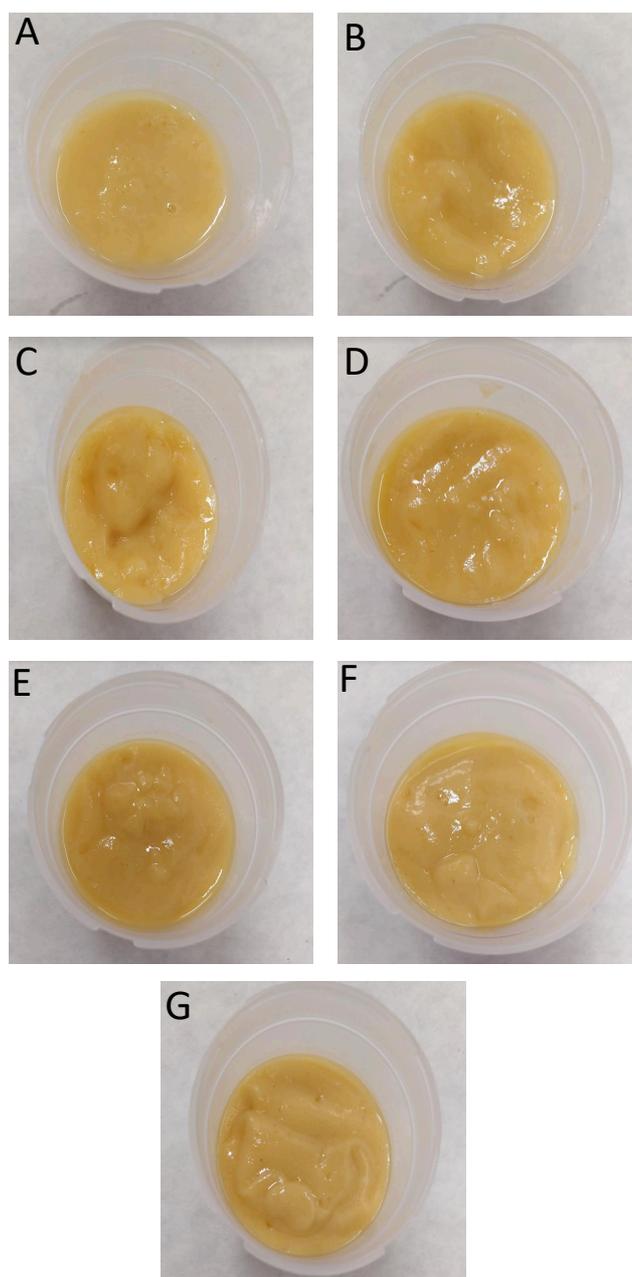
#### 3.1.4. **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con el programa Statgraphics Centurion XVII. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial, donde los factores analizados fueron %CP y %PPI. Para determinar las diferencias significativas entre las muestras se utilizó el Test Turkey de LSD (Least Significant Difference) a un nivel de significancia del 95%.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

### 4.1. PREPARACIÓN DE LAS EMULSIONES

Las diferentes HIPEs desarrolladas en este trabajo se muestran en la Figura 6.



**Figura 6.** Emulsiones elaboradas con diferentes concentraciones de CP y PPI. A: 0,75% CP-0% PPI; B: 1% CP-0% PPI; C: 1,25% CP-0%PPI; D: 1,25% CP-0,25% PPI; E: 1,25% CP-0,5% PPI; F:1,25% CP-0,75% PPI; G:1,25% CP-1% PPI

## 4.2. COLOR

La Tabla 2 muestra los valores obtenidos en el espacio CIEL\*a\*b\* (L\*, a\*, b\*, C\* y h\*) para cada una de las emulsiones preparadas.

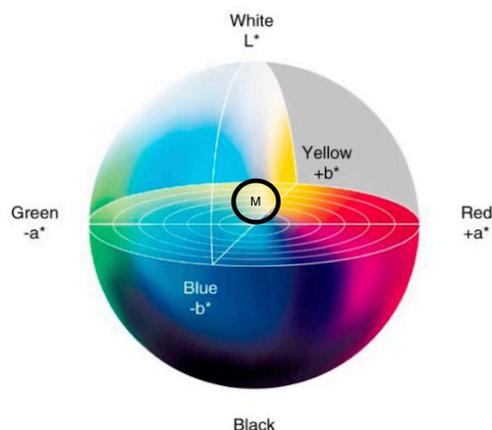
**Tabla 2.** Coordenadas de color en el espacio CIEL\*a\*b\* de las diferentes emulsiones.

MUESTRA	CP (%)	PPI (%)	L*	a*	b*	C*	h*
A	0,75	0	58,30 <sup>Aa</sup> (2,04)	-4,58 <sup>Aa</sup> (0,21)	26,71 <sup>Aa</sup> (0,91)	27,10 <sup>Aa</sup> (0,93)	99,72 <sup>Ba</sup> (0,21)
B	1	0	57,57 <sup>Aa</sup> (1,16)	-4,46 <sup>Aa</sup> (0,45)	28,89 <sup>Ba</sup> (0,56)	29,24 <sup>Ba</sup> (0,52)	98,78 <sup>ABa</sup> (0,96)
C	1,25	0	57,74 <sup>Aa</sup> (3,42)	-4,10 <sup>Aa</sup> (0,35)	31,21 <sup>Ca</sup> (2,08)	31,48 <sup>Ca</sup> (2,08)	97,48 <sup>Aa</sup> (0,65)
D	1,25	0,25	60,58 <sup>Aab</sup> (1,28)	-4,08 <sup>Aa</sup> (0,69)	31,01 <sup>Ca</sup> (1,92)	31,28 <sup>Ca</sup> (1,83)	97,54 <sup>Aa</sup> (1,67)
E	1,25	0,5	60,76 <sup>Aab</sup> (0,30)	-3,88 <sup>Aa</sup> (0,16)	30,73 <sup>Ca</sup> (0,45)	30,98 <sup>Ca</sup> (0,43)	97,21 <sup>Aa</sup> (0,36)
F	1,25	0,75	62,24 <sup>Ab</sup> (2,16)	-4,11 <sup>Aa</sup> (0,46)	30,0 <sup>Ca</sup> (0,91)	30,36 <sup>Ca</sup> (0,85)	97,80 <sup>Aa</sup> (1,07)
G	1,25	1	61,26 <sup>Ab</sup> (0,62)	-3,56 <sup>Aa</sup> (0,08)	30,99 <sup>Ca</sup> (0,73)	31,20 <sup>Ca</sup> (0,73)	96,55 <sup>Aa</sup> (0,12)

\*Diferentes letras mayúsculas en superíndice en la misma columna indican valores con diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) para el factor % de CP. Diferentes letras minúsculas en la misma columna indican valores con diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) para el factor % de PPI.

Por lo que se observa en la tabla, las emulsiones se pueden describir con una luminosidad (L\*) media-alta, ya que presentaron valores alrededor de 60, de un máximo de luminosidad de 100. Las emulsiones presentaron mayor contenido de verde que de rojo (valores muy bajos negativos de a\*), y mayor contenido de amarillo que de azul (valores positivos de alrededor de 30 de b\*), por lo que se podría decir que las emulsiones presentaron un color amarillo pálido. En la Figura

7 se marca con un círculo con una "M" el lugar del espacio CIELab donde estarían situadas las muestras.



**Figura 7.** Situación de las muestras en el espacio de color CIELab

Se puede observar (Tabla 2) que el % de CP no afectó significativamente ( $P > 0,05$ ) al parámetro  $L^*$ . En cambio, la adición de proteína sí provocó un ligero aumento ( $P < 0,05$ ) en la luminosidad, entre las emulsiones sin proteína (A, B y C) y las emulsiones con mayor % de esta (F y G). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre ninguna de las muestras con proteína. Cabe citar que el color de la emulsión está relacionado con las características coloidales, como, por ejemplo: el tamaño de gota, la concentración y el índice de refracción, produciéndose un aumento de la luminosidad a medida que aumenta la concentración de gotas y disminuye el tamaño de estas (Chantrapornchai et al., 1998), por lo que según esto, el aumento de luminosidad al añadir proteína se podría explicar por un aumento en la concentración de gotas y una disminución del tamaño de estas, así como por la propia adición de proteína.

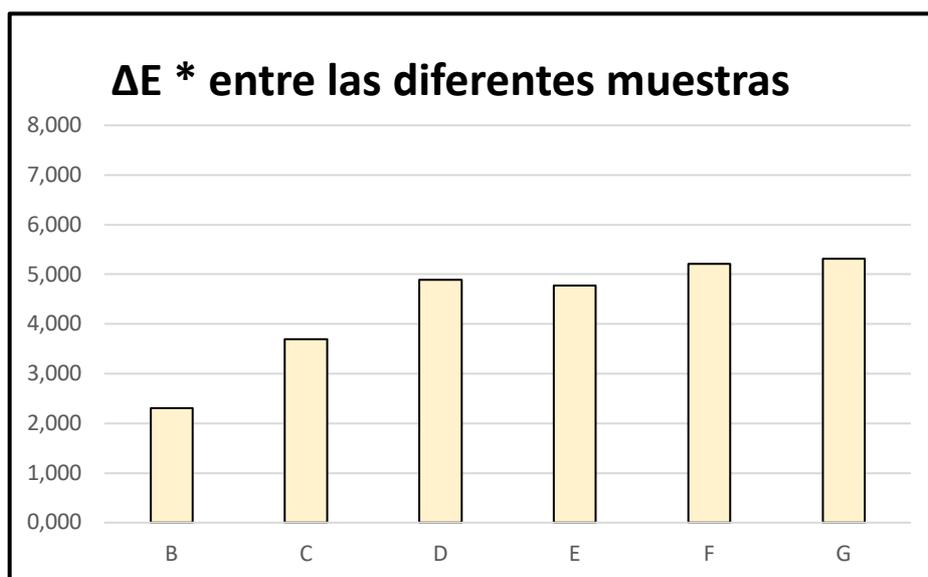
El parámetro  $a^*$  no se vio afectado significativamente ( $P > 0,05$ ) ni por el % de CP ni por el % de PPI. En cambio, el parámetro  $b^*$  se vio afectado significativamente ( $P < 0,05$ ) por el % de CP, presentando valores superiores al aumentar la proporción de CP en la emulsión, indicando así un aumento en el contenido de amarillo (+b). Esto podría deberse al color que presenta el propio bagazo (de tono amarillo), y por ello, al aumentar la concentración de este en la emulsión, el parámetro  $b^*$  se acerca más al amarillo. Respecto al % de PPI, se observa que este no afectó significativamente ( $P > 0,05$ ) al parámetro  $b^*$ .

El parámetro  $C^*$  mide la pureza, saturación o croma, de un color, siendo un valor de 0 para  $C^*$  un estímulo acromático, sin ninguna orientación hacia rojo, verde, azul o amarillo, y un valor alto de  $C^*$  un color altamente saturado (Talens, 2017). Se ha de tener en cuenta que la pureza depende de los parámetros  $a^*$  y  $b^*$ . En la tabla anterior (Tabla 2) se puede observar como al aumentar el % de CP, la emulsión presentó valores de  $C^*$  significativamente superiores ( $P < 0,05$ ), mientras que la adición de proteína no afectó significativamente a este parámetro.

El tono (parámetro  $h^*$ ) es el atributo de la sensación visual según la cual una superficie parece similar a uno, o a proporciones de dos, de los colores percibidos rojo, naranja, amarillo, verde, azul y púrpura (Talens, 2017). Se define el origen  $0^\circ$  en la posición  $a^*$  positiva y  $b^*=0$ , que representa un color estrictamente rojo. Siguiendo el sentido contrario a las agujas del reloj en el ángulo  $90^\circ$  sería un color estrictamente amarillo, en  $180^\circ$  un verde estricto, y un azul estricto en  $270^\circ$ . Según los valores obtenidos, todas las emulsiones formuladas presentaron un tono amarillo tirando ligeramente hacia verde. En este caso también hay que tener en cuenta que la pureza depende de los parámetros  $a^*$  y  $b^*$ . Al aumentar el % de CP de 0,75 a 1,25%, se observó que el parámetro  $h^*$  tomó valores significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ), acercándose más al amarillo y alejándose así aún más del verde. Además, en este caso también se puede observar que la adición de proteína no afectó significativamente ( $P > 0,05$ ) al parámetro  $h^*$ .

En general, el contenido en CP fue el que más influyó en los diferentes atributos de color mientras que el contenido en PPI solo pareció influir en la luminosidad de las emulsiones.

En la Figura 8 se pueden observar las diferencias de color presentadas entre las diferentes emulsiones con la emulsión A, que se toma como muestra de referencia.

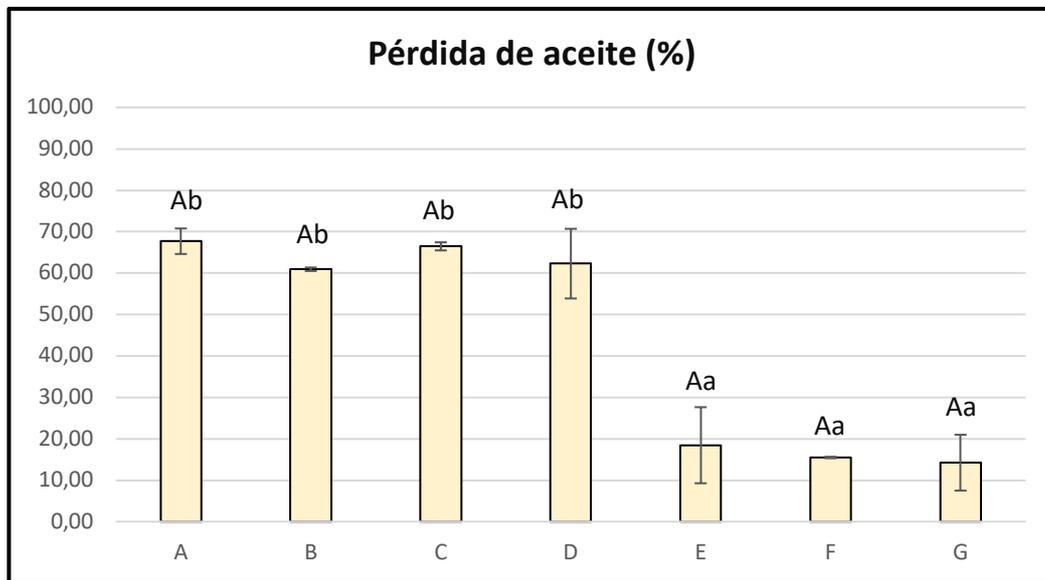


**Figura 8.** Diferencia de color total ( $\Delta E^*$ ) entre las diferentes emulsiones con la emulsión A

Se puede observar que, en todas las emulsiones, excepto en la emulsión B, las diferencias de color con la muestra de referencia (emulsión A) pudieron ser detectadas por el ojo humano ( $\Delta E^* > 3$ ). Además, cabe comentar que tanto el % de CP como el % de PPI afectó a las diferencias de color de las emulsiones, siendo las emulsiones con un contenido en CP del 1,25% y con cualquiera de las proporciones estudiados de PPI las que presentaron las mayores diferencias de color.

### 4.3. % PÉRDIDA DE ACEITE

Para evaluar su estabilidad, se determinó la pérdida de aceite en las emulsiones desarrolladas en este trabajo (Figura 9). Para ello, las muestras fueron sometidas a centrifugación.



**Figura 9.** % Pérdida de aceite de las diferentes emulsiones

*\*Diferentes letras mayúsculas indican valores con una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) para el factor % de CP. Diferentes letras minúsculas indican valores con una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) para el factor % de PPI.*

En la Figura 9 se observa que el % de CP no tuvo efectos significativos ( $P > 0,05$ ) sobre el % de pérdida de aceite, presentando todas las muestras sin proteína o con bajo porcentaje de la misma (emulsiones A, B, C y D) un % de pérdida de aceite de entre un 60 y un 70%, independientemente del % de CP que contenían (0,75, 1 o 1,25% de CP). Los datos obtenidos de % de pérdida de aceite indicaron que el recubrimiento de las gotas de aceite por parte de los polisacáridos (celulosa y pectina) presentes en el CP, así como su efecto estabilizante no fue del todo efectivo, por lo que al someter a las muestras al proceso de centrifugación, posiblemente, la película interfacial que intenta rodear a las gotas de aceite, que ya de por sí es muy débil, se rompió, lo que condujo a la liberación de una elevada cantidad de aceite de la emulsión (Wijaya et al., 2017). Respecto al efecto de la proteína, a partir de un 0,5% de proteína (emulsiones E, F y G) se observó un efecto sinérgico de estabilización entre los polisacáridos y la proteína, que permitió obtener valores más bajos de pérdida de aceite (en torno a un 15% en este caso), lo que estaría relacionado con una cobertura más eficiente de las gotas de aceite.

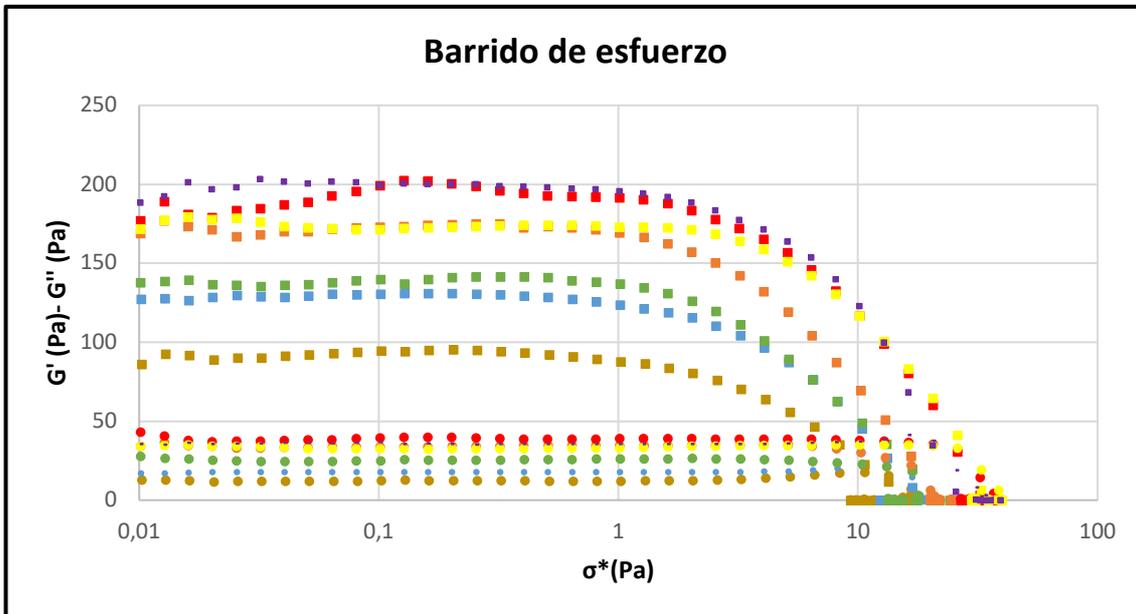
Vélez-Erazo y colaboradores (2020) estudiaron la pérdida de aceite en HIEs usando proteína de guisante y diferentes hidrocoloides como estabilizantes, y obtuvieron entre un 2 y un 17% de pérdida de aceite en función del hidrocoloide empleado, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo (pérdida de aceite de entorno a un 15% en las emulsiones E, F y G). Meng y colaboradores (2018) obtuvieron HIEs estabilizados con 1% HPMC con una pérdida de aceite de en torno a un 7%. Por otro lado, Gaudino y colaboradores (2019) consiguieron HIEs muy estables estabilizadas con lecitina de soja y ácido esteárico, con una pérdida de aceite cercana a un 0%; sin embargo, las concentraciones de estabilizante utilizadas en este caso fueron bastante elevadas, cercanas al 20 y 30%.

En la actualidad, no existen estudios de estabilidad de HIEs elaborados con subproductos de la industria alimentaria y con aislado de proteína de guisante, por lo que los resultados obtenidos no se pueden comparar directamente con otros, pero el % de pérdida de aceite obtenido por algunas de las emulsiones preparadas en este trabajo (emulsiones E, F y G) indican una buena estabilidad. Se ha de tener en cuenta que el hecho de presentar una buena estabilidad es un factor necesario a la hora de proponer estas emulsiones como posibles sustitutas de las grasas plásticas en los alimentos.

#### 4.4. REOLOGÍA

La reología juega un papel crucial en el comportamiento físico de las emulsiones, tanto en su aspecto y estructura como en su estabilidad, por lo que resulta ser un parámetro de gran interés. Permite conocer las interacciones gota-gota, gota-partícula o partícula-partícula. Las emulsiones con diferentes proporciones de emulsionantes presentan diferentes comportamientos reológicos (Liu et al., 2021), por lo que se espera que las diferentes emulsiones estudiadas en el actual trabajo presenten comportamientos reológicos distintos al contener diferentes % de CP y de PPI. Se midieron las propiedades viscoelásticas de las emulsiones y se determinaron los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ), así como el factor de pérdida ( $\tan \delta$ ). La  $G'$  es una medida de la respuesta elástica, la  $G''$  corresponde a la respuesta viscosa del material, y el factor de pérdida es la relación entre el módulo de pérdida y el módulo de almacenamiento. Si el factor de pérdida es  $> 1$  prevalece el componente viscoso sobre el elástico y si es  $< 1$  prevalece el elástico sobre el viscoso (Urbánková et al., 2021). De esta forma es posible cuantificar en qué medida se comporta como sólido o como líquido.

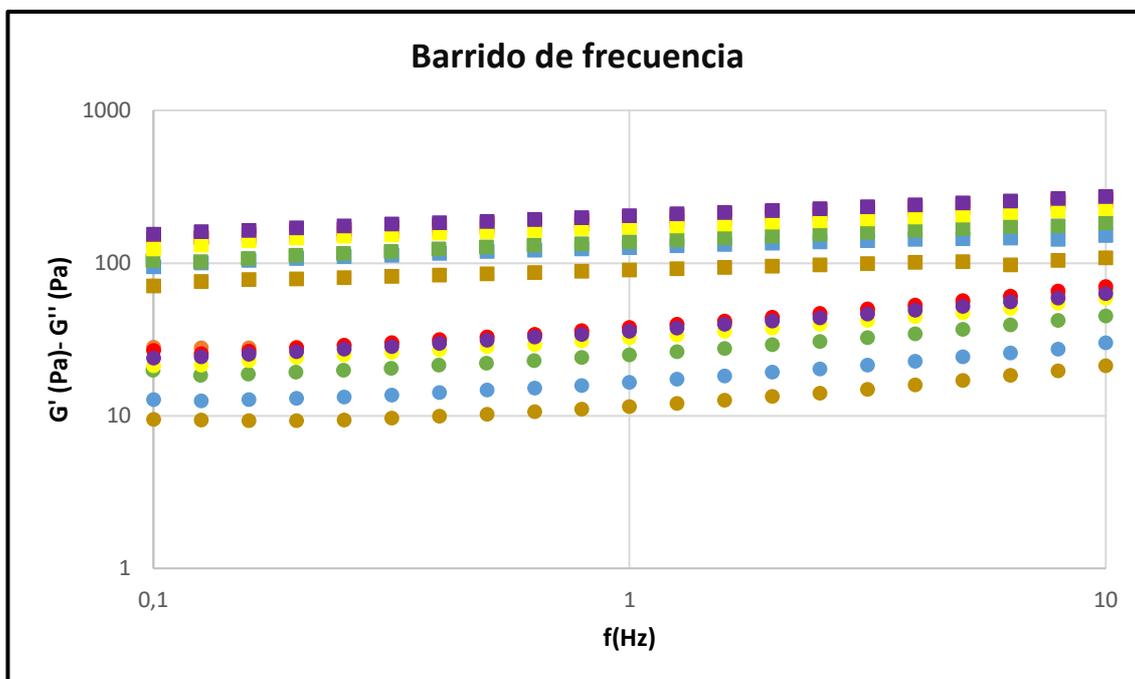
Se obtuvieron los barridos de esfuerzo de las diferentes muestras en un intervalo de 0,01 a 100 Pa, a 20°C, y a una frecuencia de 1 Hz (Figura 10). Estos barridos de esfuerzo permitieron determinar el intervalo de viscoelasticidad lineal (LVR) de cada emulsión, que comprende el intervalo de esfuerzos para el cual los valores de las funciones viscoelásticas no varían significativamente.



**Figura 10.** Barrido de esfuerzo de las diferentes emulsiones a una frecuencia de 1Hz. El barrido de esfuerzo de cada emulsión se presenta de distinto color (emulsión A en marrón, emulsión B en azul, emulsión C en verde, emulsión D en naranja, emulsión E en rojo, emulsión F en amarillo y emulsión G en morado). El módulo  $G'$  de cada emulsión se representa con cuadrados, el módulo  $G''$  con círculos.

En la Figura 10 se puede observar que para todas las muestras  $G'$  siempre fue mayor que  $G''$  a esfuerzos más bajos, predominando así el carácter elástico (sólido) sobre el viscoso (líquido). A esfuerzos más altos se observó un punto de cruce entre  $G'$  y  $G''$ , relacionado con la deformación de la estructura a partir de un determinado valor de esfuerzo. Este fenómeno, a partir del cual predomina el carácter viscoso sobre el elástico, se asocia a los reordenamientos estructurales de las gotas de la emulsión en situaciones de alto estrés (Tan et al., 2014), presentando así todas las emulsiones un comportamiento reológico viscoelástico. Se observaron los valores de tensión en el punto de cruce (o tensión de fluencia) y como se esperaba, la adición de CP y de PPI mejoró la tensión de fluencia (Wijaya et al., 2017), presentando las emulsiones con un mayor % de CP y de PPI una región viscoelástica lineal más amplia.

La dependencia de la respuesta del material a la frecuencia aplicada se estudió sometiendo las muestras a un esfuerzo constante (0,3 Pa), a la cual todas las emulsiones se encontraban dentro del intervalo viscoelástico lineal (LVR), a frecuencias variables (de 0,1 a 10 Hz), y a una temperatura constante de 20°C. El barrido de frecuencia de las diferentes muestras se ilustra en la Figura 11.



**Figura 11.** Barrido de frecuencia de las diferentes emulsiones (escala logarítmica) a un esfuerzo constante de 0,3 Pa. El barrido de frecuencia de cada emulsión se presenta de distinto color (emulsión A en marrón, emulsión B en azul, emulsión C en verde, emulsión D en naranja, emulsión E en rojo, emulsión F en amarillo y emulsión G en morado). El módulo  $G'$  de cada emulsión se representa con cuadrados, el módulo  $G''$  con círculos.

En la Figura 11 se puede observar que, tal y como se observó en el barrido de esfuerzo (Figura 10), todas las emulsiones exhibieron un comportamiento similar a un gel, ya que el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) era mayor que el módulo de pérdida ( $G''$ ), y, además, este comportamiento fue más notable en las emulsiones que contenían un mayor % de CP y que contenían proteína, tal y como se esperaba. Respecto al factor de pérdida, todas las emulsiones presentaron un valor inferior a 1, marcando así una prevalencia del componente elástico sobre el viscoso en todo el intervalo de frecuencias estudiado.

La Tabla 3 muestra el módulo elástico ( $G'$ ) y el módulo viscoso ( $G''$ ) de todas las muestras obtenidos a una frecuencia de 1 Hz y un esfuerzo de 0,3 Pa.

**Tabla 3.** Valores del módulo elástico ( $G'$ ) y del módulo viscoso ( $G''$ ) para las diferentes muestras a una frecuencia de 1 Hz, 0,3 Pa y a 20°C

Muestra	CP (%)	PPI (%)	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)
A	0,75	0,00	90,62 <sup>Aa</sup> (4,63)	11,72 <sup>Aa</sup> (0,65)
B	1,00	0,00	128,82 <sup>Ba</sup> (5,49)	17,32 <sup>Ba</sup> (0,73)
C	1,25	0,00	137,37 <sup>Ba</sup> (10,56)	24,84 <sup>Ca</sup> (1,64)
D	1,25	0,25	157,93 <sup>Bb</sup> (27,02)	33,54 <sup>Cb</sup> (3,52)
E	1,25	0,50	181,90 <sup>Bc</sup> (17,27)	36,49 <sup>Cc</sup> (2,29)
F	1,25	0,75	169,70 <sup>Bbc</sup> (5,82)	32,38 <sup>Cb</sup> (0,64)
G	1,25	1,00	206,93 <sup>Bd</sup> (13,41)	37,10 <sup>Cc</sup> (2,71)

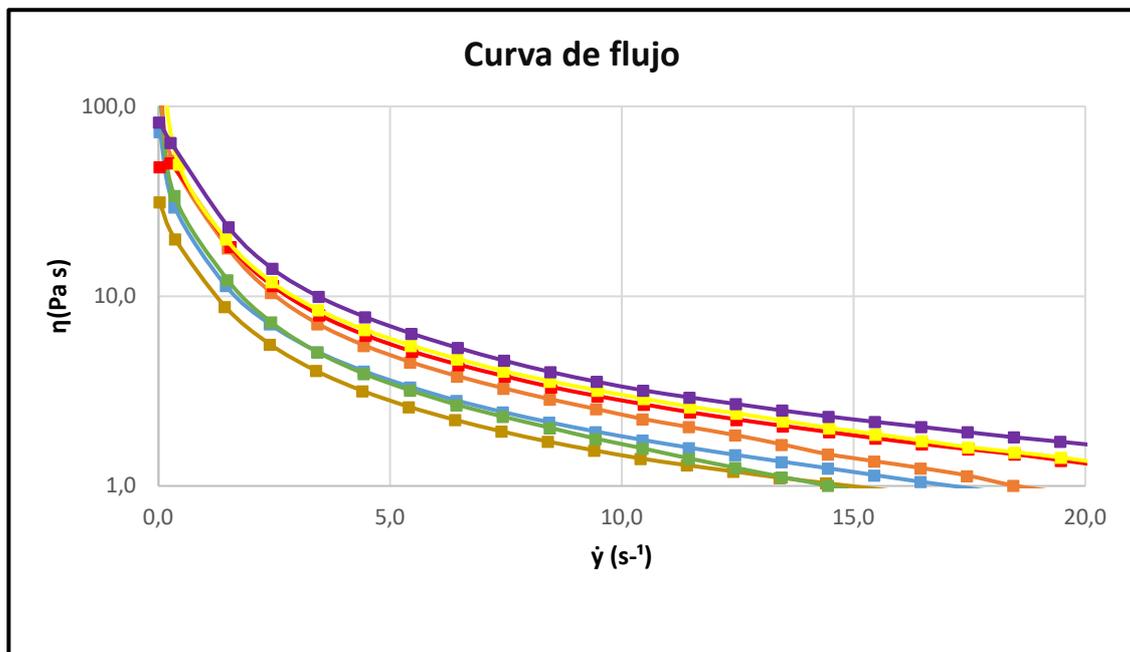
\*Diferentes letras mayúsculas en superíndice en la misma columna indican valores con una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) para cada muestra con el factor % de CP. Diferentes letras minúsculas en la misma columna indican valores con una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) para las diferentes muestras con el factor % de PPI.

Tanto  $G'$  como  $G''$  se vieron afectados por el % de CP y por el % de PPI. Por un lado, en la Tabla 3 se puede observar que el módulo elástico ( $G'$ ) tomó valores significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) al aumentar el % de CP de 0,75 a 1 o a 1,25%, así como también tomó valores significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) al añadir proteína, produciéndose un aumento en el comportamiento dominante sólido. Este aumento puede estar relacionado con la adsorción y la acumulación de las partículas en las interfases agua-aceite y con la formación de una estructura de red de gotas (Zeng et al., 2017), presentando así las emulsiones con mayor % de CP y con proteína un mayor grado de estructuración. Por otro lado, se observó que al aumentar el % de CP en las emulsiones, el módulo viscoso ( $G''$ ) tomó valores superiores, indicando así un mayor componente viscoso, lo que puede deberse a una mayor cantidad de CP solubilizado. La adición de proteína también afectó significativamente ( $P < 0,05$ ) al valor del módulo viscoso, presentando un mayor valor de  $G''$  debido a una mayor cantidad de sólidos solubilizados.

Los presentes resultados (barrido de esfuerzo y barrido de frecuencia) sugirieron que las propiedades reológicas de las HIPE estaban dominadas por las propiedades de las partículas (CP y PPI), y por la capacidad de estas de situarse en la interfase agua-aceite, formando así materiales con un carácter sólido predominante a valores de esfuerzo  $< 10$ -25 Pa (en función de la emulsión). Es probable que esto se atribuya a una mayor viscoelasticidad de las capas de proteína-polisacárido formadas en la interfase aceite-agua, además de beneficiarse de la alta viscosidad debido a la compactación de las gotas de aceite (Wijaya et al., 2017). Los resultados de reología se compararán con los resultados obtenidos en microscopía.

Zeng y colaboradores (2017) prepararon HIEs O/W con un volumen de aceite elevado (80-90%) con aceite de maíz y con partículas híbridas de gliadina y quitosano como emulsionantes, y obtuvieron una emulsión con una tensión de fluencia de 70 Pa y una  $G'$  de aproximadamente 800 Pa, valores muy superiores a los presentados por las emulsiones estudiadas en el presente trabajo. Por otro lado, Huang y colaboradores (2019) analizaron las propiedades reológicas de HIEs estabilizadas por nanocomplejos de quitosano-caseinofosfopéptidos (CS-CPP) con diferentes proporciones de masa de CS-CPP y obtuvieron valores de  $G'$  de entre 100 y 200 Pa para un esfuerzo de 1 Pa y una frecuencia de 1 Hz, valores que si que se aproximan más a los obtenidos en este trabajo.

En la Figura 12 se pueden observar las curvas de flujo de las emulsiones estudiadas desde un gradiente de velocidad de  $0 \text{ s}^{-1}$  hasta un gradiente de velocidad de  $20 \text{ s}^{-1}$ , a una temperatura constante de  $20^\circ\text{C}$ . En todos los casos se observó un descenso de la viscosidad aparente al aumentar el gradiente de velocidad, siguiendo un comportamiento típicamente pseudoplástico.



**Figura 12.** Curva de flujo de las diferentes emulsiones (escala logarítmica en el eje Y). La curva de flujo de cada emulsión se presenta de distinto color (emulsión A en marrón, emulsión B en azul, emulsión C en verde, emulsión D en naranja, emulsión E en rojo, emulsión F en amarillo y emulsión G en morado).

A partir de la curva de flujo se obtuvieron los valores de viscosidad a un gradiente de velocidad de  $10 \text{ s}^{-1}$ . Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Viscosidad aparente de las diferentes emulsiones a un gradiente de velocidad de  $10 \text{ s}^{-1}$  y a  $20^\circ\text{C}$

Muestra	CP (%)	PPI (%)	$\eta$ (Pa s)
A	0,75	0,00	1,32 <sup>Aa</sup> (0,05)
B	1,00	0,00	1,82 <sup>Aa</sup> (0,05)
C	1,25	0,00	1,58 <sup>Aa</sup> (0,01)
D	1,25	0,25	1,84 <sup>Aab</sup> (0,42)
E	1,25	0,50	2,43 <sup>Ab</sup> (0,29)
F	1,25	0,75	2,84 <sup>Ac</sup> (0,06)
G	1,25	1,00	3,01 <sup>Ac</sup> (0,14)

\*Diferentes letras mayúsculas en superíndice en la misma columna indican valores con diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) para el factor % de CP. Diferentes letras minúsculas en la misma columna indican valores con diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) para el factor % de PPI.

Se observó que el aumento en el % de CP no tuvo efectos significativos ( $P > 0,05$ ) sobre la viscosidad aparente (a  $20^\circ\text{C}$ ) a este gradiente de velocidad (de  $10 \text{ s}^{-1}$ ), pero por el contrario, la adición de proteína a partir de un cierto % provocó un aumento significativo ( $P < 0,05$ ) en la viscosidad aparente, lo que puede estar relacionado con el complejo proteína-polisacáridos en la interfase, formando así una barrera física en la superficie de las gotas de aceite, y a la presencia del exceso de polisacáridos en la fase continua, formando una red y espesando la emulsión (Huang et al., 2019), actuando así como estabilizantes. A partir de la emulsión con un 0,5% de PPI (emulsión F) la viscosidad aparente resultó significativamente ( $P < 0,05$ ) superior a la viscosidad aparente de las emulsiones sin proteína. Además, las emulsiones con un 0,75% y un 1% de PPI presentaron una viscosidad significativamente ( $P < 0,05$ ) superior a la emulsión con un 0,5% de PPI. El aumento en la viscosidad aparente a partir de la adición de un 0,5% de PPI permite que las emulsiones presenten una menor pérdida de aceite y una mayor estabilidad, tal y como se observó en el apartado del análisis del % de pérdida de aceite.

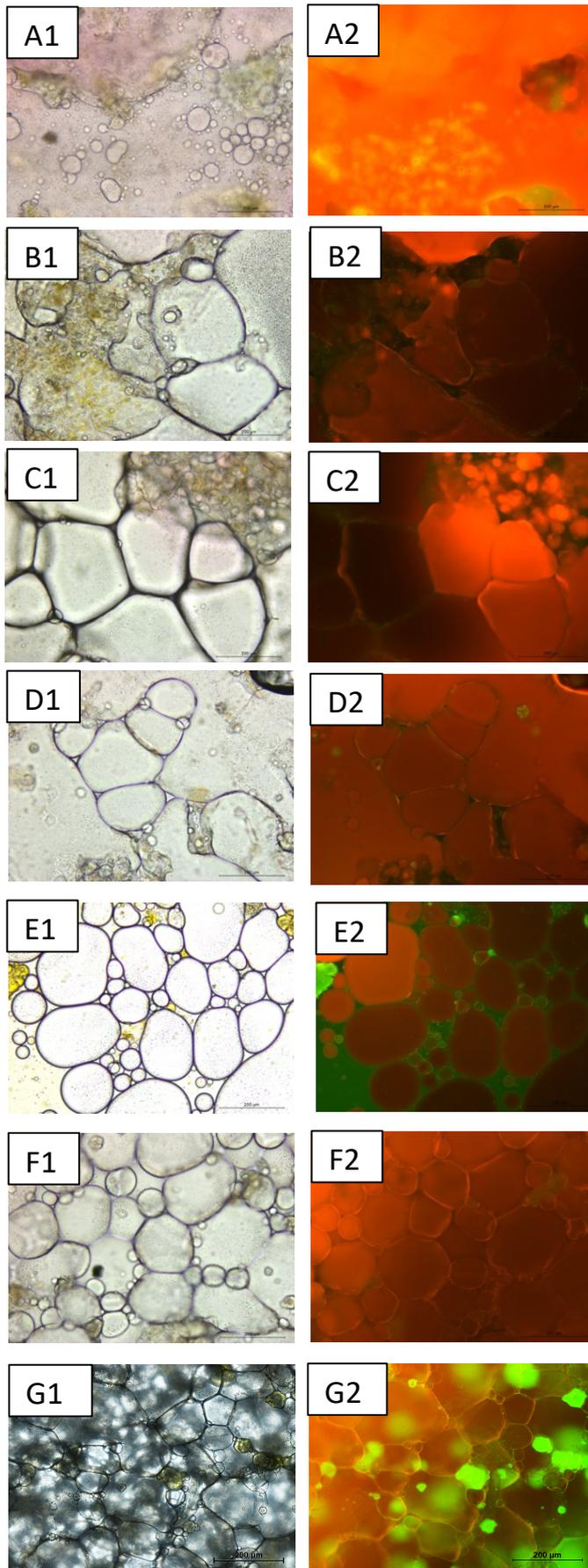
Sin embargo, estos valores resultaron inferiores a los obtenidos por otros autores. Wijaya y colaboradores (2020) estudiaron las propiedades reológicas de HIPEs estabilizadas únicamente por diferentes % de complejos de aislado de proteína de suero y pectina de bajo metoxilo (WPI:LMP), y midieron la viscosidad en un rango de velocidades de 0 a  $20 \text{ s}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ , obteniendo a un gradiente de velocidad de  $10 \text{ s}^{-1}$  una viscosidad aparente de entorno a  $30 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  para un % de WPI:LMP de 1:0,5 y una viscosidad aparente de entorno a  $60 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  para un % de WPI:LMP de 2,5:1,25.

Hay que tener en cuenta que con las emulsiones preparadas en este trabajo se pretende valorizar los subproductos de la industria de zumo de cítricos y utilizar estos subproductos junto al aislado de proteína de guisante como emulsionantes y estabilizantes, por lo que se esperaba que los resultados obtenidos no fuesen tan prometedores como otras HIPEs formuladas con emulsionantes y estabilizantes aislados, pero los resultados muestran una buena estructura y una buena estabilidad en las HIPEs con un elevado % de CP (1,25%) y de PPI (0,5 – 0,75 y 1%).

Finalmente, cabe comentar que las HIPEs representan una muy buena opción como posibles sustitutas de las grasas plásticas (como por ejemplo la margarina). Sin embargo, hay que tener en cuenta que una margarina a temperatura ambiente presenta una  $G'$  de aproximadamente  $1\cdot 10^6 \text{ Pa}$  y un límite elástico de unos  $200 \text{ Pa}$  (Zeng et al., 2017), valores muy superiores a los presentados por las emulsiones que se han estudiado en este trabajo, por lo que el desarrollo de estas HIPEs podría ser útil, pero está lejos de parecerse a una grasa plástica.

#### **4.5. MICROESTRUCTURA**

La microscopía permite estudiar la distribución y las dimensiones de los componentes de la emulsión, así como obtener información sobre la estabilidad del sistema. En la Figura 13 se pueden observar las imágenes de las emulsiones desarrolladas en este trabajo, obtenidas por microscopía óptica de campo claro (A1, B1, C1, D1, E1, F1 y G1) y fluorescencia (A2, B2, C2, D2, E2, F2 y G2).



**Figura 13.** Imágenes de microscopía de fluorescencia y microscopía en campo claro de los HIPes obtenidos. Barra de escala 200 μm. Aumentos 10x. A1, B1, C1, D1, E1, F1 y G1 imágenes en campo claro. A2, B2, C2, D2, E2, F2 y G2 aceite teñido con Nile Red (rojo) y biopolímeros con FITC (verde).

En las emulsiones con un 0,75% de CP (A) se pudo apreciar que, aunque sí hubo una pequeña proporción de grasa (teñida de color rojo por el Nile Red) estructurada en forma de pequeños glóbulos, la mayor parte se mostró desestructurada y libre (Figuras A1 y A2). Una parte del bagazo (teñido de color verde por el FITC) (Figura A2) se situó alrededor de los pequeños glóbulos de grasa (Figura A2), confiriéndoles un color amarillo. Al aumentar la concentración de CP al 1% (B) se apreció un mayor efecto emulsionante del bagazo, que apareció situado en la interfase (Figura B2), rodeando glóbulos de estructura heterogénea y de gran tamaño (Figura B1). La fracción grasa, aunque, todavía desestructurada, se observó más compartimentalizada que en la muestra anterior. En la muestra con 1,25% de CP (C), el efecto emulsificante del bagazo fue superior que en las muestras anteriores; los glóbulos de grasa, aunque todavía grandes, adoptaron una estructura más homogénea (Figuras C1 y C2).

En las muestras con el máximo contenido en CP y un 0,25% de PPI (D) se apreció una mayor proporción de biopolímeros formando la interfase que rodea los glóbulos (Figura D2), probablemente se produce interacción entre los polisacáridos del bagazo y la proteína. Se apreciaron glóbulos de menor tamaño que en las muestras sin proteína (Figura D1). Al aumentar el contenido de PPI al 0,5% (E), se observó una mayor proporción de grasa estructurada, en forma de glóbulos redondeados y ovalados (Figuras E1 y E2). Algunos glóbulos, los de mayor tamaño, adoptaron una estructura poliédrica (Figura E1). En estas muestras se observaron biopolímeros (de color verde), tanto situados en la interfase, rodeando los glóbulos, como en la fase continua, manteniéndolos separados (Figura E2). El sistema bagazo-proteína favoreció la estructuración de los glóbulos y estabilizó estas emulsiones. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el apartado de reología ya que las muestras con un 0,5 % de PPI presentaron una viscosidad superior que las muestras sin proteína y con 0,25% de PPI. En las muestras con 1% de PPI (F), se apreció una mayor estructuración de la grasa (Figuras F1 y F2) que en las muestras anteriores. La emulsión adoptó estructura de panal, con glóbulos empaquetados, de estructura poliédrica, en su mayoría, y de mayor grado de homogeneidad. El sistema bagazo-proteína actuó rodeando y estabilizando los glóbulos. Estas muestras en el apartado de reología presentaron valores de viscosidad superiores a los de la muestra E. En las muestras con 1,25 % de PPI (G), al igual que en la F, la grasa apareció estructurada (Figuras G1 y G2) en forma de glóbulos de estructura poliédrica, homogéneos y más empaquetados y pequeños que en las otras emulsiones, presentando esta emulsión una mayor estabilidad.

Si se tiene en cuenta la composición de las emulsiones y las imágenes obtenidas se observa que el aumento en la proporción de CP de 0,75% a 1,5% favoreció la estructuración de la grasa de la emulsión. Al aumentar el contenido en bagazo la emulsión adoptó una mayor estructuración, pasando así de presentar grasa, principalmente libre y no estructurada en la muestra A, a presentar una mayor proporción de grasa estructurada y en forma de glóbulos grandes e irregulares en la muestra C. Este hecho puede ser debido a un recubrimiento más eficaz de las gotas de aceite por parte de los polisacáridos presentes en el CP (celulosa y pectina), consiguiendo así una mayor estabilidad, lo que concuerda con los resultados obtenidos en reología, donde se ha observado que al aumentar el % de CP las emulsiones aumentan su módulo elástico presentando así un mayor comportamiento sólido.

Además, las emulsiones con proteína presentaron una mayor estructuración que las emulsiones sin proteína, lo que también concuerda con los resultados obtenidos en reología. A partir de un 0,5% de proteína se produjo un aumento notable en el nivel de estructuración, con presencia de glóbulos más pequeños, lo que podría relacionarse con una menor pérdida de aceite. Este hecho puede ser debido a que se produce un efecto sinérgico de estabilización al interaccionar los biopolímeros del sistema bagazo-proteína, es decir, se produce una interacción entre los polisacáridos del bagazo y el aislado de proteína de guisante, presentando así una cobertura más eficiente de las gotas de aceite.

## 5. CONCLUSIONES

En general, las emulsiones presentan todas ellas un color similar a un amarillo pálido; la incorporación de proteína de guisante afecta a la luminosidad mientras que los parámetros  $b^*$ , el croma y el tono se ven afectados principalmente por el porcentaje de bagazo.

El % de pérdida de aceite se reduce notablemente cuando se incorpora la proteína de guisante, lo que indica una mayor estabilidad de la emulsión.

Todas las muestras presentan un comportamiento viscoelástico en el que predomina el carácter elástico sobre el viscoso. Tanto el módulo elástico como el viscoso aumentan al aumentar el % de bagazo y proteína. La viscosidad aparente de las emulsiones se ve significativamente aumentada a partir de la incorporación de un 0,5 % de proteína de guisante.

A nivel microestructural, se observa una mayor estructuración de las emulsiones al aumentar el % de bagazo y de proteína de guisante. Al incorporar proteína de guisante se forma un sistema bagazo-proteína que favorece la emulsificación de la grasa y aumenta la estabilidad de las emulsiones.

Este estudio ofrece información sobre la preparación de emulsiones de alta concentración mediante la valorización de los subproductos de la industria de zumo de cítricos y el uso de proteína de guisante. Con ello se pretende crear emulsiones capaces de sustituir a las grasas plásticas en los alimentos. Aunque los resultados obtenidos son prometedores aún se necesitan más estudios para evaluar el comportamiento de estas emulsiones en los sistemas alimentarios.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- BODART, M.; DE PEÑARANDA, R.; DENEYER, A. & FLAMANT, G. (2008). Photometry and colorimetry characterisation of materials in daylighting evaluation tools. *Building and Environment*, 43(12), 2046–2058.
- CAPRON, I. & CATHALA, B. (2013). Surfactant-free high internal phase emulsions stabilized by cellulose nanocrystals. *Biomacromolecules*, 14(2), 291–296.
- CHANG, C.; LI, J.; LI, X.; WANG, C.; ZHOU, B.; SU, Y. & YANG, Y. (2017). Effect of protein microparticle and pectin on properties of light mayonnaise. *LWT - Food Science and Technology*, 82, 8–14.
- CHANTRAPORNCHAI, W.; CLYDESDALE, F. & MCCLEMENTS, D. J. (1998). Influence of Droplet Size and Concentration on the Color of Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 2914–2920.
- CINTRA, D. E.; ROPELLE, E. R.; MORAES, J. C.; PAULI, J. R.; MORARI, J.; DE SOUZA, C. T.; GRIMALDI, R.; STAHL, M.; CARVALHEIRA, J. B.; SAAD, M. J. & VELLOSO, L. A. (2012). Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS ONE*, 7(1).
- COSTA, C.; MEDRONHO, B.; FILIPE, A.; MIRA, I.; LINDMAN, B.; EDLUND, H. & NORNGREN, M. (2019). Emulsion formation and stabilization by biomolecules: The leading role of cellulose. *Polymers*, 11(10), 1–18.
- CYPRIANO, D. Z.; DA SILVA, L. L. & TASIC, L. (2018). High value-added products from the orange juice industry waste. *Waste Management*, 79, 71–78.
- DAI, L.; YANG, S.; WEI, Y.; SUN, C.; MCCLEMENTS, D. J.; MAO, L. & GAO, Y. (2019). Development of stable high internal phase emulsions by pickering stabilization: Utilization of zein-propylene glycol alginate-rhamnolipid complex particles as colloidal emulsifiers. *Food Chemistry*, 275(17), 246–254.
- DERKACH, S. R. (2010). Rheology on the Way from Dilute to Concentrated Emulsions. *International Review of Chemical Engineering*, 2(3), 465–472.
- FATTAHI-FAR, E.; SAHARI, M. A. & BARZEGAR, M. (2006). Interesterification of tea seed oil and its application in margarine production. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(10), 841–845.
- FEI, X.; JONES, O. G.; REUHS, B. L. & CAMPANELLA, O. H. (2021). Soluble pectin acts as a particle stabilizer of tomato suspensions: The impact on tomato products rheological characterization. *Lwt*, 139(October 2020), 110508.
- GANGULY, R. & PIERCE, G. N. (2015). The toxicity of dietary trans fats. *Food and Chemical Toxicology*, 78, 170–176.
- GAO, H.; MA, L.; CHENG, C.; LIU, J.; LIANG, R.; ZOU, L.; LIU, W. & MCCLEMENTS, D. J. (2021). Review of recent advances in the preparation, properties, and applications of high internal phase emulsions. *Trends in Food Science and Technology*, 112(December 2020), 36–49.

- GAUDINO, N.; GHAZANI, S. M.; CLARK, S.; MARANGONI, A. G. & ACEVEDO, N. C. (2019). Development of lecithin and stearic acid based oleogels and oleogel emulsions for edible semisolid applications. *Food Research International*, 116(September 2018), 79–89.
- GENERALITAT VALENCIANA CONSELLERIA DE AGRICULTURA, DESARROLLO RURAL, EMERGENCIA CLIMÁTICA U TRANSICIÓN ECOLÓGICA (2020). *Informe situación campaña citrícola 2019/2020*. 2020, 1–18.  
<https://agroambient.gva.es/es/informes-de-mercado>
- HUANG, X. N.; ZHOU, F. Z.; YANG, T.; YIN, S. W.; TANG, C. H. & YANG, X. Q. (2019). Fabrication and characterization of Pickering High Internal Phase Emulsions (HIPEs) stabilized by chitosan-caseinophosphopeptides nanocomplexes as oral delivery vehicles. *Food Hydrocolloids*, 93(October 2018), 34–45.
- HUNG, A.; MAGER, M.; HEMBURY, M.; STELLACCI, F.; STEVENS, M. M. & YAROVSKY, I. (2013). Amphiphilic amino acids: A key to adsorbing proteins to nanopatterned surfaces? *Chemical Science*, 4(3), 928–937.
- HUSUM, T L.; PEDERSEN, L S.; NIELSEN, P M.; CHRISTENSEN, M W.; KRISTENSEN, D. AND HOLM, H. C. (2004). Enzymatic interesterification: Process advantage and product benefits. *INFORM - International News on Fats, Oils and Related Materials*, 15(3), 150–151.
- JENNINGS, B. H. & AKOH, C. C. (2010). Trans-free plastic shortenings prepared with palm stearin and rice bran oil structured lipid. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(4), 411–417.
- JEYARANI, T. & REDDY, S. Y. (2003). Preparation of Plastic Fats with Zero trans FA from Palm Oil. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(11), 1107–1113.
- JIA, X.; XU, R.; SHEN, W.; XIE, M.; ABID, M.; JABBAR, S.; WANG, P.; ZENG, X., & WU, T. (2015). Stabilizing oil-in-water emulsion with amorphous cellulose. *Food Hydrocolloids*, 43, 275–282.
- JIAO, B.; SHI, A.; WANG, Q. & BINKS, B. P. (2018). High-Internal-Phase Pickering Emulsions Stabilized Solely by Peanut-Protein-Isolate Microgel Particles with Multiple Potential Applications. *Angewandte Chemie - International Edition*, 57(30), 9274–9278.
- KALASHNIKOVA, I.; BIZOT, H.; BERTONCINI, P.; CATHALA, B. & CAPRON, I. (2013). Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water Pickering emulsions. *Soft Matter*, 9(3), 952–959.
- KHATOON, S. & REDDY, S. R. Y. (2005). Plastic fats with zero trans fatty acids by interesterification of mango, mahua and palm oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(11), 786–791.
- KLONOFF, D. C. (2007). Replacements for trans fats - Will there be an oil shortage? *Journal of Diabetes Science and Technology*, 1(3), 415–422.
- KWON, Y. (2016). Effect of trans-fatty acids on lipid metabolism: Mechanisms for their adverse health effects. *Food Reviews International*, 32(3), 323–339.

- LEROUX, J.; LANGENDORFF, V.; SCHICK, G.; VAISHNAV, V. & MAZOYER, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 455–462.
- LIU, C.; FAN, L.; YANG, Y.; JIANG, Q.; XU, Y. & XIA, W. (2021). Characterization of surimi particles stabilized novel pickering emulsions: Effect of particles concentration, pH and NaCl levels. *Food Hydrocolloids*, 117(February), 106731.
- MARÍN, F. R.; SOLER-RIVAS, C.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J. & PÉREZ-ALVAREZ, J. A. (2007). By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry*, 100(2), 736–741.
- MCCLEMENTS, D. J. (2016). Food Emulsions, Principles, Practices, and Techniques. In *Food Emulsions, Principles, Practices, and Techniques* (3rd ed.).
- MENG, Z.; QI, K.; GUO, Y.; WANG, Y. & LIU, Y. (2018). Macro-micro structure characterization and molecular properties of emulsion-templated polysaccharide oleogels. *Food Hydrocolloids*, 77, 17–29.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN, MATERIAL VEGETAL (2020). Visto el 22 de marzo de 2021.  
<https://www.mapa.gob.es/app/MaterialVegetal/fichaMaterialVegetal.aspx?idFicha=5#>
- N.R. CAMERON, D. C. S. (1996). *High Internal Phase Emulsions (HIPes)- Structure, Properties and Use in Polymer Preparation*. 126.
- PATEL, A. R. & DEWETTINCK, K. (2016). *Function Oleogelation : background*. 20–29.
- REMIG, V.; FRANKLIN, B.; MARGOLIS, S.; KOSTAS, G.; NECE, T. & STREET, J. C. (2010). Trans Fats in America: A Review of Their Use, Consumption, Health Implications, and Regulation. *Journal of the American Dietetic Association*, 110(4), 585–592.
- SHEN, W.; GUO, L.; WU, T.; ZHANG, W. & ABID, M. (2016). Stabilizing beverage emulsions by regenerated celluloses. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 292–301.
- SIRI-TARINO, P. W.; SUN, Q.; HU, F. B. & KRAUSS, R. M. (2010). Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91(3), 502–509.
- SUN, Q. (2018). *HIPE-TEMPLATED OLEOGELS STABILIZED BY PROTEIN-POLYSACCHARIDE: PREPARATION AND CHARACTERIZATION*. *Food Sciences (track Food Safety)*, 1–39.
- TALENS, P. (2017). *Evaluación del color y tolerancia de color en alimentos a través del espacio CIELAB.1–7*.
- TAN, H.; SUN, G.; LIN, W.; MU, C. & NGAI, T. (2014). Gelatin particle-stabilized high internal phase emulsions as nutraceutical containers. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6(16), 13977–13984.
- URBÁNKOVÁ, L.; SEDLÁČEK, T.; KAŠPÁRKOVÁ, V. & BORDES, R. (2021). Formation of oleogels based on emulsions stabilized with cellulose nanocrystals and sodium caseinate. *Journal of Colloid and Interface Science*, 596, 245–256.

- VÉLEZ-ERAZO, E. M.; BOSQUI, K.; RABELO, R. S.; KUROSZAWA, L. E. & HUBINGER, M. D. (2020). High internal phase emulsions (HIPE) using pea protein and different polysaccharides as stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 105(October 2019).
- WIJAYA, W.; VAN DER MEEREN, P.; WIJAYA, C. H. & PATEL, A. R. (2017). High internal phase emulsions stabilized solely by whey protein isolate-low methoxyl pectin complexes: effect of pH and polymer concentration. *Food and Function*, 8(2), 584–594.
- WINUPRASITH, T. & SUPHANTHARIKA, M. (2015). Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by microfibrillated cellulose from mangosteen rind. *Food Hydrocolloids*, 43, 690–699.
- ZENG, T.; WU, Z.; LING, ZHU, J. Y.; YIN, S. W.; TANG, C. H.; WU, L. Y. & YANG, X. Q. (2017). Development of antioxidant Pickering high internal phase emulsions (HIPEs) stabilized by protein/polysaccharide hybrid particles as potential alternative for PHOs. *Food Chemistry*, 231, 122–130.