



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DE COMPLEJOS DE  
PROTEÍNA-POLISACÁRIDOS EN LA  
MICROENCAPSULACIÓN MEDIANTE SECADO  
POR ASPERSIÓN DEL ACEITE DE ALMENDRA  
DE CAPULÍN (*Prunus serotina*)”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

Presenta:

**I.Q. DAVID ALEJANDRO GONZALEZ MARTINEZ**

Comité Tutorial

**Dr. César Pérez Alonso**

**Dra. Sandra Luz Martínez Vargas**

**M. en C.Q. Héctor Carrillo Navas**



Toluca Estado de México, Octubre 2017

## INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
PARTE 1: “PROTOCOLO DE TESIS”	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1. ANTECEDENTES	5
1.1 Aceite naturales	5
1.2 Aceite de Capulín ( <i>Prunus serotina</i> )	6
1.2 Microencapsulación de aceites	8
1.2.1 Secado por aspersión	10
1.3 Emulsiones	11
1.3.1 Propiedades de las Emulsiones	13
1.4 Agentes encapsulantes	14
1.4.1 Proteínas	16
1.4.1.1 Aislado de Proteína de Suero de Leche (WPI)	16
1.4.2 Polisacáridos	17
1.4.2.1 Goma Arábiga	18
1.4.2.2 Mucílagos	19
1.4.2.2.1 Mucílago de Tamarindo	20
1.4.3 Complejos coacervados	21
2. JUSTIFICACIÓN	25
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo general	26
4.2 Objetivos particulares	26
5 METODOLOGÍA Y MÉTODOS	27
5.1 MATERIALES	27
5.2 MÉTODOS	27
5.2.1 Extracción aceite de almendra de capulín	27
5.2.2 Extracción mucílago de Tamarindo	28
5.2.3 Preparación de soluciones de biopolímeros	28
5.2.4 Titulación protolítica	28
5.2.5 Preparación de los complejos WPI-TSM y WPI-GA	29
5.2.5.1 Mediciones de Potencial Zeta	29
5.2.6 Formación de emulsiones O/W	29
5.2.6.1 Propiedades reológicas de las emulsiones	30

5.2.6.2 Cinética de coalescencia de las emulsiones .....	30
5.2.6.3 Obtención de microcápsulas a través de secado por aspersión.....	31
5.2.6.4 Oxidación del aceite de almendra de capulín en las microcápsulas .....	31
5.2.6.5 Temperatura de transición vítrea de las microcápsulas.....	31
5.2.6.6 Estabilidad térmica acelerada .....	31
5.2.6.7 Caracterización estructural por FT-IR.....	32
5.2.6.8 Morfología de las microcápsulas .....	32
5.2.6.9 Eficiencia de encapsulación .....	32
PARTE 2: “DISCUSIÓN DE RESULTADOS” .....	33
PARTE 3: “CONCLUSIONES” .....	69
PARTE 4: “BIBLIOGRAFÍA” .....	72
PARTE 5: “ANEXOS” .....	78
ANEXO A. ESTUDIO DE EMULSIONES .....	79
ANEXO B. ESTUDIO DE MICROCÁPSULAS .....	86
ANEXO C. ARTÍCULO PUBLICADO .....	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura general de un aceite natural	5
Figura 2	Fruto al árbol <i>Prunus serotina</i> y su semilla	7
Figura 3	Esquema de los diferentes procesos de microencapsulación	9
Figura 4	Esquema del proceso de secado por aspersión	10
Figura 5	Ilustración de una emulsión o/w	11
Figura 6	Representación esquemática de los procesos de desestabilización en emulsiones	12
Figura A1	Cambio en el tamaño de gota (In $D_{4,3}$ ) con respecto al tiempo, de las emulsiones de los complejos	80
Figura A2	Curvas de flujo de las emulsiones WPI-TSM y WPI-GA	82
Figura A3	Ajuste a parámetros reológicos de la emulsión WPI-GA	82
Figura A4	Curva de flujo de la emulsión WPI-TSM	83
Figura A5	Dependencia de la Tensión de los Módulos viscoelásticos en la emulsión WPI-TSM	84
Figura A6	Dependencia de la Tensión de los Módulos viscoelásticos en la emulsión WPI-GA	85
Figura B1	Curvas endotérmicas de las microcápsulas de WPI-TSM y WPI-GA a flujo cte. de $N_2$	87
Figura B2	Termograma oxidativo del aceite de capulín	88
Figura B3	Termograma oxidativo de las microcápsulas de WPI-TSM y WPI-GA	89
Figura B4	Perfil oxidativo de las microcápsulas y del aceite de capulín puro almacenado a $35^{\circ}C$	90
Figura B5	FTIR de aceite de capulín, microcápsulas WPI-TSM y microcápsulas WPI-GA	93
Figura B6	SEM de las Microcápsulas WPI-TSM y de las Microcápsulas WPI-GA	95

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Estructura de algunos ácidos grasos comunes	6
Tabla 2	Características entre proteínas y polisacáridos como materiales de pared	15
Tabla 3	Concentración de las proteínas del suero de leche	17
Tabla 4	Condiciones óptimas encontradas en diferentes complejos coacervados	23
Tabla 5	Encapsulación de aceites esenciales usando complejos coacervados	24
Tabla A1	Parámetros de la cinética de coalescencia de 1° orden de emulsiones o/w	81
Tabla A2	Parámetros de la “ <i>Ley de potencia</i> ”	83
Tabla A3	Parámetros del “ <i>Modelo de Carreau</i> ”	84
Tabla B1	Parámetros de la cinética de oxidación del aceite de capulín	91
Tabla B2	Eficiencia del proceso de encapsulamiento del aceite de capulín	92

**PARTE 1:**  
**“PROTOCOLO DE TESIS”**

## RESUMEN

El crecimiento exponencial en la demanda de hidrocoloides por parte de la industria alimenticia y farmacéutica ha limitado el suministro y por tanto encarecido el valor de estos materiales. Lo que ha llevado a los científicos a la búsqueda de nuevos hidrocoloides de origen natural, de bajo costo, que puedan ser obtenidos a través de subproductos industriales y que puedan sustituir parcialmente a los materiales clásicos, como lo son los mucílagos. El mucílago extraído de la semilla de tamarindo representa una buena alternativa para ser usado en la síntesis de complejos coacervados proteína-polisacárido, usando como polisacárido al mucílago de tamarindo.

Hasta la fecha no se han realizado estudios sobre la formación de complejos coacervados proteína-mucílago, y tampoco acerca de sus propiedades funcionales como agente emulsionante y encapsulante de aceites poliinsaturados como lo es el aceite extraído de la almendra de capulín (AAC). Por lo que el presente trabajo de investigación se dividió en tres etapas generales: a) se caracterizó tanto fisicoquímica, térmica y estructuralmente el complejo coacervado compuesto por Aislado de proteína de suero de leche (WPI) y Mucílago de tamarindo (TSM) para establecer las condiciones óptimas de formulación; b) a partir de las condiciones óptimas establecidas, se estudió la capacidad del complejo para emulsionar el AAC; c) se determinaron las propiedades microencapsulantes del complejo en el AAC. Además, a modo de comparación se formuló y caracterizó el complejo coacervado Aislado de proteína de suero de leche (WPI) y goma Arábiga (GA).

La formación del complejo coacervado entre WPI-TSM se optimizó en términos de pH y relación de mezclado WPI y TSM en condiciones ambientales. Usando las pruebas de Titulación protolítica, Potencial zeta y Turbidez, se encontró que las condiciones óptimas de máxima interacción entre WPI y TSM fueron a  $\text{pH} = 3.65$  y relación proteína-polisacárido ( $R_{PP}$ ) = 1:0.3. El análisis FTIR (Espectrometría Infrarroja de Transformada de Fourier) demostró que la formación del complejo se llevó a cabo principalmente por interacciones electrostáticas atractivas y puentes de hidrógeno.

El aceite de capulín emulsionado usando en condiciones óptimas el complejo WPI-TSM como agente emulsificante, presentó un incremento en el tamaño de gota a través del tiempo correspondiente a una cinética de coalescencia de primer orden ( $k_c = 2.7 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ). La emulsión promovió la formación de un sistema con características pseudoplásticas, en el que el modelo reológico de Carreau representó adecuadamente este comportamiento con respecto a los datos experimentales.

El aceite de capulín emulsionado fue secado por aspersion para evaluar la capacidad protectora del complejo WPI-TSM como material de pared. La estabilidad oxidativa del aceite de capulín encapsulado fue mejor que la del no-encapsulado, presentando una cinética de reacción de orden cero ( $k_{HP} = 2.22 \times 10^4 \text{ meq/kg aceite}$ ) y presentando una mayor temperatura de oxidación de las microcápsulas (185.1°C) con respecto al aceite sin encapsular (151.1°C). El complejo coacervado WPI-TSM pudo microencapsular eficazmente el aceite de capulín y las microcápsulas presentaron bajos valores de aceite superficial (5.8%) y un alto rendimiento de encapsulación (82.19%). Estos resultados sugieren que de acuerdo a las similitudes presentadas entre las propiedades funcionales del complejo WPI-TSM y el complejo WPI-GA, el complejo WPI-TSM puede servir como material de pared alternativo para la industria alimentaria.

## ABSTRACT

The exponential growth in the demand for hydrocolloids by the food and pharmaceutical industry has limited the supply and therefore the value of these materials has increased. This has led scientists to search for new hydrocolloids from natural sources and low-cost obtained through industrial by-products and partially replacing classical materials such as mucilage. The mucilage extracted from the tamarind seed represents a good alternative to be used in formation of protein-polysaccharide complexes coacervates, using tamarind mucilage as polysaccharide.

Until date, no studies have been carried out on the formation of protein-mucilage complexes coacervates, neither about its functional properties as an emulsifying and encapsulating agent for essential oils such as oil extracted from capulin almond (AAC). The



present research was divided into three general stages: a) complex coacervates composed by Whey Protein Isolate (WPI) and Tamarind Seed Mucilage (TSM) was characterized both physicochemically, thermally and structurally to establish the optimal conditions; b) from the optimum conditions, the ability of the complex to emulsify the AAC was studied; c) finally, the microencapsulating properties of the complex were determined in the ACC. In addition, Whey Protein Isolate-Gum arabic complex coacervate was formulated and characterized by comparison.

The formation of complex coacervate between WPI-TSM was optimized in terms of pH and mixing ratio WPI and TSM under ambient conditions. Using Protolytic Titration, Zeta Potential and Turbidity tests, it was found that the optimum conditions of maximum interaction between WPI and TSM were at pH=3.65 and R<sub>PP</sub>=1:0.3. FTIR analysis showed that complex formation was carried out mainly by attractive electrical interactions and hydrogen bonds.

Emulsified capulin oil using optimum conditions of WPI-TSM complex as an emulsifying agent showed an increase in droplet size over time corresponding to a first order coalescence kinetics ( $k_c = 2.7 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ). The emulsion promoted the formation of a system with pseudoplastic characteristics, in which the rheological model of Carreau adequately represented this behavior with respect to experimental data.

The emulsified capulin oil was spray-dried to evaluate the protective capacity of the WPI-TSM complex as a wall material. The oxidative stability of the encapsulated capulin oil was better than non-encapsulated, showing zero order reaction kinetics ( $k_{HP} = 2.22 \times 10^4 \text{ meq/kg oil}$ ) and presenting a higher oxidation temperature of microcapsules (185.1 °C) with respect to unencapsulated oil (151.1 °C). The WPI-TSM complex coacervate was able to microencapsulate efficiently the capulin oil and the microcapsules presented low surface oil values (5.8%) and a high encapsulation efficiency (82.19%). These results suggest that according to the similarities between the functional properties of WPI-TSM and WPI-GA complex, the WPI-TSM complex can serve as an alternative wall material for the food

industry.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Aceite naturales

Los aceites naturales se han utilizado durante siglos como remedios para enfermedades humanas, ya que contienen componentes químicos con valor terapéutico y tienen importantes aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica, entre otras (Cerempei et al., 2014).

Los aceites naturales pueden clasificarse en: a) Aceites esenciales, que son aquellos que imparten a las especias su aroma particular y también se conocen como “aceites volátiles”, estos son mezclas complejas de compuestos orgánicos, tales como hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, ésteres y otros (Hirasa y Takemasa, 2002); b) Aceites vegetales, que son los productos líquidos naturales obtenidos de plantas. Ellos son comúnmente extraídos por hidrodestilación o destilación de vapor, aunque existen otros métodos de extracción, tales como la extracción por fluidos supercríticos, maceración, entre otros. Además, algunos métodos físicos como la extracción por prensado en frío ofrece la ventaja de obtener un producto libre de sustancias externas como los disolventes.

Los compuestos principales de los aceites naturales, consisten de moléculas de triglicéridos (tres ácidos grasos unidos por medio de un glicerol), que contienen cierta cantidad de insaturaciones. De acuerdo al tipo de aceite, región geográfica donde se obtiene, y su pureza, estos contienen distintas composiciones de ácidos grasos libres, y diferente número de insaturaciones. En la figura 1 se muestra un ejemplo de una molécula de este tipo de aceites:

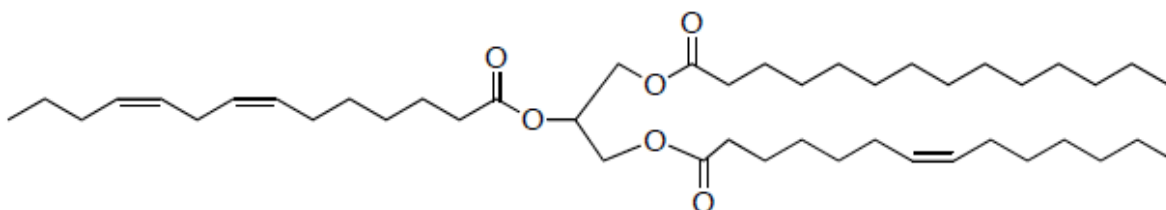


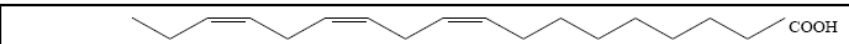

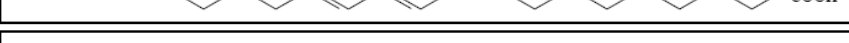


Figura 1 Estructura general de un aceite natural

Los ácidos grasos son cadenas de hidrocarburos que terminan en un grupo carboxilo en un extremo y un grupo metilo en el otro. Están formados por cadenas de 4 a 30 átomos de carbono, que pueden ser totalmente saturados, parcialmente insaturados o poliinsaturados (PUFA's), de acuerdo al número de dobles ligaduras presentes. Las familias más importantes son los Omega-3 y Omega-6 ya que sus ácidos grasos son considerados como esenciales en la dieta humana porque no se sintetizan en el cuerpo y tienen que ser suministrados a través de la dieta (Mahan y Scott-Stump, 1998). La Tabla 1, muestra las estructuras de algunos ácidos grasos comunes que se derivan de algunos aceites vegetales.

Tabla 1 Estructura de algunos ácidos grasos comunes

ÁCIDOS GRASOS COMUNES		
Nombre	No. de carbonos	Estructura
<i>Ácidos no Saturados</i>		
Ácido oleico	18	
Ácido linoleico	18	
Ácido linolénico	18	
Ácido eleosteárico	18	
Ácido araquidónico	20	

Este tipo de estructuras químicas hace a los ácidos grasos inherentemente inestables y sensibles a la oxidación, isomerización y polimerización cuando entran en contacto con factores estresantes ambientales tales como el oxígeno, la humedad, el calor, la luz y algunos iones metálicos (Rustan y Drevon, 2005). Un ácido graso poliinsaturado, tiene dos o más puntos de insaturación en una molécula, por lo que es más inestable que un ácido graso monoinsaturado.

## 1.2 Aceite de Capulín (*Prunus serotina*)

La especie *Prunus serotina*, conocido como capulín, se cultiva a menudo, en las partes más altas de México, debido principalmente a que sus frutos son comestibles. El fruto, de sabor agridulce, es una drupa globosa de 6 a 8 mm de diámetro (Figura 2). La piel es de color

rojizo oscuro y la pulpa es verde translúcida. El fruto posee una sola semilla, de hueso semi-rugoso y dentro del cual hay una almendra comestible (Ordaz-Galindo et al., 1999).



Figura 2. Fruto al árbol *Prunus serotina* y su semilla

La almendra de capulín (*Prunus serotina*) es muy apreciada y consumida en los Estados de México, Hidalgo, Tlaxcala y la Ciudad de México. Esta semilla representa un recurso muy valioso desde el punto de vista económico y nutricional, posee un alto contenido de proteína y aceite, lo que podría facilitar su uso, incluso con fines industriales en la región central del país (Raya et al., 2012).

La semilla de *P. serotina* contiene aproximadamente un 21-33% de fracción de aceite que está libre de componentes de cianuro. El aceite se distingue de los otros aceites vegetales por su alto índice de refracción. El aceite de capulín es altamente poliinsaturado y abundante en los siguientes ácidos grasos: oleico (35%),  $\alpha$ -eleosteárico (27%), linoleico (27%), palmítico (4%), esteárico (4%),  $\beta$ -eleostearico (1%), palmitoléico (0.1%) y  $\alpha$ -linolénico (0.2%). El aceite de la semilla de *Prunus Serotina* es algo único debido a su contenido significativo de ácido  $\alpha$ -eleosteárico ( $\alpha$ -ESA) (Aguerrebere et al., 2011).

El  $\alpha$ -ESA también se encuentra presente en ciertos frutos como lo es en las semillas de melón, del árbol de Tung (Hyun et al., 2009) y del de calabaza. El  $\alpha$ -ESA, es un compuesto natural que posee potente actividad antioxidante y antitumoral. Estudios *in vitro* mostraron que  $\alpha$ -ESA inhibe la proliferación de ciertas células cáncergenicas como las de colon,

hígado, pulmón, estómago, leucemia y cáncer de mama (Zhang et al., 2011). La presencia de  $\alpha$ -ESA aumenta el potencial terapéutico del aceite de la semilla de capulín como alimento funcional e ingrediente nutracéutico para la salud (Aguerreberre et al., 2011). Sin embargo, estas condiciones convierten al aceite de capulín en un material susceptible a sufrir procesos degradativos, por lo que es necesario protegerlo contra este tipo de agentes externos. Una manera de proteger a este tipo de aceite es mediante alguna tecnología de microencapsulación.

## **1.2 Microencapsulación de aceites**

Los aceites microencapsulados son ingredientes en polvo, donde los glóbulos de aceite se encuentran dispersos en una matriz compuesta generalmente por carbohidratos y/o proteínas. La microencapsulación es definida como una tecnología de empaquetamiento de materiales sólidos, líquidos o gaseosos en una partícula sólida tan pequeña como de 1 a 1000  $\mu\text{m}$  con la finalidad de aislar y proteger el componente del medio que lo rodea (Araneda y Valenzuela, 2009).

La microencapsulación es una tecnología utilizada en las industrias farmacéutica, química y alimentaria desde hace muchos años, permite la incorporación de componentes naturales como polifenoles, aceites esenciales, ácidos grasos insaturados, enzimas, bacterias ácido lácticas y probióticos en pequeñas cápsulas que encierran el producto, lo protegen del medio externo (Nazzaro et al., 2012). Las microcápsulas selladas puede liberar sus contenidos a velocidades controladas bajo condiciones específicas, y pueden proteger el producto encapsulado de los factores del medio ambiente, retrasan la evaporación del núcleo volátil, controla la velocidad de liberación del material encapsulado (Alvarenga et al., 2014), permite un fácil almacenaje y transportación, enmascara el sabor y el olor del material encapsulado y lo protege de distintos factores pro-oxidantes (Astray et al., 2009; Madene et al., 2006; Drusch y Mannino, 2009). En el caso de los aceites, este proceso les confiere nuevas propiedades de utilidad ya que los transforma en sólidos, facilitando así su mezcla u homogeneización con los demás componentes del alimento (Márquez-Ruiz et al., 2010).

Dentro de las tecnologías disponibles para el proceso de microencapsulación se pueden encontrar procesos mecánicos y procesos químicos como se observa en la Figura 3. Entre los métodos químicos pueden citarse la coacervación compleja (Timilsena, Adhikari, Barrow, & Adhikari, 2016), la polimerización interfacial, la gelificación iónica, la incompatibilidad polimérica y el atrapamiento por liposomas (Mozafari et al., 2008) y entre los métodos físicos destacan el secado por aspersión (Gharsallaoui et al., 2007; Arslan, Erbas, Tontul, & Topuz, 2015), liofilización (Anwar & Kunz, 2011), extrusión y la encapsulación por lecho fluidificado.

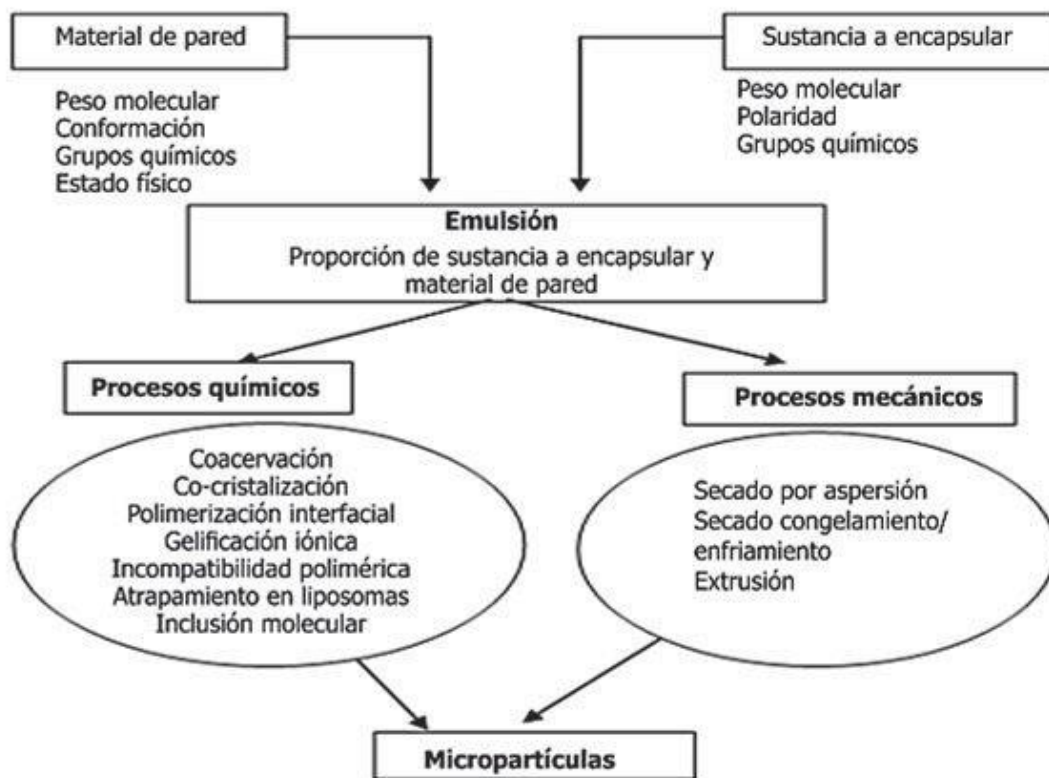


Figura 3 Esquema de los diferentes procesos de microencapsulación (Parra, 2010, p.5676)

La elección de los métodos de microencapsulación depende de numerosos factores que incluyen el costo, las propiedades del material a encapsular, el tamaño deseado de las microcápsulas, la aplicación final y recientemente los mecanismos de liberación. Por lo que el diseño de un sistema de encapsulación eficiente requiere una comprensión adecuada de

los mecanismos fisicoquímicos de la encapsulación, la posible interacción de los compuestos activos con la matriz de pared y la naturaleza de la matriz de la envoltura (Augustin & Hemar, 2009).

### 1.2.1 Secado por aspersión

En comparación con otros métodos, el secado por aspersión proporciona una eficiencia de encapsulación relativamente alta, un secado extremadamente rápido para los productos sensibles al calor, un tamaño y densidad de partícula controlable dentro ciertos límites y costos de operación bajos (Carneiro et al., 2013). El secado por aspersión es la transformación de un fluido en un material sólido. Un ejemplo gráfico del proceso se observa en la Figura 4, el cual involucra tres etapas: preparación de la dispersión o emulsión, homogeneización y atomización (García et al., 2004).

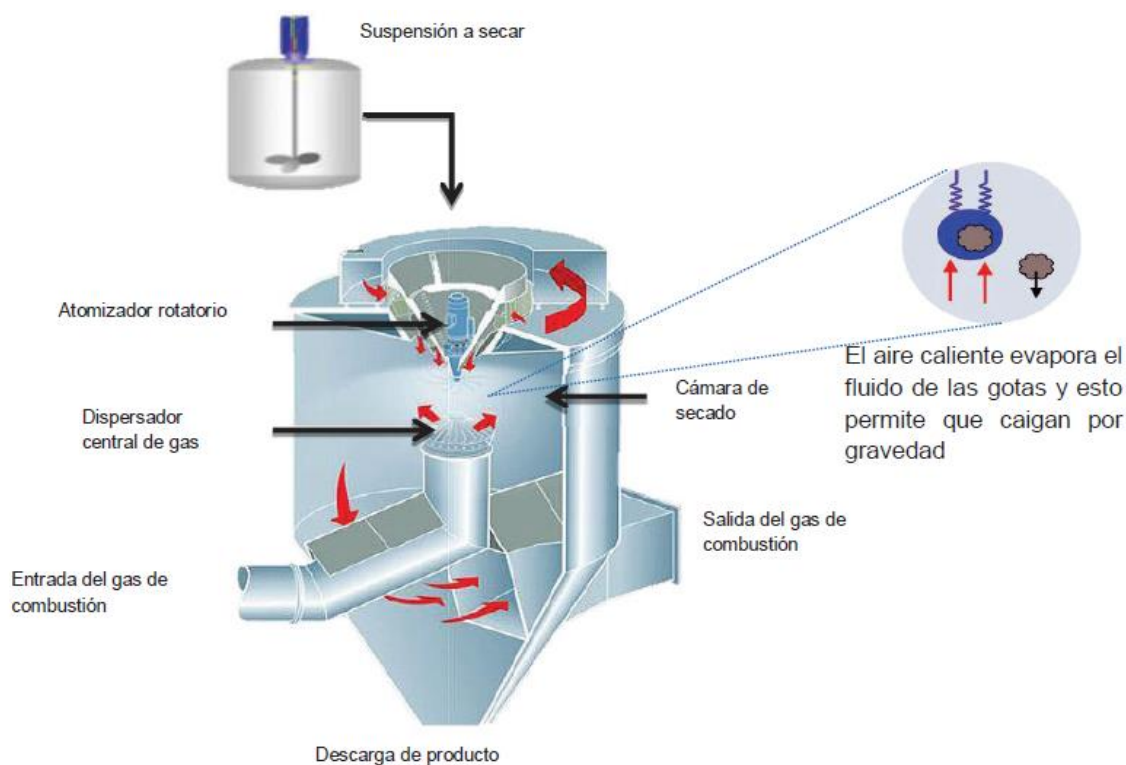


Figura 4 Esquema del proceso de secado por aspersión

El proceso consiste en alimentar al secador mediante atomización al componente activo en estado de suspensión o emulsión según corresponda; la turbina del equipo hace que se formen finas gotas que entran en contacto con una corriente de gas caliente, generalmente aire, se produce una rápida evaporación del solvente y se forma una fina película del material de recubrimiento alrededor de una micro gota del componente, dando como producto un polvo en el orden de los micrones en forma de pequeñas esferas (Parize et al., 2008).

### 1.3 Emulsiones

Uno de los pasos en el proceso de microencapsulación de aceites es la obtención de emulsiones estables o/w. Las emulsiones simples son sistemas que contienen dos líquidos inmiscibles, dispersos uno en otro, que tienen entre 0,1 y 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. La fase constituida por pequeñas gotas se denomina fase “interna” o “dispersa”, y la matriz en la que están disueltas se denomina fase “externa” o “continua” (Figura 5). Varias clases de emulsiones se pueden distinguir, entre las que se encuentran las emulsiones agua-en-aceite (W/O), aceite-en-agua (O/W) y emulsiones múltiples (O/W/O; W/O/W) (McClements, 1999).

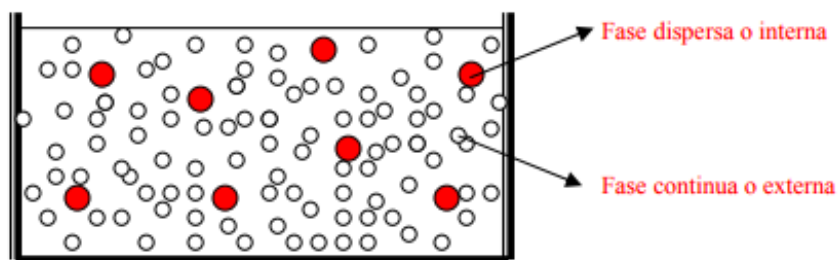


Figura 5 Ilustración de una emulsión o/w

En la figura 6 se ilustran esquemáticamente los diversos procesos relacionados con la desestabilización de las emulsiones que pueden ocurrir durante el almacenamiento (Tadros, 2009), dependiendo de:



- La distribución del tamaño de partícula y la diferencia de densidad entre las gotas y el medio.
- La magnitud de las fuerzas atractivas frente a las fuerzas repulsivas, que determina el nivel de floculación.
- La solubilidad de las gotas dispersas y la distribución del tamaño de partícula, que a su vez determina la maduración de Ostwald.
- La estabilidad de la capa líquida entre las gotas, que determina la inversión de fase; y la coalescencia. La coalescencia, es una fusión irreversible de las gotas dispersas para crear unas gotas más grandes con la eliminación de la interfase líquido/líquido, conducente a una reducción del área interfacial, y por ende de la energía libre superficial del sistema. Por lo tanto, eventualmente la emulsión se separa en fases individuales discretas (Dalglish, 2006).

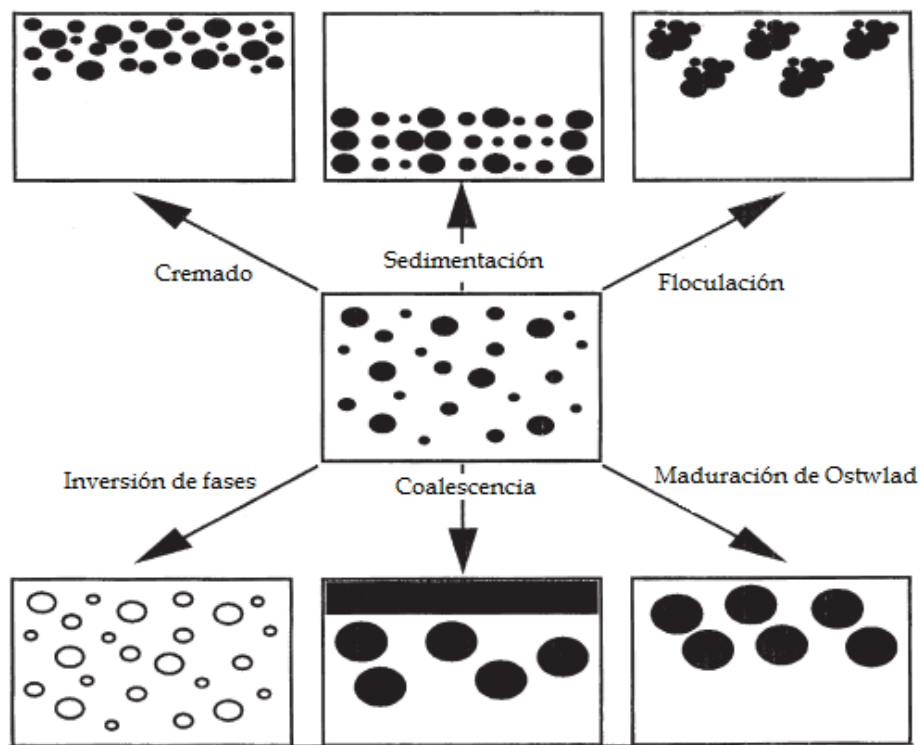


Figura 6 Representación esquemática de los procesos de desestabilización en emulsiones

### 1.3.1 Propiedades de las Emulsiones

En general, las emulsiones son dispersiones termodinámicamente inestables y las fases que la componen tienden a separarse por diferentes mecanismos (McClements, 2005). Sin embargo, las emulsiones pueden convertirse en cinéticamente estables, incluso por largos periodos de tiempo debido a la presencia de un tercer componente llamado emulsificante. La elección del emulsificante es crucial no solo para la formación de la emulsión sino también para la estabilidad a largo plazo (Kabalnov, 1998). Las variables más importantes que determinan las propiedades de una emulsión son las siguientes (Fennema, 2000):

- *Tipo*, es decir, la cantidad, calidad del emulsionante y el orden en que se añaden los ingredientes de la emulsión (McClements, 1999).
- *Distribución del tamaño de las gotas*. Esta variable repercute de manera importante en la estabilidad física; generalmente las gotas más pequeñas constituyen emulsiones más estables. La energía y la cantidad de emulsionante necesario para producir la emulsión dependen del tamaño de las partículas deseado.
- *Fracción volumétrica de la fase dispersa ( $\phi$ )*: en la mayor parte de los sistemas alimentarios, oscila entre 0,01 y 0,4 (Dalglish, 2006).
- *Composición y grosor de la película superficial*. Determina la tensión interfacial, las fuerzas de interacción coloidales, etc.
- *Composición de la fase continua*, que determina las relaciones entre el disolvente, y el surfactante, por lo tanto las interacciones coloidales. La viscosidad de la fase continua afecta considerablemente al “desnatado” (Fennema, 2000).

Asimismo, existen factores que contribuyen a la estabilización de una emulsión, entre las que podemos mencionar (Fennema, 1993):

- *Tensión interfacial*: La mayoría de los emulsionantes son anfifílicos, por lo que se concentran en la interfase aceite-agua, produciendo una disminución significativa de la tensión interfacial y una reducción de la energía necesaria para formar las emulsiones (Buffo, Reineccius & Oehlert, 2001).

- *Estabilización por macromoléculas:* El efecto estabilizante de la emulsión depende principalmente de la viscoelasticidad y del espesor de la película proteica, formando una barrera física frente a la coalescencia.
- *Estabilización por aumento de la viscosidad de la fase continua:* Cualquier factor que contribuya a aumentar la viscosidad de la fase continua de una emulsión retarda significativamente los procesos de floculación y coalescencia (Branen et al., 2001).
- *Repulsión debida a la carga eléctrica:* Frecuentemente, la estabilidad de la emulsión se atribuye, en gran medida, a la presencia de fuerzas eléctricas repulsivas en las superficies de las gotitas de la emulsión (Dickinson, 2003).
- *Estabilización mediante cristales líquidos:* En una emulsión (o/w o w/o) las interacciones débiles entre el emulsificante, el aceite y el agua dan lugar a la formación de una multicapa con estructura de cristal líquido alrededor de las gotitas. Esta barrera produce en la interacción una reducción de las fuerzas de Van der Waals, dando lugar a una mayor estabilidad de la emulsión.

#### **1.4 Agentes encapsulantes**

Principalmente en la industria alimentaria, un aspecto fundamental en la formación tanto de emulsiones como de microcápsulas estables es el uso de emulsionantes de origen natural conocidos como biopolímeros. Uno de los biopolímeros más usados en la actualidad como material de pared son los llamados hidrocoloides, los cuales son biopolímeros hidrofílicos de alto peso molecular empleados como ingredientes funcionales para controlar la microestructura, textura, sabor y vida de anaquel debido a sus propiedades emulsionantes, estabilizantes, espesantes y encapsulantes (Dickinson, 2003).

Algunas de las características que debe poseer un material de pared destinado a la microencapsulación de alimentos y/o fármacos son (Kuang et al., 2010):

- Debe ser soluble en los solventes utilizados en la industria alimentaria.
- Deber tener gran estabilidad y capacidad emulsionante.
- Baja viscosidad a altas concentraciones.

- Debe tener la capacidad de proveer la máxima protección al componente activo contra las condiciones ambientales.
- Ser de bajo costo.
- No debe permitir la separación de lípidos durante la deshidratación.
- No debe reaccionar con el componente activo.
- Ser grado alimenticio.
- No poseer sabor.

Entre los hidrocoloides más usados en la formulación de emulsiones, se identifican dos tipos de ingredientes: el “agente emulsionante” y el “estabilizante” (Dickinson, 1992; Garti y Reichman, 1993). El agente emulsionante es la especie química única (o mezcla de especies) que promueve la formación de la emulsión y estabilización a corto plazo por acción interfacial. Los estabilizantes son generalmente biopolímeros- proteínas o polisacáridos, ya que los surfactantes de bajo peso molecular no son efectivos para conferir estabilidad a largo plazo. El principal mecanismo de estabilización de los polisacáridos es vía la modificación de la viscosidad o gelación de la fase continua acuosa (Tabla 2).

Tabla 2 Características entre proteínas y polisacáridos como materiales de pared

<b>Similitudes</b>	
<b>Polímeros naturales</b>	
<b>Agentes gelantes/estabilizantes</b>	
<b>Estructura compleja</b>	
<b>Presentan comportamiento de agregación</b>	
<b>Polímeros amigables al medio ambiente</b>	
<b>Usados en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y de productos personales</b>	
<b>Diferencias</b>	
<i>Proteínas</i>	<i>Polisacáridos</i>
<b>Estructuras muy diversas</b>	Estructuras similares
<b>Reactivas</b>	No reactivas
<b>Monodispersas</b>	Polidispersos
<b>Cadena lineal</b>	Cadena lineal o ramificada
<b>Cadena flexible</b>	Cadena rígida
<b>Peso molecular medio</b>	Alto peso molecular
<b>Anfifílicas</b>	Hidrofílicos

<b>Superficialmente activas</b>	Sin actividad superficial
<b>Polielectrolitos</b>	No iónicos o cargados
<b>Emulsionante/espumante</b>	Espesante/retención de agua
<b>Sensible a la temperatura</b>	Insensible a la temperatura
<b>Fuerte interacción con surfactantes</b>	Baja interacción con surfactantes

### 1.4.1 Proteínas

Debido a las excelentes propiedades funcionales que poseen, las proteínas representan buenos materiales a la hora de microencapsular un alimento (Xiao et al., 2014). Las proteínas más utilizadas como material de pared en la microencapsulación mediante secado por aspersión son las proteínas extraídas de productos derivados de animales (gelatina, proteína de suero de leche, caseína) y vegetales (proteínas de soya, proteínas de chícharo, proteína de cereal) (Jafari et al., 2008).

Estos polímeros exhiben la mayoría de las propiedades deseables en un material de pared como: abundancia, económicos, biocompatibles, no tóxicos, biodegradables, presentan buenas propiedades anfifílicas y funcionales tales como solubilidad en agua, capacidad emulsionante y espumante (Gharsallaoui et al., 2007).

#### 1.4.1.1 Aislado de Proteína de Suero de Leche (WPI)

Una de las proteínas más utilizadas para encapsular ingredientes alimenticios por secado por aspersión son las provenientes de la leche (o suero de leche). Debido a que poseen propiedades funcionales requeridas como material de pared, y se han utilizado con éxito para encapsular aceite esencial de comino proporcionándole una protección eficaz contra la oxidación (Gharsallaoui et al., 2007). La leche bovina es un sistema muy complejo que contiene aproximadamente un 3.5% p/p de proteína. Ésta se divide en dos fracciones principales basadas en su solubilidad. Las caseínas, que representan cerca del 80% del nitrógeno de la leche y el 20% restante que es soluble en el suero corresponde a un 15% de proteínas y el remanente son compuestos nitrogenados no proteicos (Tabla 2) (Philips y Williams, 2000).

La proteína del suero de leche es un conjunto de proteínas globulares (Tabla 3) que

pueden ser aisladas físicamente del suero de la leche, subproducto de procesos industriales de productos como el queso. Desde el punto de vista químico es una mezcla de proteínas solubles en agua en sus formas nativas independientemente del pH de la solución (Rocha, Souza, Magalhães, Andrade, & Goncalves, 2014). A valores de pH más bajos que el punto isoeléctrico (pH ~ 4.6), las proteínas de suero tienen una carga positiva y se comportan como cationes, mientras que a valores de pH por encima del punto isoeléctrico tiene una carga neta negativa y se comportan como aniones permitiendo el fraccionamiento mediante procesos de intercambio iónico (Weinbreck, Tromp y de Kruif, 2004).

Tabla 3. Concentración de las proteínas del suero de leche (Philips y Williams, 2000)

Proteínas del suero de leche	Concentración g/l proteína total	Punto isoeléctrico	Peso molecular (kDa)
$\beta$ -lactoglobulina	2 - 4	5.2	18
$\alpha$ - lactoalbúmina	0.7 - 1.5	4.2 - 4.5	14
Inmunoglobulinas	0.6 - 1.0	---	150 – 900
Albúmina bovina sérica	0.1 – 0.4	5.3	66
Peptonas de proteosa	0.6 - 1.8	---	4.1 - 40.8

A nivel industrial, la proteína del suero de leche puede diferir en concentración según el proceso o elaboración al que haya sido sometido. Por lo general, en el mercado existen tres tipos de proteínas solubles: polvo (~30%), concentrado (30%-85%) y aislado (~90%) (Philips y Williams, 2000).

#### 1.4.2 Polisacáridos

Los polisacáridos incluyendo las gomas y mucílagos, son abundantes en la naturaleza y se encuentran comúnmente en árboles altos. Estos polisacáridos constituyen una clase estructuralmente diversa de macromoléculas biológicas con una amplia gama de propiedades fisicoquímicas, que en su mayor parte son polisacáridos solubles en agua, y tienen muchas aplicaciones tanto en la industria alimentaria como no alimentaria. El

término goma se refiere a polisacáridos, que no forman parte de la pared celular, sino que son exudados y son productos patológicos. Mientras que los mucílagos forman parte del contenido de la pared celular o forman parte de los productos celulares y fisiológicos (Prajapati et al., 2013).

Las gomas y mucílagos se usan con frecuencia como agentes espesantes, aglutinantes, emulsionantes, de suspensión y estabilizantes en la industria alimentaria y farmacéutica debido a su alta capacidad de hinchamiento en agua, no toxicidad, bajo costo y disponibilidad. Su uso depende de las propiedades fisicoquímicas únicas que proporcionan, a menudo a costos inferiores a los de los polímeros sintéticos (Prajapati et al., 2013).

#### **1.4.2.1 Goma Arábiga**

Las gomas son polímeros naturales biodegradables ampliamente utilizados en los procesos de microencapsulación por su viscosidad, solubilidad y capacidad de formar emulsiones. La más conocida y utilizada en la industria es la goma Arábiga (GA) también conocida como goma acacia (Rodea-González et al., 2012). La GA es un polisacárido natural derivado de exudados del árbol de *Acacia senegal* y *Acacia seyal*. La fracción principal de la GA consiste en un esqueleto polisacárido de  $\beta$ -(1-3) galactopiranososa que está altamente ramificado con residuos de  $\beta$ -(1-6) galactopiranososa terminando en arabinosa y ácido glucurónico y/o 4-O-metil-glucurónico (Xiao et al., 2014). La composición de la GA se ha reportado de la siguiente manera: 39-42% de galactosa, 24-27% de arbinosa, 12-16% de ramnosa, 15-16% de ácido glucurónico, 1.5-2.6% proteína, 0.22-0.23% de nitrógeno y 12.5-16% de humedad (Badreldin et al., 2009).

Esta goma es ampliamente apreciada por su solubilidad en agua, por ser un agente emulsionante muy efectivo y por la capacidad de formar películas estabilizantes macromoleculares alrededor de las gotas de aceite. Sin embargo, otros estudios han demostrado que la GA no es eficiente como material de pared para la encapsulación de cinco monoterpenos diferentes (cital, linalol,  $\beta$ -mirceno, limoneno y  $\beta$ -pineno). De hecho, las microcápsulas obtenidas mostraron una capacidad de barrera limitada contra la

oxidación porque actúan como membranas semipermeables y su permeabilidad al oxígeno es un factor preponderante en la vida útil del material en el núcleo de la cápsula. También se ha encontrado que la GA no es eficaz en la microencapsulación de aceite de naranja al compararlo con suero de leche y proteína de soya (Gharsallaoui et al., 2007). Del mismo modo, el alto costo, la oferta limitada y las variaciones de calidad han restringido el uso de la goma arábiga para propósitos de encapsulación y han hecho que los investigadores busquen materiales de pared alternativos (Pérez-Alonso et al., 2003).

#### **1.4.2.2 Mucílagos**

De acuerdo a lo reportado en la literatura, “mucílago” es una designación que se usa para definir ciertas sustancias gelatinosas que se encuentran en algunas plantas naturales. Los mucílagos provienen de la pared secundaria en la capa exterior. Se extrae fácilmente de la capa de la semilla mediante contacto con agua. Cuando se hidratan, las células del mucílago se hinchan, y su contenido exuda en la superficie de las semillas. El mucílago representa aproximadamente el 8% del peso total de la semilla. Diversos informes han demostrado que el rendimiento de la extracción, el contenido proteínico y las propiedades fisicoquímicas del mucílago final dependen tanto del procedimiento de extracción como de la variedad de la materia prima (Kaewmanee et al., 2014).

El mucílago puede existir como una sustancia intracelular y muchas veces es una reserva de alimento o de agua. Los mucílagos han sido divididos en tres grupos, de acuerdo a sus características químicas (Rishabh, Pranati y Kulkarni, 2011):

1. Los polisacáridos neutros que contienen uno o más azúcares residuales, unidos a su vez a través de grupos reductores, con la formación de sustancias de alto peso molecular.
2. Polisacáridos que contienen residuos de ácido urónico, así como otros residuos de azúcares.
3. Los mucílagos de algas que contienen sales, ésteres y azúcares formadores de moléculas de alto peso molecular. En general, los mucílagos son generalmente hetero polisacáridos, conteniendo una variedad de ácido urónico.



Los mucílagos extraídos de las semillas son fuente de hidrocoloides naturales de bajo costo que ofrecen una ingesta baja en calorías con propiedades benéficas para el consumo humano, convirtiéndolos en una opción potencial en el área de alimentos y la industria farmacéutica (Alpizar-Reyes et al., 2017). Debido a la alta concentración de grupos hidroxilo en el polisacárido, los mucílagos generalmente tienen una alta capacidad de unión al agua. El uso de los mucílagos depende de sus propiedades funcionales características, tales como la viscosidad, las propiedades emulsionantes y espumantes, la gelificación y la unión al agua, así como su papel bioactivo en la prevención y / o el tratamiento de ciertas enfermedades (Kaewmanee et al., 2014).

Actualmente, existe una búsqueda de nuevos biomateriales que puedan ser utilizados en la formulación de emulsiones y microcápsulas para consumo humano en sustitución de moléculas sintéticas que se consideran cada vez más como un riesgo para la salud humana (Avila-de la Rosa et al., 2015). Además, son ecológicos, capaces de sufrir modificaciones químicas, potencialmente degradables y compatibles debido a su origen natural. Entre los mucílagos que se han estudiado se encuentran los del nopal, tamarindo, pitaya, nuez malvina, cactus, aloe vera, pimienta, okra, linaza y chía. (Archana et al., 2013, Salehi y Kashaninejad, 2014). El mucílago obtenido a partir de las semillas de tamarindo (*Tamarindus indica L.*) ha recibido atención últimamente como un biomaterial prometedor para estabilizar emulsiones para consumo humano (Alpizar-Reyes et al., 2017).

#### **1.4.2.2.1 Mucílago de Tamarindo**

El mucílago de tamarindo se extrae de las semillas del árbol *Tamarindus indica L.* que puede alcanzar 30 m de alto. La parte más útil es la vaina y contiene alrededor de 3-12 semillas por cada vaina que constituyen el 35% de la fruta entera. El tamarindo ha sido plantado extensamente en Bangladesh, India, Myanmar, Malasia, Sri Lanka, Tailandia y varios países africanos, australianos, centroamericanos y sudamericanos (Alpizar-Reyes et al., 2017). La semilla de tamarindo es un subproducto disponible de la pulpa de tamarindo industrial, que contiene hasta 72% en peso de polisacáridos (Khounvilay y Sittikijyothin,

2012), el cual se compone de un esqueleto  $\beta$ -(1,4)-D-glucano sustituido con cadenas laterales  $\alpha$ -(1,4)-d-xilopiranosas y con uniones de residuos glucosos (1,6) [ $\beta$ -D-galactopiranosil-(1,2)- $\alpha$ -D-xilopiranosil] (Patel et al., 2008). Las unidades monoméricas de glucosa, xilosa y galactosa están presentes en una proporción de 2.8:2.25:1.0 y con un peso molecular de 720-880 kDa (Sharma, Mondal, Mukesh & Prasad, 2014).

El mucílago disperso en agua tiene la capacidad de formar soluciones viscosas por lo que es usado como agente espesante, estabilizante y/o emulsionante, formador de hidrogeles, encapsulante y controlador en la liberación de fármacos, tanto en la industria alimenticia y/o farmacéutica (Manchanda et al., 2014; Alpizar-Reyes et al., 2017; Kulkarni, Gowthamarajan, y Dhobe, 2005; Datta y Bandyopadhyay, 2006). Además de tener una alta estabilidad térmica y química, también posee propiedades como: alta tolerancia al pH, biodegradable, no-cancerígeno, biocompatible, mucoadhesivo y no tóxico (Phani et al., 2011). Sin embargo, a pesar de los estudios realizados aún no se han explorado las posibles aplicaciones industriales que el mucílago de tamarindo podría presentar, como lo es en la formación complejos coacervados proteína-mucílago.

### **1.4.3 Complejos coacervados**

Anteriormente, las proteínas y polisacáridos eran utilizados de forma individual en los procesos industriales. Sin embargo, en los últimos años se han estudiado las interacciones electrostáticas atractivas entre ambos hidrocoloides debido a que sus propiedades funcionales mejoran en comparación a las de los componentes por separado (Semenova, 2007; Milanović et al., 2014).

El proceso de coacervación compleja fue descrito por primera vez por Bungenberg de Jong (1949) como una separación de fases líquido-líquido promovida por interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas e interacciones atractivas inducidas por polarización que ocurren entre dos polímeros de carga opuesta en solución acuosa (Xiao et al., 2014). Las interacciones atractivas entre dos biopolímeros pueden presentarse de varias maneras: a) formación de un pequeño complejo soluble,

manifestándose en soluciones turbias; b) formación de un gel débil homogéneo, si las interacciones son débiles; y c) precipitación de ambos biopolímeros, si las interacciones son fuertes. En este último caso se presenta una separación de la solución en dos fases conocido como complejo coacervado (Espinosa-Andrews et al., 2010).

Se han establecido que tanto las propiedades del material tales como: peso molecular de los biopolímeros, densidad de carga, concentración y relación de la mezcla; y los parámetros del proceso tales como: método usado para producir la emulsión/grado de homogeneización, pH, temperatura y fuerza iónica afectan en gran medida el proceso de coacervación compleja (Timilsena et al., 2017; Azarikia y Abbasi, 2016).

Por otra parte, la producción de microcápsulas por coacervación compleja comprende en general las siguientes etapas (Xiao et al., 2014):

- i) Disolución. Etapa de creación de una solución acuosa que contiene dos biopolímeros diferentes (comúnmente una proteína y un polisacárido), usualmente a temperatura por encima del punto de gelificación de la proteína y a un pH que está por encima del punto isoelectrico ( $pI$ ) de la proteína.
- ii) Emulsificación/dispersión. Se realiza la emulsificación del material hidrofóbico (aceite) en la solución acuosa. La emulsión se estabiliza mediante los dos biopolímeros.
- iii) Coacervación. Separación en dos fases líquidas (una fase rica en biopolímeros insolubles y otra fase acuosa agotada de ambos) como resultado de las interacciones electrostáticas atractivas entre biopolímeros de carga opuesta causados por la reducción del pH de la solución por debajo del punto isoelectrico de la proteína.
- iv) Gelación. Formación de una pared debido a la deposición de la fase rica en biopolímero alrededor de las gotas del material aceite, inducida por el enfriamiento controlado por debajo de la temperatura de gelificación.
- v) Endurecimiento y enjuague/filtración/secado. Se utiliza un agente de reticulación para endurecer las paredes de la microcápsula y estabilizar la estructura. El agente reticulante en exceso y el aceite residual que no estaba encapsulado o adsorbido en la

superficie es lavado. A continuación, las microcápsulas se secan para obtener el material en polvo.

Tabla 4 Condiciones óptimas encontradas en diferentes complejos coacervados (Timilsena et al., 2017)

Biopolímeros		Rango de pH	Condiciones óptimas	
Catiónicos	Aniónicos		pH	Relación biopolímero
WPI	Goma Arábica	3.0-4.5	4.0	2:1
SPI	Goma Arábica	2.5-4.5	4.0	1:1
Quitosano	Goma Arábica	2.0-4.0	3.6	4:1
Gelatina	CMC	9.0-11.0	9.0	1:1
Gelatina	Quitosano	4.5-6.5	5.25-5.50	10:1 - 20:1
SPI	Pectina	---	4.4	1:1
PPI	Goma Arábica	2.4-4.3	3.6	2:1
Globulina	Goma Arábica	2.0-4.0	3.0	1:1
Gelatina	Alginato	2.0-5.0	3.5-3.8	3.5:1
$\beta$ -lactoglobulina	Goma Arábica	3.5-4.4	3.76	2:1
Gelatina	Pectina	---	3.8	1:1

Nota: CMC=Carboximetil celulosa; SPI=Aislado de proteína de soya; PPI=Aislado de proteína de chícharo; WPI= Aislado de proteína de suero de leche.

El desarrollo de complejos coacervados alternativos proteína-polisacárido requiere una optimización rigurosa de los parámetros complejos de coacervación porque cada par de proteínas y polisacáridos forman complejos coacervados estables a valores específicos de pH y relaciones de biopolímero. Por tanto, las condiciones óptimas para un conjunto de biopolímeros no pueden usarse en otro conjunto de biopolímeros (Timilsena et al., 2017). Por esta razón, la optimización de los parámetros de coacervación es el paso esencial para la aplicación exitosa en el proceso de microencapsulación. En la Tabla 4 se muestran las condiciones óptimas encontradas en la encapsulación de omega-3 usando diferentes complejos coacervados.

Actualmente, existe una tendencia creciente del uso de proteínas y polisacáridos vegetales en la industria alimentaria, en parte impulsada por su menor tendencia a estimular una

respuesta alérgica en comparación con las alternativas de origen animal. Por lo que se ha visto fuertemente incrementado el número de artículos científicos donde se desarrollan nuevas matrices de encapsulación basadas en la técnica de coacervación compleja (Tabla 5). Sin embargo, hasta el momento no existe información disponible sobre la capacidad encapsulante de los complejos formados por proteínas-mucílagos.

Tabla 5 Encapsulación de aceites esenciales usando complejos coacervados (Xiao et al., 2014)

Aceite	Material de pared	Eficiencia de encapsulamiento	Tamaño de partículas ( $\mu\text{m}$ )	Aplicación
Aceite de naranja	WPI-GA	80–90 %	5–1000	Queso gouda
Aceite de naranja	SPI-GA	80 %	8	Conservador de alimentos
Aceite de menta	GE-GA	90 %	50	Ingredientes alimenticio
Aceite de semilla de neem	GE-CMC	72–97 %	$\sim 10^*$ y $\sim 100$	Control de plagas
Aceite de pachuli	CS-GA	67 %	$\sim 10^*$	Tratamiento médico
Aceite de limón	GE-GA	---	28–76	Algodón de telas
Aceite de citronela	GE-GA	---	25–100	Algodón de telas
Aceite de lavanda	Colágeno hidrolisado-CS	37–60 %	$\sim 5^*$	Control de liberación
Aceite de ajo	GE-GA	63–99 %	90–120	Control de liberación
Aceite de alcanfor	GE-GA	99 %	86–295	Tratamiento médico

Nota: CMC=Carboximetil celulosa; CS=Quitosano; GA=Goma arábica; GE=Gelatina.

Por lo que el objetivo del presente trabajo fue estudiar las propiedades emulsionantes y microencapsulantes en el aceite de capulín usando como material de pared el complejo constituido por aislado de proteína de leche (WPI, por sus siglas en inglés) y el Mucílago extraído de la semilla de tamarindo (TSM, por sus siglas en inglés).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Los aceites de semillas han adquirido un renovado interés en diferentes ramos de la industria. Al tratarse de productos naturales, poseen interesantes propiedades fisicoquímicas con alto valor agregado. El aceite de la semilla de capulín (*Prunus serótina*) posee alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, posee actividad antioxidante y antitumoral. Sin embargo, la exposición a distintos factores ambientales puede causar oxidación de los componentes del aceite. En este contexto, la microencapsulación, a través del secado por aspersión ha sido propuesta para evitar tales procesos degradativos. La etapa inicial y que resulta esencial en la microencapsulación es la selección del material de pared, el cuál debe poseer buenas propiedades emulsionantes y de protección contra los fenómenos oxidativos.

Tradicionalmente en la industria alimentaria y farmacéutica se han utilizado como materiales de pared aquellos que provienen de recursos biodegradables, como lo son las proteínas (gelatina, suero de leche, haba, etc.) y polisacáridos (goma arábica, quitosano, pectina, etc.). No obstante, algunos presentan desventajas como baja disponibilidad, alto costo, y baja eficiencia de encapsulamiento. Por lo que recientemente se ha prestado especial interés en otro tipo de polisacáridos hidrocoloides conocidos como mucílagos, los cuales son abundantes en la naturaleza y pueden actuar como emulsionantes. El mucílago extraído de la semilla de tamarindo representa una buena alternativa para usarse como material encapsulante debido a su carácter aniónico, alta estabilidad térmica y química, capacidad de formar membranas, biocompatibilidad, etc.

Generalmente, tanto las proteínas como los polisacáridos eran utilizados de forma individual en los procesos industriales. Sin embargo, en los últimos años se han estudiado las interacciones electrostáticas atractivas entre ambos biopolímeros mediante el proceso de

coacervación compleja, debido a que sus propiedades funcionales mejoran en comparación a la de los componentes por separado. Un complejo prometedor podría ser el constituido por el Aislado de Proteína de Suero de Leche y el Mucílago de Tamarindo, por lo que fue necesario estudiar la interacción entre éstos biopolímeros, en la microencapsulación del aceite de almendra de capulín

### **3. HIPÓTESIS**

La interacción entre el Aislado de proteína de suero de leche y el Mucílago de tamarindo pueden conformar complejos coacervados estables con la capacidad para emulsionar y encapsular el aceite extraído de la almendra de capulín.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

Evaluar la capacidad emulsionante y encapsulante del complejo coacervado Aislado de Proteína de Suero de Leche-Mucílago de tamarindo en el aceite de almendra de capulín.

#### **4.2 Objetivos particulares**

- Extraer el mucílago de la semilla de tamarindo.
- Extraer el aceite de la almendra de capulín mediante técnicas en frío.
- Preparar las soluciones de biopolímeros a diferentes condiciones de pH y concentración para determinar las condiciones óptimas mediante las pruebas de titulación protolítica, potencial zeta y turbidez.
- Preparar emulsiones aceite/agua empleando como agentes emulsionantes la relación óptima de los complejos de WPI-TSM y WPI-GA.
- Caracterizar e identificar las emulsiones producidas, mediante análisis de estabilidad, tamaño de gota y reología.
- Obtener las microcápsulas de aceite de capulín mediante el proceso de secado por aspersión.

- Determinar la estabilidad de las microcápsulas mediante análisis de las propiedades térmicas, morfológicas y oxidativas.
- Determinar la eficiencia de encapsulamiento del aceite de capulín.
- Comparar las propiedades fisicoquímicas y funcionales del complejo WPI-TSM con respecto al complejo WPI-GA.

## 5 METODOLOGÍA Y MÉTODOS

### 5.1 MATERIALES

La semilla de capulín (*Prunus serotina*) se adquirió en SEDAGRO (Probosque), Toluca, Estado de México. El fruto de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) se obtuvo en la Central de Abastos de la Ciudad de Toluca, Estado de México. El Aislado de Proteína de Suero de Leche y la Goma Arábica, utilizados como agentes encapsulantes, se adquirieron de la compañía Hilmar Ingredients, Hilmar, EUA. Los reactivos utilizados fueron grado analítico, adquiridos de la compañía Sigma Aldrich S.A. de C.V., Toluca, Estado de México. El agua destilada y desionizada se obtuvo del Departamento Biotecnología, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,

### 5.2 MÉTODOS

#### 5.2.1 Extracción aceite de almendra de capulín

Del fruto del capulín se quitó la pulpa mecánicamente y se procedió a lavar la semilla, posteriormente se quitó la corteza de la semilla (hueso), rompiéndola por medio de pinzas de presión, obteniendo del interior la almendra de capulín. Para la extracción del aceite de almendra de capulín (AAC) se empleó el método de prensado en frío. Se colocaron 300g de AAC dentro de un émbolo de 40 cm de largo por 10 cm de diámetro, y este a su vez se colocó en una prensa hidráulica Tamer (modelo PHT-20, Shangai, China) y se ejerció una presión gradual sobre el pistón, hasta alcanzar 9 toneladas de presión a temperatura



ambiente. El aceite extraído se recolectó en un vaso de precipitado y posteriormente se envasó en frascos de vidrio color ámbar y se almacenó en una cámara de refrigeración a 5°C.

### **5.2.2 Extracción mucílago de Tamarindo**

Para la extracción del mucílago de tamarindo (TSM) se tomó como base el método propuesto por Khounvilay y Sittikijyothin (2012) con algunas modificaciones. Se peló el tamarindo quitando toda la cascara y pulpa, obteniendo solamente la semilla. Ésta se molió en un molino de martillos PULVEX 100 MINI 2HP (Ciudad de México, México). Se tomaron 20 g de semilla molida de tamarindo y se colocaron en 200 mL de agua destilada. La mezcla resultante se vertió en 800 mL de agua a 80°C y se mantuvo en agitación continua durante 40 min con un agitador magnético. Se dejó reposar 24 h a 20°C. La mezcla se centrifugó a 50 rpm, se separó el supernadante en un vaso de precipitado y la materia pesada fue desechada.

### **5.2.3 Preparación de soluciones de biopolímeros**

El mucílago de tamarindo (0.1% w/w) se dispersó en agua desionizada a pH de hidratación, goma Arábiga (1% w/w) a pH de hidratación, y WPI se hidrato (1% w/w) a pH igual a 3. Las dispersiones se agitaron suavemente durante 24 h a 20°C para garantizar una hidratación completa de los biopolímeros.

### **5.2.4 Titulación protolítica**

Las titulaciones protolíticas se llevaron a cabo para estimar la relación estequiométrica entre las dispersiones de WPI, TSM y GA. Una muestra de la dispersión de WPI (20 mL) se tituló con NaOH (0.1 M) y el pH fue registrado mediante el uso del potenciómetro (Vernier pH-BTA, Beaverton, Oregón, EE.UU.). Del mismo modo, una muestra de la dispersión de TSM y GA por separado (20 mL) se tituló con HCl (0.1 M), con un monitoreo continuo del resultado de pH. Los resultados de la titulación se compararon con los obtenidos para el agua desionizada usada para la preparación de las dispersiones (Roldan-Cruz et al., 2016).

### **5.2.5 Preparación de los complejos WPI-TSM y WPI-GA**

El potencial zeta (PZ) de las soluciones de WPI, TSM y GA se midió de forma individual en función del pH con el fin de conocer el intervalo de pH adecuado para la formación de los sistemas de complejos coacervados. Los complejos WPI-TSM se obtuvieron de la siguiente manera: la solución WPI (1%, w/w) se mantuvo en agitación magnética durante 10 min. A continuación, la solución de TSM (0.1%, w/w) se añadió lentamente a la solución de WPI. La formación del complejo óptimo se obtuvo variando la proporción másica de WPI-TSM desde 10:1 hasta 10:10. Se usó la misma metodología para la formación del complejo WPI-GA, y variando la proporción en peso de WPI-GA de 5:1 a 1:5 (Timilsena et al., 2016).

#### **5.2.5.1 Mediciones de Potencial Zeta**

Los valores de pH de las soluciones de WPI, TSM y GA se ajustaron mediante la adición de ácido clorhídrico 0.1M o NaOH 0.1 M. Se prepararon soluciones de los diferentes biopolímeros a diferentes valores de pH, los cuales varían de 2 hasta 10 con el objetivo de conocer el comportamiento de los biopolímeros en forma individual. Mientras que el efecto de la interacción de los complejos WPI-TSM y WPI-GA en el potencial zeta, se obtuvo variando la relación. Los valores del PZ se midieron utilizando un Zeta-sizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido).

#### **5.2.6 Formación de emulsiones O/W**

Se formularon sistemas de emulsiones empleando como agentes emulsionantes los complejos de WPI-TSM y WPI-GA, de acuerdo a las proporciones óptimas encontradas en el punto 5.2.5.1, y dejando como variable la concentración de aceite a emulsionar. El procedimiento consistió en tres etapas: (1) Se formuló la fase continua disolviendo el complejo en agua; (2) La fase dispersa se añadió gota a gota a la fase continua emulsionada en un homogeneizador Ultra-turrax T50 basic (IKA-WERKE Works Inc., Wilmington, NC, EUA), a una velocidad de 6400 rpm durante 10 min. La emulsión se mantuvo en un baño con hielo para mantener la temperatura por debajo de los 30 °C; (3) La preparación de la emulsión descrita anteriormente se formuló de acuerdo a la metodología descrita por Rodea-González et al. (2012), tomando como base aquella en donde se obtuvo la mayor

eficiencia de encapsulamiento.

### 5.2.6.1 Propiedades reológicas de las emulsiones

Se llevó a cabo mediciones oscilatorias de baja amplitud, en muestras de cada emulsión de 1 mL a 25 °C con un Reómetro Physica MCR 301 (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania) con una geometría cono-plato de 50 mm de diámetro y ángulo de cono de 2°. La temperatura se mantuvo en 25 °C, mediante un controlador de temperatura Physica TEK 150P. Se aplicaron barridos de frecuencia (0.1-100 Hz y 0.1% de deformación) y barridos de amplitud (0.01-10 % de deformación a frecuencia de 1 Hz) para determinar los módulos de almacenamiento ( $G'$ ), pérdida ( $G''$ ) y el factor de pérdida ( $\tan \delta = G''/G'$ ). Estos parámetros representan los componentes elástico, viscoso y viscoelástico de las emulsiones, respectivamente (Carrillo-Navas et al., 2011).

### 5.2.6.2 Cinética de coalescencia de las emulsiones

La velocidad de coalescencia sigue, en gran parte, una cinética de primer orden y puede ser representada como:

$$\frac{N_0}{N_t} = e^{Kt} \quad (\text{Ec. 5.1})$$

donde  $N_t$  es el número de gotas al tiempo  $t$ ,  $N_0$  es el número de gotas recién formada la emulsión (tiempo cero) y  $K$  es la tasa de coalescencia, la cual es relacionada a la probabilidad de ruptura de la capa interfacial entre las gotas en un tiempo  $t$ .

A su vez:

$$N_t = \frac{6\Phi 10^{12}}{\pi D_t^3} \quad (\text{Ec. 5.2})$$

donde  $\Phi$  es la fracción volumétrica de aceite en la emulsión y  $D_t$  es el diámetro promedio volumétrico de las gotas al tiempo  $t$ . Un gráfico de  $\ln N_0/N_t$  en función del tiempo para cada emulsión nos da una línea recta de la cual se obtiene la constante de velocidad (Carrillo-Navas et al., 2011). También la cinética puede expresarse con la siguiente ecuación que omite la fracción de la fase dispersa ( $\Phi$ ):

$$\frac{D_t}{D_0} = e^{1/3 Kt} \quad (\text{Ec. 5.3})$$

donde  $D_t$  es el diámetro de las gotas al tiempo  $t$ ,  $D_0$  es el diámetro de las gotas recién formada la emulsión (tiempo cero) y  $K$  es la tasa de coalescencia, la cual es relacionada a la probabilidad de ruptura de la capa interfacial entre las gotas en un tiempo  $t$ . Un gráfico de  $\ln D_t/D_0$  en función del tiempo para cada emulsión nos da una línea recta de la cual se obtiene la constante de velocidad.

#### **5.2.6.3 Obtención de microcápsulas a través de secado por aspersión**

Se alimentaron las emulsiones obtenidas anteriormente a un flujo de 40 mL/min por medio de un dosificador a un secador por aspersión Nichols/Niro a nivel planta piloto (Turbo Spray PLA, Nueva York, EUA), a una temperatura de entrada del aire de  $170 \pm 5$  °C, inyectando aire comprimido a 4 bar (Pérez-Alonso et al., 2008).

#### **5.2.6.4 Oxidación del aceite de almendra de capulín en las microcápsulas**

Se acondicionaron nuevamente las microcápsulas anteriormente en un intervalo de actividad de agua entre 0.3 y 0.4 y a una temperatura de 35 °C. Una vez acondicionadas las microcápsulas se determinaron las cinéticas de oxidación del aceite de las microcápsulas (concentración de hidroperóxidos que se formen) en un lapso de tiempo de 30 días, empleando la metodología descrita por Shantha y Decker (1994).

#### **5.2.6.5 Temperatura de transición vítrea de las microcápsulas**

Se tomaron muestras entre 4 y 5 mg de microcápsulas acondicionadas a la temperatura de estudio y actividad de agua, y se colocaron en un calorímetro diferencial de barrido modulado TA Instruments modelo Q1000 (New Castle, DE, EUA), empleando una rampa de calentamiento de 3 °C/min desde una temperatura de -160 °C hasta 200 °C. Se consideró como la temperatura de transición vítrea al midpoint que se obtuvo del termograma generado por el software del equipo.

#### **5.2.6.6 Estabilidad térmica acelerada**

Se colocaron 4-5 mg del aceite de capulín y de las microcápsulas WPI-TSM y WPI-GA en el DSC TA Instruments modelo DSC Q1000 (New Castle, DE, EE.UU.). Las muestras se sometieron a velocidades de calentamiento de 10°C/min de 30 a 400°C, usando un flujo de

oxígeno de 50 cm<sup>3</sup>/min.

#### **5.2.6.7 Caracterización estructural por FT-IR**

Las estructuras químicas de las muestras del aceite y de las microcápsulas fueron caracterizadas mediante un espectrómetro FT-IR (Espectrometría Infrarroja de Transformada de Fourier) Perkin Elmer (Waltham, MA) utilizando el software Spectrum One versión 5.3.1. Los espectros IR se recolectaron en el intervalo de 4000-500 cm<sup>-1</sup> y una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>. Un espectro blanco se adquirió individualmente antes de obtener los espectros IR de cada muestra para eliminar las interferencias.

#### **5.2.6.8 Morfología de las microcápsulas**

Las microcápsulas se pegaron a un portamuestras de Microscopia Electrónica de Barrido usando cinta adhesiva por ambos lados (Ted Pella, Redding, California, EUA) para examinar su estructura externa. Las muestras subsecuentemente se cubrieron con oro en un Fine Coat Ion Sputter JFC 1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japón). La morfología de las microcápsulas se observó con un microscopio electrónico de alto vacío Jeol a 25 kV.

#### **5.2.6.9 Eficiencia de encapsulación**

La eficiencia de encapsulación del AC se obtuvo a partir del aceite superficial no encapsulado y del total del aceite esencial de almendra de capulín bajo el procedimiento utilizado por Rodea et al. (2012), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$EE = \frac{(CAT - CAS)}{CAT} \times 100 \quad (\text{Ec. 5.4})$$

donde: EE es la eficiencia de encapsulación, CAT es el contenido de aceite total (g) de la microcápsula y CAS es el contenido de aceite superficial no encapsulado (g).

**PARTE 2:**  
**“DISCUSIÓN DE  
RESULTADOS”**

**Characterization of a novel complex coacervate based on whey protein isolate-tamarind seed mucilage**

D.A. González-Martínez<sup>a</sup>, H. Carrillo-Navas<sup>b,\*</sup>, C.E. Barrera-Díaz<sup>a</sup>, S.L. Martínez-Vargas<sup>a</sup>, J. Alvarez-Ramírez<sup>b</sup>, C. Pérez-Alonso<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón esq. Paseo Tollocan s/n, Col. Residencial Colón, C.P. 50120, Toluca, Estado de México, México.

<sup>b</sup> Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, C.P. 09340, México, D.F., México.

\* **Corresponding author:** Email address: hcnavas@gmail.com (H. Carrillo-Navas).

## **Abstract**

A complex coacervate was prepared with whey protein isolate (WPI) and tamarind seed mucilage (TSM) and was compared with a commonly used whey protein isolate (WPI)-gum Arabic (GA) complex coacervate. Protolytic titration,  $\zeta$ -potentiometry and turbidimetry analyses were used to determine structural transitions during coacervate formation. Hydrocolloid blending ratio and pH effects on phase transitions were examined to finding the maximum strength interaction of the complex coacervates. The optimum WPI-TSM complex coacervate ratio and the pH value were 1:0.3 and 3.68, respectively. In contrast, the WPI-GA complex coacervate reached the optimal interaction at ratio of 1.4:1 and pH = 3.46. The complex coacervates were spray-dried and analyzed to characterize structural, morphological and thermal properties. The results of FTIR showed that the formation of complexes was by means of electrostatic interactions and hydrogen bonds. The XRD analysis of WPI-TSM complex revealed higher crystallinity with respect to WPI-GA complex. The spray-dried complex coacervates exhibited clusters of amorphous aggregates, smooth and non-fractured particles. Thermal stability showed that coacervation enhanced protein stability as compared to WPI alone. Besides, WPI-TSM complex coacervate exhibited higher thermal stability than its WPI-GA counterpart. Therefore, WPI-TSM complex coacervate can be used as an economic and nutritionally valuable alternative for food additives.

**Keywords:** Complex coacervates; Tamarind seed mucilage; Protolytic titration;  $\zeta$ -potential; Thermal properties.



## 1. Introduction

Hydrocolloids based on proteins and polysaccharides have been widely used in the pharmaceutical, cosmetics and food industry, because of their positive influence on structure, functionality (e.g., emulsification, foaming and thickening), rheology and processing (Li & Nie, 2016; Schmitt, Sanchez, Desobry-Banon, & Hardy, 1998). However, hydrocolloids based on a sole material rarely possess all the characteristics required for emulsification, stabilization and thickening. Recently, scientific and industrial attention has been focused on developing hydrocolloids resulting from the complex interaction between proteins and polysaccharides (de Kruif & Tuinier, 2001; Dickinson, 2008; Liu, Shim, Wang, & Reaney, 2015). These complex coacervates have been used as microencapsulant agents, stabilizers of dispersed systems, as well as in the synthesis of composite materials (Gorji, Gorji, Mohammadifar, & Zargaraan, 2014; Rocha, Souza, Magalhães, Andrade, & Goncalves, 2014).

In aqueous solutions, a rich diversity of interactions is displayed when proteins and polysaccharides interact. Interactions are influenced by and depend strongly on environment conditions, such as pH, temperature and hydrocolloids ratio (Espinosa-Andrews et al., 2013; Yang, Anvari, Pan, & Chung, 2012). Complex coacervates can be classified as soluble or insoluble according to their electrostatic repulsive or attractive forces (Kaushik, Dowling, Barrow, & Adhikari, 2015; Klemmer, Waldner, Stone, Low, & Nickerson, 2012). The first stage of the complex coacervation process occurs at an initial pH (denoted as  $\text{pH}_c$ ), where noncovalent interactions occur between positively charged proteins and anionic polysaccharides, leading to the formation of soluble complex (Liu, Elmer, Low, & Nickerson, 2010). The second stage occurs when a macroscopic phase separation is observed and the pH is reduced (defined as  $\text{pH}_{\phi 1}$ ). At this point, the interaction between both biopolymers begins to increase and the insoluble complex is formed. Subsequently, the formation of the optimal complex coacervation is attained at a pH value where both hydrocolloids reach their electrical equivalence (named  $\text{pH}_{\text{opt}}$ ). Here, an insoluble complex completely neutral is obtained (Gulão, de Souza, Andrade, & Garcia-Rojas, 2016). Finally, the interaction between both hydrocolloids decreases until a final pH (denoted as  $\text{pH}_{\phi 2}$ ), resulting again in the formation of a soluble complex induced by the protonation of the anionic polysaccharides (Liu et al., 2010).

One of the most investigated and industrially used complexes is the protein-gum Arabic system. Rheological, structural and functional properties of this complex have been described with some detail (Anvari & Chung, 2016; Aryee & Nickerson, 2012). Gum Arabic (GA) is composed mainly of monosaccharides such as galactose (~40.0%), arabinose (~25.0%) and rhamnose (~15.0%) (Idris, Williams, & Phillips, 1998). Further, is considered as a weak anionic polyelectrolyte, owing its ability to stabilize emulsions to a covalently arabinogalactan-protein complex (~10%). This component has

the ability to adsorb in the oil-water interface (Coelho et al., 2011; Klein, Aserin, Ishai, & Garti, 2010). Given the limited supply and high cost of GA, the recent trend is to replace the GA by novel polysaccharides to improve the functional properties of formed complexes based on whey protein isolate (WPI) (Pérez-Alonso, Báez-González, Beristain, Vernon-Carter, & Vizcarra-Mendoza, 2003). An alternative is to combine WPI with new biomaterials, such as mucilage extracted from natural resources seeds and plants located in the cell wall of plants at high concentrations (Phani, Gangarao, Kotha, & Raju, 2011; Prajapati, Jani, Moradiya, & Randeria, 2013; Salehi & Kashaninejad, 2014). One of the most promising mucilage is the extract from tamarind seed, which has interesting functional and economic advantages. Tamarind seed mucilage (TSM) is a mixture of biopolymers which is composed of proteins (12.77-15.40%), ashes (2.45-3.30%), fats (3.0-7.5%) and carbohydrates (61.0-72.2%). TSM contains glucose, xylose and galactose in a ratio of ~3:2:1 (Khounvilay & Sittikijyothin, 2012; Manchanda, Arora, & Manchanda, 2014). TSM has proven to be a good alternative as stabilizing agent, thickener, emulsifier and encapsulant in the pharmaceutical and food industry. In addition, TSM possesses thermal and chemical stability, biocompatibility, non-toxicity. Besides, TSM high viscosity and pH tolerance over a wide range of pH and temperature conditions (Gupta, Puri, Gupta, Jain, & Rao, 2010; Pitchaon, Tanawan, & Thepkunya, 2013). In this way, TSM seems to be a good alternative as biomaterial for coacervation with, e.g., WPI. However, as far as we know, the use of mucilages to interact with other hydrocolloids (proteins) to form complex coacervation in aqueous solution has not been reported yet.

The objectives of this work were (a) to study the complex coacervation process of a system consisting of whey protein isolate (WPI) and tamarind seed mucilage (TSM), (b) to evaluate the interactions between both hydrocolloids, (c) to characterize the structure of the complex coacervates, (d) to analyze the thermal stability of complex coacervates, (e) to compare WPI-TSM complex coacervate against WPI-GA complex coacervate in order to discern their physicochemical characteristics. It should be pointed out that gum Arabic was chosen simply because this polysaccharide is widely used in industry for coacervate applications.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Materials*

Tamarind fruit (*Tamarindus indica* L.) was acquired from a local market (Toluca, Mexico) and stored at 25 °C in plastic bags until its use. Hydrochloric acid (HCl) and sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Sigma-Aldrich (Toluca, State of Mexico, Mexico). All reagents were analytical grade.

Whey protein isolate (WPI) was obtained from Hilmar Ingredients (Hilmar, USA) and gum Arabic was purchased from Industria Ragar, S.A. de C.V. (Mexico City, Mexico). Deionized water was used in all the experiments.

### *2.2. Extraction of tamarind mucilage and proximate compositional analysis*

The method proposed by Khouvilay and Sittikijyothin (2012) was used for the extraction of tamarind seed mucilage (TSM). Tamarind peel and pulp was removed, obtaining only the seed. This was milled in a hammer mill PULVEX 100 MINI 2HP (Mexico City, Mexico). 20 g of ground tamarind seed was taken and placed in 200 mL of distilled water. The resulting mixture was poured into 800 mL of water at 80 °C and left under continuous stirring for 40 min in a magnetic stirrer. It was left standing 24 hours at 20 °C. The mixture was centrifuged using a Hermle Z323K highspeed centrifuge (Hermle, Labortechnik, Germany) at 50 rpm for 5 min, the supernatant was separated into a beaker and heavy matter was discarded. Lipid and ash contents of TSM were determined using AOAC standard methods 920.85, and 923.03, respectively (AOAC, 2006). The total protein content of the mucilage was estimated by Kjeldahl procedure as described in AOAC official method 981.10. The total carbohydrate content was evaluated by difference.

### *2.3. Preparation of WPI, TSM and GA dispersions*

Tamarind seed mucilage (0.1% w/w) and gum Arabic (1.0% w/w) were hydrated in deionized water at pH 6.32 and 5.12, respectively. Whey protein isolate (1.0% w/w) was hydrated in deionized water and adjusted at pH 3.0 with HCl solution (0.1 M) to guarantee cationic character. The dispersions were shaken gently for 24 hours at 20 °C to guarantee complete hydration of biopolymers. Deionized water was used for all dispersions.

### *2.4. Preparation of complex coacervates*

WPI-TSM and WPI-GA complexes were obtained as follows. The WPI (1.0% w/w) dispersion was obtained using a magnetic stirring for 10 min. Then, either the TSM dispersion (0.1% w/w) and GA dispersion (1.0% w/w) was slowly added to the solution of WPI.

### *2.5. Protolytic titration test*

The protolytic titration tests were carried out to estimate the stoichiometric ratio dispersions of TSM, GA and WPI. A sample of WPI dispersion (20 mL) was titrated with NaOH (0.1 M). On the other hand,

samples (20 mL) of TSM and GA dispersions were titrated with HCl (0.1 M). The pH was measured using a potentiometer (pH-BTA Vernier, Beaverton, OR, USA), with a continuous pH monitoring result. Titration curves were constructed by obtaining the numerical derivative of pH as a function of milliequivalents of either NaOH or HCl. All titrations were made by triplicate.

### 2.6. $\zeta$ -potential measurements

Biopolymers dispersions were prepared at different pH values by adding HCl or NaOH solution (0.1 M), from 2 to 10, in order to know the behavior of biopolymers individually. The effect of the interaction of WPI-TSM and WPI-GA complexes in the  $\zeta$ -potential was obtained by varying the mass ratio ranging from 10:1 to 10:10 and 5:1 to 1:5, respectively. To this end, the anionic and cationic stocks were mixed at a specific ratio, gently stirred to achieve equilibrium conditions and subjected to zeta potential and pH measurements.  $\zeta$ -potential were measured using Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). The equipment software converted the electrophoretic mobility measurements into  $\zeta$ -potential values using the Smoluchowsky mathematical model.

### 2.7. Turbidity measurements

Turbidity measurements were performed on mixed WPI-TSM and WPI-GA systems at optimal mass ratio determinate from  $\zeta$ -potential measurement. The total solid concentration was maintained at 0.5% (w/w). In order to measure the turbidity in terms of light absorption, a UV Genesys 10 UV spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 278 nm was used. The pH range in both complexes was adjusted from 2.0 to 6.0. The mixture was adjusted using NaOH or HCl 0.1 M. Stage transitions ( $\text{pH}_c$ ,  $\text{pH}_{\phi_1}$ , and  $\text{pH}_{\phi_2}$ ) were determined graphically from the curve according to Liu, Shim, Wang and Reaney (2015), whereas  $\text{pH}_{\text{opt}}$  corresponds to the pH value at which the highest optical density at 278 nm was observed. This wavelength value is in the proposed range by Espinosa-Andrews et al. (2010) where maximum sensitivity was found. The relative turbidity was defined as  $-\ln(T/T_0)$ , where  $T$  and  $T_0$  are light transmittance with and without sample, respectively (Hwang et al., 2010). All these measurements were carried out in triplicate.

### 2.8. Optical microscopy of complex coacervates dispersions

Microstructures of protein-polysaccharide complexes (WPI-TSM and WPI-GA) formed at different ratios were observed on an optical microscope (Olympus BX45, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) coupled to an image analyzer system (Carl Zeiss AxioCam ERc 5s camera and Zen-2012 software package, Carl Zeiss Microscopy GmbH). Selected micrographs at 100 $\times$  were used for illustration.

### 2.9. Spray drying of complex coacervates dispersions

Liquid complex coacervates were separated from the equilibrium phase by centrifugation with a Hermle Z323K highspeed centrifuge (Hermle, Labortechnik, Germany) at 6000 rpm for 10 min. Subsequently, the coacervate was fed, using a flow rate of 40 mL min<sup>-1</sup> through a dispenser into a spray dryer Nichols/Niro pilot plant level (Turbo Spray PLA, New York, USA). The inlet temperature of air was 150 ± 5 °C, injecting compressed air at 4 bar (Salazar-Miranda, Cruz-Sosa, Rodríguez-Huezo, Jiménez-Alvarado, & Pérez-Alonso, 2016).

### 2.10. Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) of WPI, TSM, GA, WPI-TSM and WPI-GA solid samples were obtained using a Perkin Elmer spectrophotometer (Spectrum 100, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) coupled to a crystal diamond universal ATR sampling accessory. Four scans were performed for obtaining the spectra in a range of 3600 to 800 cm<sup>-1</sup> at a resolution of 4 cm<sup>-1</sup>.

### 2.11. X-ray diffractograms

X-ray diffractograms (XRD) of WPI, TSM, GA and complexes powders were obtained using a diffractometer (Siemens D-5000, Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Germany) with Cu-K $\alpha$  radiation ( $\lambda = 1.543$ ) and a secondary beam graphite monochromator. Diffractograms were taken between 5° and 50° ( $2\theta$ ) at a rate of 1 s<sup>-1</sup> and with a step size of 0.03°. The diffractograms were obtained at 25° C using an accelerating voltage of 40 kV and a current of 30 mA. The increase of crystallinity of the complex coacervates with respect to polysaccharide was used for quantifying crystallinity changes. The crystallinity increase for the complex coacervates was defined as (Carrillo-Navas, Fouconnier, Vernon-Carter, & Alvarez-Ramírez, 2013):

$$CI(\%) = \frac{\int_{2\theta_{min}}^{2\theta_{max}} I^{CC}(2\theta) d(2\theta) - \int_{2\theta_{min}}^{2\theta_{max}} I^{PS}(2\theta) d(2\theta)}{\int_{2\theta_{min}}^{2\theta_{max}} I^{PS}(2\theta) d(2\theta)} \times 100 \quad (1)$$

where  $I^{CC}$  and  $I^{PS}$  are respectively the intensity for complex coacervates and polysaccharide for the diffraction range  $2\theta_{min} = 5^\circ$  hasta  $2\theta_{max} = 50^\circ$ .

### 2.12. Scanning electron microscopy (SEM)

All powders samples were mounted on a circular aluminum stubs with double-sided adhesive carbon

tape, coated for 100 s with 15 nm gold, then examined and photographed in a scanning electron microscope (JEOL JSM 7600F, Jeol Ltd., Akishima, Japan) at an accelerating voltage of 5 kV. Micrographs at 2000× magnification were presented.

#### 2.13. Differential scanning calorimetry (DSC)

The thermal characteristics of WPI, WPI-TSM and WPI-GA complexes were studied using differential scanning calorimetry (DSC) (TA Instruments, Q1000, New Castle, DE, USA) previously calibrated with indium. About 5 mg of sample was weighed onto an aluminum pan and hermetically sealed. An empty aluminum pan was used as reference. Samples were heated from 25 °C to 180 °C at a heating rate of 2.5 °C min<sup>-1</sup> with a purging stream of dry nitrogen at 50 mL min<sup>-1</sup>.

#### 2.14. Thermogravimetric analysis (TGA)

Thermogravimetric analysis (TGA) was carried out using a thermal analyzer (TA Instruments, 2950, New Castle, DE, USA). The samples were studied using around 5 mg and were placed in a platinum pan. The experiments were heated from 25 °C to 550 °C at a heating rate of 10 °C min<sup>-1</sup>. For temperature control, the TGA was equipped with an infrared furnace, where the loss weight was recorded to know the thermal stability of every sample. The nitrogen flow rate for heating was kept at 100 mL min<sup>-1</sup>. The denaturation temperature ( $T_{dn}$ ) peak and degradation temperature ( $T_{dg}$ ) peak were estimated using the associated software (Universal Analysis 2000, New Castle, DE, USA).

#### 2.15. Statistical analysis

All experiments were performed on triplicate samples and values were expressed as mean values ± SD. Statistical analysis was done through the program SPSS Statistics 19.0. To determine the statistically significant difference between values, analysis of variance one-way (ANOVA) and Tukey's test were performed. Differences were considered statistically significant at  $P \leq 0.05$ .

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Proximate analysis of tamarind seed mucilage

TSM is a complex mixture of biopolymers. Recently, Khounvilay and Sittikijyothin (2012) and Manchanda et al. (2014) reported the typical molecular weight of this mixture, ranging from 720 to 880 kDa. On the other hand, the proximate analysis results of the extracted tamarind seed mucilage presented the following composition on a dry basis: 80.25±0.80% of total polysaccharides, 14.24±0.28% of protein, a significant quantity of fats (4.96±0.15%) and a low amount of ashes

(0.55±0.02%). Khounvilay and Sittikijyothin (2012) reported similar values. Nevertheless, small differences in the perceptual composition can be attributed to extraction method, origin, variety, and harvesting conditions. It is noted the relatively high content of fats in the TSM. In general, fat components do not exhibit double-layer charge as expressed in  $\zeta$ -potential measurements. In this way, fat is unable to form stable coacervates with biomaterial with cationic or anionic expressions.

Carbohydrates contained in TSM are composed of complex blend of polysaccharides. Gidley et al. (1991) used  $^{13}\text{C}$ -NMR analyses to obtain a qualitative characterization of the polysaccharides likely contained in tamarind seeds. They found that the major polysaccharide in tamarind seed is a galactoxyloglucan with ratios of galactose:xylose:glucose of about 1:2.25:2.8. A minor polysaccharide (2-3%) containing branched (1→5)- $\alpha$ -L-arabinofuranan and unbranched (1→4)- $\beta$ -D-galactopyranan features was also reported. The blend of these polysaccharides offers a material with high shear-thickening capacity. Besides, the TSM polysaccharides conforms an entangled aqueous dispersion interacting in a complex way with the WPI used for coacervation.

### *3.2. Determination of equivalence point of biopolymer dispersions*

Figure 1 shows the protolytic titration curves and the inflection point of the titration curves of WPI, TSM and GA dispersions. When WPI is titrated with NaOH solution, the dissociated hydroxyl ions ( $\text{OH}^-$ ) react with the amino groups ( $\text{NH}_3^+$ ), while the sodium ions ( $\text{Na}^+$ ) interact with the carboxyl groups ( $\text{COO}^-$ ) (Espinosa-Andrews et al., 2010). On the other hand, titration of polysaccharides with HCl promotes the formation of a protonation gradient where hydroxyl ions are captured by the polysaccharide molecular structure accompanied by a condensation reaction (Beck, Jekle & Becker, 2011). In this way, the protonation degree of biopolymers will depend on the amount of HCl solution used. Figure 1.a shows that maximum protonation of WPI is achieved with 0.75 mEq of NaOH/g of WPI. On the other hand, Figures 1.b and 1.c show that maximum protonation of TSM and GA is achieved respectively by about 26.1 mEq of HCl/g and 1.1 mEq of HCl/g. This shows that the optimal ratios  $R_{\text{WPI-TSM}}$  and  $R_{\text{WPI-GA}}$  were about 1:0.29 and 1:0.69, respectively.

### *3.3. Characterization of biopolymer dispersions by $\zeta$ -potential measurements*

The  $\zeta$ -potential measurements of the WPI, TSM and GA dispersions are shown in Figures 2.a and 2.c. WPI exhibited an amphiphilic character. As expected (Huang, Sun, Xiao, & Yang, 2012), the WPI dispersion presented positive  $\zeta$ -potential values (cationic character) at pH lower than its isoelectric point ( $pI$ ), i.e. at pH = 4.55. This effect can be attributed to protonation of the amino groups ( $\text{NH}_3^+$ ) promoted by the interaction with the hydrogen ions ( $\text{H}^+$ ). The WPI dispersion exhibited the maximum

cationic character in a  $\zeta$ -potential value of +20 mV at pH = 3.0. For pH values above its  $pI$ , WPI showed anionic character due to the deprotonation of the carboxyl groups caused by the presence of hydroxyl ions (OH<sup>-</sup>). It should be noted that these values are in agreement with those reported by Klein et al. (2010).

The TSM and GA polysaccharides have an anionic character throughout the studied pH range (2.0-10.0). The TSM dispersion showed an anionic character with a maximum value at -12 mV and pH = 10.0 due to the COO<sup>-</sup> ions present in its structure. On the other hand, the GA showed a trend similar to TSM, since it behaved as an anionic biopolymer with a gradual increase on  $\zeta$ -potential to a minimum value of -24.9 mV. This feature was induced by the ionization of the residual carboxyl groups (Yang et al., 2012; Espinosa-Andrews et al., 2013). Differences in the  $\zeta$ -potential curve of the TSM and GA dispersion can be explained from the higher protein content (~14%) of the former compared to the latter, leading to a higher interaction between the amino and carboxyl groups from its composition. In turn, this difference explains the fact that the charges in TSM are neutralized to a greater extent than charges in GA. Therefore, the TSM dispersion can be considered as a more stable biopolymeric system at pH and  $R_{PP}$  variations than GA. However, it should be recognized that the TSM contains an important amount of protein (~14.24%), which can contribute to the quantifiable amount of WPI-TSM coacervate. Given the pH conditions at which the TSM stock was prepared, it is likely that the natural TSM protein is partially carried out in the form of a natural coacervate. The WPI mixed with the TSM would neutralize the residual polysaccharides. In this way, the protein contained in the TSM should be seen as a functional advantage over the gum Arabic, which contains marginal amounts of protein.

Figure 2.b shows the characteristic trajectory of titration curve of the WPI dispersion (1.0% w/w) adjusted to an initial pH of 3.0 (maximum cationic character), using as the titrant solution to the TSM dispersion (0.1% w/w). A sharp decrease of the  $\zeta$ -potential (~11%) to a pH of 3.6 in a range from  $R_{1:0}$  to  $R_{1:0.2}$  can be observed, caused probably by the electrostatic attraction between the COO<sup>-</sup> groups from mucilage and the NH<sub>3</sub><sup>+</sup> groups from protein. However, an excess of cationic groups with respect to the anionic groups are present under these conditions. In addition, as the ratio of TSM to WPI ( $R_{WPI-TSM}$ ) increases, a point is reached where the interaction between charges is completely neutralized ( $\zeta$ -potential = 0). Therefore, the interaction is maximal at pH = 3.65 and  $R_{WPI-TSM} = 1:0.3$ . As the proportion of TSM increases, the anionic character of the WPI-TSM complex slightly decreased the  $\zeta$ -potential value to -2.5 mV in a ratio  $R_{WPI-TSM} = 1:1$ . This marginal effect could be attributed to structural changes of the protein contained in TSM as the pH is also slightly increased. That is, the protein



contained in the TSM achieved an anionic character when added in the WPI stock with lower pH value. Given the relatively high protein content of TSM, no significant decrease in  $\zeta$ -potential value was observed, remaining stable over a wide range of  $R_{WPI-TSM}$ . A similar trend occurred in the WPI-GA complex formation (Figure 2.d). Note that in the  $R_{WPI-GA}$  range from 5:0 to 1.5:1, the cationic character of the complex was maintained. Subsequently, the complex reaches the maximum interaction at pH = 3.45 and  $R_{WPI-TSM} = 1.4:1$ . As the proportion of GA increased, the trend continued with the decrease in  $\zeta$ -potential to reach a value of about  $\zeta$ -potential = -13.7 mV at pH = 4.41. These results differ from Klein et al. (2010) and Weinbreck, Tromp and de Kruif (2004) since the initial pH conditions of the WPI dispersion and variations in the physicochemical characteristics of biopolymers. Moreover, it can be observed that the WPI-GA complex is more susceptible to variations in pH and  $R_{PP}$  than the WPI-TSM complex because of difference in protein content of the anionic hydrocolloids (TSM and GA) and the ability to stabilize the loads for a given pH range. This suggests that the WPI-TSM complex is more stable at pH and  $R_{PP}$  variations than the WPI-GA complex.

#### *3.4. Determination of soluble and insoluble complex by turbidity measurements*

To identify the optimal pH of the complex coacervates, the optical density curves were obtained as a function of changes in pH while maintaining the optimal ratio  $R_{PP}$  previously determined. Figure 3.a shows the characteristic transition stages observed by changes in turbidity of the WPI-TSM complex. In the first stage, the presence of co-soluble biopolymers was exhibited up to pH values of 5.27 ( $pH_c$ ). In this stage, there is no complexing between the biopolymers since both materials have negative charge, which prevents their attraction by electrostatic repulsion. This was corroborated as the dispersion remained translucent. When the pH scale decreases at value of 4.77 ( $pH_{\phi_1}$ ), an increase in turbidity of the system was observed, which is indicative of the formation of soluble complex. However, since the pH corresponding to the  $pI$  of WPI is lower than  $pH_{\phi_1}$ , electrostatic attraction between both biopolymers is not possible. It should be mentioned that the high protein content of the TSM is likely to aid the complex formation between the total amino groups and the carboxyl groups. As the pH decreases, a gradual increase in the turbidity of the system was detected, an effect reflecting the formation of insoluble complexes as promoted by the electrostatic attraction between the WPI positive charges and the TSM negatives charges ( $pH < 4.77$ ). The trend continued until reaching a maximum absorbance value at pH equal to 3.68 ( $pH_{opt}$ ). At this point the total neutralization of the charges was achieved, obtaining the maximum formation of the complex. This value of  $pH_{opt}$  was corroborated since it is practically equal to that obtained by  $\zeta$ -potential measurements ( $pH = 3.65$ ). Subsequently, there was a gradual decrease in turbidity of the system to pH of 2.0 ( $pH_{\phi_2}$ ), indicating the

complex dissociation caused by to protonation of the carboxyl groups. In turn, protonation above the critical pH value increased the solubility of biopolymers.

Figure 3.b shows the transition stages of the WPI-GA complex formation. The presence of co-soluble biopolymers was maintained until pH of 4.6 ( $\text{pH}_c$ ), which could be caused by the repulsion between positive charges of GA and the surface residues of WPI. In fact, GA chains prevent the aggregation of the WPI molecules (Liu et al., 2009). Subsequently, the soluble complex was formed until pH of 3.75 ( $\text{pH}_{\phi 1}$ ). From this point, electrostatic attraction between opposing charges are still present. However, the solution remains translucent because of the size and the number of minimum interactions were unlikely reached to observe a cloudy solution. At a lower pH scale, the insoluble complex formation was identified by the sudden increase in the absorbance of the system until reached the maximum value at pH of 3.46 ( $\text{pH}_{\text{opt}}$ ). As the pH further decreased, dissociation of the WPI-GA complex occurred due to deprotonation of the GA molecule at pH of 2.75 ( $\text{pH}_{\phi 2}$ ). At this point, the change from a cloudy solution to a translucent solution was observed. It is suggested that GA does not possess sufficient negative charges to interact with the WPI positive charges from this point.

In the stage of co-soluble biopolymers formation, the WPI-GA complex exhibited lower absorbance with respect to the WPI-TSM complex. This effect can be explained from the fact that at a pH higher than  $\text{pH}_c$ , the TSM showed higher protein content promoting the interaction between the amino and carboxyl groups of TSM with those exposed by WPI. In turn, the above effect was observed in a higher turbidity degree than in the WPI-GA complex. However, the WPI-GA complex exhibited higher absorbance at  $\text{pH}_{\text{opt}}$  than the WPI-TSM complex, i.e., the electrostatic interaction degree of the WPI-GA complex at  $\text{pH}_{\text{opt}}$  is stronger than in the WPI-TSM complex. It is noted that WPI-TSM combination showed insoluble complexes over a higher pH range (2.0-4.77) as compared with the WPI-GA combination (2.75-3.75). This suggests that the WPI-TSM complex is less sensitive to variations in pH than the WPI-GA complex, in accordance with the established by  $\zeta$ -potential measurements. Table 1 summarizes the findings discussed above where the optimal conditions for coacervate formation are described.

### 3.5. Optical microscopy of complex coacervates

The optical microscopes of the WPI-TSM complex formation can be seen in Figures 4.a-c. In Figure 4.b the complex is stoichiometrically neutral at  $R_{\text{WPI-TSM}} = 1:0.3$ , exhibiting a tendency to form defined structures. It can be seen that a set of individual micro complexes are encompassed within a boundary,

forming a cell-like macro complex (Roldan-Cruz et al., 2016). These structures were also studied by Oparin in his theory of formation of the first living cells from the coacervation processes (Kizilay, Kayitmazer, & Dubin, 2011). On the other hand, an excess of WPI with respect to TSM ( $R_{\text{WPI-TSM}} = 1:0.1$ ) led to the degradation of the complex coacervate (Figure 4.a). Therefore, protein-protein aggregation was promoted in greater magnitude compared with the protein-polysaccharide complex formation (Liu et al., 2009). In contrast, by increasing the ratio of TSM with respect to WPI ( $R_{\text{WPI-TSM}} = 1:1$ ) the complex deformation was also observed, showing a tendency to disintegration of the overall macro-complex into individual forms by imbalance in the charges of macroions (Roldan-Cruz et al., 2016).

The WPI-GA complex formation showed that in the optimal ratio ( $R_{\text{WPI-GA}} = 1.4:1$ ), a defined structure is formed composed of individual complexes (Figure 4.e). This defined structure was more clearly observed than in the WPI-TSM complex. This effect was confirmed by the turbidity tests as the WPI-GA complex exhibited higher turbidity under optimum conditions. In contrast, at  $R_{\text{WPI-GA}} = 5:1$  (Figure 4.d) the complex formation is not observed since only protein-protein aggregation from WPI prevailed. Likewise, in the WPI-GA complex at  $R_{\text{WPI-GA}} = 1:5$  the disintegration of the individual complexes was observed, probably caused by the excess of anions that affected the charge distribution and the attracting force of the macro complex (Figure 4.f). Nevertheless, the WPI-TSM complex exhibited less disintegration than the WPI-GA complex, probably due to the proteins contained in the TSM. In general, the TSM presented higher stability in the complex formation than GA over a wide range of protein-polysaccharide ratios.

### 3.6. FTIR of complex coacervates

Figure 5.a shows the infrared spectra of WPI, TSM and WPI-TSM complex. The WPI spectrum exhibited strong absorption band at  $3270 \text{ cm}^{-1}$  corresponding to -OH contraction vibrations, attributed to hydrogen bonds of water. At  $3065 \text{ cm}^{-1}$ , there was a weak absorption vibration N-H stretching (amide B), at  $2955 \text{ cm}^{-1}$  a C-H stretching band, at  $1628 \text{ cm}^{-1}$  a C=O stretching vibration (acetylated unit - CONH<sub>2</sub>, characteristic of amide I group), a peak resulting from N-H bending and C-N stretching combination (amide II), at  $1520$ ,  $1390$  and  $1231 \text{ cm}^{-1}$  a overtone vibration of N-H bending and C-N stretching (amide III), at  $1149 \text{ cm}^{-1}$  a C-O-C symmetric stretching band and at  $1078 \text{ cm}^{-1}$  a C-O strong vibration stretching.

Given the influence of the protein content, the TSM exhibited characteristic peaks at  $3317 \text{ cm}^{-1}$ , a

wide band due to the overlap of -OH and N-H stretching vibrations. The bands at 2915  $\text{cm}^{-1}$  indicate the presence of alkane C-H stretch and aldehyde C-H stretch (Daoub, Elmubarak, Misran, Hassan, & Osman, 2016). The band at 1610  $\text{cm}^{-1}$  denotes  $-\text{COO}^-$  stretching, at 1525  $\text{cm}^{-1}$  represents a  $-\text{COO}^-$  asymmetric vibration due to the presence of glucuronic acids. At 1371  $\text{cm}^{-1}$  there is a -OH stretching band and an absorption at 1269  $\text{cm}^{-1}$  represents C-O stretch vibration and C-O carboxyl acid stretch. Finally the spectrum displayed a strong C-O-C stretching band at 1039  $\text{cm}^{-1}$ , characteristic of polysaccharide backbone (Daoub et al., 2016).

The spectrum of the WPI-TSM complex is a result of the contribution of both biopolymers. However, it may be noted that the behavior of the complex is quite similar to that shown by WPI, but with variations in intensity and shifts of absorption bands. This is not surprising at all since the proportion of WPI was greater than TSM. Timilsena, Wang, Adhikari and Adhikari (2016) reported a similar behavior for coacervates containing chia seed protein. An important band ranging from 3200 to 3400  $\text{cm}^{-1}$  can be observed, which was attributed to the interaction of hydrogen bond. The hydrogen bond between both biopolymers was shifted at 3265  $\text{cm}^{-1}$ , corresponding to a strong O-H stretching vibration. This means that the hydrogen bond had important influence in the interaction between WPI amide groups and TSM hydroxyl groups, representing a significant force in the stability of protein-polysaccharide complexes (Luo, Zhang, Whent, Yu, & Wang, 2011). On the other hand, the amide I group showed no changes at 1629  $\text{cm}^{-1}$ . However, both amide II peaks at 1533  $\text{cm}^{-1}$  and amide III bands at 1390 and 1241  $\text{cm}^{-1}$  (corresponding to N-H bending and C-N stretching vibrations) displayed less absorption and shifted peaks with respect to WPI. In turn, this might suggest that WPI-TSM complex underwent changes in its original conformation. Additionally, changes in the secondary structure of the protein were induced, promoting the interaction between both biopolymers, as reflected by the band disappearance at 1610, 1525 and 1269  $\text{cm}^{-1}$  (corresponding to  $-\text{COO}^-$  stretching vibration from TSM) and the reduced-shift of amide II and amide III groups (bands at 1533, 1390 and 1241  $\text{cm}^{-1}$ ). It is suggested that WPI and TSM also interact by electrostatic attraction to carry out the WPI-TSM complex formation.

FTIR spectrum of the WPI-GA complex is shown in Figure 5.b. The GA spectrum presented the typical absorption bands of a polysaccharide, at 3308  $\text{cm}^{-1}$  (-OH broad band), at 2937  $\text{cm}^{-1}$  (C-H stretching vibration), at 1596  $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{COO}^-$  asymmetric stretching vibration), at 1415  $\text{cm}^{-1}$  (strong  $-\text{COO}^-$  stretching symmetric band) and at 1024  $\text{cm}^{-1}$  (C-O-C stretching). Similar results corresponded to those reported by Gulão, de Souza, Andrade and Garcia-Rojas (2016), Espinosa-Andrews et al. (2010)

for the peptide leucine-gum Arabic and gum Arabic-chitosan systems, respectively. The WPI-GA complex displayed a narrow band at  $3277\text{ cm}^{-1}$  attributed to O-H stretching, so it can be inferred the contribution of the hydrogen bond. It is observed a vibration at  $2934\text{ cm}^{-1}$  (corresponding to C-H stretching) and the amide I peak shifted from  $1628\text{ cm}^{-1}$  (present on WPI) to  $1632\text{ cm}^{-1}$  (observed in WPI-GA complex). Both the amide II band (at  $1531\text{ cm}^{-1}$ ) and the amide III group (at  $1397$  and  $1240\text{ cm}^{-1}$ ) decreased their absorption band in the complex with respect to WPI. Therefore, it can be confirmed that the electrostatic interaction between amino groups of WPI and the carboxyl groups of GA were in the carbonyl-amide region, an effect that was reflected in the decreasing of the amide II and III band of WPI and the  $-\text{COO}^-$  groups of GA.

Overall, the interaction between biopolymers of WPI-TSM and WPI-GA complexes was carried out both by electrostatic interaction and by the contribution of hydrogen bonding water clusters. Additionally, it was corroborated that TSM presented a greater amount of absorption bands in the carbonyl-amide region with respect to GA, an effect that can be due to the higher protein content of the TSM.

### *3.7. X-ray diffractograms of complex coacervates*

Figure 6.a exhibits the diffractograms of WPI-TSM complex and its individual components, showing that the structures of both biopolymers are basically amorphous. However, two broad peaks were observed in WPI, one of them at  $8.83^\circ$  ( $2\theta$ ) with less broad and intensity than at  $19.66^\circ$  ( $2\theta$ ). This value is indicative of the presence of crystalline regions and non-covalent bonds (da Silva Bastos, Gonçalves, de Andrade, de Lima Araújo, & da Rocha Leão, 2012). The TSM diffractogram only showed a significant peak at  $19.92^\circ$  ( $2\theta$ ), which could promote electrostatic interactions due to the presence of covalent bonds. The WPI-TSM complex presented two leading peaks at  $19.53^\circ$  ( $2\theta$ ) and at  $8.18^\circ$  ( $2\theta$ ), similar to those shown by WPI. This suggests that the WPI-TSM complex retained the amorphous packaging properties of pure WPI (Neo et al., 2013).

On the other hand, the crystallinity value increased 21.48% in the WPI-TSM complex with respect to TSM, but with less intensity than WPI. This increase can be seen as evidence of the formation of the WPI-TSM coacervate complex since the increase of crystallinity and the presence of peak at  $8.18^\circ$  ( $2\theta$ ). Figure 6.b shows that the GA presented a characteristic broad peak of an amorphous structure (Gulão, et al., 2016). With respect to the WPI-GA complex, a decrease of 14.66% in the crystallinity of the complex with respect to GA was obtained. However, the two characteristic peaks at  $19.53^\circ$  ( $2\theta$ ) and

8.57° (2 $\theta$ ) can be noted, indicating the presence of oriented crystalline regions in the polymer matrix (Bastos et al., 2012).

Both complexes presented the broadest peak at approximately 8.5° (2 $\theta$ ) and 20° (2 $\theta$ ), conferring crystalline regions and diminished solubility. Nevertheless, the WPI-TSM complex displayed a peak in the region at 8.18° (2 $\theta$ ), which is more intense than GA. It is suggested that this effect reflects the higher protein content of the TSM, which is also corroborated in the crystallinity increase of WPI-TSM complex. It could be assumed that high initial protein content in the polysaccharide increased the crystallinity of the complexes formed by oppositely charged biopolymers. Conversely, low protein content in the polysaccharide decreases the final crystallinity of the complex.

### 3.8. Scanning electron microscopy (SEM) of complex coacervates

The morphology of individual biopolymers and complex coacervates obtained by spray drying is illustrated in Figure 7. WPI showed spherical shape, typical of globular proteins due to its apolar groups bunched towards the interior of the molecule (Whitford, 2013). The micrographs on the TSM obtained by spray-dried process (Figure 7.b) showed a set of semi-spherical irregular particles with the apparition of concavities. The teeth on the particles can be explained because the rapid vaporization of water related to the dilatation of the TSM particles during the final stages of the drying process, causing contraction on the surface particle (Alpizar-Reyes et al., 2017). The morphology of GA (Figure 7.c) displayed regular forms, spherical type and with various dents on the surface that are useful in entrapping different agents as oleoresins or essential oils (Krishnan, Kshirsagar, & Singhal, 2005; Bertolini, Siani, & Grosso, 2001).

Both complex coacervates showed spherical structures, characteristics of materials obtained by spray-drying (Timilsena et al., 2016). The micrographs of WPI-TSM complex coacervate (Figure 7.d) showed a cluster of amorphous agglomerated particles smooth and non-fractured, resulting from the interaction between both biopolymers and a particle size of about 5-10  $\mu\text{m}$ . In the WPI-TSM complex coacervate, a smaller number of concavities and the tendency to form a macrocomplex resulting from the union of several individual complex coacervates with more defined and uniform structures with respect to the individual biopolymers can be observed. The WPI-GA complex coacervate (Figure 7.e) presented a set of regular and integral agglomerated particles with various concavities in its structure and the particle size was approximately 10-20  $\mu\text{m}$ .

### 3.9. Thermal analysis of complexes

The DSC thermograms of WPI and both complex coacervates obtained by spray drying are shown in Figure 8. The main endothermic peak of powders was associated with the peak of denaturation temperature ( $T_{dn}$ ) and were observed at different values; namely, 92.95 °C, 94.95 °C and 98.2 °C for WPI, WPI-TSM complex coacervate and WPI-GA complex coacervate, respectively. In both complex coacervates, there is a slight increase in  $T_{dn}$  with respect to WPI due to interactions such as hydrogen bonds (Sun, Dai, & Gao, 2017), steric and electrostatic repulsions (Joye, Davidov-Pardo, & McClements, 2015) and water-biopolymer interactions (Kittur, Prashanth, Sankar, & Tharanathan, 2002). Both biopolymers TSM and GA improved the stability of the WPI by affecting its  $T_{dn}$  in the conformation of the complex coacervates, which agrees with reports by Huang et al. (2012) for the soybean protein isolate and chitosan system. In addition, the WPI-GA complex coacervate presented slightly higher  $T_{dn}$  than the WPI-TSM complex coacervate because the GA has a higher hydrophilic character than TSM. This property offers a greater amount of hydrogen bonds, allowing to enhance the  $T_{dn}$  in the complex WPI-GA.

The TGA tests of complex coacervates and WPI are exhibited in Figures 9.a and 9.b from 25 to 550 °C, showing the weight loss percentage as a function of temperature. Typical TGA thermograms of all materials showed two characteristic zones, with the first one associated with evaporation of water and volatile components below 160 °C (Neo et al., 2013). In this region, the weight decreased between 4% and 6%. Subsequently, a slight weight loss (1-2%) until 200-210 °C was displayed. The second zone is related with weight loss of about 55-60%, in a temperature range from 210 to 420 °C, where partial or total degradation of the material likely occurred. The peak degradation temperature ( $T_{dg}$ ) is obtained by the derivative thermogravimetry (DTG) thermogram, which reflected the rate of weight change (Yoksan, Jirawutthiwongchai, & Arpo, 2010). For WPI and WPI-TSM complex coacervate, a single degradation step was shown at 316 °C and 330 °C, respectively (Figures 9.c and 9.d). However, in WPI-GA complex coacervate two-step degradation were observed at 251 °C and 336 °C, which can be designated as the  $T_{dg}$  of the free GA and the WPI-GA complex coacervate, respectively. It has been shown that polysaccharides of gum Arabic dissociates at relatively low temperatures (~250 °C) (Mothé & Rao, 2000). This suggests that at temperatures above 250 °C, the WPI-GA complex coacervate partially dissociates suffering degradation of free GA. While from 330 °C, part of the complex coacervate that does not dissociate begins to undergo degradation of the structure. Therefore, the higher  $T_{dg}$  values of the complex coacervates with respect to WPI indicate greater thermal resistance to undergo degrading processes when forming the complex coacervates. Table 2 summarizes the thermal

properties discussed above, presenting the critical temperatures at which transitions were detected.

#### **4. Conclusions**

This study showed that WPI and TSM can be successfully used to form complex coacervates at optimized conditions. The optimum ratio and pH where the maximum strength interaction of the complex coacervate was reached were 1:0.3 and 3.68, respectively. Afterwards the complex coacervate was spray-dried and the structural, morphological and thermal characteristics of the powders were studied. FTIR analysis of complex coacervates showed that the WPI-TSM complex formation was carried out mainly by electrostatic interactions and hydrogen bonds. The XRD diffractograms showed increase of crystallinity degree of the complex with respect to TSM. Moreover, both analyses were able to confirm WPI-TSM complex formation. The micrographs of WPI-TSM complex showed a cluster of amorphous agglomerated, smooth and non-fractured particles. Finally, the thermal stability against denaturation and the degradation temperature of WPI-TSM complex coacervate was better than individual WPI. This suggests that the WPI-TSM complex coacervate can be used as an economic and nutritionally valuable alternative for food additives. Further research is needed to study the practical applications of this matrix.

#### **Acknowledgements**

The authors wish to acknowledge the partial financial support of this research to the Universidad Autónoma del Estado de México through project 4371/2017/CI. Also the authors wish to thank the financial support provided to the author D. González-Martínez who received a scholarship with number 581826 by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) of Mexico.

**The authors declare no conflict of interest.**

#### **References**

- Alpizar-Reyes, E., Carrillo-Navas, H., Romero-Romero, R., Varela-Guerrero, V., Alvarez-Ramírez, J., & Pérez-Alonso, C. (2017). Thermodynamic sorption properties and glass transition temperature of tamarind seed mucilage (*Tamarindus indica* L.). *Food and Bioproducts Processing*, 101, 166-176.
- Anvari, M., & Chung, D. (2016). Dynamic rheological and structural characterization of fish gelatin–



- Gum arabic coacervate gels cross-linked by tannic acid. *Food Hydrocolloids*, 60, 516-524.
- AOAC. (2006). *Official methods of analysis of AOAC International*. (18th ed.). Washington: Association of Official Analytical Chemists, (Vol. 534).
- Aryee, F. N., & Nickerson, M. T. (2012). Formation of electrostatic complexes involving mixtures of lentil protein isolates and gum Arabic polysaccharides. *Food Research International*, 48(2), 520-527.
- Beck, M., Jekle, M., & Becker, T. (2011). Starch re-crystallization kinetics as a function of various cations. *Starch- Stärke*, 63(12), 792-800.
- Bertolini, A. C., Siani, A. C., & Grosso, C. R. F. (2001). Stability of monoterpenes encapsulated in gum arabic by spray-drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 780-785.
- Carrillo-Navas, H., Fouconnier, B., Vernon-Carter, E. J., & Alvarez-Ramírez, J. (2013). Shear rheology of water/glycerol monostearate crystals in canola oil dispersions interfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 436, 215-224.
- Coelho, S., Moreno-Flores, S., Toca-Herrera, J. L., Coelho, M. A., Pereira, M. C., & Rocha, S. (2011). Nanostructure of polysaccharide complexes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363(2), 450-455.
- da Silva Bastos, D.P. Gonçalves, M., de Andrade, C. T., de Lima Araújo, K. G., & da Rocha Leão, M. H. M. (2012). Microencapsulation of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice using a new chitosan-commercial bovine whey protein isolate system in spray drying. *Food and Bioprocess Processing*, 90(4), 683-692.
- Daoub, R. M., Elmubarak, A. H., Misran, M., Hassan, E. A., & Osman, M. E. (2016). Characterization and functional properties of some natural Acacia gums. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*.
- de Kruif, C. G., & Tuinier, R. (2001). Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 555-563.
- Dickinson, E. (2008). Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein-polysaccharide interactions. *Soft Matter*, 4(5), 932-942.
- Espinosa-Andrews, H., Enríquez-Ramírez, K. E., García-Márquez, E., Ramírez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C., & Vernon-Carter, J. (2013). Interrelationship between the zeta potential and viscoelastic properties in coacervates complexes. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 161-166.
- Espinosa-Andrews, H., Sandoval-Castilla, O., Vázquez-Torres, H., Vernon-Carter, E. J., & Lobato-Calleros, C. (2010). Determination of the gum Arabic-chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their

- coacervates. *Carbohydrate Polymers*, 79(3), 541-546.
- Gidley, M. J., Lillford, P. J., Rowlands, D. W., Lang, P., Dentini, M., Crescenzi, V., Edwards, M., Fanutti, C., & Reid, J. S. G. (1991). Structure and solution properties of tamarind-seed polysaccharide. *Carbohydrate Research*, 214(2), 299-314.
- Gorji, S. G., Gorji, E. G., Mohammadifar, M. A., & Zargaraan, A. (2014). Complexation of sodium caseinate with gum tragacanth: effect of various species and rheology of coacervates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 503-511.
- Gulão, E. D. S., de Souza, C. J., Andrade, C. T., & Garcia-Rojas, E. E. (2016). Complex coacervates obtained from peptide leucine and gum arabic: Formation and characterization. *Food Chemistry*, 194, 680-686.
- Gupta, V., Puri, R., Gupta, S., Jain, S., & Rao, G. (2010). Tamarind kernel gum: An upcoming natural polysaccharide. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 1(1), 50.
- Huang, G. Q., Sun, Y. T., Xiao, J. X., & Yang, J. (2012). Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. *Food Chemistry*, 135(2), 534-539.
- Hwang, D. S., Zeng, H., Srivastava, A., Krogstad, D. V., Tirrell, M., Israelachvili, J. N., & Waite, J. H. (2010). Viscosity and interfacial properties in a mussel-inspired adhesive coacervate. *Soft Matter*, 6(14), 3232-3236.
- Idris, O. H. M., Williams, P. A., & Phillips, G. O. (1998). Characterisation of gum from Acacia senegal trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. *Food Hydrocolloids*, 12(4), 379-388.
- Joye, I. J., Davidov-Pardo, G., & McClements, D. J. (2015). Encapsulation of resveratrol in biopolymer particles produced using liquid antisolvent precipitation. Part 2: stability and functionality. *Food Hydrocolloids*, 49, 127-134.
- Kaushik, P., Dowling, K., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2015). Complex coacervation between flaxseed protein isolate and flaxseed gum. *Food Research International*, 72, 91-97.
- Khounvilay, K., & Sittikijyothin, W. (2012). Rheological behaviour of tamarind seed gum in aqueous solutions. *Food Hydrocolloids*, 26(2), 334-338.
- Kittur, F. S., Prashanth, K. H., Sankar, K. U., & Tharanathan, R. N. (2002). Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate polymers*, 49(2), 185-193.
- Kizilay, E., Kayitmazer, A. B., & Dubin, P. L. (2011). Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1), 24-37.

- Klein, M., Aserin, A., Ishai, P. B., & Garti, N. (2010). Interactions between whey protein isolate and gum Arabic. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(2), 377-383.
- Klemmer, K. J., Waldner, L., Stone, A., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2012). Complex coacervation of pea protein isolate and alginate polysaccharides. *Food Chemistry*, 130(3), 710-715.
- Krishnan, S., Kshirsagar, A. C., & Singhal, R. S. (2005). The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate polymers*, 62(4), 309-315.
- Li, J. M., & Nie, S. P. (2016). The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods. *Food Hydrocolloids*, 53, 46-61.
- Liu, J., Shim, Y. Y., Wang, Y., & Reaney, M. J. (2015). Intermolecular interaction and complex coacervation between bovine serum albumin and gum from whole flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Food Hydrocolloids*, 49, 95-103.
- Liu, S., Cao, Y. L., Ghosh, S., Rousseau, D., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2009). Intermolecular interactions during complex coacervation of pea protein isolate and gum arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 552-556.
- Liu, S., Elmer, C., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2010). Effect of pH on the functional behaviour of pea protein isolate–gum Arabic complexes. *Food Research International*, 43(2), 489-495.
- Luo, Y., Zhang, B., Whent, M., Yu, L. L., & Wang, Q. (2011). Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol, and its in vitro controlled release study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 145-152.
- Manchanda, R., Arora, S. C., & Manchanda, R. (2014). Tamarind seed polysaccharide and its modification-versatile pharmaceutical excipients-a review. *International Journal of PharmTech Research*, 6(2), 412-420.
- Mothé, C. G., & Rao, M. A. (2000). Thermal behavior of gum arabic in comparison with cashew gum. *Thermochimica Acta*, 357, 9-13.
- Neo, Y. P., Ray, S., Jin, J., Gizdavic-Nikolaidis, M., Nieuwoudt, M. K., Liu, D., & Quek, S. Y. (2013). Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein–gallic acid system. *Food Chemistry*, 136(2), 1013-1021.
- Pérez-Alonso, C., Báez-González, J. G., Beristain, C. I., Vernon-Carter, E. J., & Vizcarra-Mendoza, M. G. (2003). Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, 53(2), 197-203.
- Phani, K. G. K., Gangarao, B., Kotha, N. S., & Raju, L. (2011). Isolation and evaluation of tamarind seed polysaccharide being used as a polymer in pharmaceutical dosage forms. *Research Journal of*

*Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2, 274-290.

- Pitchaon, M., Tanawan, W., & Thepkunya, H. (2013). Tamarind kernel powder, gum arabic and maltodextrin as a novel combination for encapsulating agents of phenolic antioxidants. *International Food Research Journal*, 20, 645-652.
- Prajapati, V. D., Jani, G. K., Moradiya, N. G., & Randeria, N. P. (2013). Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1685-1699.
- Rocha, C. M., Souza, H. K., Magalhães, N. F., Andrade, C. T., & Gonçalves, M. P. (2014). Rheological and structural characterization of agar/whey proteins insoluble complexes. *Carbohydrate Polymers*, 110, 345-353.
- Roldan-Cruz, C., Carmona-Ascencio, J., Vernon-Carter, E. J., & Alvarez-Ramirez, J. (2016). Electrical impedance spectroscopy for monitoring the gum Arabic–chitosan complexation process in bulk solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 495, 125-135.
- Salazar-Miranda, M. A., Cruz-Sosa, F., Rodríguez-Huezo, M. E., Jiménez-Alvarado, R., & Pérez-Alonso, C. (2016). Microencapsulation of chlorthalidone by spray-drying of double emulsion and melt granulation coating. *Drying Technology*, 34(9), 1118-1128.
- Salehi, F., & Kashaninejad, M. (2014). Effect of different drying methods on rheological and textural properties of Balangu seed gum. *Drying Technology*, 32(6), 720-727.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., & Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(8), 689-753.
- Sun, C., Dai, L., & Gao, Y. (2017). Formation and characterization of the binary complex between zein and propylene glycol alginate at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, 64, 36-47.
- Timilsena, Y. P., Wang, B., Adhikari, R., & Adhikari, B. (2016). Preparation and characterization of chia seed protein isolate–chia seed gum complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 52, 554-563.
- Weinbreck, F., Tromp, R. H., & De Kruif, C. G. (2004). Composition and structure of whey protein/gum arabic coacervates. *Biomacromolecules*, 5(4), 1437-1445.
- Whitford, D. (2013). *Proteins: structure and function*. John Wiley & Sons.
- Yang, Y., Anvari, M., Pan, C. H., & Chung, D. (2012). Characterisation of interactions between fish gelatin and gum arabic in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 135(2), 555-561.
- Yoksan, R., Jirawutthiwongchai, J., & Arpo, K. (2010). Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 292-297.

## Figure Captions

**Figure 1.** Protolytic titration curves: (a) Whey protein isolate (1% w/w); (b) Tamarind seed mucilage (0.1% w/w); and (c) Gum Arabic (1% w/w) dispersions.

**Figure 2.** (a), (b) Zeta potential curves of WPI, TSM and GA dispersions, and (c), (d) Titration trajectory of complex coacervates on the zeta potential as a function of pH.

**Figure 3.** Optical density (turbidity values) as a function of pH for: (a) WPI-TSM, and (b) WPI-GA complex coacervates.

**Figure 4.** Optical images morphology of complex coacervates: (a), (b), (c) WPI-TSM and (d), (e), (f) WPI-GA at different mass ratios ( $R_{PP}$ ).

**Figure 5.** FTIR spectra of individual biopolymers, WPI-TSM and WPI-GA complex coacervates by spray-dried.

**Figure 6.** X-Ray diffractograms of individual biopolymers, WPI-TSM and WPI-GA complex coacervates powders.

**Figure 7.** SEM micrographs of: (a) WPI, (b) TSM, (c) GA, (d) WPI-TSM complex coacervate, and (e) WPI-GA complex coacervate.

**Figure 8.** Differential scanning calorimetric (DSC) thermograms of WPI and complex coacervates powders.

**Figure 9.** (a) Weight loss for WPI and WPI-TSM coacervate. (b) Weight loss for WPI and WPI-GA coacervate. (c) Derivative thermogravimetry (DTG) thermograms of WPI and WPI-TSM coacervate. (d) Derivative thermogravimetry (DTG) thermograms of WPI and WPI-GA coacervate.

**Table 1.** Optimal conditions for preparation of complex coacervates.

<b>Sample</b>	<b>Ratio (R<sub>PP</sub>) by Protolytic titration</b>	<b>pH by ζ-potential</b>	<b>Ratio (R<sub>PP</sub>) by ζ-potential</b>	<b>pH by Turbidity</b>
WPI-TSM	1:0.29	3.65 ± 0.04 <sup>a</sup>	1:0.30	3.68 ± 0.05 <sup>a</sup>
WPI-GA	1:0.69	3.45 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.4:1	3.46 ± 0.04 <sup>a</sup>

Values are means ± standard error, of three replicates. Superscripts with different letters in same line indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ).

**Table 2.** Thermal properties of WPI and complex coacervates powders.

<b>Samples</b>	<b>Peak of denaturation temperature (T<sub>dn</sub>) (°C)</b>	<b>Peak of degradation temperature (T<sub>dg</sub>) (°C)</b>
WPI	92.95 ± 1.79 <sup>a</sup>	316 ± 6.32 <sup>b</sup>
WPI-TSM	94.95 ± 1.17 <sup>a</sup>	330 ± 4.95 <sup>c</sup>
WPI-GA	98.20 ± 1.44 <sup>b</sup>	251 ± 4.27 <sup>a</sup> 336 ± 6.72 <sup>c</sup>

Values are means ± standard error, of three replicates. Superscripts with different letters in same column indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ).

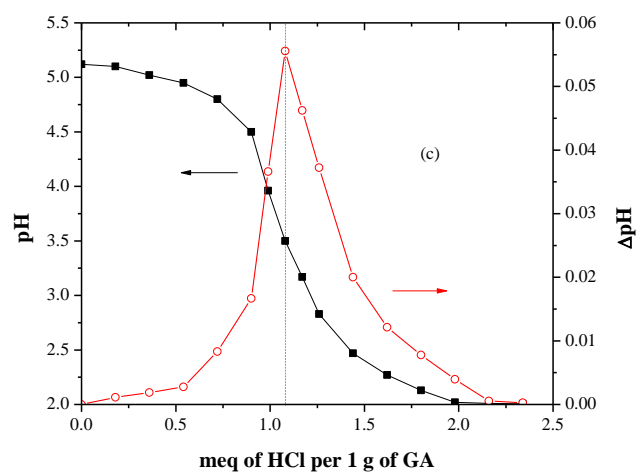
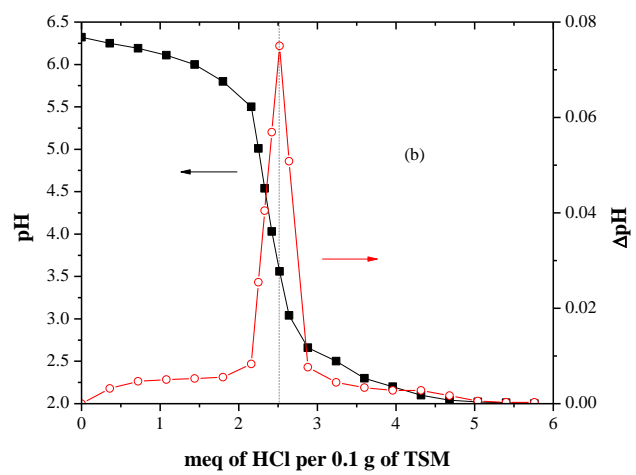
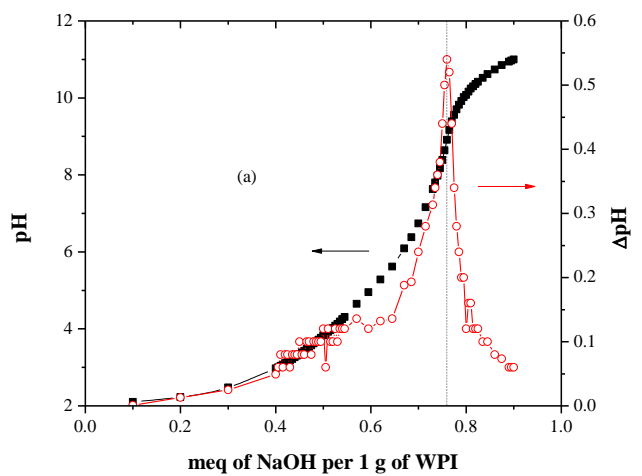


FIGURE 1



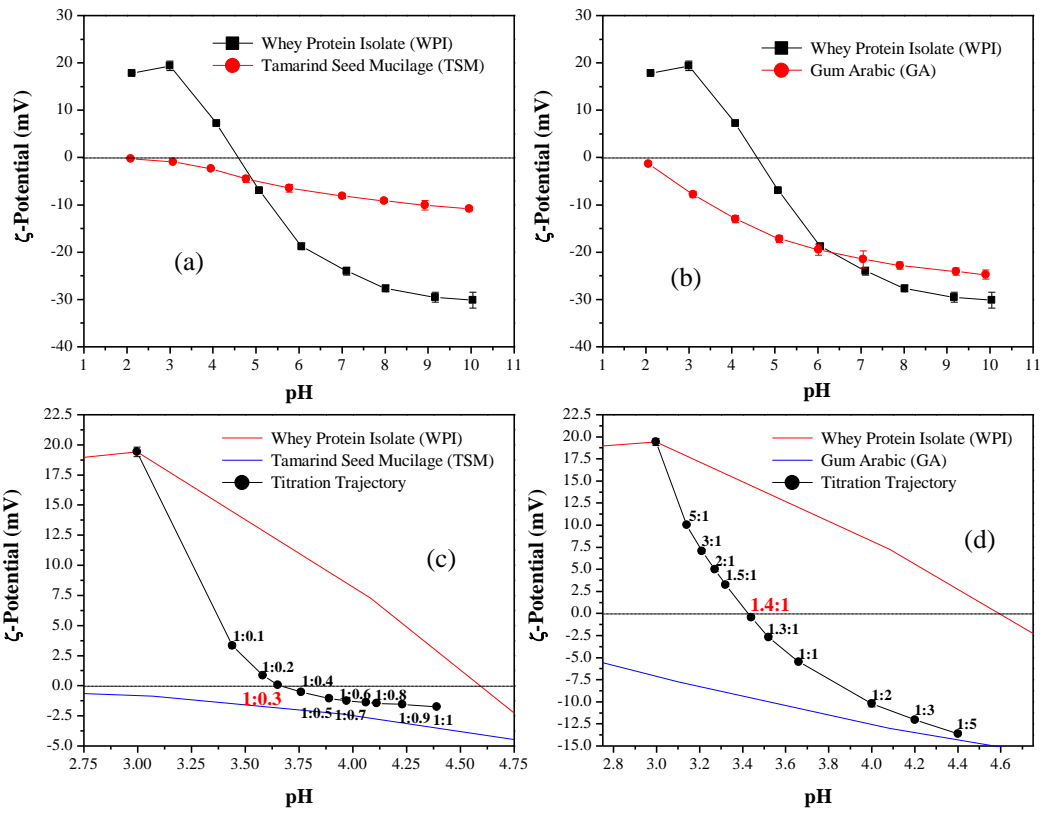


FIGURE 2

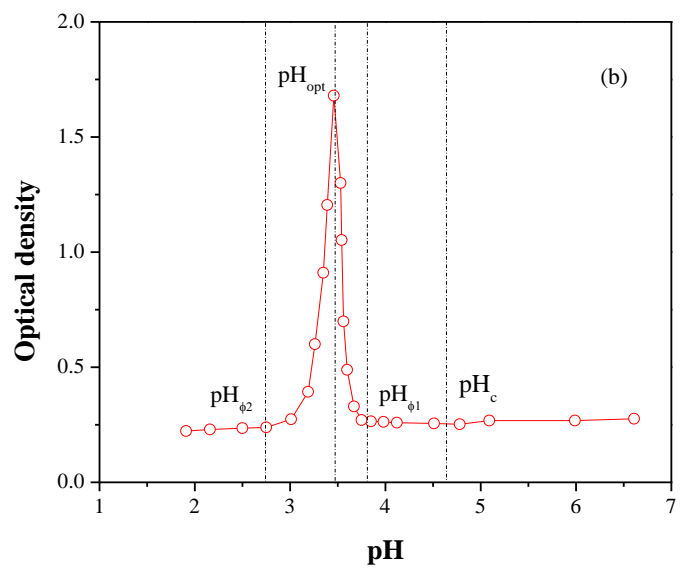
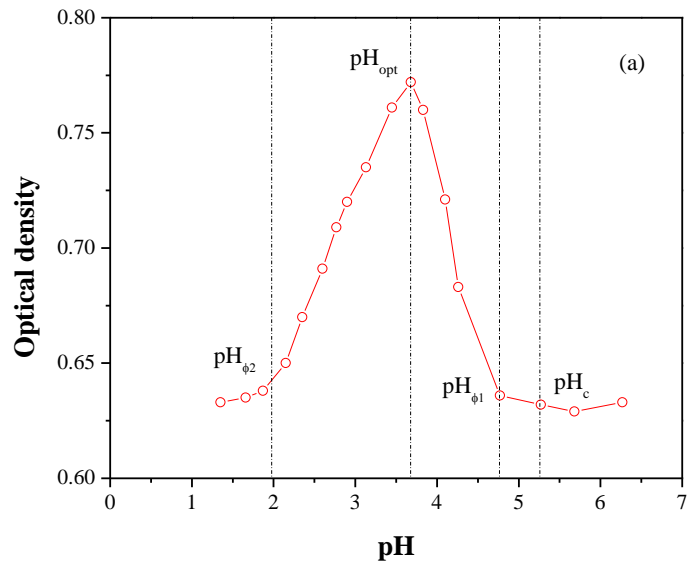
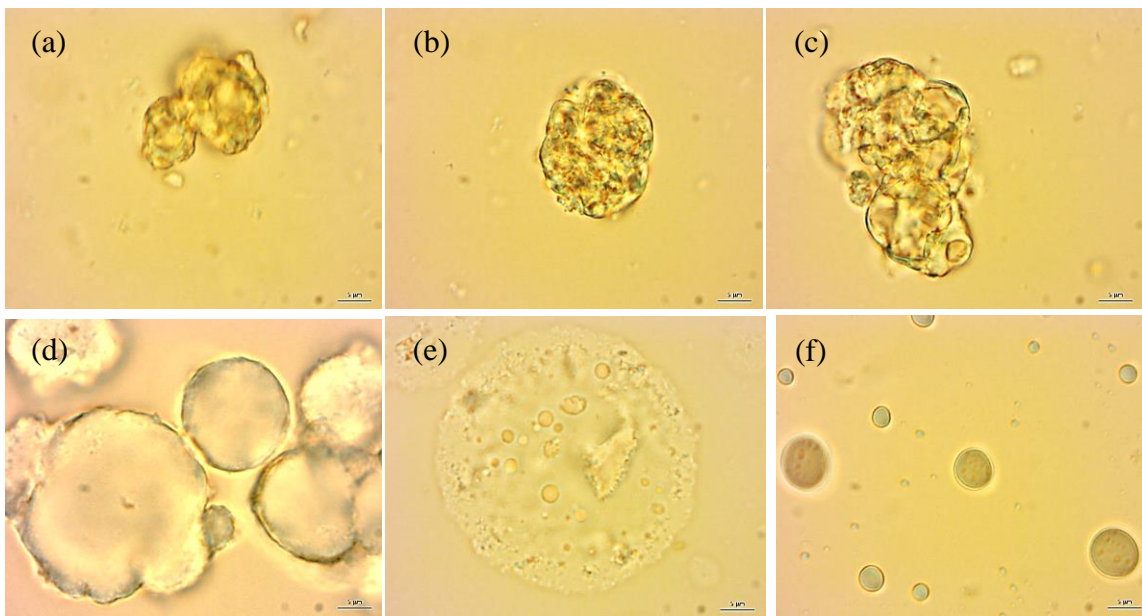
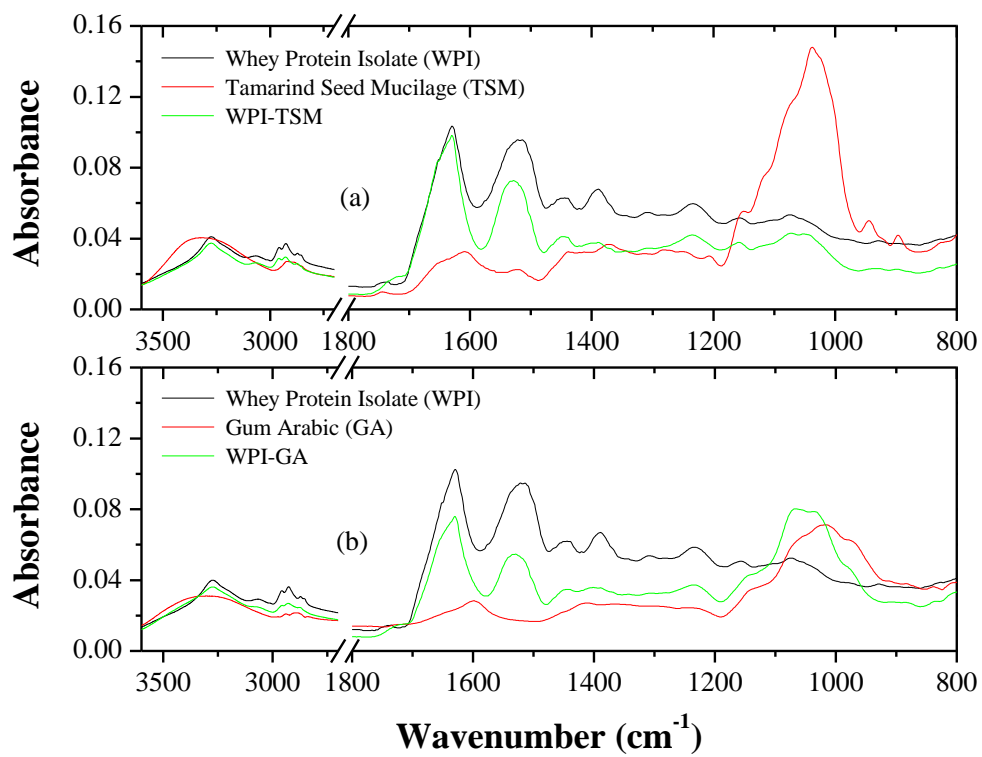


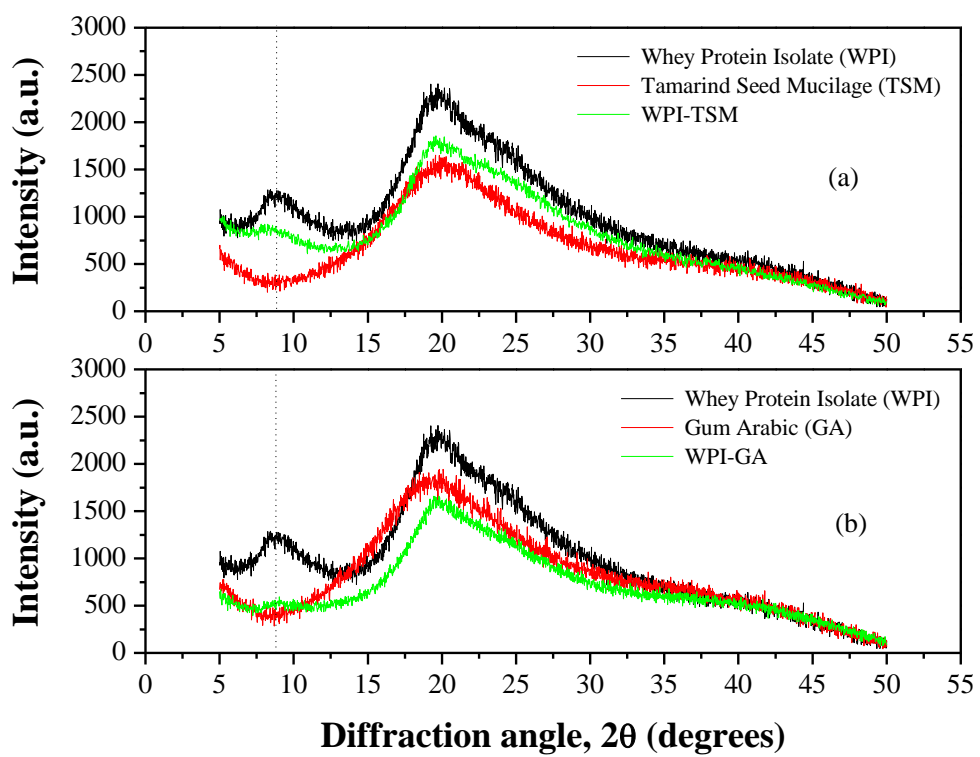
FIGURE 3



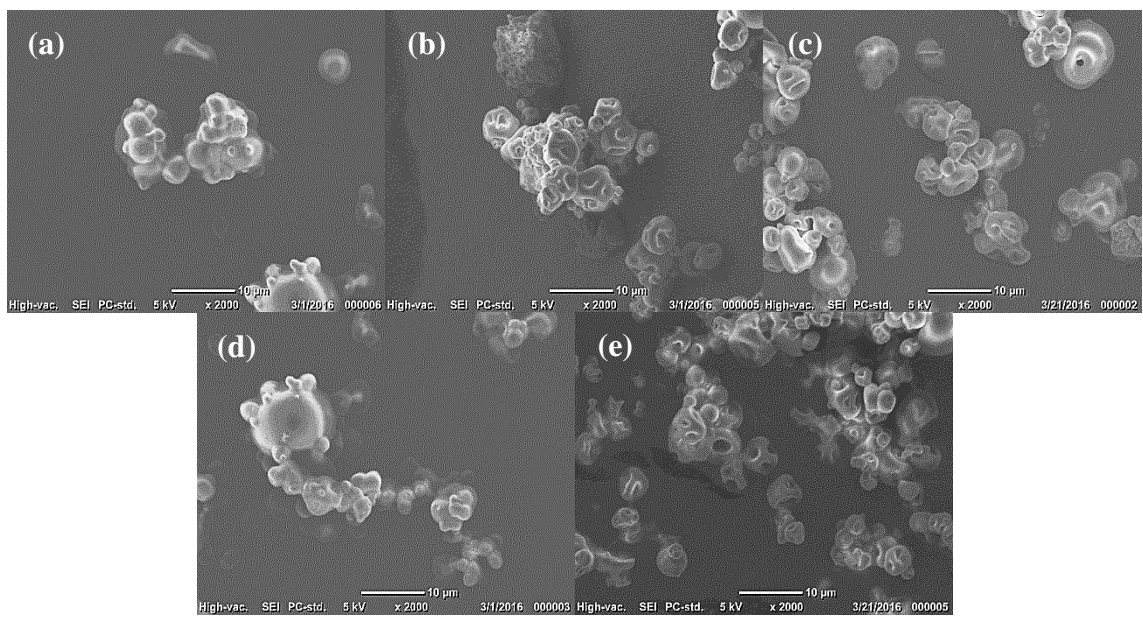
**FIGURE 4**



**FIGURE 5**



**FIGURE 6**



**FIGURE 7**

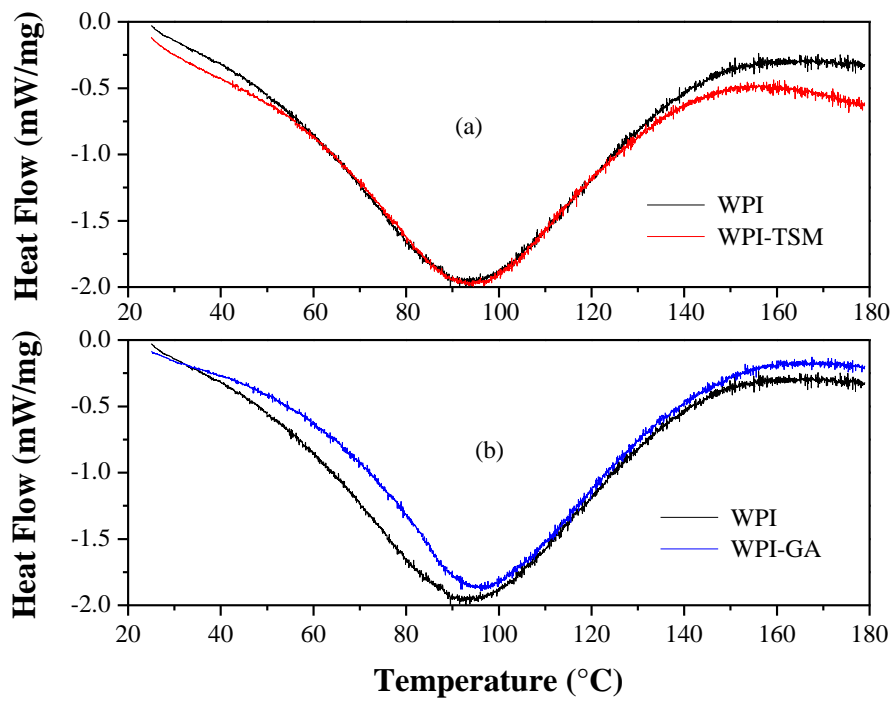
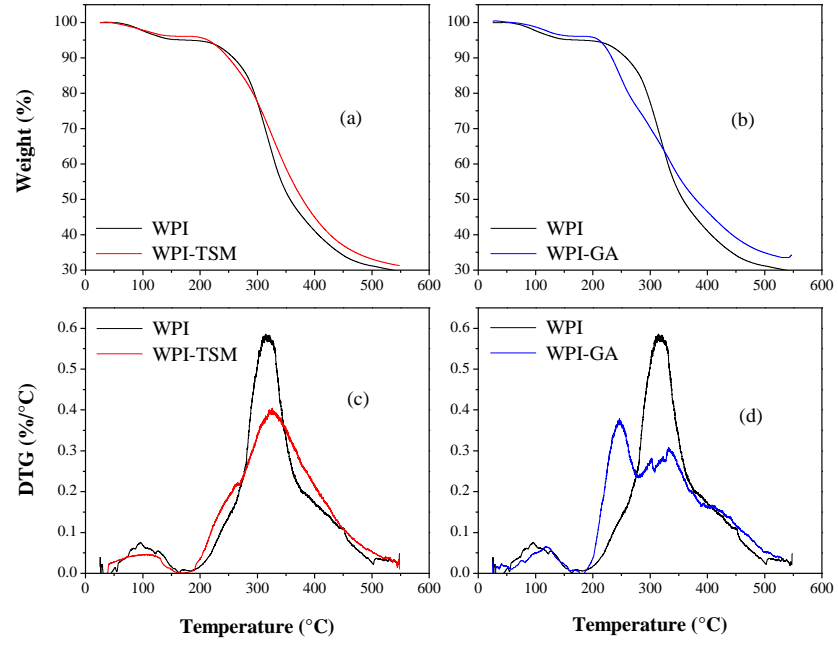


FIGURE 8



**FIGURE 9**



## **Highlights**

- A novel WPI-TSM complex was carried out mainly by electrostatic interactions.
- The WPI-TSM complex presented greater stability than WPI-GA complex.
- The spray-dried complex coacervates possessed a morphology smooth with concavities.
- The crystallinity degree of the complex coacervates was determined by XRD.
- Thermal stability against denaturation of WPI-TSM complex coacervate was improved.

**PARTE 3:**  
**“CONCLUSIONES”**

- La formación del complejo coacervado entre el Aislado de proteína de suero de leche (WPI) y el Mucílago de la semilla de tamarindo (TSM) se optimizó en términos de pH y relación de mezclado WPI y TSM en condiciones ambientales. Usando las pruebas de Titulación protolítica, Potencial zeta y Turbidez, se encontró que las condiciones óptimas de máxima interacción entre WPI y TSM fueron a pH = 3.65 y  $R_{PP} = 1:0.3$ . El análisis FTIR demostró que la formación del complejo se llevó a cabo principalmente por interacciones electrostáticas atractivas y puentes de hidrógeno. El difractograma XRD mostró aumento en el grado de cristalinidad del complejo con respecto a TSM. Por lo que ambos análisis fueron capaces de confirmar la formación del complejo. La estabilidad estructural frente a la desnaturalización y a la degradación del complejo WPI-TSM fue mejor comparada con la de sus componentes individuales.
- El aceite de capulín emulsionado a condiciones óptimas del complejo WPI-TSM como agente emulsionante, presentó un incremento en el tamaño de gota a través del tiempo correspondiente a una cinética de coalescencia de primer orden ( $k_c = 2.7 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ). La emulsión promovió la formación de un sistema con características pseudoplásticas, en el que el modelo reológico de Carreau representó adecuadamente este comportamiento con respecto a los datos experimentales ( $R > 0.99$ ). Las propiedades dinámicas mostraron el comportamiento de un gel débil con una región viscoelástica no lineal por encima del 20% de deformación.
- El aceite de capulín emulsionado fue secado por aspersion para evaluar la capacidad protectora del complejo WPI-TSM como material de pared. Las microcápsulas WPI-TSM presentaron valores de Tg igual a 74°C, y una morfología con estructuras esféricas y algunas vacuolas. La estabilidad oxidativa del aceite de capulín encapsulado fue mejor que la del no-encapsulado, siguiendo una cinética de reacción de orden cero ( $k_{HP} = 2.22 \times 10^4 \text{ meq/kg aceite}$ ) y presentando una mayor temperatura de oxidación de las microcápsulas (185.1°C) con respecto al aceite sin encapsular (151.1°C). Las microcápsulas WPI-TSM se obtuvieron con éxito, como lo confirmó el FT-IR a través de la aparición de bandas características de aceite de capulín en las microcápsulas. Este estudio muestra que el complejo coacervado WPI-TSM puede microencapsular

eficazmente el aceite de capulín y las microcápsulas producidas usando el secado por aspersión presentan bajos valores de aceite superficial (5.8%) y un alto rendimiento de encapsulación (82.19%). Estos hallazgos sugieren que de acuerdo a las similitudes presentadas en las propiedades funcionales del complejo WPI-TSM con respecto al complejo WPI-GA, éste puede servir como material de pared alternativo para ser empleado en la industria alimentaria.

**PARTE 4:**  
**“BIBLIOGRAFÍA”**

- Aguerreberre I., Rojas A., Oomah D., Drover J. (2011). Characteristics of *Prunus serotina* seed oil. *Food Chemistry*, 124, 983-990.
- Alpizar-Reyes, E., Carrillo-Navas, H., Gallardo-Rivera, R., Varela-Guerrero, V., Alvarez-Ramirez, J., & Pérez-Alonso, C. (2017). Functional properties and physicochemical characteristics of tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed mucilage powder as a novel hydrocolloid. *Journal of Food Engineering*, 209, 68-75.
- Alvarenga D., Barros R., Vilela S., Yoshida M. (2014). Influence of wall matrix systems on the properties of spray-dried microparticles containing fish oil. *Food Research International*, 62, 344-352.
- Anwar, S. H., & Kunz, B. (2011). The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules: Comparison of spray granulation, spray drying, and freeze drying. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 367-378.
- Araneda C., & Valenzuela, F. (2009). Microencapsulación de extractantes: una metodología alternativa de extracción de metales. *Revista Ciencia Ahora*, 22(11), 9-19.
- Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I., Topuz, A. (2015). Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. bouldarii with different wall materials by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 685-690.
- Archana, G., Sabina, K., Babuskin, S., Radhakrishnan, K., Mohammed, F.A., Azhagu, P., Babu, S., Sivarajan, M., Sukumar, M. (2013). Preparation and characterization of mucilage polysaccharide for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 98, 89– 94.
- Asbahani, E., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Aït, Addi E., Casabianca, H., Mousadik, E., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F., Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483, 220-243.
- Astray, G., Mejuto, J., Rial, R., González, C., Simal J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1631-1640.
- Augustin, M.A., & Hemar, Y. (2009). Nano-and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, 38(4), 902-912.
- Avila-de la Rosa, G., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E.J., Carrillo-Navas, H., Pérez-Alonso, C. (2015). Viscoelasticity of chia (*Salvia hispanica* L.) seed mucilage dispersion in the vicinity of an oil-water interface. *Food Hydrocolloids*, 49, 200-207.
- Azarikia, F., & Abbasi, S. (2016). Mechanism of soluble complex formation of milk proteins with native gums (tragacanth and Persian gum). *Food Hydrocolloids*, 59, 35-44.
- Badreldin, H.A. (2009). Biological effects of gum arabic: a review of some recent research. *Food and Chemical Toxicology*, 47(1):1-8
- Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S., & Thorngate, J. (Eds.). (2001). *Food additives*. CRC Press.
- Buffo, R.A., Reineccius, G.A., Oehlert, G.W. (2001). Factors affecting the emulsifying and rheological properties of gum acacia in beverage emulsions. *Food Hydrocolloids*, 15(1), 53-66.
- Bylaite, E., Venskutonis, P. R., Mapdbieriene, R. (2001). Properties of caraway (*Carum carvi* L.) essential oil encapsulated into milk proteinbased matrices. *European Food Research and Technology*, 212, 661–670.
- Carneiro, H., Tonon, C., Grosso, R., Hubinger, C. (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 443-451.

- Carrillo-Navas, H., González-Rodea, D., Cruz-Olivares, J., Barrera-Pichardo, J.F., Román-Guerrero, A., Pérez-Alonso, C. (2011). Storage stability and physicochemical properties of passion fruit juice microcapsules by spray-drying. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(3), 421-430.
- Cerempei, A., Muresan, E., & Cimpoesu N. (2014). Biomaterials with controlled release of geranium essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 26(4), 267-273.
- Costa, L., Valeriano, R., Dupas, M. (2012). Effect of homogenization pressure and oil load on the emulsion properties and the oil retention of microencapsulated basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.). *Drying Technology*, 30, 1413-1421.
- Dalgleish DG. Food emulsions-their structures and structure-forming properties. *Food Hydrocolloid* 2006; 20: 415-422.
- Datta, R., & Bandyopadhyaya, A. K. (2006). A new nasal drug delivery system for diazepam using natural mucoadhesive polysaccharide obtained from tamarind seeds. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 14(2), 115-119.
- Desai K., Park H., (2005). “Recent Developments in microencapsulation of food ingredients”. *Drying Technology*, 23, 1361–1394.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food hydrocolloids*, 17(1), 25-39.
- Drusch, S. & Mannino, S. (2009) Patent-based review on industrial approaches for the microencapsulation of oils rich in polyunsaturated fatty acids. *Trends Food Science and Technology*, 20(6-7), 237-244.
- Favaro, C., Santana, A., Monterrey, E., Trindade, M., Netto, F. (2010). The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 336-340.
- Fennema, O.R. (2000). *Química de los Alimentos*, 2ª Edición, Acribia, Zaragoza, España.
- Frascareli, E., Martins, V., Valeriano, R., Dupas, M. (2012). Determination of critical storage conditions of coffee oil microcapsules by coupling water sorption isotherms and glass transition temperature. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 1044–1054.
- de Kruif, G.C., Weinbreck, F., De Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9, 340-349.
- García, G., González, M., Ochoa, M., Medrano, H. (2004). Microencapsulación del jugo de cebada verde mediante secado por aspersión. *Revista Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4(4), 262-266.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107–1121.
- Gordon, M., & Taylor, J. (1952). Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. *Journal of Applied Chemistry*, 2(9), 493-500.
- Guadarrama-Lezama, A.Y., Cruz-Olivares, J., Martínez-Vargas, S.L., Carrillo-Navas, H., Román-Guerrero, A., Pérez-Alonso, C. (2014). Determination of the minimum integral entropy, water sorption and glass transition temperature to establishing critical storage conditions of beetroot juice microcapsules by spray drying. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(3), 405-416.
- Hirasa, K., & Takemasa, M. (2002). *Ciencia y tecnología de las especias*. Acribia. Segunda edición. Capítulo 3.
- Hyun, M., Ding, G., Hong, L., Yun, C., Jae, K., Kyungmin, J., Jung, E., Cheol, Y., Chong, C.

- (2009). Alpha-eleostearic acid suppresses proliferation of MCF-7 breast cancer cells via activation of PPAR $\alpha$  and inhibition of ERK 1/2. *Cáncer Science*, 101(2), 396-402.
- Jafari, S., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B. (2008). Encapsulation efficiency of food flavours and oils during Spray Drying. *Drying Technology*, 26(7), 816–835.
- Jafari, R.A. (2010). Revisión: Microencapsulación de alimentos. *Facultad Nacional de Agronomía de Medellín*, 63(2), 5669–5684.
- Kabalnov, A.S. (1998). Coalescence in emulsions, in modern aspects of emulsion science. Cambridge (Reino Unido).
- Kaewmanee, T., Bagnasco, L., Benjakul, S., Lanteri, S., Morelli, C.F., Speranza, G., Cosulich, M.E. (2014). Characterisation of mucilages extracted from seven Italian cultivars of flax. *Food Chemistry*, 148, 60-69.
- Kaushik, P., Dowling, K., Barrow, C., Adhikari, B. (2015). Complex coacervation between flaxseed protein isolate and flaxseed gum. *Food Research International*, 72, 91-97.
- Khounvilay, K., Sittikijyothin, W. (2012). Rheological behaviour of tamarind seed gum in aqueous solutions. *Food Hydrocolloids*, 26(2), 334-338.
- Kuang, S.S., Oliveira, J.C., Crean, A.M. (2010). Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(10), 951–968.
- Kulkarni, G.T., Gowthamarajan, K., Dhobe, R.R., Yohanan, F., Suresh, B. (2005). Development of controlled release spheroids using natural polysaccharide as release modifier. *Drug Delivery*, 12(4), 201-206.
- Kumar, P., Battu, G., Lova, K. (2011). Isolation and Evaluation of Tamarind Seed Polysaccharide being used as a Polymer in Pharmaceutical Dosage Forms. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Science*, 2(2), 274-290.
- Madene, A., Scher, J., Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 4(1), 1-21.
- Márquez-Ruiz, G., Velasco, J., Holgado, F. (2010) Aceites microencapsulados. Capítulo vol. III - Aplicaciones en “Temas selectos en Aceites y Grasas”. Editorial Blucher
- McClements, D.J. (1999). Food emulsions: principles, practice and techniques. Boca Raton (Florida): CRC Press.
- McClements, D.J. (2005). Food emulsions. Principles, practices, and techniques (2nd ed.). Boca Raton (Florida): CRC Press.
- Manchanda, R., Arora, S., Manchanda, R. (2014). Tamarind Seed Polysaccharide and its Modifications-Versatile Pharmaceutical Excipients—A Review. *International Journal of Pharmaceutical Technology Research*, 6(2), 412-420.
- Mahan, L.K. & Escott-Stump, S. (1998). Nutrición y Dietoterapia de Krausse. 9a Edición. McGraw-Hill Interamericana. Ciudad de México.
- Milanović, J., Petrović, L., Sovilj, V., Katona, J. (2014). Complex coacervation in gelatin/sodium caseinate mixtures. *Food Hydrocolloids*, 37, 196-202.
- Monroy, A., Cano, C., Alamilla, L., Hernández, H., Gutiérrez, G. (2014). Coupled Taguchi-RSM optimization of the conditions to emulsify  $\alpha$ -Tocopherol in an Arabic gum-Maltodextrin matrix by microfluidization. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(3), 679-688.
- Mozafari, M.R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G.G., Cui, J., Pardakhty, A., Yurdugul, S. (2008). Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties*, 11(4), 833-844.
- Murúa, B., Beristain, C., Martínez, F. (2009). Preparation of starch derivatives using reactive



- extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 91(3), 380–386.
- Nazzaro, F., Orlando, P., Coppola, R., Fratianni, F. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 182-186.
- Ordaz-Galindo, A., Wesche-Ebeling, P., Wrolstad, R.E., Rodríguez-Saona, L., Argáiz-Jamet, A. (1999). Purification and identification of Capulín (*Prunus serotina Ehrh*) anthocyanins. *Food Chemistry*, 65, 201-206.
- Parize, A., Rozone, T., Costa, I., Fávere, V., Laranjeira, M., Spinelli, A., Longo, E. (2008). Microencapsulation of the natural urucum pigment with chitosan by spray drying in different solvents. *African Journal of Biotechnology*, 7(17), 3107-3114.
- Patel, T., Morris, G., Ebringerova, A., Vodenicarova, M., Velabny, V., Ortega, A. (2008). Global conformation analysis of irradiated xyloglucans. *Carbohydrate Polymers*, 74, 845-851.
- Pérez-Alonso, C. Baez.-Gonzalez, J. G. Beristain, C.I. Vernon-Carter, E.J. Vizcarra-Mendoza, M.G. (2003). Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, 53,197–203.
- Pérez-Alonso, C., Cruz-Olivares, J., Barrera-Pichardo, J.F., Rodríguez-Huezo, M.E., Báez-González, J.G., Vernon-Carter, E.J. (2008). DSC thermo-oxidative stability of red chilli oleoresin microencapsulated in blended biopolymer matrices. *Journal of Food Engineering*, 85(4), 613-24.
- Phani, G., Gangarao, B., Kotha, N. (2011). Isolation and evaluation of tamarind seed polysaccharide being used as a polymer in pharmaceutical dosage forms. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2(2), 274-290.
- Philips, G.O., & Williams, P.A. (2000). Handbook of Hydrocolloids. Boca Raton (Florida): CRC press.
- Prajapati, V., Jani, G, Moradiya, N., Randeria, N., (2013). Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1685– 1699.
- Raya, J., Aguirre, C., Tapia, R., Ramírez, J., Covarrubias, J. (2012). Caracterización de las proteínas de reserva y composición mineral de la semilla de capulín (*Prunus serotina*). *Polibotánica*, 34, 203-215.
- Rishabh, M., Pranati, S., & Kulkarni, G.T. (2011). Applications of mucilages in drug delivery—A review. *Advances in Biological Research*, 5(1), 1–7.
- Rivera, J., Rodríguez, F., Rendon, R., García, E., Solorza, J. (2014). Thermal, structural and rheological properties of sorghum starch with cactus mucilage addition. *LWT - Food Science and Technology*, 1-7.
- Rocha, C. M., Souza, H. K., Magalhães, N. F., Andrade, C. T., & Gonçalves, M. P. (2014). Rheological and structural characterization of agar/whey proteins insoluble complexes. *Carbohydrate Polymers*, 110, 345-353.
- Rodea-González, D.A., Cruz-Olivares, J., Román-Guerrero, A., Rodríguez-Huezo, M.E., Vernon-Carter, E. J., Pérez-Alonso, C. (2012). Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 102–109.
- Roldan-Cruz, C., Carmona-Ascencio, J., Vernon-Carter E.J., Alvarez-Ramirez, J. (2016). Electrical impedance spectroscopy for monitoring the gumArabic–chitosan complexation process in bulk. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 495, 125-135.

- Rustan, A.C., & Drevon, C.A. (2005). Fatty acids: Structures and properties. In Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons, Ltd.
- Salehi F. y Kashaninejad M., (2014). Effect of Different Drying Methods on Rheological and Textural Properties of Balangu Seed Gum, *Drying Technology: An International Journal*, 32:6, 720-727
- Shantha, N., & Decker E. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77(2), 421-24.
- Sharma, M., Mondal, D., Mukesh, C., Prasad, K. (2014). Preparation of tamarind gum based soft ion gels having thixotropic properties. *Carbohydrate polymers*, 102, 467-471.
- Tadros, T. F. (2009). *Emulsion science and technology: a general introduction*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Timilsena, Y., Wang, B., & Adhikari, R. (2016). Preparation and characterization of chia seed protein isolate chia seed gum complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 52, 554-563.
- Timilsena, Y. P., Wang, B., Adhikari, R., Adhikari, B. (2017). Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-rich plant oils using complex coacervation: A review. *Food Hydrocolloids*, 69, 372-377.
- Weinbreck, F., Tromp, R. H., & De Kruijff, C. G. (2004). Composition and structure of whey protein/gum arabic coacervates. *Biomacromolecules*, 5(4), 1437-1445.
- Xiao, Z., Liu, W., Zhu, G., Zhou, R., Niu, Y. (2014). A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(8), 1482-1494.
- Zhang, T., Gao, Y., Mao, Y., Zhang, Q., Lin, C., Lin, P., Zhang, J., Wang, X. (2011). Growth inhibition and apoptotic effect of alpha-eleostearic acid on human breast cancer cells. *Journal of Natural Medicines*, 66(1), 77-84.

**PARTE 5:**  
**“ANEXOS”**

**ANEXO A.**  
**ESTUDIO DE EMULSIONES**

## CINÉTICA DE COALESCENCIA

En la figura A1 se muestra el cambio en el tamaño promedio volumétrico de partícula ( $D_{4,3}$ ) de las emulsiones usando como agente emulsionante los complejos formados por WPI-TSM y WPI-GA durante 30 días de monitoreo. En ambas emulsiones existe un ligero incremento en el tamaño de partícula (TP) en el tiempo de estudio desde 4.07 hasta 5.06  $\mu\text{m}$  y de 9.78 a 10.01  $\mu\text{m}$  para las emulsiones WPI-TSM y WPI-GA, respectivamente. La emulsión WPI-GA presenta mayor TP que la emulsión WPI-TSM debido a que la interacción atractiva en el complejo WPI-GA es mayor en condiciones óptimas de formación, de acuerdo a lo corroborado en los estudios de turbidez.

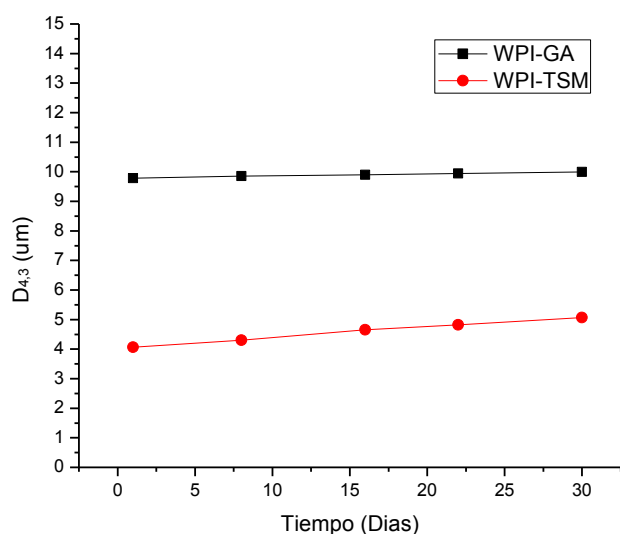


Figura A1. Cambio en el tamaño de gota ( $\ln D_{4,3}$ ) con respecto al tiempo, de las emulsiones de los complejos

Para conocer la velocidad con la que incrementa el tamaño de gota de las emulsiones a través del tiempo, se ajustaron los datos de tiempo (s) y tamaño de partícula ( $D_{4,3}$ ) a una cinética de coalescencia de primer orden [ $t$  vs  $\ln(D_{4,3})$ ]. En la tabla A1 se presentan los valores de la constante cinética de orden uno ( $K_C$ ) de las emulsiones, así como su respectivo coeficiente de determinación ( $R^2$ ), encontrando un correcto ajuste de los datos ( $R^2 \sim 1$ ) a una cinética de primer orden. La emulsión WPI-GA es ligeramente más estable a través del tiempo que la emulsión WPI-TSM debido a que el valor de  $K_C$  es menor.

Algunos autores han demostrado que entre mayor sea la estabilidad de la emulsión, mejor será la eficiencia de encapsulamiento (EE); sin embargo, en la emulsión WPI-TSM se obtuvo menor TP que es indicio para mejorar la EE en el proceso de microencapsulación de lípidos. Por este motivo es necesario realizar pruebas para determinar cuál es el efecto que tiene mayor impacto en la EE.

Tabla A1. Parámetros de la cinética de coalescencia de 1° orden de emulsiones o/w

<b>Muestra emulsión</b>	<b><math>K_c (s^{-1})</math></b>	<b><math>R^2</math></b>
WPI – TSM	$2.7 \times 10^{-7}$	0.9891
WPI – GA	$2.4 \times 10^{-8}$	0.9894

## PROPIEDADES REOLÓGICAS DE LAS EMULSIONES

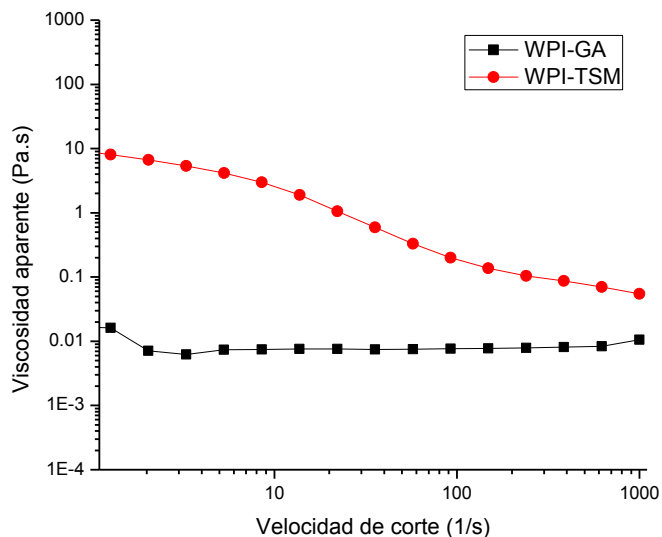


Figura A2. Curvas de flujo de las emulsiones WPI-TSM y WPI-GA

La relación entre la viscosidad aparente y la velocidad de corte de las emulsiones aceite de capulín usando los complejos WPI-TSM y WPI-GA se presenta en la figura A2. La emulsión estabilizada con WPI-TSM exhibe valores iniciales de viscosidad 100 veces mayores que la emulsión WPI-GA. La mayor viscosidad observada se puede relacionar con el alto contenido proteínico de TSM con respecto a la GA. Las dispersiones base-proteína, se asocian con una mayor retención de agua y la capacidad de generar enlaces que contribuyen a aumentar la viscosidad del medio.

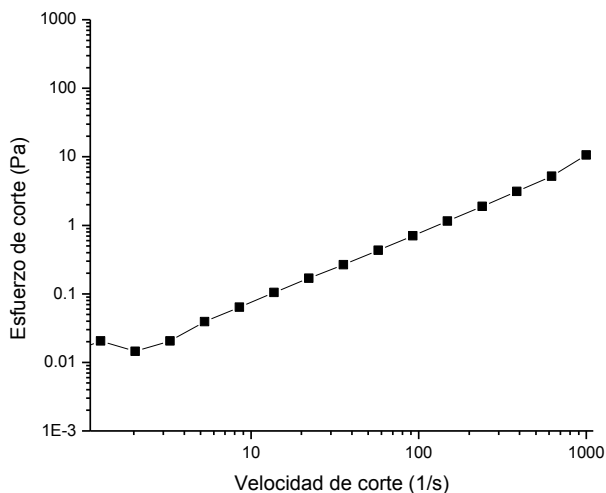


Fig. A3 Ajuste a parámetros reológicos de la emulsión WPI-GA

Respecto a las curvas de flujo se observa que los complejos impulsaron la formación de emulsiones con diferentes comportamientos. Por tanto, fue necesario ajustarlos a diferentes modelos reológicos. La ley de potencia fue usada para analizar las propiedades de flujo de la emulsión WPI-GA, mostrando una tendencia hacia un comportamiento de fluido newtoniano. De acuerdo a los resultados del índice de comportamiento de flujo (Tabla A2), existe una relación lineal entre el esfuerzo y la velocidad de corte debido a que el valor de  $n$  es cercano a 1 ( $n \sim 1$ ).

Ecuación A1  $\rightarrow \tau = k\dot{\gamma}^n$

Tabla A2. Parámetros de la «Ley de potencia»

Muestra emulsión	$K$	$n$	$R^2$
WPI – GA	8.2	0.9972	0.9894

Donde:  $\dot{\gamma}$  = Vel. Corte (1/s)

$\tau$  = Esfuerzo Corte (Pa)

$k$  = Coef. de consistencia (mPas <sup>$n$</sup> )

$n$  = Índice comportamiento de flujo

Sin embargo, el proceso de emulsificación usando el complejo WPI-TSM promovió la formación de un sistema con características pseudoplásticas (Figura A4). Se considera que un material pseudoplástico es aquel en el que la viscosidad decrece conforme la velocidad de corte aumenta. Esta característica se atribuye a una estructura reversible o una red que tiende al equilibrio. Cuando el material es expuesto a un esfuerzo, la estructura se rompe, resultando en un comportamiento esfuerzo-dependiente.

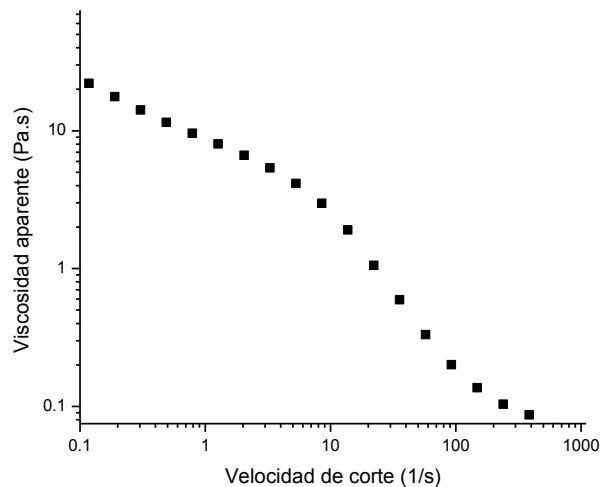


Fig. A4 Curva de flujo de la emulsión WPI-TSM



El modelo reológico de Carreau representa adecuadamente los datos experimentales de la emulsión WPI-TSM ( $R^2 > 0.98$ ). Los valores de los parámetros del modelo de Carreau están dados en la Tabla A3. El bajo valor del índice de flujo ( $n \ll 1$ ) corrobora que la emulsión WPI-TSM muestra un comportamiento alejado del fluido newtoniano

Tabla A3. Parámetros del «Modelo de Carreau»

Muestra emulsión	$\eta_{\infty}$	$\eta_0$	$\Lambda$	$n$	$R^2$
WPI – TSM	54.0	$63 \times 10^3$	58.36	0.242	0.988

Donde:  $\dot{\gamma}$  = Vel. Corte (1/s)

Ecuación A2  $\rightarrow \eta = \eta_0 + \frac{\eta_{\infty} - \eta_0}{[1 + (\lambda\dot{\gamma})^2]^n}$

$\eta$  = Viscosidad aparente (Pa·s)  
 $\lambda$  = cte. relajación de floculación (s)  
 $\eta_0$  = Viscosidad inicial (mPa·s)  
 $\eta_{\infty}$  = Viscosidad final (mPa·s)  
 $n$  = Índice comportamiento de flujo

La viscosidad de la emulsión puede afectar la eficiencia de encapsulamiento porque al incrementar la viscosidad a un valor óptimo, se reduce la oscilación y la circulación de las gotas internas, mejorando la retención del aceite. En contraste, un incremento excesivo en la viscosidad decrece la retención del aceite debido a una formación más lenta de gota y a una mayor exposición durante el secado por aspersión.

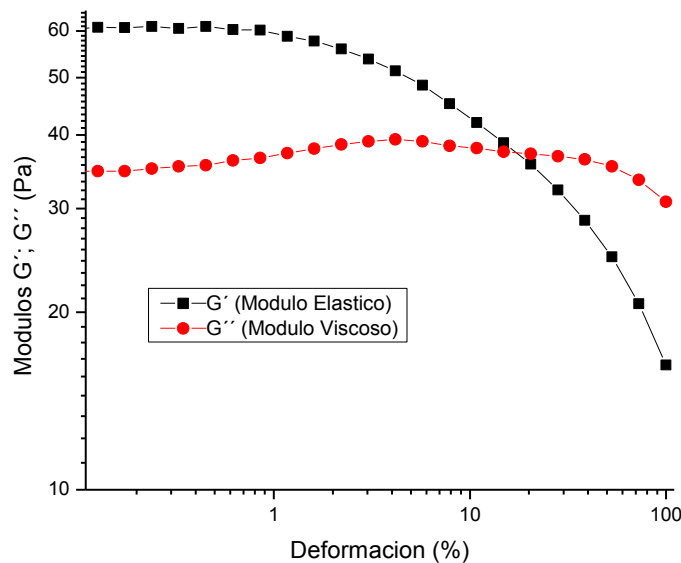


Fig. A5 Dependencia de la Tensión de los Módulos viscoelásticos en la emulsión WPI-TSM

Respecto a las propiedades dinámicas de las emulsiones, las muestras de los complejos fueron sometidos a un barrido de deformación en un rango de 0.1-100% bajo una frecuencia constante de 1.0 Hz y una temperatura de 25°C. La emulsión WPI-TSM presentó el típico comportamiento de un gel débil (Fig. A5), mostrando un comportamiento de adelgazamiento a la deformación. La emulsión se caracterizó por presentar una región viscoelástica lineal (RVL) donde  $G'$  y  $G''$  exhiben valores constantes a pequeñas deformaciones, seguida por una región viscoelástica no lineal caracterizada por una inflexión de los módulos a valores elevados de deformación. Los valores de  $G'$  predominaron por arriba de los valores de  $G''$  hasta un 20% de deformación, indicando que el comportamiento fue predominantemente elástico a ese porcentaje de deformación. Termodinámicamente, significa que la energía que se pierde en la emulsión es menor a la energía que se almacena hasta 20% de deformación de la muestra. Contrariamente, a porcentajes de deformación mayores a 20%, las propiedades viscosas predominan sobre las elásticas.

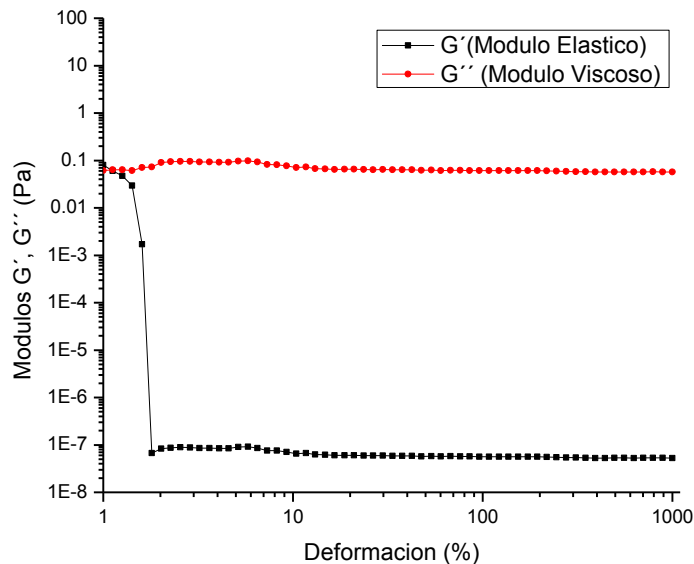


Fig. A6 Dependencia de la Tensión de los Módulos viscoelásticos en la emulsión WPI-GA

La emulsión WPI-GA presenta un comportamiento elástico al inicio de la deformación hasta 1% de deformación (Fig. A6). Sin embargo, existe un decremento drástico en las propiedades elásticas desde 2% de deformación, predominando el comportamiento viscoso a partir de este punto. Este comportamiento de adelgazamiento drástico podría deberse a una posible microseparación de fases de la estructura del complejo causada por el esfuerzo de deformación.

**ANEXO B.**  
**ESTUDIO DE MICROCÁPSULAS**

## DETERMINACIÓN DE T<sub>g</sub>

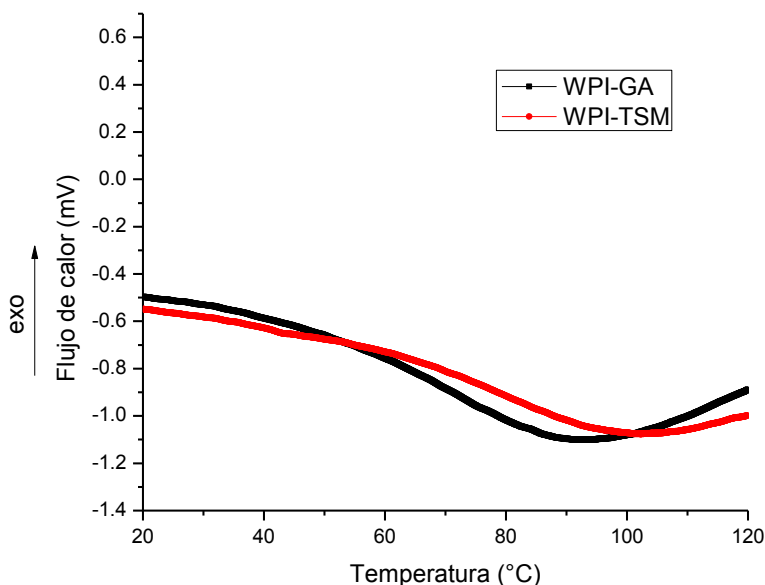


Fig. B1 Curvas endotérmicas de las microcápsulas de WPI-TSM y WPI-GA a flujo cte. de N<sub>2</sub>

Las curvas DSC obtenidas de las partículas usando como material de pared los complejos WPI-TSM y WPI-GA, permiten observar modificaciones en el flujo de calor debido a cambios en la capacidad calorífica de las temperaturas de transición de fase (Fig. B1).

La temperatura a la cual el material de pared cambia de un estado vítreo amorfo a un estado gomoso, se conoce como temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>). La T<sub>g</sub> es afectada por diferentes factores como lo es el peso molecular, la estructura química y el contenido de humedad del material. La evaluación de T<sub>g</sub> en los materiales en polvo es de gran importancia debido a que si la temperatura del medio excede la T<sub>g</sub>, pueden ocurrir cambios negativos en sus propiedades físicas como pegajosidad, cristalización, apelmazamiento o colapso estructural.

Las T<sub>g</sub> fueron registradas del punto medio del rango de transición vítrea. La microcápsula WPI-TSM exhibió mayor T<sub>g</sub> que la microcápsula WPI-GA, obteniendo 74 y 65°C, respectivamente. Es probable que el mucílago de tamarindo incremente la T<sub>g</sub> debido a que, entre ambos materiales de pared, es el que posee el mayor peso molecular y la T<sub>g</sub> esta positivamente relacionada con el peso molecular. Materiales con mayor T<sub>g</sub> producen partículas que son más estables durante el procesamiento y, más importante, durante el almacenamiento.

## ESTABILIDAD TÉRMICA ACELERADA

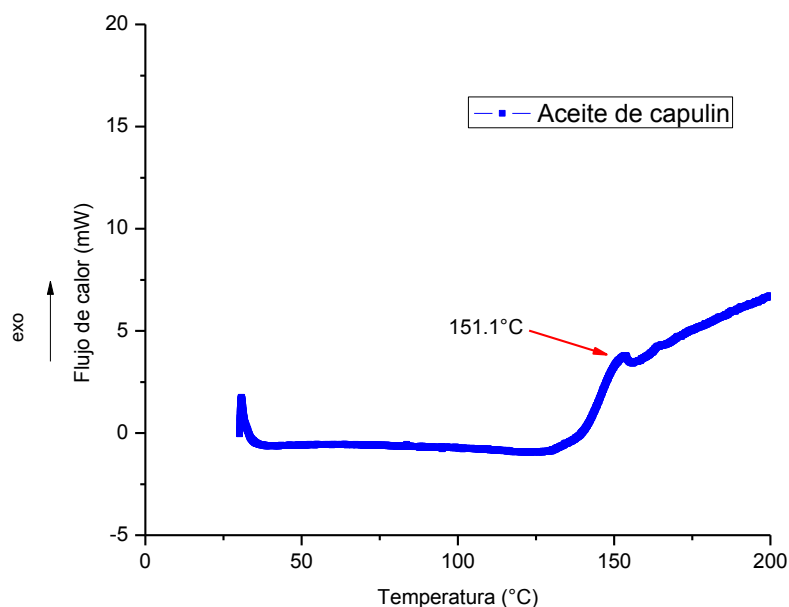


Fig. B2 Termograma oxidativo del aceite de capulín

El proceso de autooxidación de los aceites es un proceso de tipo exotérmico, en el que el calor de reacción generado puede ser medido en función de la temperatura. La figura B2 muestra los termogramas del flujo de calor en función de la temperatura del aceite de capulín sin microencapsular a un flujo constante de oxígeno. En la gráfica se observan tres zonas importantes, una en la que la pendiente de la curva se eleva gradual y lentamente, de forma similar a lo que ocurre durante el periodo de inducción del proceso autooxidativo. Otra, en la que se produce un cambio brusco de la pendiente con un gran incremento del flujo de calor, coincidiendo con el periodo de iniciación. Y la última etapa donde se produce el pico más alto de flujo de calor correspondiente a la máxima oxidación del aceite. El aceite de capulín puro mostró un pico exotérmico máximo bien definido a 151.1°C, indicando el proceso de oxidación.

La figura B3 muestra los termogramas de las microcápsulas WPI-TSM y WPI-GA. Se exhiben dos picos exotérmicos definidos. El primero corresponde a la oxidación del aceite de capulín microencapsulado, que para ambos sistemas de microcápsulas se encuentra aproximadamente a 185.1°C. El cual ocurre a mayor temperatura que la del aceite sin microencapsular, indicando que el aceite de capulín es menos estable no encapsulado que cuando está microencapsulado. El

segundo pico exotérmico es de mayor intensidad y se lleva a cabo a temperatura mucho más alta que el primero ( $\sim 300.7^{\circ}\text{C}$ ). Estos picos máximos exotérmicos observados son debido a la degradación del material de pared (complejos coacervados).

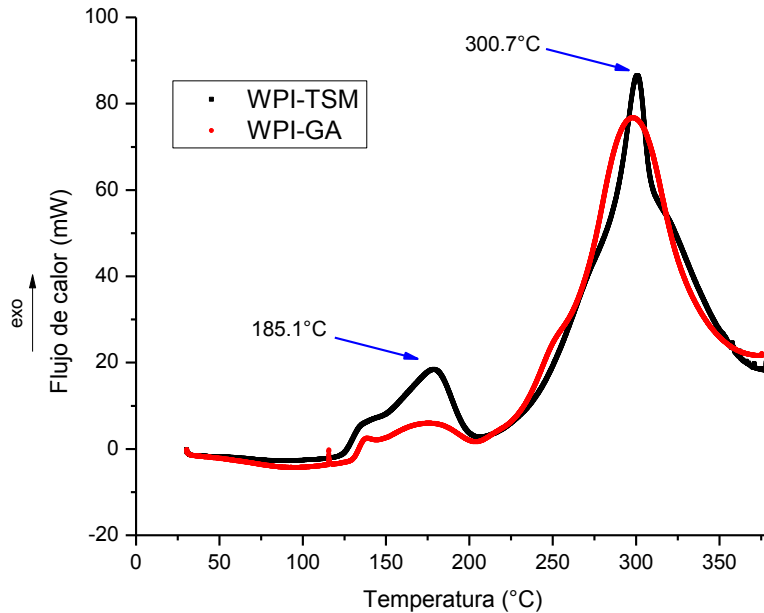


Fig. B3 Termograma oxidativo de las microcápsulas de WPI-TSM (línea roja) y WPI-GA (línea negra)

A pesar de que el análisis termooxidativo permitió demostrar que el aceite microencapsulado presenta mejoría en su estabilidad oxidativa con respecto al aceite sin microencapsular ( $185.1^{\circ}\text{C}$  vs  $151.1^{\circ}\text{C}$ ), no fue posible conocer cuál de las dos microcápsulas (WPI-TSM ó WPI-GA) presentó mejor estabilidad oxidativa. Por tanto es necesario realizar un análisis cuantitativo para conocer más a profundidad la estabilidad oxidativa de ambas microcápsulas, como se muestra a continuación.

## ESTUDIO DE ACEITE RETENIDO Y ESTABILIDAD OXIDATIVA DE MICROCÁPSULAS

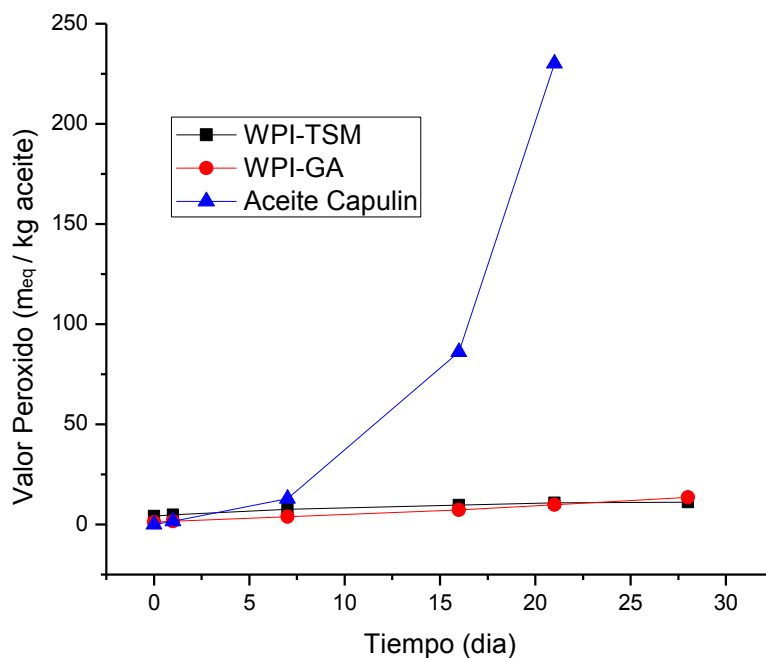


Fig. B4 Perfil oxidativo de las microcápsulas y del aceite de capulín puro almacenado a 35°C

El aceite de capulín puro y las microcápsulas WPI-TSM y WPI-GA fueron almacenadas por 30 días para evaluar su estabilidad oxidativa a 35°C y los resultados se muestran en la figura B4. Para ambos sistemas de microcápsulas, no hubo incremento significativo en el valor de peróxidos (PV, por sus siglas en inglés) a lo largo del tiempo de estudio. En contraste, el aceite de capulín puro exhibió una etapa de iniciación de aproximadamente 6 días de estudio. Después de este periodo de tiempo, se identifica un incremento notable en el PV atribuida a la fase de propagación de hidroperóxidos. Estos resultados ponen de manifiesto la eficacia de los complejos WPI-TSM y WPI-GA para retardar significativamente la difusión de agentes oxidantes en el interior de las microcápsulas, confirmando la eficiencia de la microencapsulación en proteger el aceite de capulín contra la oxidación lipídica.

Se determinó el orden de reacción de la formación de hidroperóxidos mediante la oxidación del aceite puro y del aceite microencapsulado. Los datos de la figura B2 se ajustaron a modelos cinéticos de orden cero y uno (ecuación B1 y B2):

$$C_{HP} = -k_{HP}t + C_{HP_0} \quad \dots \text{ (Ecuación B1)}$$

$$\ln(C_{HP}) = \ln(C_{HP_0}) - k_{HP}t \quad \dots \text{ (Ecuación B2)}$$

Donde  $C_{HP_0}$  es el valor PV inicial al día 0;  $C_{HP}$  es PV después del tiempo ( $t$ );  $k_{HP}$  es la constante de velocidad de formación de hidroperóxidos, que se obtiene a partir de la pendiente de la gráfica de PV en función del tiempo.

Tabla B1. Parámetros de la cinética de oxidación del aceite de capulín

Material	$k_{HP}$	$R^2$	Orden de reacción
WPI-TSM (Microcápsula)	$2.22 \times 10^4$ (mEq/kg aceite·s)	0.9372	Cero
WPI-GA (Microcápsula)	$3.73 \times 10^4$ (mEq/kg aceite·s)	0.9927	Cero
Aceite Capulín (No microencapsulado)	$2.21 \times 10^4$ (1/s)	0.9836	Uno

La tabla B1 resume los parámetros cinéticos del aceite encapsulado y no-encapsulado. Con respecto a ambos sistemas de microcápsulas, se observa que ambas siguieron cinéticas de orden cero. Esto significa que la velocidad de formación de hidroperóxidos es independiente de la concentración del aceite y solamente podría depender de factores ambientales (temperatura, actividad de agua, etc).

La microcápsula WPI-TSM provee mejor protección a la oxidación a largo plazo que la microcápsula WPI-GA, debido a que es menor la constante de velocidad de reacción,  $k_{HP}$ . A pesar de que inicialmente la microcápsula WPI-GA presento valores de PV (1.13 mEq/kg ac.) menores que WPI-TSM (4.18 mEq/kg ac.). Sin embargo, el comportamiento se invierte al cabo de 30 días de estudio (11.16 y 13.6 mEq/kg ac. para WPI-GA y WPI-TSM, respectivamente).



Tabla B2. Eficiencia del proceso de encapsulamiento del aceite de capulín

<b>Material</b>	<b>Aceite Superficial</b>	<b>Aceite total</b>	<b>Eficiencia de encapsulamiento (%)</b>
WPI-TSM (Microcápsula)	0.2896 g (5.8%)	1.6259 g	82.19%
WPI-GA (Microcápsula)	0.3297 g (6.5%)	1.7074 g	80.69 %

El aceite superficial (SO) y el contenido de aceite total (TO), y la eficiencia de encapsulamiento (EE) de las microcápsulas secadas por aspersión, se muestran en la Tabla B2. Aunque las microcápsulas WPI-GA mostraron mayor contenido de TO, las microcápsulas WPI-TSM presentaron menor contenido de SO (5.8%), y mayor eficiencia de encapsulamiento (82.1%) comparado con el sistema WPI-GA.

En general, a mayor contenido de aceite superficial se generan valores mayores de peróxido. Esto está relacionado con la menor EE obtenida en las microcápsulas WPI-GA que conduce a una pobre protección contra la oxidación lipídica a tiempos prolongados de exposición. Este aceite no-encapsulado, cuando entra en contacto con oxígeno, es mucho más susceptible a la oxidación del aceite que el aceite encapsulado. Cuando es aceite es encapsulado en una matriz vítrea, algunas partículas de aceite se pueden oxidar rápidamente, mientras otras se oxidan más lentamente debido a la heterogeneidad en el grado de encapsulación.

## FT-IR DE LAS MICROCÁPSULAS

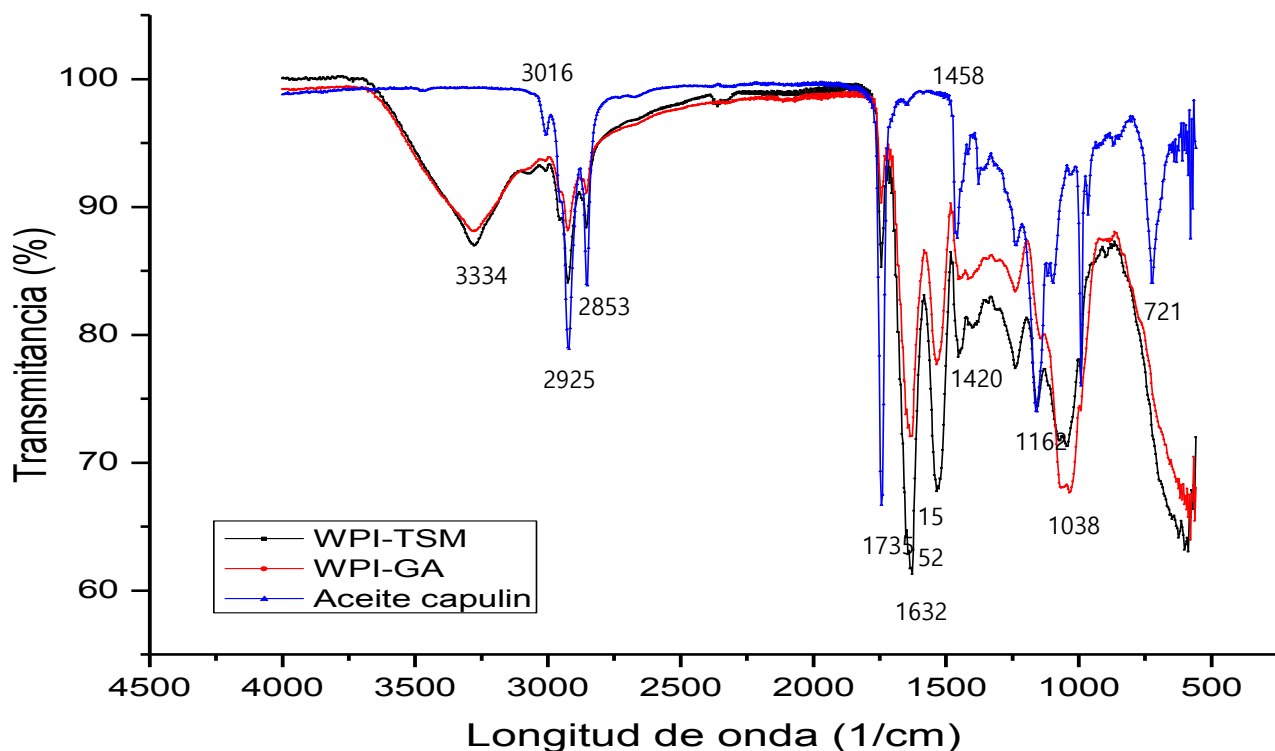


Fig. B5 FTIR de aceite de capulín, microcápsulas WPI-TSM y microcápsulas WPI-GA

En la Fig. B5 se muestra la caracterización estructural del aceite de capulín sin encapsular y del aceite microencapsulado usando los complejos WPI-TSM y WPI-GA mediante espectrofotometría FT-IR.

El espectro del aceite de capulín reveló picos a  $\sim 3016 \text{ cm}^{-1}$  correspondientes a vibraciones de tensión C-H, y a  $2925$  y  $2853 \text{ cm}^{-1}$  vibración de tensión asimétrica y simétrica asignadas a los grupos metilo C-H. Las bandas a  $1458$  y  $1735 \text{ cm}^{-1}$  se refieren a las vibraciones de flexión de los grupos  $\text{CH}_2$  y a las vibraciones de tensión C=O, respectivamente. La banda a  $1162 \text{ cm}^{-1}$  puede atribuirse a las vibraciones de tensión del grupo éster C-O y a  $721 \text{ cm}^{-1}$  corresponden a las vibraciones de flexión de las cadenas  $\text{CH}_2$ , las cuales aparecen cuando se presentan más de siete átomos de carbono en la molécula.

Los espectros de los polisacáridos mostraron una banda ancha a  $\sim 3334 \text{ cm}^{-1}$  correspondiente a tensiones O-H de los grupos hidroxilo. La banda a  $1420 \text{ cm}^{-1}$  representa la tensión del grupo

carboxilo, que se encuentran comúnmente en los polisacáridos y confieren características aniónicas a la macromolécula.

Durante la coacervación compleja, los grupos amino de WPI interactúan con los grupos carboxilo tanto de ambos polisacáridos para formar un complejo que contiene un enlace amida. Los picos característicos de amidas en el espectro de las microcápsulas se pueden visualizar a  $1632\text{ cm}^{-1}$  (Amida I) y a  $1552\text{ cm}^{-1}$  (Amida II) confirmando la formación del complejo coacervado. Sin embargo, la presencia de un pico característico de los ésteres C-O-C a  $1038\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de las microcápsulas (aunque en menor intensidad), sugirió que parte de los grupos carboxilo de ambos polisacáridos no participaron en la formación del complejo.

Los espectros de las microcápsulas exhibieron bandas que aparecen en el aceite de capulín a la misma longitud de onda, pero en menor intensidad, debido a la cantidad de aceite encapsulado. Los resultados sugieren que el aceite está atrapado en ambos complejos, lo que confirma la eficacia del proceso de microencapsulación por coacervación compleja utilizado en este trabajo. Además, los espectros FT-IR demostraron que el aceite de capulín y el complejo WPI-TSM y WPI-GA han interactuado durante la formación de las microcápsulas.

## MORFOLOGÍA DE LAS MICROCÁPSULAS

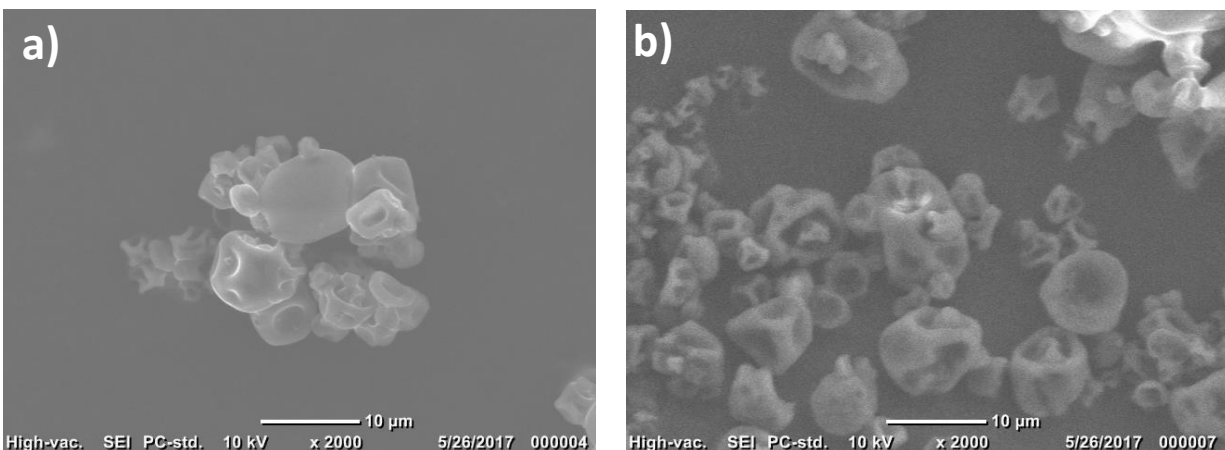


Fig. B6 SEM de: a) Microcápsulas WPI-TSM; b) Microcápsulas WPI-GA

El análisis de las imágenes SEM revela que en ambos sistemas no hay evidencia de grietas en la superficie de las partículas producidas por el secado por aspersión, lo que es importante para asegurar baja permeabilidad de los compuestos volátiles y por tanto mejor protección del aceite interior. Las partículas obtenidas mediante secado por aspersión generalmente generan estructuras esféricas y con vacuolas, las cuales se relacionan a la expansión del aire dentro de las partículas durante las primeras etapas del secado. Aunque la forma final de las partículas depende en gran medida de las propiedades del material de pared usado.

En general, las microcápsulas WPI-TSM (Figura B6a) y WPI-GA (Figura B6b) exhibieron formas semi-esféricas. Sin embargo, se distinguen variaciones en la rugosidad de la superficie de las microcápsulas. Esto puede deberse a que las microcápsulas WPI-GA presenta una estructura ligeramente más porosa e irregular que las microcápsulas WPI-TSM. La estructura porosa hace más fácil que el oxígeno se difunda a través de una pared porosa para acceder al aceite encapsulado, debilitando la estabilidad oxidativa a largo plazo. Esto podría explicar porque las microcápsulas WPI-GA presentan relativamente menor estabilidad oxidativa a largo plazo con respecto a las microcápsulas WPI-TSM.

**ANEXO C.**  
**ARTÍCULO PUBLICADO**