



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

**POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA**

**PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y FUNCIONALES DE COACERVADOS
TERNARIOS: PROTEÍNA DE AMARANTO-PECTINA-POLIFENOLES DE
CACAO**

TESIS

**Que como requisito parcial
para obtener el grado de:**



DOCTORA EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS



Presenta:

KARLA GARCÍA DE LA ROSA

Bajo la supervisión de: LANDY HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, DRA.



Chapingo, Estado de México, diciembre de 2024

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y FUNCIONALES DE COACERVADOS
TERNARIOS: PROTEÍNA DE AMARANTO-PECTINA-POLIFENOLES DE
CACAO

Tesis realizada por **KARLA GARCÍA DE LA ROSA** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

DIRECTOR: 
DRA. LANDY HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

ASESOR: 
DRA. CONSUELO S. O. LOBATO CALLEROS

ASESOR: 
DR. E. JAIME VERNON CARTER

ASESOR: 
DR. JUAN CARLOS CUEVAS BERNARDINO

LECTOR EXTERNO: 
DRA. MONZERRAT ROSAS ESPEJEL

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	viii
DEDICATORIA.....	x
AGRADECIMIENTOS.....	xi
DATOS BIOGRÁFICOS	xii
RESUMEN GENERAL.....	xiii
GENERAL ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Objetivo general.....	3
1.2. Objetivos específicos.....	3
1.3. Hipótesis.....	4
1.4. Capítulos de tesis	4
1.5. Literatura citada	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
2.1. Proteínas vegetales	7
2.1.1. Generalidades	7
2.1.2. Obtención de proteínas vegetales	9
2.1.3. Aplicaciones tecnológicas de proteínas vegetales	10
2.2. Pectinas.....	11
2.2.1. Características fisicoquímicas y funcionales de pectinas	11
2.2.2. Aplicaciones tecnológicas de pectina de cáscara de cacao	13
2.3. Polifenoles	14
2.3.1. Origen y extracción.....	14
2.3.2. Características funcionales de extractos fenólicos	16
2.4. Coacervación compleja	18
2.4.1. Generalidades	18
2.4.2. Formación de complejos coacervados	19

2.5. Caracterización de coacervados.....	20
2.5.1. Propiedades fisicoquímicas.....	21
2.5.2. Propiedades funcionales	26
2.6. Literatura citada	30
3. AMARANTH PROTEIN-CACAO PECTIN/PHENOLIC EXTRACT COMPLEX	36
3.1. Summary	36
3.2. Introduction	37
3.3. Materials and Methods	38
3.3.1. Procurement of vegetal materials.....	38
3.3.2. Chemicals reagents.....	38
3.3.3. Amaranth protein isolate extraction	39
3.3.4. Pectin extraction from the cacao pod husk.....	40
3.3.5. Physicochemical characterization of pectin from cacao pod husk....	40
3.3.6. Phenolic extract (PE) obtention	41
3.3.7. Ternary complex coacervates formation	41
3.3.8. Determination of pH for complex coacervates formation	42
3.3.9. Turbidimetric measurements for complex coacervates formation.....	42
3.3.10. Physicochemical characterization of complex coacervates	42
3.3.11. Statistical analysis	46
3.4. Results and discussion	46
3.4.1. Proximal chemical composition of cacao pod husk flour (CPF), cacao seed shell flour (CSF), and cacao pod husk pectin (CP).....	46
3.4.2. ζ -potential measurements	47
3.4.3. Turbidimetric measurements	50
3.4.4. Yield, moisture content and protein	51
3.4.5. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).....	52
3.4.6. Microstructure and particle size	55
3.4.7. Colorimetry	57
3.4.8. Antioxidant activity	58
3.5. Conclusions	61
3.6. Acknowledgments.....	62
3.7. Funding.....	62

3.8. Conflict of interest	62
3.9. Authors' contribution	62
3.10. References	62
4. PROPIEDADES FUNCIONALES DE COMPLEJOS COACERVADOS TERNARIOS FORMADOS POR PROTEÍNA-PECTINA-POLIFENOL DE ORIGEN VEGETAL	69
4.1. Resumen	69
4.2. Introducción	71
4.3. Materiales y Métodos.....	72
4.3.1. Materiales.....	72
4.3.2. Extracción de aislado de proteína de amaranto	73
4.3.3. Extracción de pectina de la cáscara de la vaina de cacao	73
4.3.4. Obtención de extractos fenólicos	73
4.3.5. Formación de complejos coacervados	74
4.3.6. Propiedades funcionales de los complejos coacervados	74
4.3.7. Análisis estadístico	79
4.4. Resultados y discusión	79
4.4.1. Actividad antioxidante.....	79
4.4.2. Eficiencia de encapsulación (EE)	82
4.4.3. Condiciones Gastrointestinales Simuladas (CGS)	82
4.4.4. Determinación de la viscosidad aparente.....	83
4.4.5. Capacidad de formación de espuma	84
4.4.6. Propiedades emulsionantes	88
4.4.7. Determinación de la solubilidad.....	90
4.5. Conclusiones	90
4.6. Agradecimientos	91
4.7. Literatura citada	91
5. CONCLUSIONES GENERALES	95

LISTA DE CUADROS

Table 1. Proximal chemical composition cacao pod husk flour (CPF), cacao seed shell flour (CSF), and pod husk pectin (CP).....	47
Table 2. Mean values of yield, moisture contents, protein of complex coacervates.	52
Table 3. Antioxidant compounds in phenolic extract (PE).	60
Cuadro 4. Porcentaje de inhibición de ABTS ⁺ y DPPH• en función del tiempo de almacenamiento de complejos coacervados y extracto fenólico.....	81
Cuadro 5. Porcentaje de inhibición de ABTS ⁺ después de condiciones gastrointestinales simuladas (CGS) de complejos coacervados y extracto fenólico.	83
Cuadro 6. Capacidad espumante, emulsionante y solubilidad de complejos coacervados.....	86

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. a) ζ -potential as a function of pH of amaranth protein (●), cacao pod husk pectin (◇), phenolic extract of cacao shell/husk (□). b) ζ -potential of CC _{a/b} as a function of pH.....	49
Fig. 2. Change in the absorbance of supernatants from solution (1%, m/m) of amaranth protein (AP) and cacao pod husk pectin (CP) at different AP:CP ratios as a function of pH.	51
Fig. 3. FTIR spectra of phenolic extract of cacao shell/husk (PE), cacao pod husk pectin (CP), amaranth protein isolate (AP), and complex coacervate variations (CC _{a/b}).	54
Fig. 4. SEM micrographs of complex coacervates variations (CC _{a/b}), with different AP to CP mass ratios (a/b): CC _{2:1/0.1} (a), CC _{2:1/0.5} (b), CC _{5:1/0.1} (c), CC _{5:1/0.5} (d). Amplitude: 5000× (1) and 10000× (2).	56
Fig. 5. Chromatogram of silylated compounds present in the cacao shell/husk extract (PE).	58
Figura 6. Micrográficas ópticas (10x) de espumas de PA y CC _{a/b} a 0, 30 y 60 min.	87
Figura 7. Variación del índice de cremado de CC _{a/b} en función del tiempo.....	89

ABREVIATURAS

PA	Proteína de amaranto
CC	Complejos coacervados
CEE	Capacidad de expansión de la espuma
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas
CGS	Condiciones gastrointestinales simuladas
PC	Pectina de cáscara de cacao
CPF	Harina de cáscara de vaina de cacao
CSF	Harina de cascarilla de cacao
DA	Grado de acetilación
DAm	Grado de amidación
DDW	Agua destilada
DE	Grado de esterificación
Dh	Diámetro hidrodinámico
EE	Eficiencia de encapsulación
FTIR	Espectroscopía de Infrarrojo por transformada de Fourier
GAE	Equivalente de ácido gálico
IAE	Índice de actividad emulsionante
IC	Índice de cremado
IEE	Índice de estabilidad de emulsión

IV	Incremento de volumen de la espuma
MeO	Porcentaje de metoxilos
PAM	Pectina de alto metoxilo
PBM	Pectina de bajo metoxilo
EF	Extracto fenólico
PEE	Porcentaje de estabilidad de la espuma
PE _{libre}	Extracto fenólico libre
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TPC	Contenido fenólico total

DEDICATORIA

A mis papás, Margarita y Carlos, como un tributo a su amor, su ejemplo de vida es una influencia fundamental en mi formación profesional y crecimiento personal.

A mis hermanos, Carlos, Rosalva, Isaac, Lorena, Alejandra y Emmanuel, por su fraternidad, compañerismo y porque hacen que la vida tenga matices de todos los colores.

A mi compañero de vida, Daniel, con cariño, por el apoyo y amor incondicional que me has brindado, por hacer de los momentos más simples algo maravilloso.

Karla García de la Rosa.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo por haberme brindado la oportunidad de formarme y crecer profesionalmente en un entorno académico de excelencia.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el financiamiento otorgado que me permitió realizar mis estudios de posgrado.

Al Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria por abrirme sus puertas para seguir formándome profesionalmente.

A la Dra. Landy Hernández Rodríguez, por su dirección, guía y apoyo en este proyecto de investigación. Su dedicación, profesionalismo y la confianza depositada en mí, han sido inspiración y motivación para mi desarrollo como profesional.

A la Dra. Consuelo Lobato Calleros, por sus comentarios y observaciones acertados que permitieron fortalecer el trabajo de investigación.

Al Dr. Juan Carlos Cuevas Bernardino, por su valiosa contribución y acompañamiento para la mejora de este proyecto.

Al Dr. E. Jaime Vernon Carter, por su vasta experiencia y colaboración en la revisión y proceso de publicación del proyecto de investigación.

A la Dra. Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez, por brindarme parte de su valioso tiempo y conocimiento en el laboratorio.

A los profesores del posgrado por la labor que hacen para formar investigadores, y al personal por el apoyo brindado en cuestiones administrativas.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Karla García de la Rosa
Fecha de nacimiento: 17 de Junio 1991
Lugar de nacimiento: Metepec, Estado de México
CURP: GARK910617MMCRSR04
Profesión: Licenciatura en Nutrición y Dietética
Cédula profesional: 09150999 (Licenciatura),
12391252 (Maestría)



Desarrollo académico

Bachillerato: Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Toluca, Sede Metepec. 2006-2009.
Licenciatura: Nutrición y Dietética. Universidad del Valle de Toluca. 2009-2013.
Maestría: Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo. 2018-2020.

Experiencia profesional

Facilitadora de campo como especialista en nutrición en el Proyecto Estratégico de Seguridad Alimentaria (PESA) en localidades de alta marginación de Veracruz y en el Proyecto de Seguridad Alimentaria para Zonas Rurales (PSAZR) en el Estado de México.

RESUMEN GENERAL

Propiedades fisicoquímicas y funcionales de coacervados ternarios: proteína de amaranto-pectina-polifenoles de cacao¹

Se formaron complejos coacervados ternarios (CC) entre aislado de proteína de amaranto (PA)-pectina de cáscara de cacao (PC)-extracto fenólico de cáscara/cascarilla de cacao (EF), con dos relaciones en peso PA:PC (2:1 y 5:1 p / p), distintas concentraciones de EF (0.0, 0.1 y 0.5 % p / v), ajustando el pH a 3. Se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas y funcionales. Los valores de potencial- ζ se acercaron a la neutralidad de carga, evidenciando interacciones electrostáticas entre los biopolímeros. Los espectros FTIR de CC mostraron cambios en las bandas en comparación con los espectros individuales (PA, PC y EF) confirmando la formación de CC. Los CC mostraron una microestructura heterogénea y porosa, exhibiendo agregados más pequeños en la relación 2:1 (PA:PC). El tamaño de partícula aumentó a medida que aumentaba la relación en peso PA:PC y la concentración de EF, variando de 1070.3 ± 21.9 a 1893.0 ± 40.3 nm. La actividad antioxidante de los CC disminuyó levemente conforme pasó el tiempo de almacenamiento (3.3 ± 2.8 a 17.6 ± 2.0 %) a diferencia del EF no encapsulado (EF_{libre}) que presentó una disminución del 64.7 ± 3.5 %. Se observó que la relación en peso 5:1 (PA:PC) fue la mejor para encapsular (76.25 %) y asegurar que la matriz polimérica protegiera al EF. El EF_{libre} presentó la mayor pérdida de actividad antioxidante (> 80 %) después de condiciones gastrointestinales (CGS) en comparación al EF protegido por CC. Se evidenció una mayor capacidad de expansión de espuma (CEE), índice de actividad emulsionante (IAE) e índice de estabilidad de emulsión (IEE) a medida que aumentó la relación en peso de 2:1 a 5:1 (PA:PC), así como un menor % de índice de cremado (IC). Estos hallazgos proporcionan información para el desarrollo de nuevos alimentos con propiedades funcionales específicas.

Palabras clave: actividad antioxidante, pectina de cacao, coacervación compleja, espectroscopía, extracto fenólico

GENERAL ABSTRACT

Physicochemical and functional properties of ternary coacervates: amaranth protein-pectin- cacao polyphenols²

Ternary coacervate complexes (CC) were formed between amaranth protein isolates (AP)-cacao pod husk pectin (CP)-cacao husk/shell phenolic extract (PE), with two weight ratios AP:CP (2:1 and 5:1 w/w), different concentrations of PE (0.0, 0.1 and 0.5 % w/v), adjusting the pH to 3. Their physicochemical and functional properties were evaluated. The ζ -potential values approached charge neutrality, evidencing electrostatic interactions between the biopolymers. The FTIR spectra of CC showed shifts in the bands compared to the individual spectra (AP, CP and PE), confirming the formation of CC. The CC exhibited a heterogeneous and porous microstructure, featuring smaller aggregates in a 2:1 ratio (AP:CP). The particle size increased as the AP:CP weight ratio and PE concentration increased, ranging from 1070.3 ± 21.9 to 1893.0 ± 40.3 nm. The antioxidant activity of CC decreased slightly with storage time (3.3 ± 2.8 to 17.6 ± 2.0 %) compared to non-encapsulated PE (PE_{free}), which showed a decrease of 64.7 ± 3.5 %. It was observed that the 5:1 weight ratio (AP:CP) was the most effective for encapsulating (76.25%) and ensuring that the polymeric matrix protected the PE. The PE_{free} presented the most significant loss of antioxidant activity (> 80 %) after gastrointestinal conditions (SGC) compared to PE protected by CC. A higher foam expansion capacity (FEC), emulsifying activity index (EAI) and emulsion stability index (ESI) were evident as the weight ratio increased from 2:1 to 5:1 (AP:CP), as well as a lower % creaming index (CI). These findings provide information for the development of new foods with specific functional properties.

Keywords: antioxidant activity, cacao pectin, complex coacervation, spectroscopy, phenolic extract

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las proteínas y polisacáridos son ingredientes imprescindibles en los sistemas alimentarios; las proteínas tienen poca estabilidad al estrés ambiental como el pH, presencia de sales, calor y congelamiento. Por el contrario, los polisacáridos proporcionan una buena estabilidad en estas condiciones, sin embargo, estos son requeridos en altas concentraciones. Cuando ambas macromoléculas están presentes en las matrices alimentarias, pueden desarrollar nuevas estructuras de segregación, miscibilidad o asociación a través de interacciones, proporcionando mejores propiedades fisicoquímicas y funcionales en comparación a compuestos individuales (Niu et al., 2018). Estas interacciones se pueden llevar a cabo de forma controlada mediante la formación de complejos coacervados, los cuales son estructuras originadas por la asociación de biopolímeros con carga opuesta a través de interacciones electrostáticas, lo que resulta en la separación de la dispersión coloidal en dos fases, una fase sérica en equilibrio y una fase precipitada (Koralegedara et al., 2020). Los biopolímeros con carga positiva más utilizados para la formación de coacervados son usualmente proteínas de origen animal, como la germenina, proteínas del lactosuero y ovoalbúmina. Las proteínas de origen vegetal se han utilizado cada vez más y se extraen comúnmente a partir del chícharo, chíca, linaza, soya y canola. Por otro lado, entre los biopolímeros con carga negativa ampliamente usados podemos encontrar a la carragenina, carboximetilcelulosa, goma arábiga y pectina comercial (Muhoza et al., 2020), sin embargo, debido al origen y la naturaleza química de los biopolímeros, los coacervados tienen efectos positivos y negativos sobre la solubilidad, formación de espuma, eficiencia de encapsulación, estructuración, actividad antioxidante, entre otras propiedades funcionales (Lan et al., 2020a; Muriel et al., 2020; Vargas et al., 2021).

En este sentido, diferentes biopolímeros podrían formar coacervados con propiedades diferentes a las presentadas por biopolímeros de uso frecuente. En específico, a partir del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus spp.*) se puede obtener un aislado de proteína con un alto valor nutricional debido a su contenido de lisina, además de metionina, triptófano y un bajo porcentaje de gliadina (0.01 %) (Motta et al., 2019). Es preciso destacar que son pocos los trabajos sobre coacervación en donde se evalúe el uso de aislado de proteína de amaranto, por ello es necesario desarrollar investigaciones que estudien su interacción con otros biopolímeros (Hadidi et al., 2024).

En particular, la pectina se ha utilizado con proteínas para formar redes altamente interconectadas para mejorar la funcionalidad de ambos biopolímeros (Lan et al., 2020b). La pectina se puede extraer mediante un proceso verde a partir de residuos agroindustriales los cuales son propensos a contribuir en la contaminación ambiental (Trujillo-Ramírez et al., 2018). En México, la industria del cacao genera alrededor de 22,000 t de residuos anualmente (SIAP, 2023) que pueden ser aprovechados. De los subproductos del cacao como la cáscara de vaina, que representa el 67 a 76 % se puede extraer pectina. Además, de la cascarilla de semilla (2.1 a 2.3 %) y cáscara de vaina se pueden obtener otras sustancias de interés alimenticio y nutricional como polifenoles (Manzano et al., 2017), los cuales presentan actividad antioxidante, antimicrobiana y antiinflamatoria (Zhang et al., 2024). Estos compuestos se degradan fácilmente por la exposición a la luz, el oxígeno, la temperatura y el pH (Pan-Utai y lamtham, 2020). Por lo anterior, la formación de conjugados ternarios proteína-polisacárido-polifenol podría representar un método de protección contra estas condiciones (Yan et al., 2023).

Con base en lo anterior, el presente trabajo se desarrolló con los objetivos planteados en la sección 1.1 y 1.2.

1.1. Objetivo general

Formar complejos coacervados ternarios de proteína de amaranto-pectina de cáscara de cacao-extracto fenólico de cáscara/cascarilla de cacao y evaluar sus propiedades fisicoquímicas mediante la determinación de rendimiento, contenido de proteína, humedad, potencial- ζ , tamaño de partícula, espectroscopía Infrarroja, microestructura, colorimetría y actividad antioxidante, así como sus propiedades funcionales a través de la eficiencia de encapsulación, capacidad antioxidante condiciones gastrointestinales simuladas, viscosidad aparente, capacidad espumante, propiedades emulsionantes y solubilidad, con la finalidad de generar una tecnología que contribuya a su adecuada aplicación en el diseño de nuevos alimentos con los atributos deseados.

1.2. Objetivos específicos

- ✓ Estimar los parámetros para la formación de complejos coacervados de proteína de *Amaranthus hypochondriacus* L. variedad Revancha y pectina de cáscara de *Theobroma cacao* L. mediante la medición del potencial- ζ y análisis turbidimétrico.
- ✓ Formar complejos coacervados y encapsular extractos fenólicos de subproductos (cáscara y cascarilla) de *Theobroma cacao* L.
- ✓ Caracterizar sus propiedades fisicoquímicas (rendimiento, contenido de proteínas, humedad, potencial- ζ , tamaño de partícula, espectroscopía Infrarroja, microestructura, colorimetría y actividad antioxidante).
- ✓ Caracterizar sus propiedades funcionales (eficiencia de encapsulación, capacidad antioxidante con respecto al tiempo de almacenamiento, condiciones gastrointestinales simuladas, viscosidad aparente, capacidad espumante, propiedades emulsionantes y solubilidad).

1.3. Hipótesis

Debido a la interacción electrostática entre las moléculas con cargas positivas del aislado de proteína de amaranto y las cargas superficiales negativas de la pectina de cáscara cacao y extracto fenólico de cáscara y cascarilla de cacao se llevará a cabo la formación de complejos ternarios con capacidades fisicoquímicas y funcionales mejoradas.

1.4. Capítulos de tesis

El presente documento de tesis consta de cuatro capítulos:

Capítulo 1: Corresponde a la introducción general sobre el tema de investigación, incluyendo brevemente el planteamiento y justificación del problema. Además, se redacta el objetivo general, objetivos específicos e hipótesis que conducen al desarrollo de la investigación.

Capítulo 2: Presenta la revisión de literatura sobre las generalidades de las proteínas vegetales, pectinas y extractos fenólicos, donde se describe el método de obtención, aplicaciones tecnológicas, características fisicoquímicas y funcionales. Posteriormente, se desarrolla el tema de interés, el cual es la formación de complejos coacervados, así como las propiedades fisicoquímicas y funcionales que presentan.

Capítulo 3: Conciernen al primer artículo científico derivado de la investigación realizada. En este apartado, se especifican los parámetros para la formación de coacervados, asimismo, se presentan los datos de la evaluación de sus propiedades fisicoquímicas como rendimiento, contenido de proteínas, humedad, potencial- ζ , tamaño de partícula, espectroscopía infrarroja, microestructura, colorimetría y actividad antioxidante. También se publica el cromatograma derivado del análisis de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-EM) para la identificación de compuestos fenólicos de la muestra de extracto fenólico obtenido a partir de cáscara y cascarilla de cacao.

Capítulo 4: Se presenta el segundo artículo científico derivado de la investigación, en donde se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de las propiedades funcionales de los coacervados como actividad antioxidante con respecto al tiempo de almacenamiento, eficiencia de encapsulación, condiciones gastrointestinales simuladas, viscosidad aparente, capacidad de formación de espuma, propiedades emulsionantes y determinación de solubilidad.

1.5. Literatura citada

- Hadidi, M., Aghababaei, F., Mahfouzi, M., Zhang, W., & McClements, D. J. (2024). Amaranth proteins: From extraction to application as nanoparticle-based delivery systems for bioactive compounds. *Food chemistry*, 439, 138164. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138164>
- Koralegedara, I. D., Hettiarachchi, C. A., Prasantha, B. D. R., & Wimalasiri, K. M. S. (2020). Synthesis of nano-scale biopolymer particles from legume protein isolates and carrageenan. *Food Technology and Biotechnology*, 58(2), 214-222. <https://doi.org/https://doi.org/10.17113/ftb.58.02.20.6279>
- Lan, Y., Ohm, J.-B., Chen, B., & Rao, J. (2020). Phase behavior, thermodynamic and microstructure of concentrated pea protein isolate-pectin mixture: Effect of pH, biopolymer ratio and pectin charge density. *Food Hydrocolloids*, 101, 105556. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105556>
- Manzano, P., Hernández, J., Quijano-Avilés, M., Barragán, A., Chóez-Guaranda, I., Viteri, R., & Valle, O. (2017). Polyphenols extracted from *Theobroma cacao* waste and its utility as antioxidant. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(1), 45-50. <https://doi.org/https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-04-388>
- Motta, C., Castanheira, I., Gonzales, G. B., Delgado, I., Torres, D., Santos, M., & Matos, A. S. (2019). Impact of cooking methods and malting on amino acids content in amaranth, buckwheat and quinoa. *Journal of Food Composition and Analysis*, 76, 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.10.001>
- Muhoza, B., Xia, S., Wang, X., & Zhang, X. (2020). The protection effect of trehalose on the multinuclear microcapsules based on gelatin and high methyl pectin coacervate during freeze-drying. *Food Hydrocolloids*, 105, 105807. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107239>
- Muriel, M. J. L., Liu, J., Tan, Y., Zhou, H., Zhang, Z., & McClements, D. J. (2020). Characterization of electrostatic interactions and complex formation of γ -poly-glutamic acid (PGA) and varepsilon-poly-L-lysine (PLL) in aqueous solutions. *Food Research International*, 128, 108781. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108781>

- Niu, F., Kou, M., Fan, J., Pan, W., Feng, Z. J., Su, Y., Yang, Y., & Zhou, W. (2018). Structural characteristics and rheological properties of ovalbumin-gum arabic complex coacervates. *Food chemistry*, 260, 1-6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.141>
- Pan-Utai, W., & Iamtham, S. (2020). Enhanced Microencapsulation of C-Phycocyanin from *Arthrospira* by Freeze-Drying with Different Wall Materials. *Food Technology and Biotechnology*, 58(4), 423-432. <https://doi.org/10.17113/ftb.58.04.20.6622>
- SIAP. (2023). *Progress of sowing and harvesting, summary by state*. Mexico: Agri-Food and Fisheries Information Service Retrieved from http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do
- Trujillo-Ramírez, D., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., Hernández-Rodríguez, L., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2018). Complexation with whey protein hydrolysate improves cacao pods husk pectin surface active and emulsifying properties. *Reactive and Functional Polymers*, 123, 61-69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.12.011>
- Vargas, S. A., Delgado-Macuil, R. J., Ruiz-Espinosa, H., Rojas-Lopez, M., & Amador-Espejo, G. G. (2021). High-intensity ultrasound pretreatment influence on whey protein isolate and its use on complex coacervation with *kappa* carrageenan: Evaluation of selected functional properties. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 70, 105340. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105340>
- Yan, S., Regestein, J. M., Qi, B., & Li, Y. (2023). Construction of protein-polysaccharide- and polyphenol-based conjugates as delivery systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2293253>
- Zhang, M., Zhang, H., Jia, L., Zhang, Y., Qin, R., Xu, S., & Mei, Y. (2024). Health benefits and mechanisms of theobromine. *Journal of Functional Foods*, 115. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106126>

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Proteínas vegetales

2.1.1. Generalidades

Las proteínas son biopolímeros compuestos por aminoácidos, unidades básicas que forman a las proteínas unidos por enlaces peptídicos. Se considera proteína cuando en su estructura, se unen más de 50 aminoácidos, los cuales están conformados por un α -carbono (-C-) unido a un grupo amino (-NH₂), un grupo carboxilo (-COOH), un átomo de hidrógeno (-H) y un grupo radical (-R). Por lo tanto, las proteínas son macromoléculas compuestas principalmente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Sin embargo, pueden contener azufre, hierro, fósforo, cobre, magnesio, entre otros elementos (Damodaran y Parkin, 2019).

Las proteínas desempeñan un papel nutricional esencial para los seres humanos, ya que llevan a cabo diferentes funciones en el organismo (estructurales, enzimáticas, transportadoras, de almacenamiento, etc.) (FAO/WHO/UHU, 2007). Las proteínas se diferencian entre sí por la secuencia y cantidad de aminoácidos, que hacen que su estructura se pliegue adquiriendo una forma tridimensional (globular o fibrosa), lo que les permite llevar a cabo diversas funciones. En general, las proteínas se componen de 21 aminoácidos diferentes, clasificados como esenciales y no esenciales, sin embargo, no todas las proteínas contienen los 21 aminoácidos. A través de la dieta se adquieren los aminoácidos esenciales (fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano, valina e histidina), ya que el organismo no los puede producir por sí mismo (Motta et al., 2019). Las proteínas de alto valor biológico son aquellas en la que se encuentran los aminoácidos esenciales. A lo largo del tiempo, los alimentos de origen animal

han sido considerados como la mejor fuente de proteínas, sin embargo, a pesar de que son de alta calidad biológica se han relacionado como factores de riesgo para la salud, intolerancias digestivas, alergias alimentarias, además de un impacto negativo al medio ambiente (McClements y Grossmann, 2021). Por otro lado, las proteínas de origen vegetal han ganado relevancia, considerándose como una alternativa a aquellas de origen animal, por su alta digestibilidad y bajo costo de producción (Condés et al., 2012). De acuerdo con Thakur et al. (2023), en los últimos años, el consumo de proteínas de origen vegetal ha ido en aumento, por lo cual se han realizado investigaciones sobre su aporte a la salud humana, destacando sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, las cuales benefician al sistema gastrointestinal e inmunológico, además disminuyen el riesgo de padecer enfermedades no transmisibles (diabetes mellitus, hipertensión, dislipidemias, cáncer, etc.). Los alimentos de origen vegetal que contienen proteínas son: almendras, cacahuates, nueces, semillas de cáñamo, girasol, linaza, frijol, soya, chícharos, habas, trigo, maíz, arroz, avena, chía, quinoa, amaranto, entre otros (Kyriakopoulou et al., 2019). De los alimentos anteriores es preciso destacar al amaranto, un pseudocereal con un contenido de 15 a 17 % de proteína de excelente calidad ideal para la alimentación humana (FAO, 2020) en especial para la nutrición infantil, ya que contiene los 9 aminoácidos esenciales, entre los que destacan lisina, metionina e histidina, con una digestibilidad del 75 % proporcionando una alta biodisponibilidad (Hadidi et al., 2024). Los aminoácidos se encuentran en las principales proteínas de almacenamiento conformadas por albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas (Motta et al., 2019).

Las proteínas, además de ser esenciales en la nutrición humana, también presentan propiedades funcionales como solubilidad, viscosidad, gelación, emulsificación, espumado, capacidad retención de grasa, adhesión-cohesión, elasticidad y absorción de agua. Por lo que son un ingrediente indispensable en diversos productos alimenticios. Estas propiedades se relacionan con las características estructurales y fisicoquímicas de las proteínas (Muhoza et al., 2022).

Por lo anterior es importante estudiar las propiedades físicas, químicas, nutricionales y funcionales de las proteínas, además de los cambios que sufren durante su extracción y procesamiento (Damodaran y Parkin, 2019).

2.1.2. Obtención de proteínas vegetales

Para aprovechar las características tecno-funcionales y nutricionales de las proteínas vegetales es necesaria su extracción. En general, se utilizan métodos físicos, químicos o enzimáticos para extraer proteínas de vegetales. Sin embargo, se han preferido métodos físicos por su simplicidad, alta reproducibilidad y bajo costo. Estos métodos incluyen corte a alta velocidad, homogeneización, solubilización y precipitación (Malik y Singh, 2022). Normalmente, las fracciones proteicas se extraen de las proteínas de almacenamiento mediante solubilización, la cual se ve condicionada por enlaces peptídicos, composición superficial, carga eléctrica, e interacciones intermoleculares. Debido a lo anterior, el proceso de extracción se lleva a cabo mediante solubilización en agua, solución salina, hidroalcohólica y ácido/base; obteniendo albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas, respectivamente (Motta et al., 2019).

El método de extracción de proteínas va a depender del tipo de proteínas de almacenamiento presentes en el vegetal y de lo que se requiera obtener, ya sea un aislado o un concentrado. La mayoría de los cereales presentan prolaminas en su composición, en cambio en los pseudocereales, como el amaranto, hay principalmente albúminas y globulinas (Deleu et al., 2019). De acuerdo con Suárez et al. (2020), la metodología mayormente utilizada para obtener proteína vegetal es la solubilización alcalina y su posterior precipitación isoelectrica, en donde la carga neta superficial de la proteína es igual a cero. En particular, para extraer proteína de amaranto se utiliza una solución alcalina en un intervalo de pH entre 8 y 11. Posteriormente, para llevar a cabo su precipitación, se ajusta el pH entre 4 y 6, punto isoelectrico de la proteína (Aceituno-Medina et al., 2013).

2.1.3. Aplicaciones tecnológicas de proteínas vegetales

Las características tecnológicas y funcionales de las proteínas vegetales son importantes por su aplicación en matrices alimentarias por brindar atributos deseables como textura, color, capacidad para encapsular sustancias bioactivas (vitaminas, probióticos, antioxidantes, etc.), sustituto de grasa, retención de agua, entre otros (Yan et al., 2023). Las proteínas concentradas o aisladas se utilizan como aditivo a sistemas alimenticios, solas o en conjunto con otros biopolímeros (proteínas, polisacáridos y grasas) contribuyendo a su estructuración a través de sus interacciones. En particular, se ha observado que la mezcla de proteínas con polisacáridos proporciona mejores propiedades que los biopolímeros de forma individual (Lan et al., 2020).

Las proteínas pueden tener cambios estructurales al ser añadidas a las matrices alimentarias, por lo que el tipo de interacción de las proteínas con otros compuestos va a ser fundamental para su aplicación tecnológica. Las proteínas con una mayor solubilidad tienen una mayor capacidad de fijación de agua, por lo cual se pueden emplear para aumentar el valor nutricional de las bebidas y productos lácteos, incrementar la viscosidad de salsas, aderezos, sopas y postres, así mismo, proveer humectación a productos de panificación por la capacidad de retención de agua (Barac et al., 2015).

Las proteínas se adsorben en la interfase aceite-agua o aire-agua, formando una película, aumentando la capacidad de formar emulsiones y espumas, por ello se emplean para elaboración de aderezos, embutidos, estabilizar emulsiones aceite en agua (nata, mayonesa, crema, leche), helados, confitería, crema para batir, etc. Las interacciones entre proteína y otros biopolímeros, pueden ser hidrofóbicas, iónicas, puentes de hidrógeno y puentes disulfuro, generando excelentes propiedades de gelificación, cohesión, adhesión y elasticidad, por lo tanto, se pueden agregar a quesos, carnes, flanes, pan, crema, yogur, entre otros (Cáñez-Carrasco et al., 2016; Chaquilla et al., 2018).

2.2. Pectinas

2.2.1. Características fisicoquímicas y funcionales de pectinas

La pectina es un heteropolisacárido con una estructura conformada por una cadena lineal principal de ácido D-galacturónico esterificado con unidades de metanol, unido mediante enlaces α -(1-4) glucosídicos, contiene en menor cantidad azúcares neutros como D-galactosa, L-arabinosa y D-ramosa que constituyen a las cadenas ramificadas. Las pectinas se clasifican dependiendo del grado de esterificación (DE), con un contenido de ésteres de metilo mayor al 50 % se identifican como alto metoxilo (PAM), con un % menor a 50 se clasifican como bajo metoxilo (PBM) (Xu et al., 2018). El GE y el contenido de ácido galacturónico se relacionan con el porcentaje de metoxilos (MeO) y grado de acetilación (DA) que pueden sustituir a los grupos de ácidos carboxílicos en los residuos de ácido galacturónico (Singhal y Swami, 2022). La composición química, rendimiento y propiedades de la pectina varían dependiendo de su origen, método de extracción y tratamiento posterior. Los parámetros principales que afectan las propiedades funcionales de la pectina son el grado de ramificación de las cadenas, peso molecular, DE, grado de acetilación (DA), grado de amidación (DAm) y cantidad de proteína. En particular, el GE influye sobre la solubilidad, las propiedades gelificantes y emulsificantes de la pectina, ya que afecta a la tensión superficial. Además, se ha observado que un mayor grado de ramificación de la cadena principal afecta la viscosidad, gelificación y solubilidad, debido a que se limita el grado de asociación entre las cadenas (Frosi et al., 2023).

Las pectinas modifican reológicamente las matrices alimentarias ya que puede aumentar o disminuir la viscosidad de su sistema (Figuerola y Genovese, 2018), mediante la intervención en la movilidad del agua, debido a que estas partículas coloidales tienen la capacidad de retenerla, por lo anterior se les conoce como hidrocoloides (Damodaran y Parkin, 2019).

Dependiendo de la clasificación de las pectinas, se requieren condiciones específicas para que se lleve a cabo la formación de redes tridimensionales (gel) en las que quede atrapada el agua. Al utilizar PAM se necesita adicionar al medio un ácido para mantener un pH entre 2.5 a 3.8, contenido de azúcares alrededor de 65 %, y sólidos solubles entre 55 y 85 %, lo anterior contribuye en la disminución de la repulsión electrostática de las moléculas, al reducir la disociación de grupos carboxilos, aumentando la asociación entre las cadenas que formaran la red en la cual quedará atrapada la solución acuosa. Para que la PBM forme una estructura de gel estable en forma de “caja de huevo”, requiere la presencia de iones calcio y una concentración de sacarosa baja o nula, ya que si es elevada tiende a pre- gelificarse (Abid et al., 2017).

Las pectinas también presentan propiedades espesantes, estabilizantes, emulsionantes, de glaseado, además, tienen la capacidad de biodegradabilidad, una característica que presentan los materiales orgánicos de descomponerse en sustancias simples o sencillas por actividad enzimática de microorganismos (García-García et al., 2023).

Se han utilizado métodos químicos, microbiológicos y enzimáticos para la extracción de pectina. No obstante, la forma más común de extraerla de los residuos agroindustriales es por hidrólisis ácida, en la cual se utilizan diversos solventes como ácido clorhídrico, acético, nítrico, fosfórico, láctico, cítrico, entre otros. Sin embargo, actualmente las investigaciones se centran en el uso de ácidos orgánicos, para cumplir con los principios de la química verde (Singhal y Swami, 2022). Las condiciones experimentales que conducen a la obtención de mayores rendimientos son temperatura de 85 a 90 °C durante 90 minutos, pH de 2.5 a 3.0 y su posterior precipitación mediante etanol (Frosi et al., 2023; Gonzalez et al., 2022).

Las pectinas se encuentran en la pared celular, tejido de vegetales y frutas; se pueden extraer de la pulpa, albedo y cáscara de distintas fuentes botánicas. Entre los frutos más utilizados podemos encontrar a los cítricos, manzana y betabel, también se ha obtenido pectina a partir de guayaba, maracuyá, piña, tejocote,

tomate, entre otros (Abid et al., 2017; García-García et al., 2023). En la actualidad, se ha estudiado el uso de residuos agroindustriales alternativos para la extracción de pectina, sobre todo aquellos que generan grandes cantidades de subproductos y que no tienen un manejo adecuado, lo que puede causar problemas ambientales. En especial, el cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo importante en diversos países de África, Asia y América. Particularmente, en México se generan alrededor de 22,000 t de desechos (Frosi et al., 2023; SIAP, 2023), la cáscara representa del 67 al 76 % del fruto del cacao, con un contenido de pectina del 59 %, además de otras sustancias de interés alimenticio y nutricional (Campos-Vega et al., 2018)

2.2.2. Aplicaciones tecnológicas de pectina de cáscara de cacao

La pectina se utiliza en la industria agrícola, textil, cosmética, farmacéutica y alimentaria, como agente de recubrimiento, espesante, gelificante, emulsionante, estabilizante, de glaseado, modificador de textura y por su biodegradabilidad. Originalmente se empleaba para la elaboración de mermelada, jalea y confitería, sin embargo, su uso se ha expandido a productos de panadería, repostería, lácteos, gelatinas, bebidas, salsas, conservas, además de jabones y productos desechables (Dubey et al., 2020; Singhal y Swami, 2022).

La pectina es un ingrediente esencial en la industria alimentaria por sus propiedades tecno-funcionales. En el mercado existen diferentes tipos de pectinas que proveen al producto alimenticio de distintas propiedades fisicoquímicas y funcionales. Al extraer pectinas de nuevas fuentes botánicas, es necesario que cumpla con los estándares establecidos para ser consideradas de calidad alimentaria, el contenido de ácido galacturónico debe ser mayor al 65 %, además de especificar el GE, GAm, GA y MeO (Trujillo-Ramírez et al., 2018).

Se ha empleado PBM para la elaboración de jaleas, gelatinas, mermeladas y otros productos con bajo contenido de azúcar, ya que no se requiere adicionar azúcares para su gelificación (Damodaran y Parkin, 2019). Mientras que de la PAM se ha estudiado su posible uso como prebiótico funcional, además de

portador de fármacos mediante la desesterificación con tratamiento alcalino, generando un cambio en su estructuración (Frosi et al., 2023).

La pectina se utiliza principalmente como recubrimiento comestible que aporta dureza, enmascara olores y sabores no deseados, limita la migración de lípidos y aporta textura, consistencia y viscosidad a alimentos gelificados, evitando sinéresis (Moslemi, 2020; Singh et al., 2018). En helados y alimentos congelados se agrega para evita la pérdida de jarabe, textura y calidad, ayudando a conservar el sabor y color, además se puede utilizar como sustituto de grasa (Zhang et al., 2018). En bebidas como refresco o jugos, la pectina se usa como agente de enturbiamiento y viscosificador manteniendo el líquido estable, potenciando la textura y sensación no pegajosa en boca (Singhal y Swami, 2022). Se ha observado que los recubrimientos de pectina poseen propiedades antioxidantes, antimicrobianas y son biodegradables (Picot-Allain et al., 2020). Además, se ha empleado como material de pared para encapsular compuestos bioactivos, mediante la formación de complejos coacervados, aumentando la vida útil y estabilidad de estos compuestos (Lan et al., 2020; Yan et al., 2023).

2.3. Polifenoles

2.3.1. Origen y extracción

Los compuestos fenólicos son un amplio grupo de sustancias químicas cuya característica principal es la presencia de uno o varios anillos fenólicos en su estructura molecular. Los polifenoles se originan en frutas, vegetales y plantas como resultado del metabolismo secundario, desempeñan roles esenciales en las funciones fisiológicas, defensivas ante patógenos y estímulos como luz, gravedad, temperatura, etc. Los polifenoles se encuentran en la pared celular o en el interior de las células, también se pueden encontrar en células y tejido de animales que han ingerido frecuentemente alimentos vegetales (Marín-Canul et al., 2023; Murcia y Castañeda, 2022).

La biosíntesis de los compuestos fenólicos ocurre a través de dos rutas primarias o su combinación:

- ✓ Ruta del ácido siquímico: resultando en aminoácidos aromáticos, ácidos cinámicos, fenoles, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, fenilpropanos.
- ✓ Ruta de los poliacetatos: originando quinonas y xantonas.
- ✓ Rutas mixtas: combinan precursores que derivan en flavonoides (Quiñones et al., 2012).

Los polifenoles se clasifican según el número de anillos fenólicos y su estructura, en cinco grupos primordiales:

- ✓ Ácidos fenólicos
- ✓ Estilbenos
- ✓ Lignanos
- ✓ Alcoholes fenólicos
- ✓ Flavonoides

Los flavonoides son compuestos con estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos, y son los polifenoles los más abundantes en la naturaleza. Se clasifican en función de la posición y número de los grupos hidroxilo, además de grupos funcionales que pueden estar presentes como metilos, azúcares, ácidos orgánicos, entre otros. Los subgrupos de flavonoides incluyen flavonoles, flavonas, flavanonas, dihidroflavonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (Jia et al., 2016).

Los estudios científicos se han enfocado en el aprovechamiento de los subproductos (pulpas, cáscaras y semillas) de la industria agroalimentaria que contengan estos metabolitos. El contenido de polifenoles en los subproductos es variable, ya que este dependerá de su origen y factores ambientales (Marín-Canul et al., 2023). Existen varios métodos de extracción de polifenoles, por cocción, infusión, hidrodestilación, percolación, Soxhlet, maceración, asistida por enzimas, por microondas, fluidos supercríticos, líquido presurizado y por ultrasonido. Sin embargo, se tienen que tomar en cuenta varios factores que

influyen en el rendimiento, como el tipo de solvente, cantidad de muestra, tiempo, temperatura, pH, entre otros (Cortés-Marín et al., 2023; Vargas-Sánchez et al., 2021). Los métodos utilizan inicialmente maceración de contacto sólido-líquido, utilizando muestra seca y triturada con un solvente que va a degradar las paredes celulares y liberar los polifenoles. Los solventes se eligen dependiendo de los polifenoles a extraer por su polaridad, entre estos se encuentran el agua, etanol a distintos grados de pureza (75, 80, 96 y 99.9 %) metanol, acetona, acetona acuosa al 50 %, éter de petróleo y hexano (Gaber et al., 2020; Murcia y Castañeda, 2022).

2.3.2. Características funcionales de extractos fenólicos

Los polifenoles han ganado interés en la industria alimentaria desde un punto de vista nutricional y tecnológico, debido a sus características fisicoquímicas que les permiten ser partícipes de varias reacciones metabólicas de óxido-reducción. En la actualidad diversas investigaciones sustentan los efectos positivos sobre la salud por consumir alimentos con alto contenido en polifenoles. Dentro de las múltiples propiedades nutricionales de los polifenoles destacan las antisépticas, diuréticas, antimutagénicas, antitumorales, antiinflamatorias, antimicrobianas, antidiabéticas, cardioprotectoras, vasodilatadoras, antitrombóticas y antioxidantes (Cortés-Marín et al., 2023; Jia et al., 2016; Reyes et al., 2022).

La principal fuente de polifenoles en la dieta humana es el consumo de frutas, verduras, granos, semillas y especias. Algunos alimentos que contienen polifenoles son el café, té, cacao, cebolla, chicozapote, uvas, frambuesa, manzanas, toronja, arándanos, cacahuates, chía, achiote, clavo, hinojo, comino, epazote, entre otros (Gaber et al., 2020; Marín-Canul et al., 2023; Quiñones et al., 2012; Shaddel et al., 2018). Los compuestos fenólicos como el ácido p. cumárico, p-hidroxibenzoico, cafeico, clorogénico, cinámico, ferúlico, gálico, protocatéquico, vainílico, entre otros, se han extraído de residuos de manzana, cítricos, papa, aguacate, cacahuete y tomate. Los polifenoles se han utilizado principalmente en la industria alimentaria como aditivos en productos lácticos,

cárnicos y bebidas, sin embargo, se ha ampliado su aplicación en la industria química y farmacéutica (Vargas-Sánchez et al., 2021).

Además de las propiedades benéficas que le confieren al cuerpo humano, los polifenoles son responsables del color, textura, olor y sabor de frutas, verduras y plantas (Marín-Canul et al., 2023). Dependiendo del color que se resalta en el alimento se puede relacionar con el tipo de compuesto fenólico, en concreto, las antocianinas aportan tonalidades rosas, rojas, moradas y azules, las flavonas, calconas, flavononas e isoflavononas contribuyen a coloraciones amarillas y, los flavonoles como mirecitina, kaempferol y quercitina son clave en el color verde del té. Se ha observado que los polifenoles bajo ciertas condiciones de procesamiento, almacenamiento o congelación pueden perder su color o colorearse. Por ejemplo, las antocianinas en la naturaleza son estables debido al pH del medio en el que se encuentran (inferior a 3), otorgando una coloración roja; en su forma inestable (pH superior a 6) el color tornará a azul y su biodisponibilidad disminuirá. El sabor astringente es dado por las proantocianidinas o taninos, mientras que el sabor amargo por las flavononas, además, las calconas podrían conferir un sabor dulce mediante hidrogenación (Jia et al., 2016).

En general, los polifenoles son susceptibles a degradación por factores ambientales como exposición a luz, oxígeno, enzimas, humedad, cambios de temperatura y pH (Dewi et al., 2023; Valadez-Carmona et al., 2017), estas condiciones tienen lugar en el estómago e intestino donde se da la mayor parte de los procesos de digestión y absorción de nutrimentos (Jia et al., 2016). Por lo anterior, es necesario protegerlas mediante diferentes métodos como formación de nanopartículas (Chen et al., 2020), emulsiones (Huang et al., 2021), secado por aspersión (Ostroschi et al., 2018; Susanti et al., 2021), coacervación compleja (Souza et al., 2020). Estos métodos encapsulan o entrapan estos compuestos bioactivos mediante una matriz de pared polimérica, la cual va a proteger al material del núcleo ante condiciones adversas y promover su liberación controlada (Moschakis y Biliaderis, 2017).

2.4. Coacervación compleja

2.4.1. Generalidades

Las proteínas y polisacáridos son los ingredientes más utilizados para la elaboración de matrices alimentarias, al ser mezcladas pueden contribuir al desarrollo de nuevas estructuras mediante sus interacciones proporcionando mejores propiedades fisicoquímicas y funcionales, que cuando son agregadas de forma individual (McClements, 2006; Niu et al., 2018). Las interacciones entre estos biopolímeros pueden ser de segregación, miscibilidad o asociación, generando diferentes sistemas resultado de las cargas generadas por la mezcla. Cuando se tienen polímeros con cargas del mismo signo se generan interacciones repulsivas generando incompatibilidad o cosolubilidad, en la primera la mezcla se separa en dos fases cada una rica con un solo tipo de biopolímero, mientras que en la segunda se genera una solución en donde ambos polímeros se encuentran solubles, pero no interactúan entre sí. Por otro lado, cuando los biopolímeros tienen cargas opuestas no iguales se produce interacción atractiva, lo que resulta en un complejo soluble. Por el contrario, cuando las cargas opuestas son iguales se neutralizan las cargas dando como resultado un complejo insoluble o coacervado (Anal et al., 2019; Patino y Pilosof, 2011).

La coacervación se determina como la separación de sistemas coloidales en dos fases líquidas que se encuentran en equilibrio, una fase sérica y otra fase coacervada. Dependiendo de las sustancias coloidales presentes se clasifica en:

- 1) Coacervación simple: la cual implica la utilización de una macromolécula (ej. ácidos nucleicos, proteína, lípido, polisacárido, polifenol) y la adición de una sal o alcohol que al mezclarse induce a una neutralización de cargas produciendo la separación de fases.
- 2) Coacervación compleja: involucra polímeros polielectrolitos, que exhiben cargas opuestas (polianión y policación), al ser mezclados van a formar un

complejo insoluble mediante interacciones electrostáticas que son influenciadas por variaciones en el pH, grupos funcionales, fuerza iónica, hidrofobicidad, concentración total de biopolímeros, densidad de carga superficial, estrés mecánico, relación en peso proteína-polisacárido, naturaleza química y origen de los biopolímeros (Galland et al., 2024; Muriel et al., 2020). Lo anterior es importante, ya que conocer las interacciones intermoleculares que se pueden dar entre los biopolímeros es fundamental para el estudio de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de los coacervados (Hu et al., 2024).

2.4.2. Formación de complejos coacervados

La formación de complejos coacervados se lleva a cabo normalmente entre proteínas y polisacáridos, sin embargo, también se ha estudiado la conjugación binaria de otros polímeros alimentarios como proteína-proteína y proteína-polifenol, con la finalidad de mejorar las propiedades fisicoquímicas y funcionales de los productos, por ejemplo, en textura y aporte de compuestos antioxidantes (Agazzi et al., 2023; Liu et al., 2016).

Recientemente, la fabricación de conjugados ternarios proteína-polisacárido-polifenol ha ganado interés como perspectivas potenciales para su aplicación en la conservación y el desarrollo de alimentos funcionales (Yan et al., 2023). A diferencia de los conjugados binarios (Blocher et al., 2020), los conjugados ternarios han demostrado una capacidad mejorada como material de pared para encapsular y liberar de forma controlada bioactivos en el sistema digestivo (Yan et al., 2023).

La formación de conjugados ternarios se ha llevado a cabo mediante métodos químicos simples como ajuste de pH y temperatura, además de enzimáticos, ya que son amigables con el medio ambiente y la salud del consumidor (Liu et al., 2016). En particular, los polifenoles pueden interactuar con las proteínas y polisacáridos a través de puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas

entre sus grupos funcionales (hidroxilos, aminos y carboxilos, respectivamente), para formar conjugados ternarios (Ba et al., 2020).

En la formación de coacervados o conjugados binarios se han utilizado proteínas de origen animal como grenetina, α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y ovoalbúmina, así como proteína vegetal obtenida a partir de chía, chícharos, soya, linaza, quinua, cáñamo y canola; polisacáridos como goma arábica, carragenina, carboximetilcelulosa y pectina (Moschakis y Biliaderis, 2017; Muhoza et al., 2022). En la fabricación de conjugados ternarios se han empleado polisacáridos de té verde (Ba et al., 2020), semilla de uva, flor de jamaica (Thongkaew et al., 2014), frambuesa (Mansour et al., 2020), arroz negro (Sui et al., 2018), etc.

En diversos productos alimenticios es posible encontrar a los biopolímeros en forma de coacervados, los cuales influyen en sus propiedades como sabor, color, textura, y viscosidad. Además, los coacervados se han utilizado como sustitutos de grasa, purificación de proteínas, estabilizantes, gelantes, emulsificantes, elaboración de películas comestibles y como material de pared para encapsular o entrapar compuestos bioactivos como vitaminas, aceites, colorantes, antioxidantes, entre otros (Muhoza et al., 2022; Niu et al., 2018).

Es esencial el estudio sobre las interacciones entre polímeros, ya que en diversas investigaciones sobre coacervados se han destacado efectos tanto positivos como negativos en la solubilidad, eficiencia de encapsulación, formación de espuma, estructuración, color, actividad antioxidante, entre otras propiedades funcionales y fisicoquímicas (Lan et al., 2020).

2.5. Caracterización de coacervados

La utilización de subproductos de la industria agroalimentaria ha recibido un mayor enfoque gracias a que se contribuye a la sustentabilidad de los recursos naturales, además de que de ellos se pueden extraer sustancias de interés alimenticio y nutricional. En este sentido, las investigaciones se han centrado en

la extracción de polímeros para la elaboración de complejos que pueden ser incorporados en matrices alimentarias como sustitutos de sustancias sintéticas, además de incrementar el valor tanto de los residuos como del producto final. Cuando se combinan por primera vez dos o más biopolímeros para la formación de complejos coacervados, es necesario determinar sus propiedades mediante su caracterización para evidenciar si sus propiedades fisicoquímicas y funcionales son diferentes y mejores a las de los biopolímeros que se utilizan frecuentemente (Lan et al., 2022; Yemenicioğlu et al., 2020).

2.5.1. Propiedades fisicoquímicas

Las propiedades físicas y químicas son características observables o medibles en todas las sustancias. Las características físicas incluyen tamaño, dureza, porosidad puntos de fusión y ebullición, densidad, masa, volumen, color, entre otras. En contraste, las características químicas se pueden identificar cuando hay un cambio químico en la sustancia a analizar. A continuación, se describen propiedades fisicoquímicas llevadas a cabo en complejos coacervados:

2.5.1.1. Potencial- ζ

Es una medida que repercute en el grado de interacción entre partículas coloidales, el cual puede ser de atracción o repulsión. Las interacciones dependerán de la carga superficial neta de las partículas que se origina por la ionización o protonación de los grupos funcionales. Cuando las partículas coloidales se encuentran estabilizadas eléctricamente se pueden observar valores mayores de potencial- ζ , ya sean positivos o negativos. En contraste, la existencia de valores bajos o igual a cero de potencial- ζ mostrarán partículas proclives a la inestabilidad y por consecuencia a precipitar (Shevkani et al., 2014; Tiwari y Singh, 2012; Trujillo-Ramírez et al., 2018).

Los principales factores que influyen en el valor de potencial- ζ en un sistema coloidal es el pH, concentración de polímeros y temperatura. Al modificar el pH del medio con un ácido o una base, las partículas pueden adquirir una mayor

carga negativa, positiva o bien neutralizarse. Para que se lleve a cabo la formación de coacervados binarios fuertes entre proteínas y polisacáridos, estos biopolímeros deben presentar cargas netas opuestas. Los restos carboxílicos ($-\text{COOH}$) de los polisacáridos se hallarán ionizados formando grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$) presentando valores negativos de potencial- ζ , mientras que la proteína exhibirá valores positivos del potencial- ζ debido a que los restos de aminoácidos ($-\text{NH}_2$) se encuentran protonados produciendo grupos amonio ($-\text{NH}_3^+$) (Anal et al., 2019; Hernández-Rodríguez et al., 2014). Con respecto a los conjugados ternarios entre proteína-polisacárido-polifenol, a un pH determinado se puede llegar a la neutralidad de carga, ya que los fenoles pueden interactuar a través de sus grupos hidroxilo y carboxilo con los grupos amino de proteínas (Shahidi y Senadheera, 2019).

El potencial- ζ es una propiedad física que incide en las propiedades funcionales de los coacervados como en la capacidad emulsionante, estabilizante y solubilidad, por ello puede ser utilizada para conocer el grado de estabilidad de un sistema coloidal (Shevkani et al., 2014)

2.5.1.2. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Es un método empleado para analizar la estructura de proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y de materiales conocidos o desconocidos para su identificación y clasificación (de Luca et al., 2011). Para obtener un espectro infrarrojo que presenta una huella dactilar molecular única dada por la composición química de la muestra, se utiliza un equipo espectrofotométrico FTIR provisto con un accesorio universal de reflectancia total atenuada, en el cual una pequeña cantidad de muestra seca, líquida o fresca se coloca en contacto con un cristal de diamante, la radiación infrarroja pasa sobre la interfase entre la muestra y el cristal, la muestra absorbe parte de la radiación y otra parte es transmitida a través de ella. De este modo, dependiendo de los grupos funcionales, enlaces químicos y estructurales presentes en la muestra, se identifican bandas en la región electromagnética del infrarrojo medio (García-de la Rosa et al., 2023).

En el análisis de los espectros de muestras simples y complejas se pueden encontrar diferencias, en los primeros las bandas de absorción se asignan a los enlaces químicos y estructurales, mientras que en los segundos se pueden dilucidar las interacciones moleculares entre biopolímeros por sus grupos funcionales, ya que las bandas de absorción muestran los enlaces químicos traslapados (Mata Miranda et al., 2017).

2.5.1.3. Microestructura

La microestructura de los materiales permite conocer la organización interna de los componentes de una sustancia. Su análisis es importante debido a la relación entre la estructura y las propiedades fisicoquímicas y funcionales del material de estudio. La microestructura y morfología de complejos biopoliméricos puede verse influenciada por factores como pH, temperatura, concentración de biopolímeros, fuerza iónica, tiempo y tasa de corte, obteniendo materiales con distintas propiedades que van a ser específicas dependiendo de las distintas formas de reordenamiento que presenten dichos materiales. Además, su estudio aporta conocimientos para asegurar la estabilidad de las sustancias o productos durante su vida útil (Dickinson, 2017; Hernández-Rodríguez et al., 2014).

Para observar la microestructura de los complejos coacervados se pueden utilizar distintos métodos de microscopía como de contraste de fase, confocal de escaneo láser o electrónica de barrido con diferentes aumentos (Moschakis y Biliaderis, 2017). En particular, mediante la microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) se obtienen micrográficas con las que puede realizar un análisis cualitativo sobre las características estructurales presentadas por los coacervados.

La microestructura de los coacervados está condicionada por macropartículas, diferentes tamaños y distribuciones de los poros, estos a su vez dependen de la relación de masa y número de enlaces entre los biopolímeros (Brito de Souza et al., 2018; Hernández-Rodríguez et al., 2014; Zhang et al., 2020).

2.5.1.4. Tamaño de partícula

Es un parámetro físico importante que rige al comportamiento de las partículas, por lo cual se emplea para determinar la estabilidad de sistemas coloidales al ser incorporados a matrices alimentarias. Su análisis contribuye a garantizar que el producto se conserve en buen estado y estable durante su vida útil. Además, el tamaño de partícula influye en la calidad, textura, atributos sensoriales y eficiencia del proceso de elaboración de los productos alimenticios (Malvern, 2024; Preining, 2008).

El tamaño de partícula puede definirse en función de su dimensión o tamaño geométrico equivalente, volumen y área de superficie de la partícula que presentan comportamientos físicos equivalentes a una esfera. En este sentido, la medición del tamaño de partículas se calcula utilizando un tamaño unidimensional, mediante el diámetro equivalente esférico establecido por el volumen de una esfera con un volumen semejante al de las partículas en la muestra de estudio (Sirota et al., 2021).

La medición del tamaño y distribución de partículas se realiza a través de equipos avanzados mediante la técnica de dispersión de luz dinámica, con la cual se obtiene el diámetro hidrodinámico medio (D_h), proporcionado en nanómetros. Esta tecnología es un procedimiento no invasivo que contribuye al análisis del tamaño, estabilidad e interacciones de partículas en la industria agroalimentaria (Malvern, 2024).

Los factores como pH, concentración total, relación proteína-polisacárido en las condiciones adecuadas, además de un bajo tamaño de partícula de los biopolímeros favorecen las interacciones electrostáticas, promoviendo la formación de complejos coacervados, evidenciándose por un aumento notorio en el tamaño de partícula en comparación con los biopolímeros individuales. La utilización de proteínas vegetales (leguminosas, semillas, cereales) con polisacáridos para la formación de coacervados generan tamaños de partículas que van de los 0.4 a 337 μm (Muhoza et al., 2022). Ba et al. (2020) observaron

que un tamaño de partícula menor en los coacervados binarios y ternarios favoreció a la estabilidad del sistema durante el almacenamiento, ya que conforme pasaron los días los coacervados mostraron mínima agregación de partículas y no presentaron un aumento de tamaño significativo. El tamaño de partícula es una variable que se asocia con la microestructura y propiedades reológicas. En este sentido, el aumento en el tamaño de partícula puede verse como formación de grandes agregados, microestructura densa y mayor resistencia al flujo (García-de la Rosa et al., 2023; Muhoza et al., 2022). Por lo tanto, menores tamaños de partículas en complejos coacervados son idóneos para su potencial aplicación en alimentos, bebidas y en la industria farmacéutica (Ba et al., 2020).

2.5.1.5. Colorimetría

Es una técnica utilizada para evaluar cualitativa y cuantitativamente el color de los materiales y se fundamenta en la cantidad de absorción de radiación de luz visible por parte de las muestras coloreadas. La absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la muestra de estudio y se ve influenciada por la distancia que recorre el haz de luz al atravesar la muestra (Eze et al., 2022).

La luminancia, longitud de onda y pureza son parámetros que definen al color y se pueden medir con la ayuda de instrumentos colorimétricos como el colorímetro, fotocolorímetro o espectrofotómetro, en los que se mide la intensidad de radiación de un haz de luz al pasar a través de una muestra. Los parámetros de color muestran coordenadas en toda la gama del círculo cromático que podría percibir el ojo humano. La luminancia es el brillo claro u oscuro que tendría un color ($L^* = 0$ a 100). El tono es un rasgo que diferencia a un color de otro, es atribuido a la longitud de onda predominante, además, dependiendo de las coordenadas se asignan colores verde, rojo, azul y amarillo ($-a^*$, $+a^*$, $-b^*$, $+b^*$, respectivamente). El ángulo de tono (H^*) es la tendencia hacia un color en específico que puede presentar la muestra, así el rojo corresponde a 0 o 360°, amarillo a 90°, verde a 180° y azul a 270°. La pureza es la magnitud de saturación (C^*) de un color diluido en blanco y va de 0 a 100 (Kuck y Norena, 2016).

El color es un atributo que normalmente refleja la calidad de los alimentos, por lo tanto, es una variable importante en la selección de los productos por parte de los consumidores. En particular, los coacervados han sido utilizados para encapsular colorantes naturales o artificiales, lípidos, antioxidantes y bioactivos, los cuales le confieren color a la matriz biopolimérica. Además, el color podría ser un indicador de estabilidad de estos compuestos (Chung et al., 2016). Diversos estudios han mencionado que la adición de sustancias coloreadas (β -caroteno, antocianinas, astaxantinas, curcumina, α -tocoferol) y su concentración han influido en el color de sus respectivos sistemas (Bassijeh et al., 2020; Chung et al., 2016; Eze et al., 2022). Por lo anterior, dependiendo del color, los coacervados pueden ser aplicados a cierto tipo de alimentos como bebidas, análogos cárnicos, quesos, alimentos ultra procesados, entre otros (Chung et al., 2016; J. Hu et al., 2024).

2.5.2. Propiedades funcionales

Las propiedades funcionales son características que uno o varios biopolímeros confieren a una matriz alimentaria en la que están presentes o fueron agregados. El comportamiento de las macromoléculas afecta a las cualidades del producto contribuyendo a su calidad. Son varias las propiedades funcionales que exhiben los coacervados, entre ellas se destacan las propiedades espumantes, emulsificantes, de protección y liberación controlada de compuestos bioactivos en condiciones gastrointestinales y como sustitutos de grasa (Chel et al., 2003; Hernández-Rodríguez et al., 2014; Vargas et al., 2021).

A continuación, se describen algunas propiedades funcionales determinadas en coacervados:

2.5.2.1. Formación de espuma

Se lleva a cabo mediante la generación de una fase dispersa al incorporar aire a un sistema y una fase dispersante líquida, semilíquida o sólida. Los métodos utilizados para la formación de espuma en la fabricación de bebidas, lácteos y

panificación son de dispersión en el cual el aire es inyectado directamente y por condensación mediante el uso de aire presurizado (Salais-Obregón et al., 2022). Para generar una mayor estabilidad de las espumas en función del tiempo, a los productos se les añade un estabilizante. Las proteínas suelen ser la elección por excelencia para la formación y estabilidad de espuma, ya que presentan actividad superficial e interfacial. Por otro lado, los polisacáridos son utilizados como agentes gelificantes y espesantes que pueden modificar las propiedades de flujo. En las matrices alimentarias al estar presentes ambos biopolímeros, interactúan formando coacervados, los cuales han demostrado tener una mayor capacidad para formar espumas. La espuma debe presentar un diámetro de sus burbujas de aire específico y una distancia óptima para que retengan por más tiempo el aire y evitar que se fusionen (Salais-Obregón et al., 2022; Xu et al., 2021). La influencia de factores como concentración, pH, fuerza iónica, relación de biopolímeros, entre otros sobre esta propiedad en los coacervados se evalúa a través del porcentaje de estabilidad, incremento de volumen y capacidad de expansión de espuma (Vargas et al., 2021).

Específicamente, la utilización de coacervados formados por proteínas vegetales y polisacáridos han evidenciado una adecuada capacidad de formación de espuma, debido a la creación de una capa interfacial rígida-elástica que reduce la tensión superficial y brinda estabilización a la interfaz aire-agua (Muhoza et al., 2022). La utilización de polisacáridos para la formación de coacervados puede proveer de protección a las proteínas, ya que al ser susceptibles a cambios en el pH tienden a la desnaturalización y disminución de su funcionalidad como agentes espumantes (Wijaya et al., 2017).

2.5.2.2. Capacidad de formación de emulsión

Las emulsiones son estructuras que se forman utilizando un homogeneizador para la dispersión en forma de pequeñas gotas de un líquido en otro, ambos inmiscibles. Los sistemas utilizan usualmente agua y aceite, pero dependiendo

del líquido disperso se forman varios tipos de emulsión, aceite en agua (O / W), agua en aceite (W / O) o emulsiones múltiples agua-aceite-agua y aceite-agua-aceite (Bautista y Álvarez, 2019). La creación de emulsiones en alimentos es compleja, ya que en la fase acuosa se pueden encontrar distintas sustancias solubilizadas como sales, azúcares, alcoholes, etc., que tienden a desestabilizar la matriz alimenticia durante su almacenamiento dando lugar a diversos fenómenos como separación gravitacional, cremado, coalescencia, floculación y separación del aceite (J. Hu et al., 2024). Con frecuencia, para estabilizar un sistema se añade un emulsificante, proteína o polisacárido que es adsorbido en la interfaz aceite-agua o agua-aceite, rodeando a las gotitas (Dong et al., 2022). Con respecto a lo anterior, Vargas et al. (2021) mencionan que la incorporación al sistema de ambos biopolímeros en forma de coacervados es favorable para la estabilización de las emulsiones.

2.5.2.3. Viscosidad

Es una propiedad funcional importante en la industria alimentaria que determina la resistencia de una sustancia a fluir. La viscosidad se puede clasificar en cinemática, dinámica y aparente (Agwu et al., 2021). Cuando la viscosidad real de una sustancia se ve afectada por variables como presión, temperatura, velocidad de cizalla y tiempo de cizalla, los cuales pueden modificar su estructura se hace referencia a la viscosidad aparente (Laurencio et al., 2017). La viscosidad aparente se determina en función de la velocidad de deformación, la cual es dependiente de la velocidad de corte, y está asociada a diferentes propiedades moleculares de las sustancias presentes en el sistema (García-de la Rosa et al., 2023; Vargas et al., 2021).

El cambio en la viscosidad de la mezcla proteína-polisacárido es de utilidad para indagar sobre el grado de coacervación que se evidencia por la reorganización de la estructura a causa de las interacciones electrostáticas llevadas a cabo por los biopolímeros. Es decir, una viscosidad alta en los coacervados se puede deber a una fuerte interacción electrostática (Muhoza et al., 2022).

Normalmente, los coacervados presentan un comportamiento de adelgazamiento al corte a bajas tasas de corte debido a que al aplicar un esfuerzo de corte la estructura formada por los coacervados se rompe y se desestabiliza. Este comportamiento dependiente del corte característico de los coacervados podría ser reversible, la red formada al permanecer en reposo o en condiciones de equilibrio después de su rompimiento podría reordenarse y recuperarse (You et al., 2018).

2.5.2.4. Solubilidad

Es la capacidad que posee una sustancia para disolverse en otra, basándose en un equilibrio entre interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas para formar un sistema homogéneo. La concentración y carga superficial de las partículas, así como el pH, temperatura y disolvente afectan la solubilidad e interacción entre partículas (Vargas et al., 2021; Zhu et al., 2021).

En particular, cuando se lleva a cabo la coacervación entre proteínas y polisacáridos a un pH óptimo de formación, las cargas opuestas se neutralizan disminuyendo la solubilidad debido a la reducción de la repulsión electrostática entre las moléculas, lo que conduce a la formación de agregados y la precipitación del sistema (X. Hu et al., 2024).

La solubilidad de los materiales puede repercutir en la formación de coacervados, al igual que en otras propiedades funcionales como formación de espuma, emulsificación, gelificación y protección de compuestos bioactivos (Bolontrade et al., 2013; Muhoza et al., 2022).

2.5.2.5. Protección y liberación de compuestos bioactivos

Es la capacidad que tienen los materiales de pared de preservar ante condiciones gastrointestinales y liberar en un lugar específico del intestino al compuesto bioactivo que aportará un efecto benéfico al cuerpo. La funcionalidad de los

bioactivos puede verse disminuida por las condiciones que ocurren en el estómago e intestino donde son adsorbidos los nutrimentos después del proceso de digestión, como cambios en el pH, temperatura, y exposición a oxígeno. Por lo anterior, es deseable tener una alta eficiencia de encapsulación de estos compuestos para retardar su liberación prematura, prevenir su degradación y favorecer su estabilidad (Jia et al., 2016; Muhoza et al., 2022).

La coacervación compleja se ha empleado para proteger y liberar de forma controlada a los compuestos bioactivos debido a la alta eficiencia de encapsulación o entrapamiento (Jia et al., 2016). Lo anterior permite que disminuya la pérdida de funcionalidad de estas sustancias bioactivas en la fase gástrica por la protección conferida por los biopolímeros, haciéndolas resistentes a su degradación, aumentando su estabilidad para que llegue a su sitio de absorción en el intestino y una mayor cantidad pueda ser aprovechada por el cuerpo (Liu et al., 2023; Wang et al., 2017).

2.6. Literatura citada

- Agwu, O. E., Akpabio, J. U., Ekpenyong, M. E., Inyang, U. G., Asuquo, D. E., Eyoh, I. J., & Adeoye, O. S. (2021). A critical review of drilling mud rheological models. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 203, 108659. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2021.108659>
- Anal, A. K., Shrestha, S., & Sadiq, M. B. (2019). Biopolymeric-based emulsions and their effects during processing, digestibility and bioaccessibility of bioactive compounds in food systems. *Food Hydrocolloids*, 87, 691-702. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.008>
- Ba, C., Fu, Y., Niu, F., Wang, M., Jin, B., Li, Z., Chen, G., Zhang, H., & Li, X. (2020). Effects of environmental stresses on physiochemical stability of β -carotene in zein-carboxymethyl chitosan-tea polyphenols ternary delivery system. *Food Chemistry*, 311, 125878. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125878>
- Bassijeh, A., Ansari, S., & Hosseini, S. M. H. (2020). Astaxanthin encapsulation in multilayer emulsions stabilized by complex coacervates of whey protein isolate and Persian gum and its use as a natural colorant in a model beverage. *Food Research International*, 137, 109689. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109689>
- Bautista, M. V., & Álvarez, H. N. (2019). Emulsions in food and its applications. *Presencia Universitaria*, 7(14), 65-73.

- Bolontrade, A. J., Scilingo, A. A., & Anon, M. C. (2013). Amaranth proteins foaming properties: adsorption kinetics and foam formation--part 1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 105, 319-327. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.039>
- Brito de Souza, V., Thomazini, M., Echalar Barrientos, M. A., Nalin, C. M., Ferro-Furtado, R., Genovese, M. I., & Favaro-Trindade, C. S. (2018). Functional properties and encapsulation of a proanthocyanidin-rich cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*) by complex coacervation using gelatin and different polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 77, 297-306. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.040>
- Chel, G. L. A., Corzo, L. R., & Betancur, A. D. A. (2003). Estructura y propiedades funcionales de proteínas de leguminosas. *Revista de la Universidad Autónoma de Yucatán*, 4(227), 34-43. <https://www.revistauniversitaria.uady.mx/pdf/227/ru2275.pdf>
- Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W., & McClements, D. J. (2016). Enhancement of colour stability of anthocyanins in model beverages by gum arabic addition. *Food Chemistry*, 201, 14-22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.051>
- Condés, M. C., Speroni, F., Mauri, A., & Añón, M. C. (2012). Physicochemical and structural properties of amaranth protein isolates treated with high pressure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 14, 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.12.006>
- Damodaran, S., & Parkin, K. L. (2019). *FENNEMA Química de los alimentos* (4 ed.). Acribia.
- de Luca, M., Terouzi, W., Ioele, G., Kzaiber, F., Oussama, A., Oliverio, F., Tauler, R., & Ragno, G. (2011). Derivative FTIR spectroscopy for cluster analysis and classification of morocco olive oils. *Food Chemistry*, 124, 1113-1118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.010>
- Deleu, L., Lambrecht, M., Van de V. J., & Delcour, J. (2019). The impact of alkaline conditions on storage proteins of cereals and pseudocereals. *Current Opinion in Food Science*, 25, 98-103. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.02.017>
- Dickinson, E. (2017). Biopolymer-based particles as stabilizing agents for emulsions and foams. *Food Hydrocolloids*, 68, 219-231. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.024>
- Dong, Y., Wei, Z., Wang, Y., Tang, Q., Xue, C., & Huang, Q. (2022). Oleogel-based Pickering emulsions stabilized by ovotransferrin-carboxymethyl chitosan nanoparticles for delivery of curcumin. *Lwt*, 157. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113121>
- Eze, F. N., Jayeoye, T. J., & Singh, S. (2022). Fabrication of intelligent pH-sensing films with antioxidant potential for monitoring shrimp freshness via the fortification of chitosan matrix with broken riceberry phenolic extract. *Food*

- chemistry*, 366, 130574.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130574>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2020). Macronutrientes: carbohidratos, grasas y proteínas. *Food and Agriculture Organization*. <https://www.fao.org/4/w0073s/w0073s0d.htm>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization & United Nations University (FAO/WHO/UHU). (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. *Food and Agriculture Organization and World Health Organization*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43411>
- García-de la Rosa, K., Lobato-Calleros, C., Hernández-Rodríguez, L., & Aguirre-Mandujano, E. (2023). Rheological and structural properties of complex coacervates of *Amaranthus hypochondriacus* protein-citrus pectin. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 22(1), 1-18. <https://doi.org/https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim3003>
- Hadidi, M., Aghababaei, F., Mahfouzi, M., Zhang, W., & Julian McClements, D. (2024). Amaranth proteins: From extraction to application as nanoparticle-based delivery systems for bioactive compounds. *Food chemistry*, 439, 138164. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138164>
- Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Pimentel-González, D. J., & Vernon-Carter, E. J. (2014). *Lactobacillus plantarum* protection by entrapment in whey protein isolate: κ -carrageenan complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 36, 181-188. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.09.018>
- Hu, J., Yang, R., Chen, R., Liu, C., Sha, X., Li, K., Guo, H., & Zhang, Y. (2024). Enhanced O/W emulsion stability and betanin protection using yeast protein and chitooligosaccharide: Comparative insights from complex coacervation and layer-by-layer methods. *Food Hydrocolloids*, 147. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109409>
- Hu, X., Ju, Q., Koo, C. K. W., & McClements, D. J. (2024). Influence of complex coacervation on the structure and texture of plant-based protein-polysaccharide composites. *Food Hydrocolloids*, 147. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109333>
- Jia, Z., Dumont, M.-J., & Orsat, V. (2016). Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. *Food Bioscience*, 15, 87-104. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.05.007>
- Kuck, L. S., & Norena, C. P. (2016). Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food chemistry*, 194, 569-576. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.066>

- Kyriakopoulou, K., Dekkers, B., Van der Goot, A. J. (2019). Plant-based meat analogues. In Sustainable meat production and processing. *Academic Press*. Elsevier; 103-126. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814874-7.00006-7>
- Lan, X., Liu, Z., Wang, D., Zhan, S., Chen, W., Su, W., Sun, Y., & Ni, L. (2022). Characterization of volatile composition, aroma-active compounds and phenolic profile of Qingxin oolong tea with different roasting degrees. *Food Bioscience*, 50. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101985>
- Lan, Y., Ohm, J.-B., Chen, B., & Rao, J. (2020). Phase behavior, thermodynamic and microstructure of concentrated pea protein isolate-pectin mixture: Effect of pH, biopolymer ratio and pectin charge density. *Food Hydrocolloids*, 101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105556>
- Laurencio, A. H., Gilbert, H. A., & Retirado, M. Y. (2017). Modeling of apparent viscosity of a 11° API crude oil with non-Newtonian behavior. *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 25 (4), 674-680.
- Liu, X., Xue, F., & Adhikari, B. (2023). Hemp protein isolate-polysaccharide complex coacervates and their application as emulsifiers in oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 137. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108352>
- Malvern, P. (2024). *Dynamic light scattering (DLS): Dynamic light scattering for size characterization of proteins, nanoparticles, polymers and colloidal dispersions*. <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering>
- Mata Miranda, M. M., Guerrero Robles, C. I., Rojas López, M., Delgado Macuil, R. J., González Díaz, C. A., Sánchez Monroy, V., Pérez Ishiwara, D. G., & Vázquez Zapien, G. J. (2017). Principal Components by FTIR Spectroscopy as Innovative Characterization Technique during Differentiation of Pluripotent Stem Cells to Pancreatic Cells. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 38(1), 225-234. <https://doi.org/10.17488/rmib.38.1.17>
- McClements, D. J., & Grossmann, L. (2021). The science of plant-based foods: Constructing next-generation meat, fish, milk, and egg analogs. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 4049–4100. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12771>
- Moschakis, T., & Biliaderis, C. G. (2017). Biopolymer-based coacervates: Structures, functionality and applications in food products. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 28, 96-109. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.03.006>
- Motta, C., Castanheira, I., Gonzales, G. B., Delgado, I., Torres, D., Santos, M., & Matos, A. S. (2019). Impact of cooking methods and malting on amino acids content in amaranth, buckwheat and quinoa. *Journal of Food*

- Muhoza, B., Qi, B., Harindintwali, J. D., Farag Koko, M. Y., Zhang, S., & Li, Y. (2022). Combined plant protein modification and complex coacervation as a sustainable strategy to produce coacervates encapsulating bioactives. *Food Hydrocolloids*, 124. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107239>
- Niu, F., Kou, M., Fan, J., Pan, W., Feng, Z. J., Su, Y., Yang, Y., & Zhou, W. (2018). Structural characteristics and rheological properties of ovalbumin-gum arabic complex coacervates. *Food chemistry*, 260, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.141>
- Preining, O. (2008). 1 - The Physical Nature of Very, Very Small Particles and its Impact on Their Behavior. In R. Kohli & K. L. Mittal (Eds.), *Developments in Surface Contamination and Cleaning* (pp. 3-24). William Andrew Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-081551555-5.50003-4>
- Salais-Obregón, A., Báez-González, J. G., Gallardo-Rivera, C., Castillo-Hernández, S. L., García-Alanís, K. G., Amaya-Guerra, C. A., & Durán-Lugo, R. (2022). Espumas alimenticias en el desarrollo de alimentos funcionales ejemplo: Mousse de fresa (*Fragaria* L.). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 7, 145-152. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/23437>
- Shahidi, F., & Senadheera, R. (2019). Encyclopedia of food chemistry: protein–phenol interactions. *Encyclopedia of Food Chemistry*, 532-538. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21485-6>
- Shevkani, K., Singh, N., Rana, J. C., & Kaur, A. (2014). Relationship between physicochemical and functional properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(2), 541-550. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12335>
- Sirota, E., Kwok, T., Varsolona, R. J., Whittaker, A., Andreani, T., Quirie, S., Margelefsky, E., & Lamberto, D. J. (2021). Crystallization Process Development for the Final Step of the Biocatalytic Synthesis of Islatravir: Comprehensive Crystal Engineering for a Low-Dose Drug. *Organic Process Research & Development*, 25(2), 308-317. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.0c00520>
- Suárez, S., Aphalo, P., Rinaldi, G., Añón, M. C., y Quiroga, A. (2020). Effect of amaranth proteins on the RAS system. In vitro, in vivo and ex vivo assays. *Food Chemistry*, 308, 125601. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125601>
- Tiwari, B. K., & Singh, N. (2012). *Pulse Chemistry and Technology*. Royal Society of Chemistry.
- Trujillo-Ramírez, D., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., Hernández-Rodríguez, L., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2018). Complexation with whey protein hydrolysate improves cacao pods husk

- pectin surface active and emulsifying properties. *Reactive and Functional Polymers*, 123, 61-69.
<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.12.011>
- Vargas, S. A., Delgado-Macuil, R. J., Ruiz-Espinosa, H., Rojas-Lopez, M., & Amador-Espejo, G. G. (2021). High-intensity ultrasound pretreatment influence on whey protein isolate and its use on complex coacervation with *kappa* carrageenan: Evaluation of selected functional properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105340.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105340>
- Wang, B., Blanch, E., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2017). Preparation and study of digestion behavior of lactoferrin-sodium alginate complex coacervates. *Journal of Functional Foods*, 37, 97–106.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.044>
- Wijaya, W., Patel, A. R., Setiowati, A. D., & Van der Meeren, P. (2017). Functional colloids from proteins and polysaccharides for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 56-69.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.003>
- Xu, M., Du, Z., Liang, H., Yang, Y., Li, Q., Wan, Z., & Yang, X. (2021). Adsorption and foaming properties of edible egg yolk peptide nanoparticles: Effect of particle aggregation. *Current Research in Food Science*, 4, 270-278.
<https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.04.002>
- Yemenicioğlu, A., Farris, S., Turkyilmaz, M., & Gulec, S. (2020). A review of current and future food applications of natural hydrocolloids. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(4), 1389-1406.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ijfs.14363>
- You, G., Liu, X. L., & Zhao, M. M. (2018). Preparation and characterization of hsian-tsao gum and chitosan complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 74, 255-266. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.004>
- Zhang, Q., Dong, H., Gao, J., Chen, L., & Vasanthan, T. (2020). Field pea protein isolate/chitosan complex coacervates: Formation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 250, 116925.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116925>
- Zhu, X., Chen, Y., Hu, Y., Han, Y., Xu, J., Zhao, Y., Chen, X., & Li, B. (2021). Tuning the molecular interactions between gliadin and tannic acid to prepare Pickering stabilizers with improved emulsifying properties. *Food Hydrocolloids*, 111, 106179.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106179>

3. AMARANTH PROTEIN-CACAO PECTIN/PHENOLIC EXTRACT COMPLEX

3.1. Summary

An ongoing research topic is the study of the formation and physicochemical properties of protein-polysaccharide-phenolic extract complexes, for obtaining biopolymeric structures with novel and improved physicochemical properties respect those of their individual counterparts. Ternary complex coacervates (CC) were formed between amaranth protein isolate (AP)-cacao pod husk pectin (CP)-cacao shell/husk phenolic extract (PE). Aqueous solutions of AP and CP (1 %, *m/m*), and of PE (0.0, 0.1 and 0.5, *m/V*) were made. AP solution was added in 2:1 and 5:1 mass ratio to the CP solution, adjusting the pH to 3. Then PE at the different concentrations was added in a 2:1 (*m/m*) ratio to the AP:CP solution and stirred. ζ -potential values approached charge neutrality indicating that the CC variations formation was driven by electrostatic interactions. ζ -potential values approached charge neutrality indicating that the CC variations formation was driven by electrostatic interactions. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) spectra of CC showed shifts in the peaks at 1694, 1015 and 2902 cm^{-1} compared to the AP, CP and PE individual spectra, confirming CC formation. Scanning electron micrographs (SEM) revealed that all CC displayed heterogeneous and porous structure, exhibiting smaller aggregates at AP:CP ratio of 2:1 than at 5:1 ratio. Particle size of CC increased as the AP:CP mass ratio and PE concentration increased, varying from 1070.3 ± 21.9 to 1893.0 ± 40.3 nm. This work demonstrates that it is possible to obtain promising protein-polysaccharide-phenolic extract complex coacervates, whose structure and physicochemical properties can be simply modulated by varying the relative proportion and concentrations between the components at given formation conditions. These findings provide insights for developing novel foods with targeted functional properties.

Key words: amaranth protein, pectin, phenolic extract, complex coacervation, microstructure.

3.2. Introduction

Proteins and polysaccharides are the most used ingredients in food systems; proteins have poor stability to environmental stresses such as pH, presence of salts, heat, and freezing. Conversely, polysaccharides provide good stability under these conditions, but high concentrations are generally required. When both macromolecules are present in food matrices, they can develop new structures through their interactions (segregation, miscibility, or association), providing better physicochemical properties than the individual compounds (Niu et al., 2018). Complex coacervates are structures originated by the association between oppositely charged biopolymers through electrostatic interactions, resulting in the separation of colloidal dispersion into two phases: an equilibrium serum phase, and a precipitate phase. Factors such as variations in pH, ionic strength, functional groups, hydrophobicity, protein-polysaccharide mass ratio, total concentration, surface charge density, chemical nature, and origin of biopolymers affect the formation of coacervates (Koralegedara et al., 2020). The proteins that are most commonly used for the formation of coacervates are of animal origin, such as gelatin, whey proteins, and ovalbumin. However, plant-based proteins have been increasingly used as those from peas, chia, flaxseed, soybean, and canola. The most used polysaccharides are carrageenan, carboxymethylcellulose, gum Arabic, and commercial high methoxyl pectin (Muhoza et al., 2020).

Pectin has been used with proteins to form highly interconnected networks to improve both biopolymers' functionality (Lan et al., 2020). Recently, the fabrication of ternary protein-polysaccharide-polyphenol conjugates have gained interest as potential prospects for their application in the Food and Beverage, Pharmaceutical and Cosmetic, and Biotechnology and Biomedical industries. Some benefits found are: Enhanced stability against environmental stresses (temperature, pH, and ionic strength); Increased shelf-life by affording protecting sensitive ingredients against degradation; Targeted delivery, by designing carrier systems to release their payload in response to specific stimuli (pH, temperature,

or enzymes); Sustained release for active ingredients, reducing the need for frequent reapplication; Improved bioavailability of active ingredients by protecting them from degradation and improving their solubility; Increased bioactivity of active ingredients by facilitating their interaction with biological targets; among others (Yan et al., 2023).

Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) and cacao (*Theobroma cacao*) are important native crops of Mexico, and there exists an ongoing drive to diversify their use by as food ingredients. It has been reported that proteins from amaranth can be produced more sustainably than proteins from animal origin, and that they possess a highly balanced amino acids composition (Hadidi et al., 2024). Amaranth proteins are susceptible to modification by, i.e., ultrasound and pH shifting, which result in improved physicochemical properties (Constantino & García-Rojas, 2020). On the other hand, in Mexico the cacao industry generates about 22,000 t of wastes annually (SIAP, 2023) after the grains extraction. The cacao waste is made up by seed shell (2.1 to 2.3 %), pod husk (67 to 76 %), and pulp (8.7 to 9.9 %) (Campos-Vega et al., 2018). Pectin was extracted using green process from pod husks wastes, having surface active and emulsifying properties (Trujillo-Ramírez et al., 2018). Likewise, polyphenols have been extracted from cacao wastes (Manzano et al., 2017).

Based on the above, this project aimed to form and evaluate the physicochemical properties of amaranth protein-cacao husk pectin-cacao shell/husk polyphenols ternary complex coacervates, in hope of providing insights which may allow their proper application in the design of novel foods with desired attributes.

3.3. Materials and Methods

3.4. Procurement of vegetal materials

Seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. variety Revancha were obtained from a local producer in San Jose Atlán Community, Huichapan Municipality, State of Hidalgo, Mexico, with GPS coordinates of 20° 20' 26.4192" N, 99° 41' 39.7356"

W and an elevation above sea level of 2150 m. By-products (shell and husk) of *Theobroma cacao* L. were obtained from a local producer in Arena 2nd section Community, Comalcalco Municipality, State of Tabasco, Mexico, with GPS coordinates of 18° 10' 35.2" N, 93° 23' 50.4" W and an elevation above sea level of 40 m.

3.3.1. Chemicals reagents

Hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide (NaOH), citric acid, magnesium sulfate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sulfuric acid (H_2SO_4), and analytical grade ethanol was procured from J.T. Baker (Xalostoc, State of Mexico, Mexico). Hexane was supplied by MEYER® Chemical Reagents (Tlahuac, Mexico City, Mexico). Sodium carbonate (Na_2CO_3), sodium tetraborate, 3-phenylphenol, D-galacturonic acid, gallic acid, 2,20-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 6-hydroxy-5,7,8-tetramethylcroman-2-carboxylic acid (Trolox) and sodium dodecyl sulfate (SDS) were purchased from Sigma-Aldrich Mexico (Toluca, State of Mexico, Mexico). All the water used was distilled and deionized (DDW).

3.3.2. Amaranth protein isolate extraction

Amaranth protein (AP) was obtained according to the methodology described by García-de la Rosa et al. (2023). Briefly, seeds were cleaned, winnowed and sorted to remove extraneous matter, followed by washing with water and drying (60 °C, 24 h) in RAD/RFD Lab Convection Oven (Despatch, Lakeville, MN, USA). The dried seeds were ground in a MCR model CAB-1000 Hammer Mill (Harlow, UK), and sieved through a 24-US mesh (0.8 mm) to obtain amaranth flour. Sixty g of flour were degreased using a Soxhlet equipment with hexane (150 mL, 75° C, 5 h). The defatted amaranth flour (100 g) was dispersed in DDW (10 %, *m/V*), stirred at 600 rpm (RO 15 power, IKA® Werke, Staufen, Germany) at room temperature (22.0±2.0) °C for 60 min. Subsequently, the pH of the dispersion was set to pH 11 (Potentiometer, mod. pH 120, Conductronic; Santa Cruz Buenavista, State of Puebla, Mexico) with 1 N NaOH and left in continuous stirring for 60 min.

Afterwards, the dispersion was centrifuged at 9000×g at 10 °C for 15 min in a 5810 R Eppendorf AG centrifuge (Hamburg, Germany). The pH value of the supernatant was adjusted to 4 with 1 N HCl. Precipitated protein was separated by centrifugation at 9000×g at 4 °C for 15 min. The residue was washed 3 times with DDW and neutralized with 0.1 N NaOH up to pH 7. It was then dried in an HCF-62 oven (Riossa Digital, Mexico City, Mexico), at 40 °C for 48 h with continuous fixed air circulation. The isolate had a protein content of (85.3±1.0) % (Kjeldahl method, conversion factor 6.25). The dry isolate was manually ground and stored in sealable polyethylene bags at (4.0±1.0) °C until required for use.

3.3.3. Pectin extraction from the cacao pod husk

Cacao pod husk was cut into small pieces (~1 cm) and dehydrated in the air circulation oven at 55 °C for 36 h. Dried pieces were ground in an Oster® BLSTBESTR blender (Mexico City, Mexico). A 0.8 mm sieve was used to obtain cacao pod husk flour (CPF) (Trujillo-Ramírez et al., 2018). The mass fraction of moisture content was determined by the oven drying method, protein by the Kjeldahl method (considering a conversion factor of 6.25), lipids by the Soxhlet method, ash and fiber (AOAC, 1996).

Cacao pod husk pectin (CP) was extracted from CPF by acid hydrolysis using the methodology of Vriesmann et al. (2012). The mass fraction of moisture, protein, lipids, ash, fiber, and carbohydrate content of CP were determined. The CP extraction yield was estimated using Equation 1.

$$w(\text{Yield}) \% = (m(\text{CP})/m(\text{CPF})) \cdot 100 \quad (1)$$

where CP is cacao pod husk pectin powder (g) and CPF is cacao pod husk flour (g).

3.3.4. Physicochemical characterization of pectin from cacao pod husk

Esterification degree (DE), amidation degree (DAm), acetylation degree (DA), methoxyl percentage (MeO %) and galacturonic acid quantification (D-

galacturonic acid standard curve with a concentration range of 8-80 ug/mL) of CP was determined as reported by Trujillo-Ramírez et al. (2018).

3.3.5. Phenolic extract (PE) obtention

Sample preparation was carried out according to the methodology of Gaber Ahmed et al. (2020), with slight modifications. Dried cacao pod husks and cacao shells were ground, and a 0.8 mm sieve was used to obtain CPF and cacao bean shells flour (CSF); the moisture, protein, lipids, ash, fiber, and carbohydrate content was determined. After that, crude extract of CPF (2.5 g) and CSF (2.5 g) was prepared in 100 mL of 75 % (V/V) ethanol and kept in continuous stirring for 90 min in darkness. The solution was centrifuged at 5000×g for 5 min; the supernatant was filtered through nylon filters (0.45 µm). Crude extract was stored in darkness at (4.0±1.0) °C until required for use.

3.3.6. Ternary complex coacervates formation

AP (1 %, *m/m*) and CP (1 %, *m/m*) solutions were dispersed in DDW at room temperature (22.0±2.0) °C for 12 h by continuous stirring (600 rpm). The stock dispersions were stored for 24 h at (4.0±1.0) °C to allow for complete hydration. PE extract was diluted with DDW to 0.0, 0.1 and 0.5 % (*m/V*) (Thongkaew et al., 2014).

AP dispersions were added to the CP dispersion at mass ratios of 2:1 and 5:1 (*m/m*), stirred at 50 rpm for 3 min, and adjusted to pH 3 using 0.1 N HCl. Thereupon, PE at 0.0, 0.1, and 0.5 % (*m/V*) was added to the AP:CP blends in a 2:1 (*m/m*) ratio and stirred at 50 rpm for 2 min. To ensure complete formation of the CC, mixtures were kept at (4.0±1.0) °C for 48 h; then, they were centrifuged at 121×g at room temperature (22.0±3.0) °C for 15 min to separate the different CC variations (Hernández-Rodríguez et al., 2014). The latter were coded as CC_{a/b}, where "a" represents the mass ratio between AP and CP (2:1 and 5:1, *m/m*), "b" the concentration of PE (0.0, 0.1 and 0.5 %, *m/V*).

3.3.7. Determination of pH for complex coacervates formation

ζ -potential of AP, CP, and PE dispersions was measured at a dilution of 0.01 % (*m/V*) in a pH range of 2 to 7 with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, UK). pH value of the dispersions was adjusted to the values indicated with 0.1 N HCl or 0.1 N NaOH (García-de la Rosa et al., 2023). From the above, a possible window of interaction between the three components (protein, polysaccharide and polyphenol) was established based on their relative electrical charge. A pH of 3 was selected for the formation of the complex coacervates (See Fig. 1).

3.3.8. Turbidimetric measurements for complex coacervates formation

Optimal ratios for forming insoluble complexes between AP and CP were determined by turbidimetric measurements using the methodology of Ramírez-Santiago et al. (2012), with slight modifications. AP (1 %, *m/V*) and CP (1 %, *m/V*) dispersions has their pH adjusted between 2 and 7 with 0.1 N HCl or 0.1 N NaOH. The dispersions were mixed at AP:CP mass ratio of 1:1 to 8:1 (*m/m*) with a total biopolymer concentration of 1 % (*m/V*). The mixtures were stirred at 600 rpm for 30 min and left to rest at (4.0±1.0) °C for 48 h to allow them to reach the equilibrium phase. The complex coacervates were separated from the soluble ones by centrifugation at 121×g for 15 min at 20 °C. Subsequently, the absorbance of the supernatants was measured at a wavelength of 600 nm in a Genesys 10S UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific Fisher, Waltham, MA, USA).

3.3.9. Physicochemical characterization of complex coacervates

3.3.10.1. Yield, protein, and moisture content of complex coacervates

Coacervation yield was obtained using the following Equation 2.

$$w(\text{Yield})/\% = (m(\text{CC})/m(\text{BT})) \cdot 100 \quad (2)$$

where: CC is complex coacervate mass on dry basis (g) and mBT is total mass of biopolymers used on a dry basis (g).

Protein content was measured by the Kjeldahl method, considering a conversion factor of 6.25, and reported on a dry basis. Moisture content was determined by the oven drying method (AOAC, 1996).

3.3.10.2. ζ -potential and mean hydrodynamic diameter (Dh)

The ζ -potential and mean hydrodynamic diameter (Dh) of CC_{a/b} was determined using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, UK). CC_{a/b} were diluted in DDW to 0.01 % (*m/m*), and pH was adjusted to 3 with 0.1 N HCl or 0.1 N NaOH.

3.3.10.3. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The spectra FTIR of AP, CP, PE, and CC_{a/b} were determined with a CARY 630 spectrophotometer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA), provided with a universal attenuated total reflectance fixture. Dry samples of AP, CP, PE, and CC_{a/b} variations (~10 mg) were placed in contact with the diamond crystal with a geometry adjustment to a force calibration of 60 units. Absorbance was determined over the range of 4000 cm⁻¹ to 650 cm⁻¹ at a spectral resolution of 16 cm⁻¹. A total of 128 scans were carried out per sample, which were integrated to obtain the mean values of the spectrum (García-de la Rosa et al., 2023).

3.3.10.4. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The micrographs SEM was performed on the CC_{a/b} variations with a JSM-6360 Jeol SEM microscope (Tokyo, Japan) with an acceleration voltage of 15 kV. CC_{a/b} were fixed with a solution of 2 % (*m/V*) glutaraldehyde in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2) for 6 h, followed by dehydration in aqueous ethanol solutions with increasing concentrations (20, 30, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 %, *V/V*) for 60 min each. Immediately, CC_{a/b} were critically dried in a CPA II Technics Critical Point Dryer (Tousimis, Rockville, MD, USA). A sample of each CC_{a/b} was placed directly

on the surface of the aluminum sample holder with carbon tape and coated with gold at 1.5 kV, 5-6 mA, in a JFC 1100 vacuum sputter coater (JEOL, Tokyo, Japan) (Hernández-Rodríguez et al., 2014). Micrographs are presented at magnifications of 5000× and 10000×.

3.3.10.5. Colorimetry

CIELAB color parameters L^* , a^* , and b^* of $CC_{a/b}$ samples were measured with a CR-400 colorimeter (Konica Minolta, Tokyo, Japan). L^* indicates luminosity, a^* red/green, and b^* yellow/blue. Hue angle ($H^* = \tan^{-1} b^*/a^*$) was calculated, indicating sample color and Chroma ($C^* = [a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$) indicating purity or saturation of color (Kuck & Norena, 2016).

3.3.10.6. Antioxidant activity

The antioxidant activity was determined by three methods:

The Folin-Ciocalteu method was used to determine the total phenolic content (TPC) of AP, CP, PE and $CC_{a/b}$, as described by Murcia and Castañeda (2022), with some modifications. 20 μ L of PE or $CC_{a/b}$ was placed in amber vials, and 450 μ L of 1 N Folin-Ciocalteu reagent was added, stirred in Vortex for 30 s, and left to rest for 10 min. Later, 450 μ L of Na_2CO_3 at 20 % (V/V) was added, and it was stirred in Vortex for 30 s, allowing the mixture to react in darkness for 90 min. Finally, the absorbance was measured at 760 nm using a Genesys 10S UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, United States). A gallic acid calibration curve was used to determine the concentration of phenols, which was expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) per gram of dry mass. PE underwent an analysis to identify substances using Gas Chromatography coupled to a Mass Spectrometer (GC-MS) (Agilent Technologies 7890B-5977A-MSD, Santa Clara, CA, USA). The MassHunter GC/MS Version Acquisition B.07.02.1938 software was used. 100 μ L of the sample was taken to dry by N_2 current and then silylated using BSTFA (50 μ L) and 150 μ L of HPLC grade dichloromethane at room temperature (22.0 ± 2.0) °C in continuous agitation (60 min). Separation was

carried out by injecting 1 μL into an HP-5 MS column (30 m length, 0.25 mm diameter, 0.25 μm thickness). Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min. The injector temperature is 280 $^{\circ}\text{C}$. Temperature program for separation: $T_{\text{initial}} = 40$ $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $T_{\text{Intermediate}} = 200$ $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, with a ramp of 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and $T_{\text{final}} = 310$ $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, with a temperature ramp of 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Spectrometry was performed in electron impact ionization mode, 70 eV in a range of 35 to 600 mass-to-charge ratio (m/z). The database for comparing the mass spectrum obtained was the National Institute of Standards and Technology (NIST) Version 14.0.

The radical scavenging activity (2,20-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid or ABTS) of each sample, was determined as described by Adegbaaju et al. (2020), with some modifications. ABTS radical was formed and then diluted with ethanol to obtain a working solution with an absorbance value of (0.70 ± 0.02) at 734 nm (ABTS^+). The $\text{CC}_{a/b}$ were centrifuged at $121 \times g$ for 10 min, and sterile saline solution (0.9 %) was added to the precipitate to break up the $\text{CC}_{a/b}$. An aliquot of 10 μL of each sample was mixed with 990 μL of ABTS^+ solution and kept in darkness for 7 min. Absorbance was measured at 734 nm. The percentage of ABTS^+ inhibition was calculated from Equation 3.

$$\text{Inhibition}(\%) = (\text{Abs}_{\text{Control}} - \text{Abs}_{\text{Sample}} / \text{Abs}_{\text{Control}}) \cdot 100 \quad (3)$$

where $\text{Abs}_{\text{control}}$ is ABTS^+ absorbance, $\text{Abs}_{\text{sample}}$ is absorbance of the ABTS^+ plus sample or Trolox standard.

The radical scavenging activity (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl or DPPH $\cdot$) assay was determined according to Cortés-Viguri et al. (2021), with slight modifications. After $\text{CC}_{a/b}$ breakage, similar to ABTS essay 20 μL of $\text{CC}_{a/b}$ supernatant or of each sample were mixed with 2 mL of DPPH $\cdot$ ethanol solution (0.06 mM). Subsequently, the mixture was vortexed and kept in darkness at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min. Absorbance was measured at 517 nm on a spectrophotometer. DPPH $\cdot$ inhibition % was calculated employing a Trolox standard curve, using Equation 4.

$$\text{Inhibición}(\%) = (\text{Abs}_{\text{Control}} - \text{Abs}_{\text{sample}} / \text{Abs}_{\text{Control}}) \cdot 100 \quad (4)$$

where $Abs_{control}$ is DPPH• absorbance, Abs_{sample} is absorbance of DPPH• plus sample or standard.

3.3.10. Statistical analysis

A completely randomized design of three independent experiments was used, with all measurements being performed in triplicate. Data were subjected to variance analysis when appropriate, using Tukey's test. Significance was set at $p \leq 0.05$. A multivariate analysis of variance was used to determine which factors (AP:CP mass ratio and PE concentration) had a significant effect on the characteristics of CC_{a/b}. Statgraphics 7 software (Statistical Graphics Corp., Manugistics Inc., Cambridge, MA, United States) was used for data analysis.

3.5. Results and discussion

3.4.1. Proximal chemical composition of cacao pod husk flour (CPF), cacao seed shell flour (CSF), and cacao pod husk pectin (CP)

Table 1 shows the proximal chemical composition data obtained for CPF, CSF and CP. The protein content CPF was higher than that reported in the literature, but the percentages of the rest of the components fell within the reported values (Campos-Vega et al., 2018; Cantele et al., 2020). The protein and carbohydrate contents of CSF were higher than for CPF, but fell between the ranges reported in the literature (Hutomo et al., 2016; Okiyama et al., 2017). The protein contents of CP were approximately one order of magnitude lower than for CPF and CSF, but the carbohydrate content was about 50 % higher than for either flour. The yield of CP was (11.4 ± 0.9) % of CPF which was similar to the 11.7 % found by Hutomo et al. (2016) and to the 10.1 % reported by Vriesmann et al. (2012), but higher than the 6.1 % obtained by Trujillo-Ramírez et al. (2018). CP exhibited values of DE of (63.4 ± 0.3) %, DA of (10.64 ± 1.67) %, DAm of (0.6 ± 0.3) %, MeO of (10.4 ± 0.1) %, and had a galacturonic acid content of (72.9 ± 1.6) %.

Table 1. Proximal chemical composition cacao pod husk flour (CPF), cacao seed shell flour (CSF), and pod husk pectin (CP).

Component	CPF	CSF	CP
	w(component)/%		
Moisture	6.7 ± 0.08	8.2 ± 0.16	7.4 ± 0.10
Ash	11.5 ± 0.13	7.9 ± 0.06	16.5 ± 0.45
Protein	10.6 ± 0.15	11.8 ± 0.36	1.7 ± 0.12
Lipids	0.7 ± 0.09	9.1 ± 0.05	0.6 ± 0.05
Crude fiber	27.6 ± 0.59	18.7 ± 0.13	0.1 ± 0.08
Carbohydrates	49.6 ± 0.70	51.3 ± 0.16	74.1 ± 0.31

Data represent mean value±standard deviation on a dry basis.

The values reported for these parameters for pectin extracted from cacao pod husk by other authors is highly variable (Trujillo-Ramírez et al., 2018; Vriesmann et al., 2012). This variability is attributed mainly the cultivation conditions, to the extraction method and solvent employed (Vriesmann et al., 2012).

Nevertheless, the values of these aforementioned parameters allow us to arrive to certain conclusions regarding our extracted CP. Low methoxyl pectins are pectins with less than 50 % esterification, while high methoxyl pectins are pectins with more than 50 % esterification. The values of DE, MeO, and the galacturonic acid content pinpoint that CP can be considered as a high methoxyl pectin, possessing gel-forming properties. Thus, CP can be considered as suitable for use in the food and pharmaceutical industries where gelling properties are in great demand (Kim et al., 2016; Trujillo-Ramírez et al., 2018). Likewise, CP has a DA>10 % and low protein content, conditions that are associated with adequate emulsifying and interfacial properties. The value of DAm was too low, indicative that it has little influence on CP's sensitivity to Ca²⁺ ions (Yang et al., 2022).

3.4.2. ζ -potential measurements

ζ -potential is an essential factor in determining the variation of the electrical charge of biopolymers and the magnitude of their possible interaction. Fig. 1

shows the variation of the ζ -potential as a function of the pH of solutions AP, CP, and PE. For strong electrostatic interactions to take place and coacervates to form, the charges of the biopolymers must have the same magnitude but opposite signs (Banjare et al., 2019).

ζ -potential values for CP solutions were negative throughout the studied interval, ranging from (-1.9 ± 0.4) mV at pH 2 and (-46.7 ± 1.3) mV at pH 7, similar to what was reported by Salminen and Weiss (2013). This predisposition is typical for high methoxyl pectins because carboxyl groups ($-\text{COOH}$) have low pK_a values; as pH increases, they are converted into carboxylate groups (COO^-), leading to negative values of ζ -potential (Trujillo-Ramírez et al., 2018).

In the case of AP, the values of ζ -potential were $(+14.3 \pm 0.3)$ mV (pH 2.0) to (-29.5 ± 0.4) mV (pH 7.0), similar to that reported for *Amaranthus hypochondriacus* ($+25$ mV at pH 2.0 to -30 mV at pH 8.0) (Ventureira et al., 2012). ζ -potential values for PE ranged from $(+6.7 \pm 1.0)$ to (-27.3 ± 0.4) mV as pH increased (2.0 to 7.0). Phenols can interact with proteins through electrostatic interactions between the hydroxyl group of phenolic compounds and the amino groups of protein residues (Shahidi & Senadheera, 2019). Therefore, the present concentrations of PE and CP (given in the coacervate formation section) balance their negative charges with the positive charges of AP. From the measurements of ζ -potential, a pH value of 3 was selected to form coacervates.

Formation of coacervates will depend mainly on the pH, ionic strength, concentration, proportions, and nature of the biopolymers. Therefore, electrostatic interactions will occur when mixing biopolymers with opposite charges, leading to AP and CP slow rearrangement (hours or days) to form complex coacervates. In this sense, after ensuring the complete formation of the $\text{CC}_{a/b}$ (48 h), ζ -potential was measured (Fig. 1b).

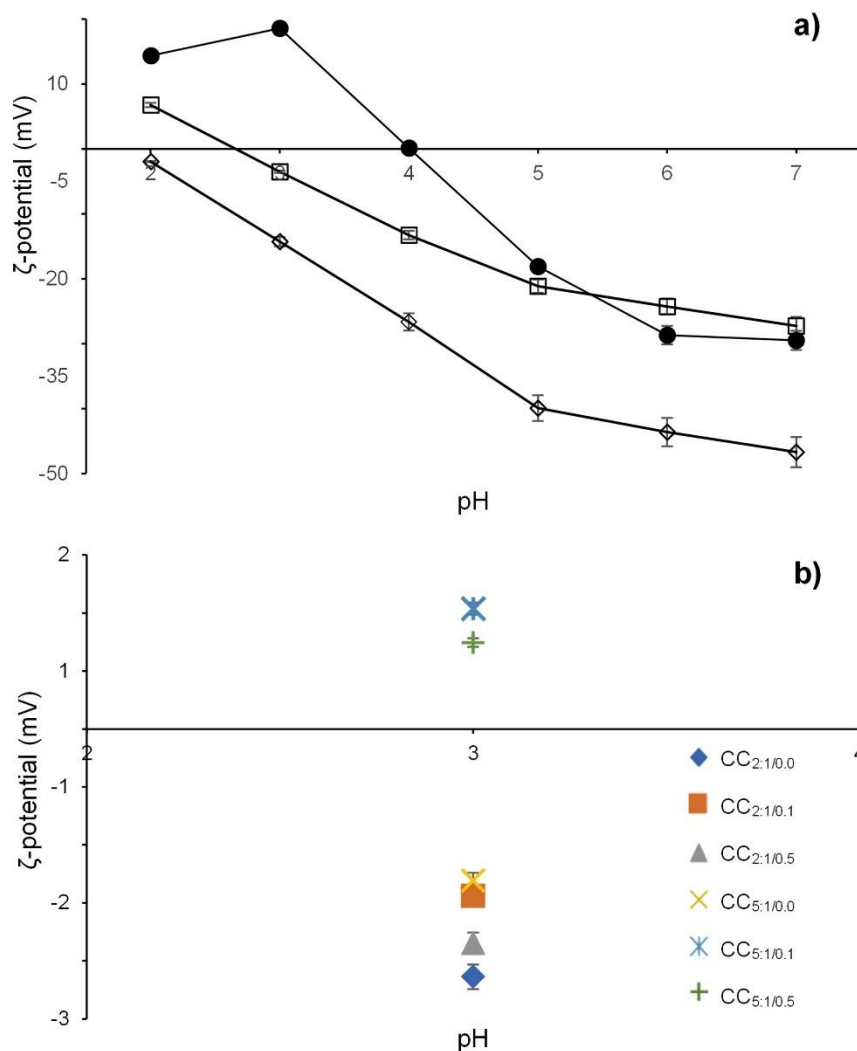


Fig. 1. a) ζ -potential as a function of pH of amaranth protein (●), cacao pod husk pectin (◇), phenolic extract of cacao shell/husk (□). b) ζ -potential of CC_{a/b} as a function of pH.

ζ -potential of CC_{5:1/0.1} approached charge neutrality (0.74 ± 0.11) mV, demonstrating that a load balance was achieved between the -NH^{3+} remnants of AP and the -COO^- of PE and CP, unlike CC_{2:1/0.0}, which showed the highest negative electrical charge ((-2.1 ± 0.1) mV). This could be due to an excess of negative charges of the CP concerning the AP loads in this ratio (2:1, AP:CP) (Espinosa-Andrews et al., 2013).

3.4.3. Turbidimetric measurements

Turbidimetry is based on the ability of particles to absorb and scatter light that falls on them. Absorbance of a biopolymeric solution can be altered by changes in pH and concentration, which influence the surface charge of the particles, contributing to the formation and dissociation of soluble and insoluble complexes. Due to the above, there are changes in the mass's size and the possible formation of aggregates or coacervates (Ghobadi et al., 2020); therefore, when a system contains a higher amount of suspended particles, a higher turbidity value is expected (Constantino & Garcia-Rojas, 2022). Fig. 2 shows the absorbance values of the supernatants of the AP and CP mixtures.

Similar trends were observed in the different AP:CP ratios, with 4 regions detected: 1) A region above pH 6.5, where AP and CP coexist to a greater extent without interacting due to a strong electrostatic repulsion due to the negative values of ζ -potential (AP: (-29.4 ± 0.5) mV; CP: (-48.0 ± 1.3) mV). 2) A region where soluble complexes begin to form at a critical pH of 6.5 (pH_c) by binding AP molecules with CP chains, exhibiting a maximum absorbance value at pH 6; this happens because there are positively charged AP remnants that interact with negatively charged CP remnants. 3) A region at pH values below 4.5 ($pH_{\phi 1}$), where higher amounts of AP molecules bind to the CP chains due to the increase in the charge density in the protein, which leads to saturation of functional groups in the CP chains and begins to aggregate to form insoluble complexes, resulting in charge neutralization, showing maximum phase separation at pH 3.0 (pH_{opt}) (Ramírez-Santiago et al., 2012). 4) A region where the pH decreased, a second critical pH ($pH_{\phi 2}$) was reached below 3.0; in this zone the insoluble complexes begin to dissociate into soluble complexes or even into individual non-interacting AP and CP molecules (Salminen & Weiss, 2013), which could be attributed to the protonation of AP and CP functional groups, which would lead to the formation of a system with partially negative charges (Hashemi Gahruie et al., 2022).

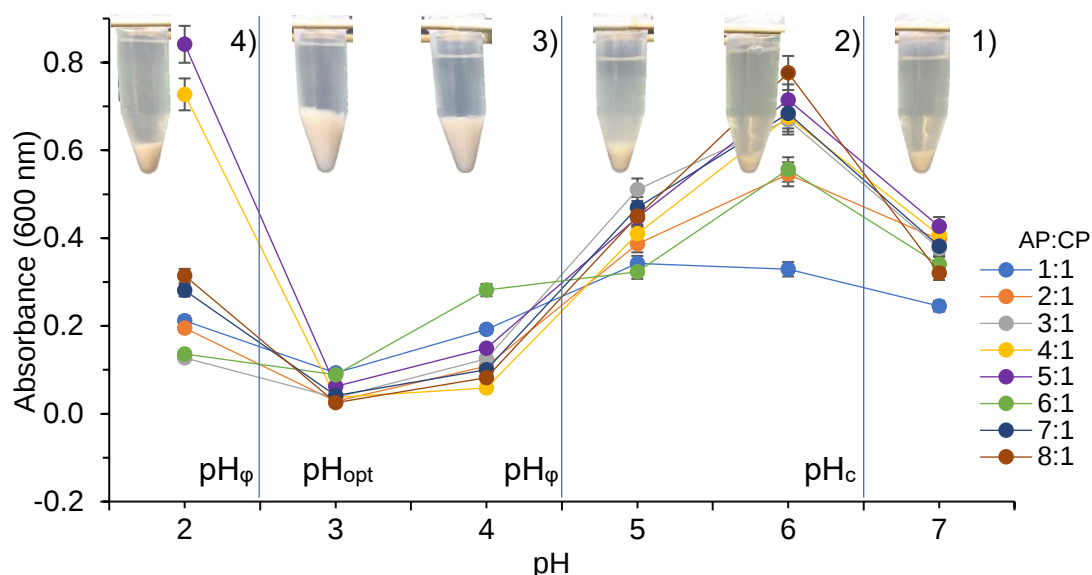


Fig. 2. Change in the absorbance of supernatants from solution (1%, m/m) of amaranth protein (AP) and cacao pod husk pectin (CP) at different AP:CP ratios as a function of pH.

These results indicate that the optimal pH value for $CC_{a/b}$ formation is 3.0, similar to that observed for ζ -potential. Results showed that the most adequate mass ratios for driving the interaction between (AP:CP) fell in the range between 2:1 to 5:1, whose supernatants exhibited significantly different lower absorbances between themselves (0.025 ± 0.002 to 0.062 ± 0.001 , respectively), in contrast to the mass ratios of 1:1, 6:1, 7:1 and 8:1, which were non-significantly different between themselves. Based on the above, the most distant mass ratios of 2:1 and 5:1 between (AP:CP) were chosen to form $CC_{a/b}$. Subsequently, an experiment was carried out where PE at different concentrations (0.0, 0.1, and 0.5 %, *m/V*) was added to the AP:CP coacervates, adjusting to pH 3; its consolidation and yield increased (data not shown) after the maturation time (48 h).

3.4.4. Yield, moisture content and protein

Table 2 shows data obtained using Multivariate Analysis of Variance. It was observed that as the AP:CP mass ratio increased, yield, and protein content increased. Results obtained could indicate that at a 5:1 (AP:CP) ratio, the presence of higher amounts of AP molecules can increase electrostatic

interactions with CP and PE molecules, which could influence the obtaining of complex coacervates with higher protein content and yield in contrast to coacervates formed at a 2:1 (AP:CP) ratio (Chang et al., 2016).

Table 2. Mean values of yield, moisture contents, protein of complex coacervates.

Parameter	Mass ratio		Extract concentration		
	AP:CP (<i>m/m</i>)		(% , <i>m/V</i>)		
	2:1	5:1	0.0	0.1	0.5
<i>w</i> (yield)/%	54.3 ± 2.0 ^b	60.1 ± 1.3 ^a	56.8 ± 3.9 ^a	55.9 ± 2.4 ^a	59.0 ± 2.6 ^a
<i>w</i> (moisture)/%	90.1 ± 1.4 ^a	91.5 ± 3.6 ^a	90.1 ± 1.2 ^a	91.2 ± 4.5 ^a	91.1 ± 1.3 ^a
<i>w</i> (protein)/%	43.4 ± 1.5 ^b	59.8 ± 1.8 ^a	50.5 ± 9.4 ^a	51.2 ± 8.1 ^a	53.1 ± 9.4 ^a

Values are presented as mean±standard deviation. Different letters on the same line indicate significant differences between means ($p \leq 0.05$).

Moisture is an important factor in food processing, so its analysis is transcendental. An increase in moisture content was observed when the AP:CP mass ratio (5:1 to 2:1) and the PE concentration (0.0 to 0.5 m/V) increased. This could be due to the protein acts as a water-binding agent through cross-linking that results in formation of a three-dimensional network from the union of biopolymeric chains. Another factor influencing the formation of coacervates is pH because it affects the surface charges of proteins to a greater degree than polysaccharides (Koralegedara et al., 2020), as observed in ζ -potential (Fig. 1). CC_{a/b} formation pH was carried out at pH 3.0, where positive surface charges of AP are capable of interacting with the negative charges of CP and PE, in addition to the fact that at this pH occurs the maximum attractive interaction between proteins and phenols (Shahidi & Senadheera, 2019). Based on the above, a small increase in yield, moisture content and protein was observed by increasing the extract concentration.

3.4.5. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Fig. 3 shows the FTIR spectra of AP, CP, PE, and CC_{a/b}. AP exhibited an absorption band at 3268 cm⁻¹ corresponding to the contraction vibrations of O-H,

attributed to hydrogen bonds present in the water. In addition, it presented a weak band at 3073 cm^{-1} appropriate for C-H stretch vibration and an N-H bond tension vibration band at 3280 cm^{-1} belonging to the amine B group (Rousi et al., 2019). It also showed peaks at 1636, 1523, and 1396 cm^{-1} corresponding to the stretching and flexural bonds of C=O, N-H, and C-N characteristic of amides I, II, and III, respectively. Amide I region is considered helpful for the analysis of the secondary structure of proteins, as this structure is more susceptible to unfolding, folding, or aggregating, and its molecular interactions, chemical reactivity, and functional properties will depend on it (Trujillo-Ramírez et al., 2018).

CP had an absorption band at 3215 cm^{-1} corresponding to the vast stretch of the O-H bond and a stretch band of the C-O-C bond at 1007 cm^{-1} due to the hydrogen bonds of the galacturonic acid (Lan et al., 2020). At 2940 cm^{-1} , a peak was associated with stretching the C-H bond of methyl groups ($-\text{CH}_3$). In addition, it had two peaks, one at 1701 and the other at 1612 cm^{-1} , characteristic of the esterified carboxyl group ($-\text{COOCH}_3$) and carboxylate group ($-\text{COO}^-$) respectively, associated with the carbonyl group (C=O) present in carbohydrates (Raei et al., 2018).

PE spectrum exhibited a broad absorption band at 3267 cm^{-1} , corresponding to the stretching of the O-H bond. In addition, it presented peaks at 2925 cm^{-1} and 2850 cm^{-1} , corresponding to the stretching of the C-H bond, associated with the $-\text{CH}_2$ and $-\text{CH}_3$ groups, respectively; the above shows the presence of phenolic groups in the extract. Two peaks at 1589 and 1224 cm^{-1} were evidenced that can be attributed to aromatic rings (Eze et al., 2022), and a peak at 1693 cm^{-1} characteristic of the carboxyl group ($-\text{COOH}$), which would indicate the presence of phenolic acids. Likewise, it exhibited a band at 1030 cm^{-1} , typical of stretching the S=O bond, showing the presence of sulfur amino acids in the extract (Kashyap et al., 2022).

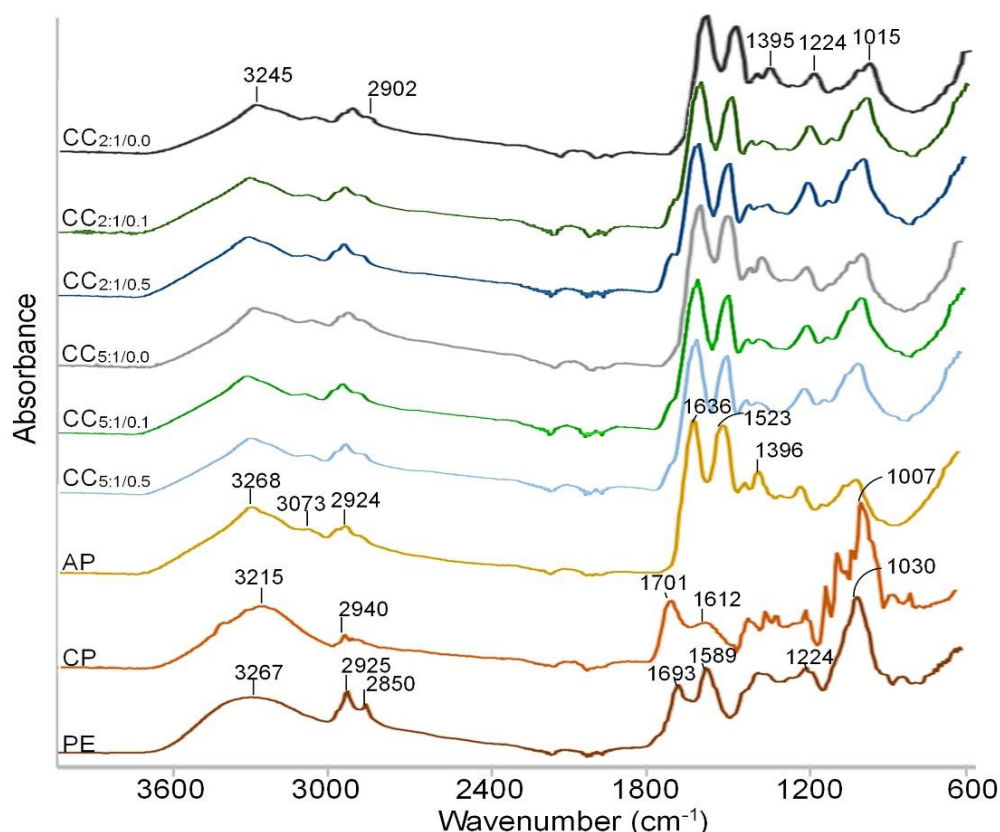


Fig. 3. FTIR spectra of phenolic extract of cacao shell/husk (PE), cacao pod husk pectin (CP), amaranth protein isolate (AP), and complex coacervate variations (CC_{a/b}).

Electrostatic interactions between AP, CP, and PE can be observed in the fingerprint region of the spectrum (1400 - 600 cm⁻¹), where peaks with different intensities and transposition of AP, CP, and CC_{a/b} spectra were shown, which can be seen as an increase in 1015 cm⁻¹ corresponding to the vibration of the N-H bond (amide II) and in 1224 cm⁻¹ which can be attributed to the vibration of the S=O bond of sulfur amino acids (Vargas et al., 2021). In addition, the band at 1395 cm⁻¹ (C-N, amide III) decreased in CC without PE compared to AP. Similarly, in the amide I region (C=O), there was a decrease in the peak to 1694 cm⁻¹ in all CC_{a/b} spectra compared to AP and CP. Furthermore, there was an increase in the peak to 2902 cm⁻¹ in the CC_{5:1/0.5} concerning the PE spectrum, suggesting hydrogen bonds in the coacervates could increase due to PE. On the other hand, in CC_{a/b}, there were visible changes in the 3223 cm⁻¹ peak that corresponds to the vibration of the N-H bonds of the proteins and in the 3014 cm⁻¹ peak, due to the

O-H bond of the PE (Li et al., 2018). Based on the above, it can be inferred that the formation of the complex coacervates was a consequence of the electrostatic interaction between the ammonium ($-\text{NH}^{+3}$) groups of AP, carboxylate groups ($-\text{COO}^{-}$) of CP, and hydroxyl groups ($-\text{OH}$) of PE (You et al., 2018).

3.4.6. Microstructure and particle size

Fig. 4 presents SEM micrographs of the $\text{CC}_{a/b}$ variations. The microstructure of protein-polysaccharide coacervates could be defined as a structural network with proteins as binding sites and polysaccharide chains as cross-linking bridges. Furthermore, coacervates show a porous microstructure with different pore sizes and two distribution types (uniform or uneven). The size and distribution depend on the mass ratio and the number of bonds between the protein and the polysaccharide (R. Zhang et al., 2020).

The morphology exhibited by the $\text{CC}_{a/b}$ showed the formation of a three-dimensional network with a heterogeneous and porous structure with small aggregates. Complex coacervates of pectin-sodium alginate with curcumin encapsulation (Huang et al., 2016) and pea-chitosan protein (Q. Zhang et al., 2020) have exhibited the same microstructure. Regular and irregular spherical particles were observed in the $\text{CC}_{a/b}$. de Souza et al. (2018) mention that the irregular shapes could be due to the interaction of phenolic compounds with the protein. In $\text{CC}_{5:1/0.1}$ and $\text{CC}_{5:1/0.5}$ larger pore sizes with an irregular distribution were observed compared to $\text{CC}_{2:1/0.1}$ and $\text{CC}_{2:1/0.5}$ which showed smaller pore sizes with a regular distribution, this suggests that there was greater dominance of proteins at a 5:1 mass ratio (AP:CP), therefore, more significant aggregation between AP molecules and with PE (R. Zhang et al., 2020). The latter can be confirmed by particle size (D_h), where at a 5:1 mass ratio (AP:CP) and different concentrations (0.0, 0.1, and 0.5 %, V/V) obtained significantly larger particle sizes ((1388.0 $\pm$ 87.7), (1660.3 $\pm$ 127.0) and (1893.0 $\pm$ 40.3) nm, respectively) compared to the 2:1 mass ratio at different concentrations (0.0, 0.1 and 0.5 %, V/V) with sizes of (1070.3 $\pm$ 21.9), (1244.73 $\pm$ 105.7) and (1217.3 $\pm$ 97.0) nm, respectively.

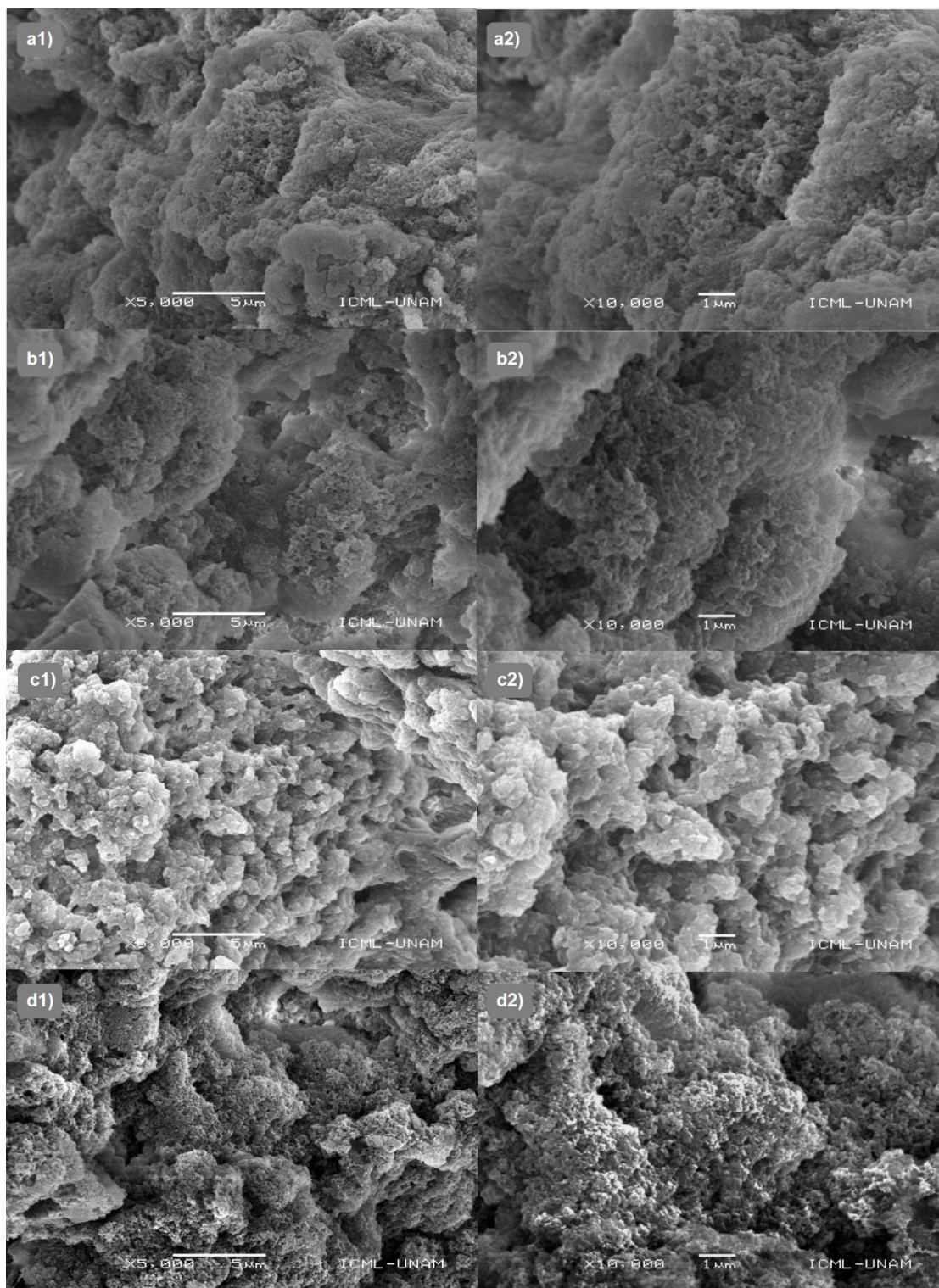


Fig. 4. SEM micrographs of complex coacervates variations ($CC_{a/b}$), with different AP to CP mass ratios (a/b): $CC_{2:1/0.1}$ (a), $CC_{2:1/0.5}$ (b), $CC_{5:1/0.1}$ (c), $CC_{5:1/0.5}$ (d). Amplitude: 5000 $\times$ (1) and 10000 $\times$ (2).

3.4.7. Colorimetry

Color parameters, according to the CIELAB system, show coordinates that cover the entire color range that the human eye perceives, where: $-a^*$ = green, $+a^*$ = red, $-b^*$ = blue, $+b^*$ = yellow, L^* = 0 to 100 (black/white), the angle of tone (H^*) = 0 to 360° (red), 90° (yellow), 180° (green), 270° (blue) and saturation (C^*) = 0 to 100 (Kuck & Norena, 2016).

L^* values in $CC_{a/b}$ were 60.7 ± 0.4 ($CC_{2:1/0.0}$), 58.3 ± 0.4 ($CC_{2:1/0.1}$), 54.4 ± 0.2 ($CC_{2:1/0.5}$), 61.1 ± 0.1 ($CC_{5:1/0.0}$), 59.7 ± 0.3 ($CC_{5:1/0.1}$) and 55.8 ± 0.3 ($CC_{5:1/0.5}$), so the samples presented a light color. $CC_{2:1/0.0}$ and $CC_{5:1/0.0}$ had significantly higher L^* values compared to those CC that contained PE ($CC_{2:1/0.1}$, $CC_{2:1/0.5}$, $CC_{5:1/0.1}$ and $CC_{5:1/0.5}$).

Values of a^* were as follows: 2.0 ± 0.2 ($CC_{2:1/0.0}$), 2.9 ± 0.2 ($CC_{2:1/0.1}$), 4.2 ± 0.2 ($CC_{2:1/0.5}$), 1.9 ± 0.2 ($CC_{5:1/0.0}$), 1.0 ± 0.1 ($CC_{5:1/0.1}$) and 3.7 ± 0.1 ($CC_{5:1/0.5}$). The b^* values were 12.0 ± 0.3 ($CC_{2:1/0.0}$), 12.1 ± 0.1 ($CC_{2:1/0.1}$), 13.2 ± 0.3 ($CC_{2:1/0.5}$), 12.7 ± 0.2 ($CC_{5:1/0.0}$), 10.6 ± 0.4 ($CC_{5:1/0.1}$) and 14.1 ± 0.1 ($CC_{5:1/0.5}$). Both values were positive showing a tendency of the $CC_{a/b}$ to red and yellow, respectively.

Eze et al. (2022) mention that the concentration of PE could contribute to the decrease in luminosity and the increase in a^* and b^* values due to the color of phenolic compounds such as anthocyanins present in cacao pod husk and bean shell, similar results were obtained in this research. It was also observed that the H^* had values of 80.5 ± 0.7 ($CC_{2:1/0.0}$), 76.7 ± 1.0 ($CC_{2:1/0.1}$), 72.6 ± 0.5 ($CC_{2:1/0.5}$), 81.5 ± 0.7 ($CC_{5:1/0.0}$), 84.8 ± 0.1 ($CC_{5:1/0.1}$), and 75.3 ± 0.2 ($CC_{5:1/0.5}$), with a tendency to reddish yellow. Also,

$CC_{a/b}$ presented low color saturation from 12.2 ± 0.3 ($CC_{2:1/0.0}$), 12.4 ± 0.1 ($CC_{2:1/0.1}$), 13.9 ± 0.4 ($CC_{2:1/0.5}$), 12.8 ± 0.2 ($CC_{5:1/0.0}$), 10.7 ± 0.4 ($CC_{5:1/0.1}$), and 14.5 ± 0.1 ($CC_{5:1/0.5}$). Bassijeh et al. (2020) mention that the reddish color presented in coacervates formed from whey protein isolate and Persian gum may have been influenced by astaxanthin encapsulation.

3.4.8. Antioxidant activity

Cacao by-products are rich in polyphenols, which have antioxidant properties that help prevent oxidative damage to cells (Zhang et al., 2024). TPC results of cacao pod husk and cacao bean shell extracts, expressed as GAE, were (53.7 ± 2.1) mg/g and (86.4 ± 4.1) mg/g, respectively. Cantele et al. (2020) reported that the TPC, expressed as GAE, of cacao bean shells ranges from 3.12 to 94.95 mg/g. On the other hand, the cacao pod husk has a TPC, expressed as GAE, between 46.0 and 57.0 mg/g (Campos-Vega et al., 2018). Therefore, the data obtained are within the ranges mentioned above.

Fig. 5 shows the chromatogram of PE obtained by CG-MS analysis for compound identification. Table 3 shows nine phenolic compounds that were identified, in addition to other compounds such as caffeine and theobromine, that have antioxidant and anti-inflammatory properties and a positive effect on mood and influence on alertness. Phenolic compounds identified have biological properties due to their ability to donate electrons and hydrogens. Compounds such as protocatechuic acid, pyrogallol, and vanillic acid, which have antioxidant and antimicrobial activity, were highlighted (Zhang et al., 2024).

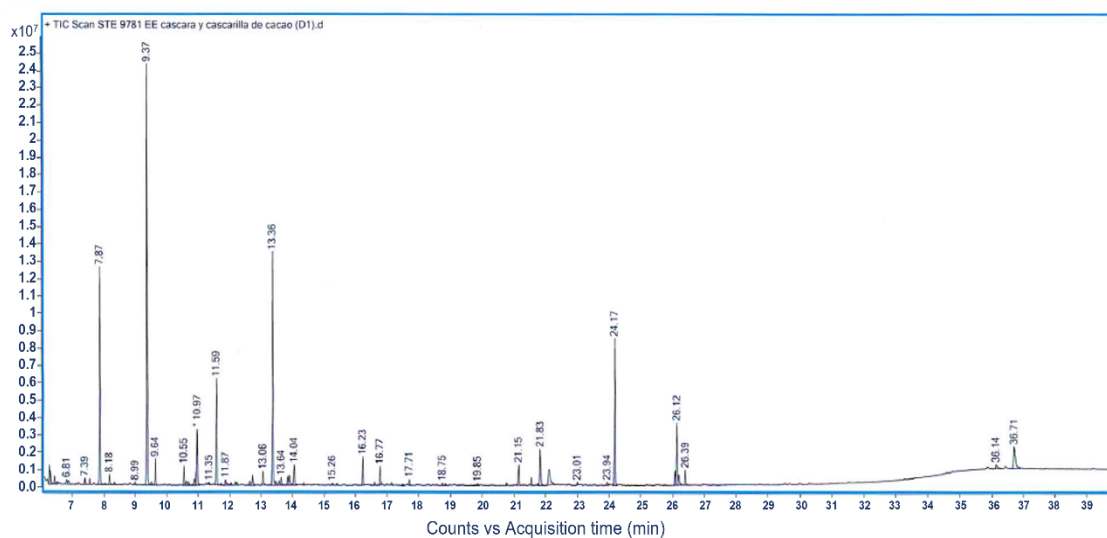


Fig. 5. Chromatogram of silylated compounds present in the cacao shell/husk extract (PE).

In addition, in the present study, the TPC, expressed as GAE, of AP (1.8 ± 0.2 mg/g), CP (23.1 ± 0.4 mg/g), and PE (70.7 ± 2.5 mg/g) was determined. It is worth mentioning that Castel et al. (2014) noted that the TPC for *Amaranthus spp.* it depends on the extraction method, which ranges expressed as GAE, from 0.01 to 3.0 mg/g. On the other hand, Nieto-Figueroa et al. (2020) report TPC values, expressed as GAE, for CP of 24 to 27 mg/g. Associated with the above, AP and CP had a low inhibition % of ABTS⁺ (9.52 ± 1.56 and 16.5 ± 0.29 %, respectively) compared to PE to 0.5 % (*m/V*) (PE_{free}) which was 34.9 ± 0.7 %.

The TPC values $w(\text{GAE})/(\text{mg/g})$ of CC_{a/b} were as follows, from highest to lowest significantly: 35.9 ± 0.2 (CC_{5:1/0.5}), 26.8 ± 0.3 (CC_{2:1/0.5}), 19.2 ± 0.1 (CC_{5:1/0.1}), 9.1 ± 0.1 (CC_{5:1/0.0}), 11.2 ± 0.2 (CC_{2:1/0.1}), 4.3 ± 0.1 (CC_{2:1/0.0}). It is important to highlight that the TPC values, obtained from AP and CP were subtracted from their respective systems so as not to overestimate the antioxidant capacity of PE. The TPC value, expressed as GAE, of PE_{free} was 46.6 ± 0.3 mg/g. DPPH• and ABTS⁺ inhibition % values of CC_{a/b} and PE_{free} were 15.1 ± 0.7 and 6.6 ± 0.2 (CC_{2:1/0.0}), 37.7 ± 0.9 and 30.7 ± 0.8 (CC_{2:1/0.1}), 49.8 ± 1.7 and 33.6 ± 0.8 (CC_{2:1/0.5}), 32.5 ± 1.3 and 12.2 ± 0.5 (CC_{5:1/0.0}), 37.1 ± 0.9 and 32.9 ± 0.7 (CC_{5:1/0.1}), 52.7 ± 2.2 and 35.0 ± 0.7 (CC_{5:1/0.5}), 49.8 ± 0.9 and 34.9 ± 0.7 (PE_{free}), respectively.

TPC values, expressed as GAE, increased from (4.3 ± 0.1) to (35.9 ± 0.2) mg/g as the PE concentration increased from 0.0 to 0.5 % (*m/V*) and the mass ratio AP:CP increased from 2:1 to 5:1. DPPH• inhibition % values of CC_{a/b} were higher (15.1 ± 0.7 to 52.7 ± 2.2) as the AP:CP mass ratio increased from 2:1 to 5:1 and PE concentration from 0.0 to 0.5 % (*m/V*). Kuck and Norena (2016) microencapsulated phenolic extract of grape skin using gum Arabic, partially hydrogenated guar gum, and polydextrose as encapsulating agents, reporting a inhibition % between 45.4 and 59.1 %, suggesting that the increase in the concentration of the phenolic extract increases the antioxidant capacity.

Table 3. Antioxidant compounds in phenolic extract (PE).

Compound*	RT (min)	MW (g/mol)	Molecular ion (<i>m/z</i>)	Fragmented ions (<i>m/z</i>)	Molecular formula
Catechol	11.9	110.1	207	75, 117, 147, 151, 167, 169	C ₆ H ₆ O ₂
4-Metilcatechol	15.2	124.1	269	147, 207, 253, 268	C ₇ H ₈ O ₂
Hydroquinone	15.4	110.1	254	73, 75, 131, 147, 207, 239	C ₆ H ₆ O ₂
Isovanillin	17.5	152.1	312	149, 165, 223	C ₈ H ₈ O ₃
Pyrogallol	17.7	126.1	343	73, 147, 239, 240, 241, 327, 342	C ₆ H ₆ O ₃
3- hydroxybenzoic acid	18.7	138.1	282	75, 193, 267, 268	C ₇ H ₆ O ₃
4- hydroxybenzoic acid	18.8	138.1	312	193, 207, 223, 267, 268	C ₇ H ₆ O ₃
Vanillic acid	20.7	168.1	297	73, 207, 223, 253, 267, 282	C ₈ H ₈ O ₄
Protocatechuic acid	21.5	154.1	371	73, 193, 194, 281, 311, 355, 370	C ₇ H ₆ O ₄
Caffeine	22.1	194.1	195	82, 109, 165, 194	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂
Theobromine	21.8	180.1	181	82, 109, 137, 180	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂

*Derivative TMS. Source: Authors' creation. PE= cacao shell/husk phenolic extract. RT=retention time. MW=molecular mass. *m/z*= mass-to-charge ratio.

ABTS⁺ inhibition % of CC_{a/b} increased from 6.6±0.2 (CC_{2:1/0.0}) to 35.0±0.7 (CC_{5:1/0.5}) as the AP:CP mass ratio increased from 2:1 to 5:1 and PE concentration from 0.0 to 0.5 % (*m/V*). Constantino and Garcia-Rojas (2022) reported similar characteristics in amaranth protein-carboxymethylcellulose coacervates used for the encapsulation of ethanolic extracts of betanin; they mentioned that increasing the mass ratio of the encapsulating material, as well as the concentration of phenolic compounds, promoted more significant antioxidant activity.

Both DPPH• and ABTS⁺ inhibition % values showed a similar trend dependent on PE concentration, probably due to the reducing properties associated with phenolic compounds that act by donating hydrogen atoms to disrupt the reaction of free radicals. In addition, the conformation and chemical structure of polyphenols can affect their reducing power (Kashyap et al., 2022).

3.6. Conclusions

A high yield of high methoxyl CP was obtained from agro-industrial cacao residues, which meets the requirements for commercial application. Coacervate formation between AP, CP, and PE is influenced by two key factors: the mass ratio AP:CP and the concentration of PE. These factors play a crucial role in determining the physicochemical and functional properties of CC_{a/b}.

As the AP:CP mass ratio increased, the resulting coacervates exhibited higher protein content, yield, and particle size. CC_{a/b} showed a tendency toward red and yellow color due to the color of phenolic compounds present in PE. Also, phenolic compounds with antioxidant and antimicrobial properties were identified in PE. High values of inhibition % of DPPH• and ABTS⁺ were observed in CC_{a/b} when the PE concentration increased from 0.0 to 0.5 % (*m/V*). Based on the above, this study offers a new and broad perspective on the application of ternary coacervation as a viable technology to contain bioactive compounds and biopolymers that could contribute to health by being applied as high-value ingredients in developing new food product.

3.7. Acknowledgments

The authors thank MC. Laura Elena Gómez Lizárraga from the Institute of Marine Sciences and Limnology, National Autonomous University of Mexico for the support provided in obtaining SEM images.

3.8. Funding

This project was funded by grant No. 919623 awarded by the National Council on Humanities, Sciences and Technology (CONAHCYT) of Mexico.

3.9. Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest in this work.

3.10. Authors' contribution

Hernández-Rodríguez and K. García-de la Rosa conceived and designed the experiments. K. García-de la Rosa performed the experiments, analyzed the data, wrote and revised the draft of the manuscript. L. Hernández-Rodríguez supervised the research and was instrumental in editing the manuscript. L. Hernández-Rodríguez, C. Lobato-Calleros, J.C. Cuevas-Bernardino, E.J. Vernon-Carter participated in the critical review, editing, and approval of the final manuscript.

3.11. References

- Adegaju, O. D., Otunola, G. A., & Afolayan, A. J. (2020). Effects of growth stage and seasons on the phytochemical content and antioxidant activities of crude extracts of *Celosia argentea* L. *Heliyon*, 6(6), e04086. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04086>
- AOAC. (1996). Official methods of analysis (Association of Official Analytical Chemist, Issue.
- Banjare, I. S., Gandhi, K., Sao, K., & Sharma, R. (2019). Spray-dried whey protein concentrate-iron complex: preparation and physicochemical characterization. *Food Technology and Biotechnology*, 57(3), 331-340. <https://doi.org/https://doi.org/10.17113/ftb.57.03.19.6228>

- Bassijeh, A., Ansari, S., & Hosseini, S. M. H. (2020). Astaxanthin encapsulation in multilayer emulsions stabilized by complex coacervates of whey protein isolate and Persian gum and its use as a natural colorant in a model beverage. *Food Research International*, 137, 109689. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109689>
- Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K. H., & Oomah, B. D. (2018). Cocoa (Theobroma cacao L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends Food Science and Technology*, 81, 172-184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11694-021-01228-7>
- Cantele, C., Rojo-Poveda, O., Bertolino, M., Ghirardello, D., Cardenia, V., Barbosa-Pereira, L., & Zeppa, G. (2020). In vitro bioaccessibility and functional properties of phenolic compounds from enriched beverages based on cocoa bean shell. *Foods*, 9(6), 1-16. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods9060715>
- Castel, V., Andrich, O., Netto, F. M., Santiago, L. G., & Carrara, C. R. (2014). Total phenolic content and antioxidant activity of different streams resulting from pilot-plant processes to obtain *Amaranthus mantegazzianus* protein concentrates. *Journal of Food Engineering*, 122, 62-67. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.032>
- Chang, P. G., Gupta, R., Timilsena, Y. P., & Adhikari, B. (2016). Optimisation of the complex coacervation between canola protein isolate and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 191, 58-66. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.07.008>
- Constantino, A. B. T., & Garcia-Rojas, E. E. (2022). Microencapsulation of betanin by complex coacervation of carboxymethylcellulose and amaranth protein isolate for application in edible gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 133, 107956. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107956>
- Constantino, A. B. T., & García-Rojas, E. E. (2020). Modifications of physicochemical and functional properties of amaranth protein isolate (*Amaranthus cruentus* BRS Alegria) treated with high-intensity ultrasound. *Journal of Cereal Science*, 95, 103076. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103076>
- Cortés-Viguri, V., Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Cuevas-Bernardino, J. C., Hernández-Rodríguez, B. E., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2021). Annatto (*Bixa orellana* L.), a potential novel starch source: antioxidant, microstructural, functional, and digestibility properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(1), 637-651. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11694-021-01228-7>
- de Souza, V. B., Thomazini, M., Echalar Barrientos, M. A., Nalin, C. M., Ferro-Furtado, R., Genovese, M. I., & Favaro-Trindade, C. S. (2018). Functional properties and encapsulation of a proanthocyanidin-rich cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*) by complex coacervation using gelatin and

- different polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 77, 297-306.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.040>
- Espinosa-Andrews, H., Enriquez-Ramirez, K. E., Garcia-Marquez, E., Ramirez-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.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.053>
- Eze, F. N., Jayeoye, T. J., & Singh, S. (2022). Fabrication of intelligent pH-sensing films with antioxidant potential for monitoring shrimp freshness via the fortification of chitosan matrix with broken riceberry phenolic extract. *Food Chemistry*, 366, 130574.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130574>
- Gaber Ahmed, G. H., Fernández-González, A., & Díaz García, M. E. (2020). Nano-encapsulation of grape and apple pomace phenolic extract in chitosan and soy protein via nanoemulsification. *Food Hydrocolloids*, 108, 105806. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105806>
- García-de la Rosa, K., Lobato-Calleros, C., Hernández-Rodríguez, L., & Aguirre-Mandujano, E. (2023). Rheological and structural properties of complex coacervates of Amaranthus hypochondriacus protein-citrus pectin. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 22(1), 1-18.
<https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim3003>
- Ghobadi, M., Koocheki, A., Varidi, M. J., & Varidi, M. (2020). Fabrication and characterization of Grass pea (Lathyrus sativus) protein isolate-Alyssum homolocarpum seed gum complex coacervate. *Polymer Testing*, 89. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2020.106636>
- Hadidi, M., Aghababaei, F., Mahfouzi, M., Zhang, W., & McClements, D. J. (2024). Amaranth proteins: From extraction to application as nanoparticle-based delivery systems for bioactive compounds. *Food Chemistry*, 439, 138164. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138164>
- Hashemi Gahruie, H., Mirzapour, A., Ghiasi, F., Eskandari, M. H., Moosavi-Nasab, M., & Hosseini, S. M. H. (2022). Development and characterization of gelatin and Persian gum composite edible films through complex coacervation. *LWT - Food Science and Technology*, 153, 112422. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112422>
- Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Pimentel-González, D. J., & Vernon-Carter, E. J. (2014). Lactobacillus plantarum protection by entrapment in whey protein isolate: κ-carrageenan complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 36, 181-188.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.09.018>
- Huang, X., Huang, X., Gong, Y., Xiao, H., McClements, D. J., & Hu, K. (2016). Enhancement of curcumin water dispersibility and antioxidant activity using core-shell protein-polysaccharide nanoparticles. *Food Research*

- Hutomo, G. S., Rahim, A., & Kadir, S. (2016). Pectin isolation from dry pod husk cocoa with hydrochloride acid. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(11), 751-756. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.511.086>
- Kashyap, P., Riar, C. S., & Jindal, N. (2022). Effect of extraction methods and simulated in vitro gastrointestinal digestion on phenolic compound profile, bio-accessibility, and antioxidant activity of Meghalayan cherry (*Prunus nepalensis*) pomace extracts. *LWT - Journal of Food Science and Technology*, 153, 112570. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112570>
- Kim, M. J., Ju, H. K., Kim, Y., Yoo, S.-H., & Kim, Y.-S. (2016). Effects of amidation and/or methylesterification of pectin on aroma release at different calcium concentration. *Food Hydrocolloids*, 52, 343-349. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.006>
- Koralegedara, I. D., Hettiarachchi, C. A., Prasantha, B. D. R., & Wimalasiri, K. M. S. (2020). Synthesis of nano-scale biopolymer particles from legume protein isolates and carrageenan. *Food Technology and Biotechnology*, 58(2), 214-222. <https://doi.org/https://doi.org/10.17113/ftb.58.02.20.6279>
- Kuck, L. S., & Norena, C. P. (2016). Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food chemistry*, 194, 569-576. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.066>
- Lan, Y., Ohm, J.-B., Chen, B., & Rao, J. (2020). Phase behavior, thermodynamic and microstructure of concentrated pea protein isolate-pectin mixture: Effect of pH, biopolymer ratio and pectin charge density. *Food Hydrocolloids*, 101, 105556. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105556>
- Li, Y., Zhang, X., Sun, N., Wang, Y., & Lin, S. (2018). Formation and evaluation of casein-gum arabic coacervates via pH-dependent complexation using fast acidification. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120(Pt A), 783-788. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.145>
- Manzano, P., Hernández, J., Quijano-Avilés, M., Barragán, A., Chóez-Guaranda, I., Viteri, R., & Valle, O. (2017). Polyphenols extracted from *Theobroma cacao* waste and its utility as antioxidant. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(1), 45-50. <https://doi.org/https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-04-388>
- Muhoza, B., Xia, S., Wang, X., & Zhang, X. (2020). The protection effect of trehalose on the multinuclear microcapsules based on gelatin and high methyl pectin coacervate during freeze-drying. *Food Hydrocolloids*, 105, 105807. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107239>

- Murcia, K. S., & Castañeda, M. d. R. (2022). Evaluation of the content of total phenols and antioxidant capacity of ethanolic extracts of cocoa shell (*Theobroma cacao* L.). *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 13(2), 53-65. <https://doi.org/https://doi.org/10.22490/21456453.4717>
- Nieto-Figueroa, K. H., Mendoza-Garcia, N. V., Gaytan-Martinez, M., Wall-Medrano, A., Guadalupe Flavia Loarca-Pina, M., & Campos-Vega, R. (2020). Effect of drying methods on the gastrointestinal fate and bioactivity of phytochemicals from cocoa pod husk: In vitro and in silico approaches. *Food Research International*, 137, 109725. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109725>
- Niu, F., Kou, M., Fan, J., Pan, W., Feng, Z. J., Su, Y., Yang, Y., & Zhou, W. (2018). Structural characteristics and rheological properties of ovalbumin-gum arabic complex coacervates. *Food chemistry*, 260, 1-6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.141>
- Okiyama, D. C. G., Navarro, S. L. B., & Rodrigues, C. E. C. (2017). Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 63, 103-112. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.007>
- Raei, M., Rafe, A., & Shahidi, F. (2018). Rheological and structural characteristics of whey protein-pectin complex coacervates. *Journal of Food Engineering*, 228, 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.02.007>
- Ramírez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C., Espinosa-Andrews, H., & Vernon-Carter, E. J. (2012). Viscoelastic properties and overall sensory acceptability of reduced-fat Petit-Suisse cheese made by replacing milk fat with complex coacervate. *Dairy Science and Technology*, 92(4), 383-398. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13594-012-0077-2>
- Rousi, Z., Malhiac, C., Fatouros, D. G., & Paraskevopoulou, A. (2019). Complex coacervates formation between gelatin and gum Arabic with different arabinogalactan protein fraction content and their characterization. *Food Hydrocolloids*, 96, 577-588. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.06.009>
- Salminen, H., & Weiss, J. (2013). Effect of pectin type on association and pH stability of whey protein-pectin complexes. *Food Biophysics*, 9(1), 29-38. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11483-013-9314-3>
- Shahidi, F., & Senadheera, R. (2019). *Encyclopedia of food chemistry: protein-phenol interactions*. In L. Melton, F. Shahidi, & R. Senadheera (Eds.), *Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 532-538). St. John's, NF, CAN: Academic Press.
- SIAP. (2023). *Progress of sowing and harvesting, summary by state*. Mexico: Agri-Food and Fisheries Information Service Retrieved from http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do

- Thongkaew, C., Gibis, M., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2014). Polyphenol interactions with whey protein isolate and whey protein isolate–pectin coacervates. *Food Hydrocolloids*, 41, 103-112. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.006>
- Trujillo-Ramírez, D., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., Hernández-Rodríguez, L., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2018). Complexation with whey protein hydrolysate improves cacao pods husk pectin surface active and emulsifying properties. *Reactive and Functional Polymers*, 123, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.12.011>
- Vargas, S. A., Delgado-Macuil, R. J., Ruiz-Espinosa, H., Rojas-Lopez, M., & Amador-Espejo, G. G. (2021). High-intensity ultrasound pretreatment influence on whey protein isolate and its use on complex coacervation with kappa carrageenan: Evaluation of selected functional properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105340. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105340>
- Ventureira, J. L., Bolontrade, A. J., Speroni, F., David-Briand, E., Scilingo, A. A., Ropers, M.-H., Boury, F., Añón, M. C., & Anton, M. (2012). Interfacial and emulsifying properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates under different conditions of pH. *LWT - Journal of Food Science and Technology*, 45(1), 1-7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.07.024>
- Vriesmann, L. C., Teófilo, R. F., & de Oliveira Petkowicz, C. L. (2012). Extraction and characterization of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) with citric acid. *LWT - Journal of Food Science and Technology*, 49(1), 108-116. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.018>
- Yan, S., Regestein, J. M., Qi, B., & Li, Y. (2023). Construction of protein-polysaccharide- and polyphenol-based conjugates as delivery systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2293253>
- Yang, X., Yuan, K., Descallar, F. B. A., Li, A., Yang, X., & Yang, H. (2022). Gelation behaviors of some special plant-sourced pectins: A review inspired by examples from traditional gel foods in China. *Trends in Food Science & Technology*, 126, 26-40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.06.012>
- You, G., Liu, X. L., & Zhao, M. M. (2018). Preparation and characterization of hsian-tsao gum and chitosan complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 74, 255-266. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.004>
- Zhang, M., Zhang, H., Jia, L., Zhang, Y., Qin, R., Xu, S., & Mei, Y. (2024). Health benefits and mechanisms of theobromine. *Journal of Functional Foods*, 115, 106126. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106126>

- Zhang, Q., Dong, H., Gao, J., Chen, L., & Vasanthan, T. (2020). Field pea protein isolate/chitosan complex coacervates: Formation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 250, 116925. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116925>
- Zhang, R., Belwal, T., Li, L., Lin, X., Xu, Y., & Luo, Z. (2020). Recent advances in polysaccharides stabilized emulsions for encapsulation and delivery of bioactive food ingredients: A review. *Carbohydrate Polymers*, 242, 116388. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116388>

4. PROPIEDADES FUNCIONALES DE COMPLEJOS COACERVADOS TERNARIOS FORMADOS POR PROTEÍNA- PECTINA-POLIFENOL DE ORIGEN VEGETAL

4.1. Resumen

Se formaron complejos coacervados (CC) a partir de aislado de proteína de amaranto (PA) y pectina de cáscara de cacao (PC), con una relación en peso PA:PC de 2:1 y 5:1 p / p y distintas concentraciones de extracto fenólico de cáscara y cascarilla de cacao (EF) (0.0, 0.1 y 0.5 % p / v). Las propiedades de los coacervados formados se evaluaron mediante actividad antioxidante en función del tiempo de almacenamiento, eficiencia de encapsulación (EE), condiciones gastrointestinales simuladas (CGS), viscosidad, capacidad de formación de espuma, propiedades de emulsificación y solubilización. El porcentaje de actividad antioxidante de los CC disminuyó levemente conforme pasó el tiempo de almacenamiento en un rango de 3.3 ± 2.8 a 17.6 ± 2.0 % a diferencia del EF no encapsulado (EF_{libre}) que presentó una disminución de 64.7 ± 3.5 %. Se observó que la relación en peso 5:1 (PA:PC) fue la mejor para encapsular (76.25 %) y asegurar que la matriz polimérica protegiera al EF. La pérdida de actividad antioxidante después de CGS fue mayor en el PF_{libre} (> 80 %) en comparación al EF protegido por CC. Se evidenció una mayor capacidad de expansión de espuma (CEE), índice de actividad emulsionante (IAE) e índice de estabilidad de emulsión (IEE) a medida que aumentó la relación en peso de 2:1 a 5:1 (PA:PC), así como un menor % de índice de cremado (IC). Los coacervados pueden tener una aplicación potencial en el desarrollo de productos alimenticios por sus propiedades funcionales.

Palabras clave: proteína de amaranto, pectina, coacervación compleja, propiedades funcionales, actividad antioxidante.

FUNCTIONAL PROPERTIES OF TERNARY COACERVATE COMPLEXES FORMED BY PROTEIN-PECTIN-POLYPHENOL FROM VEGETABLE ORIGIN⁵

Abstract

Complex coacervates (CC) were formed from amaranth protein isolate (AP) and cacao pod husk pectin (CP), with a weight ratio of 2:1 and 5:1 w / w (AP:CP) and different concentrations of phenolic extract of cacao pod husk and shell (PE) (0.0, 0.1 and 0.5 % w / v). Functional properties of CC were evaluated by antioxidant activity as a function of storage time, encapsulation efficiency (EE), simulated gastrointestinal conditions (SGC), viscosity, foaming capacity, emulsification and solubilization properties. The antioxidant activity % of CC decreased slightly as the storage time passed in a range of 3.3 ± 2.8 to 17.6 ± 2.0 % different the non-encapsulated PE (PE_{free}) which presented a decrease of 64.7 ± 3.5 %. It was observed that the 5:1 weight ratio (AP:CP) was the best to encapsulate (76.25 %) and ensure that the polymer matrix protected the PE. Loss of antioxidant activity after SGC was higher in the PE_{free} (> 80 %) compared to PE protected by CC. As the AP:CP weight ratio increased, greater foam expansion capacity (FE), emulsifying activity index (EAI) and emulsion stability index (ESI), were evidenced, as well as a lower % cremation index (CI). Due to their functional properties, coacervates may have potential application in the development of food products.

Key words: Amaranth protein, pectin, complex coacervation, functional properties, antioxidant activity.

4.2. Introducción

Los complejos coacervados se forman por la unión de biopolímeros con cargas opuestas a través de interacciones electrostáticas. Debido a la neutralización de las cargas, se crean dos fases, una rica en biopolímeros o coacervados y otra sérica en equilibrio. Los coacervados tienen aplicaciones en la industria alimentaria como material de encapsulación o atrapamiento de compuestos bioactivos, espesantes, emulsionantes, etc. (You et al., 2018). Comúnmente se utilizan proteínas de origen animal (gernetina, suero de leche, ovoalbúmina) y de origen vegetal (legumbres, cereales, semillas), además de polisacáridos como inulina, carragenina, quitosano, carboximetilcelulosa, goma arábica, alginato y pectina (Muhoza et al., 2022) para la formación de coacervados, ya que son los componentes más utilizados en las matrices alimentarias (Ru et al., 2012). Debido al origen y la naturaleza química de estos biopolímeros, los coacervados tienen efectos positivos y negativos sobre la solubilidad, formación de espuma, eficiencia de encapsulación, estructuración, actividad antioxidante, entre otras propiedades funcionales (Lan et al., 2020; Muriel et al., 2020; Vargas et al., 2021). En este sentido, diferentes biopolímeros podrían generar coacervados con propiedades diferentes a las formadas por los biopolímeros de uso frecuente.

La pectina es un polisacárido que se ha utilizado junto con proteínas para mejorar la funcionalidad de ambos biopolímeros, debido a que forman matrices interconectadas y homogéneas (Lan et al., 2020). La pectina se puede extraer de diferentes fuentes botánicas (pulpa de manzana, remolacha) y residuos agroindustriales (cáscara de cítricos, cáscara de vaina de cacao) que son propensos a causar contaminación ambiental (Yapo y Koffi, 2013). De acuerdo con el SIAP (2023), en México se generaron aproximadamente 22,000 t de residuos provenientes de la industria del cacao, entre los que se destacan subproductos como la cáscara de vaina (67 a 76%) y cascarilla de semilla (2.1 a 2.3 %). Además de la pectina, a partir de estos subproductos se pueden obtener polifenoles, que tienen actividades biológicas como antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias (Zhang et al., 2024). Sin embargo, estos

compuestos se degradan fácilmente por la exposición a la luz, oxígeno, temperatura y pH (Pan-Utai y lamtham, 2020). Por lo tanto, la coacervación podría ser un método de protección contra estas condiciones.

Por otro lado, es preciso destacar que pocos trabajos sobre coacervación han estudiado el uso del aislado de proteína de amaranto, una proteína de alta calidad que contiene aminoácidos esenciales (lisina, triptófano y metionina) en cantidades superiores a los cereales (arroz, trigo y maíz) y legumbres (alverjón, frijol, lentejas) más consumidos (Nardo et al., 2018; Santillán, 2018). Por ello, es necesario desarrollar estudios en los que se evalúe su interacción con otros biopolímeros, como la pectina, su uso en la protección de polifenoles y sus propiedades funcionales, con la finalidad de obtener nuevos ingredientes para la formulación de productos alimenticios saludables y sostenibles.

El conocimiento de las propiedades de los coacervados puede contribuir a su óptima aplicación en alimentos, por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue evaluar las propiedades funcionales de complejos coacervados de proteína *Amaranthus hypochondriacus* L.–pectina de cáscara de vaina de *Theobroma cacao* L.

4.3. Materiales y Métodos

4.3.1. Materiales

4.3.1.1. Material vegetal

Las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* L. variedad Revancha se obtuvieron de un productor local en la comunidad de San José Atlán, municipio de Huichapan, Hidalgo, México, con coordenadas GPS de 20° 20' 26.4192" N, 99° 41' 39.7356" W y una elevación sobre el nivel del mar de 2150 m. Subproductos (cáscara y cascarilla) de *Theobroma cacao* L. se obtuvieron de un productor local en la Comunidad Arena 2da sección, Municipio de Comalcalco, Tabasco, México, con coordenadas GPS de 18° 10' 35.2" N, 93° 23' 50.4" W y una elevación sobre el nivel del mar de 40 m.

4.3.1.2. Reactivos químicos

El ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH), ácido cítrico, sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), ácido sulfúrico (H_2SO_4) y etanol de grado analítico se obtuvieron de J.T. Baker (Xalostoc, Estado de México, México). El hexano fue suministrado por MEYER® Chemical Reagents (Tláhuac, Ciudad de México, México). El ácido D-galacturónico, ácido gálico, bilis porcina, ácido 2,20-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazi (DPPH), ácido 6-hidroxi-5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) y dodecil sulfato de sodio (SDS) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich México (Toluca, Estado de México, México). El agua utilizada en los experimentos fue destilada y desionizada.

4.3.2. Extracción de aislado de proteína de amaranto

Proteína de amaranto se obtuvo el aislado (AP) de acuerdo con la metodología descrita por García-de la Rosa et al. (2023). El aislado tuvo un contenido de proteína de 85.3 ± 1.0 % (método de Kjeldahl, factor de conversión 6.25).

4.3.3. Extracción de pectina de la cáscara de la vaina de cacao

La pectina de cáscara de vaina de cacao (PC) se extrajo de la harina de cáscara de cacao (HCV) mediante hidrólisis ácida utilizando la metodología de Trujillo-Ramírez et al. (2018). La PC tuvo un grado de esterificación de 63.42 ± 0.29 %.

4.3.4. Obtención de extractos fenólicos

La preparación de la muestra se llevó a cabo de acuerdo con la metodología de Gaber Ahmed et al. (2020) con ligeras modificaciones. Las cáscaras y cascarillas de cacao se secaron en una estufa de circulación de aire HCF-62 (Riossa Digital, Ciudad de México, México) a 55°C durante 36 h, posteriormente se molieron, se utilizó un tamiz de 0.8 mm para obtener HCV y harina de cascarillas de semillas de cacao (HCS). Posteriormente, se preparó un extracto crudo de HCV (2.5 g) y HCS (2.5 g) en 100 mL de etanol al 75 % v / v, se mantuvo en agitación continua

en oscuridad durante 90 min. La solución se centrifugó durante 5 min a 5000 xg en una centrífuga 5810 R, Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania), el sobrenadante se filtró a través de filtros de nailon (0.45 μ m). El extracto fenólico (EF) se almacenó en oscuridad a 4 ± 1 °C hasta su uso.

4.3.5. Formación de complejos coacervados

La formación de complejos coacervados (CC) se llevó a cabo utilizando la metodología propuesta por Hernández-Rodríguez et al. (2014) con modificaciones. Brevemente, las soluciones de PA (1 % p / p) y PC (1 % p / p) se dispersaron en agua desionizada a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) durante 12 h mediante agitación continua (600 rpm). Las soluciones se almacenaron durante 24 h a 4 ± 1 °C para permitir una hidratación completa. Posteriormente, la dispersión de PA se añadió a la solución de PC en diferentes relaciones de peso (2:1 y 5:1 p / p), y se agitó a 50 rpm durante 3 minutos, seguido de la adición de EF en diferentes concentraciones (0.0, 0.1 y 0.5 % p / v) a las mezclas de PA y PC en una relación de 2:1 p / p, se ajustaron a pH 3 utilizando HCl 0.1 N, agitando a 50 rpm durante 2 min. Las mezclas se mantuvieron a 4 ± 1 °C durante 48 h; luego, se centrifugaron a 121 xg a temperatura ambiente (22 ± 3 °C) durante 15 min para separar los diferentes CC. Estos últimos se codificaron como CC_{a/b}, donde "a" representa la relación en peso entre PA y PC (2:1 y 5:1), "b" la concentración de EF (0.0, 0.1 y 0.5 % p / v).

4.3.6. Propiedades funcionales de los complejos coacervados

4.3.6.1. Actividad antioxidante en función del tiempo de almacenamiento

Se emplearon los ensayos ABTS⁺ y DPPH• para determinar la actividad antioxidante en función del tiempo de almacenamiento a los 5, 10 y 15 días. La actividad de captadora de radicales ABTS de PA, PC, EF y CC_{a/b}, se determinó utilizando el método descrito por Adegbañu et al. (2020) con algunas modificaciones. Se formó un radical ABTS mezclando 7 mM de ABTS y 2.45 mM de persulfato de potasio en cantidades iguales, manteniendo la solución en

oscuridad durante 18 h a temperatura ambiente (22 ± 2 °C). Posteriormente, se diluyó con etanol absoluto para obtener una solución de trabajo con un valor de absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 734 nm (ABTS⁺). Los CC_{a/b} se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min, y se añadió solución salina estéril (0.9 %) al precipitado para romper los CC_{a/b}. Una alícuota de 10 µL de CC_{a/b} se mezcló con 990 µL de solución ABTS⁺ y se mantuvo en oscuridad durante 7 min. La absorbancia se midió a 734 nm. El porcentaje de inhibición de ABTS⁺ se calculó a partir de la Ecuación 5:

$$\text{Inhibición (\%)} = \left(\frac{\text{Abs Control} - \text{Abs Muestra}}{\text{Abs Control}} \right) \times 100 \quad (5)$$

donde: Abs Control = absorbancia de ABTS⁺; Abs Muestra = absorbancia del radical ABTS⁺ más muestra o estándar.

El ensayo DPPH se determinó de acuerdo con Cortés-Viguri et al. (2021) con ligeras modificaciones. Después del rompimiento de los CC_{a/b}, 20 µL de sobrenadante de CC_{a/b}, PA, PC o EF se mezclaron con 2 mL de solución de etanólica de DPPH• (0.06 mM). Posteriormente, la mezcla se agitó en vórtex y se mantuvo en oscuridad a 25 °C durante 30 min. La absorbancia se midió a 517 nm en un espectrofotómetro. La actividad de eliminación de DPPH se calculó utilizando una curva estándar de Trolox, utilizando la Ecuación 6:

$$\text{Actividad de eliminación de DPPH} \bullet (\%) = \left(\frac{\text{Abs Control} - \text{Abs Muestra}}{\text{Abs Control}} \right) \times 100 \quad (6)$$

Donde: Abs Control = absorbancia de DPPH•; Abs Muestra = absorbancia de DPPH• más muestra o estándar.

4.3.6.2. Evaluación de la eficiencia de encapsulación

Para evaluar el rendimiento de encapsulación de los EF se utilizó el procedimiento descrito por Aceituno-Medina et al. (2015), con modificaciones. El EF fue liberado de los CC_{a/b} mediante su ruptura con solución salina estéril (Peña-Solis et al., 2023). El contenido total de fenoles encapsulados se calculó mediante la curva de calibración de ácido gálico. La EE (%) de CC_{a/b} se calculó mediante la Ecuación 7:

$$EE (\%) = \left(\frac{TPCF}{TPC} \right) \times 100 \quad (7)$$

dónde; TPCF= Contenido total de fenoles libres; TPC = Contenido fenólico total.

4.3.6.3. Condiciones gastrointestinales simuladas

Se realizó una simulación de la digestión gastrointestinal basada en la metodología propuesta por Hernández-Rodríguez et al. (2014). Brevemente, se colocó 1 g de cada CC_{a/b} por separado en un tubo con 9 mL de solución de jugo gástrico simulado (pH 3.0, HCl 0.1 N). Las muestras se incubaron a 37°C por 3 h en un baño de agitación orbital (Precision Scientific 360, Chicago, Illinois, EUA). Posteriormente, las muestras se filtraron; el filtrado se lavó con solución salina estéril y se depositó en 9 mL de una solución estéril (1 g 100 mL⁻¹) de extracto de bilis porcina a pH 6.5. Los CC_{a/b} se incubaron a 37°C por 3 h bajo agitación continua. Una vez concluido el tiempo de exposición se determinó la capacidad antioxidante mediante ensayo ABTS⁺.

4.3.6.4. Determinación de la viscosidad aparente

Viscosidad aparente en los CC_{a/b} se determinó utilizando la metodología propuesta por Gorji et al. (2014) con ligeras modificaciones. Se utilizó un reómetro Physica MCR 301 (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania) con una geometría de placa cónica (1°, 50 mm de diámetro), aplicando una velocidad de corte constante de 5 s⁻¹ y una temperatura de 25 °C.

4.3.6.5. Capacidad de formación de espuma

Las propiedades espumantes se determinaron mediante el procedimiento descrito por Diniz et al. (2014) con algunas modificaciones. Se tomaron 50 mL de dispersiones de CC_{a/b} y PA. Cada muestra se homogeneizó con un Ultra-Turrax® (T50 basic IKA Works, Inc., Wilmington, Estados Unidos) operado a 10000 rpm durante 1 minuto para formar espuma. Inmediatamente se midió el volumen total y el volumen de espuma. Se midió la variación del volumen de espuma a intervalos de 0, 1, 5, 10, 20, 30 y 60 min. El porcentaje de incremento de volumen, de estabilidad de la espuma y capacidad de expansión de la espuma se evaluaron utilizando las Ecuaciones 8, 9 y 10, respectivamente.

$$IV (\%) = \left(\frac{SV2 - SV1}{SV1} \right) \times 100 \quad (8)$$

donde: IV (%) = porcentaje de aumento de volumen; SV2= volumen de suspensión de muestra después de la agitación; SV1 = volumen de suspensión de muestra antes de la agitación.

$$PEE (\%) = \left(\frac{V_{ff}}{V_{f0}} \right) \times 100 \quad (9)$$

donde: PEE (%) = porcentaje de estabilidad de la espuma; V_{f0}= volumen de espuma en el tiempo cero; V_{ff}= volumen de espuma después del tiempo t.

$$CEE (\%) = \left(\frac{V_{f0}}{V_d} \right) \times 100 \quad (10)$$

CEE (%) = porcentaje de expansión de la espuma; V_d = volumen inicial de la dispersión.

Para describir la estructura de las espumas de PA y CC_{a/b} se observaron con un aumento de 10x en un microscopio óptico Olympus BX53F (Olympus Optical

Corp., Tokio, Japón) conectado a una cámara Moticam 2500. (Motic Incorporation Ltd., Hong Kong, China), utilizando un software Motic Images Plus 2.0 (Motic, Corp., Ltd., China).

4.3.6.6. Propiedades emulsionantes

Las emulsiones aceite en agua se realizaron con base en la metodología propuesta por Vargas et al. (2021), con algunas modificaciones. Las emulsiones se prepararon incorporando la fase dispersa (10 mL de aceite de girasol) gota a gota con agitación continua a la fase continua (40 mL PA o CC_{a/b} 1 % p / p) con la ayuda de un homogeneizador de alto cizallamiento (Ultra-Turrax® T50 basic IKA Works, Inc., Wilmington, Estados Unidos), operado a 8000 rpm durante 3 minutos para formar una emulsión. Se tomó una alícuota de 10 µL, se colocó en 5 mL de SDS al 0.1 % p / v y se agitó durante 10 s en Vortex. La absorbancia se midió a 500 nm en un espectrofotómetro. Después de 10 minutos se tomó una segunda alícuota de 10 µL de la emulsión, siguiendo el mismo procedimiento. Se determinó el índice de actividad emulsionante (IAE), índice de estabilidad de la emulsión (IEE) e índice de cremado (IC) mediante las siguientes Ecuaciones 11, 12 y 13.

$$IAE (m^2 g^{-1}) = \left(\frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times N}{C \times \phi \times 10000} \right) \quad (11)$$

$$IEE (min) = \left(\frac{A_0}{\Delta A} \right) \times t \quad (12)$$

donde: A₀= absorbancia de la emulsión diluida; N = factor de dilución (500 x); C= peso de muestra por volumen antes de que se formara la emulsión (g mL⁻¹), ϕ = fracción de volumen de aceite de la emulsión; ΔA = cambio de absorbancia entre 0 y 10 min (A₀-A₁₀); t = intervalo de tiempo de 10 min.

$$IC (\%) = \left(\frac{H1}{H0} \right) \times 100$$

(13)

donde: H1= altura de capa de suero y H0= altura total de la emulsión, se registraron cada 30 min hasta 120 min, posteriormente cada 60 min hasta 240 min.

4.3.6.7. Determinación de la solubilidad

Se dispersaron polvos de CC_{a/b} (1 % p / v) en agua desionizada a 25 °C y se agitaron a 110 rpm durante 30 min. Luego, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 min. Se tomaron alícuotas de cada sobrenadante con pipetas volumétricas y se transfirieron a placas de aluminio previamente pesadas, para secarlas hasta peso constante en una estufa a 100 °C. La solubilidad se calculó a partir de la diferencia de peso (Shen et al., 2017).

4.3.7. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado de tres experimentos independientes, todas las mediciones se realizaron por triplicado. Los resultados se reportaron como medias $\pm$ desviación estándar. Los datos se sometieron a análisis de varianza cuando correspondió, utilizando la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Actividad antioxidante

En el Cuadro 4 se muestra el porcentaje de inhibición de ABTS⁺ y DPPH• de los CC_{a/b} en función del tiempo de almacenamiento (5, 10 y 15 días a 4 ± 1 °C). No se encontraron diferencias significativas entre los días 5 y 10 en comparación con el día 15, en el que se observó una disminución en el % de inhibición de 12.1 ± 0.6 (CC_{2:1/0.0}), 28.2 ± 0.8 (CC_{2:1/0.1}), 27.2 ± 1.1 (CC_{2:1/0.5}), 16.5 ± 0.6 (CC_{5:1/0.0}),

21.5 $\pm$ 1.4 (CC_{5:1/0.1}) y 17.6 $\pm$ 0.9 (CC_{5:1/0.5}) con respecto al porcentaje de inhibición del día 1. Los datos mostraron que los CC que contenían EF mostraron diferencias significativas en el día 15 en comparación con los días 5 y 10, a diferencia de los que no contenían extracto.

Los valores de % de inhibición de DPPH• de C_{a/b} mostraron una tendencia similar al % de inhibición de ABTS⁺, con una disminución en el % a medida que pasaba el tiempo. El % de inhibición de DPPH• de CC_{a/b} disminuyó 6.7 $\pm$ 0.7 (CC_{2:1/0.0}), 17.6 $\pm$ 2.0 (CC_{2:1/0.01}), 14.4 $\pm$ 0.1 (CC_{2:1/0.5}), 3.3 $\pm$ 2.8 (CC_{5:1/0.0}), 13.1 $\pm$ 1.2 (CC_{5:1/0.1}) y 13.4 $\pm$ 0.9 (CC_{5:1/0.5}) durante el tiempo de almacenamiento (días 1 a 15).

Tasch-Holkem y Favaro-Trindade (2020) encapsularon extracto de canela mediante complejos coacervados formados por proteína de suero y goma arábica, informaron que conforme trascurrieron los días de almacenamiento, el contenido de fenoles disminuía debido a varios factores como la polimerización de estos compuestos y la capacidad de interacción proteína-polifenol en el pH óptimo de formación de los coacervados, favoreciendo la disminución en el % de actividad antioxidante con respecto al tiempo de almacenamiento; comportamiento observado en los resultados de esta investigación.

Por otro lado, el % de inhibición presentado por el EF no encapsulado (EF_{libre}) en ambos ensayos ABTS⁺ y DPPH• (Cuadro 4), disminuyó significativamente durante el tiempo de almacenamiento (64.7 $\pm$ 3.5 y 60.4 $\pm$ 0.3 %, respectivamente). Jokić et al. (2018) mencionan que uno de los principales factores que repercute en la degradación de los polifenoles es la exposición a la luz, además del tiempo de almacenamiento y el proceso de conservación, los cuales influyen en la actividad antioxidante. En este sentido, se observó que cuando el EF fue protegido, presentó una mayor actividad antioxidante en comparación con el EF_{libre} durante los 15 días almacenamiento.

Cuadro 4. Porcentaje de inhibición de ABTS⁺ y DPPH• en función del tiempo de almacenamiento de complejos coacervados y extracto fenólico.

CC _{a/b}	ABTS ⁺ (%)			DPPH• (%)		
	Día 5	Día 10	Día 15	Día 5	Día 10	Día 15
CC _{2:1/0.0}	6.2 ± 0.4 ^{d,A}	5.7 ± 0.5 ^{d,A}	5.8 ± 0.6 ^{e,A}	18.0 ± 0.5 ^{f,A}	18.2 ± 0.9 ^{e,A}	15.1 ± 0.7 ^{d,B}
CC _{2:1/0.1}	28.6 ± 1.3 ^{b,A}	27.4 ± 1.9 ^{b,A}	22.0 ± 0.8 ^{c,B}	33.6 ± 1.1 ^{d,A}	35.8 ± 1.0 ^{c,A}	31.0 ± 1.1 ^{c,B}
CC _{2:1/0.5}	33.1 ± 1.6 ^{a,A}	32.1 ± 1.3 ^{a,A}	24.5 ± 1.1 ^{bc,B}	40.7 ± 1.3 ^{b,B}	45.1 ± 1.3 ^{b,A}	42.5 ± 1.9 ^{b,AB}
CC _{5:1/0.0}	11.1 ± 0.8 ^{c,AB}	11.0 ± 0.5 ^{c,AB}	10.2 ± 0.6 ^{d,B}	33.3 ± 0.5 ^{de,A}	31.7 ± 0.6 ^{d,A}	31.4 ± 0.4 ^{c,A}
CC _{5:1/0.1}	32.0 ± 3.3 ^{ab,A}	28.3 ± 0.3 ^{b,A}	25.9 ± 1.4 ^{b,B}	37.2 ± 1.0 ^{c,A}	36.7 ± 1.4 ^{c,A}	32.2 ± 0.5 ^{c,B}
CC _{5:1/0.5}	34.7 ± 0.1 ^{a,A}	33.2 ± 1.2 ^{a,A}	28.9 ± 0.9 ^{a,B}	52.5 ± 0.8 ^{a,A}	50.8 ± 1.4 ^{a,A}	45.5 ± 0.5 ^{a,B}
PE _{libre}	7.2 ± 0.4 ^{cd,A}	5.7 ± 0.2 ^{d,AB}	6.4 ± 0.6 ^{e,B}	31.0 ± 0.5 ^{e,A}	17.1 ± 1.0 ^{e,B}	19.7 ± 0.3 ^{d,C}

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias ($p \leq 0.05$). Diferentes letras mayúsculas en la misma fila indican diferencias significativas entre las medias ($p \leq 0.05$).

4.4.2. Eficiencia de encapsulación (EE)

El % EE de los CC_{a/b} varió significativamente de mayor a menor de la siguiente manera: CC_{5:1/0.5} (77.1 ± 0.4) > CC_{5:1/0.1} (75.4 ± 0.9) > CC_{2:1/0.1} (60.4 ± 1.1) > CC_{2:1/0.5} (57.4 ± 0.6). Souza et al. (2018) utilizaron coacervados de aislado de gelatina con diferentes polisacáridos (goma arábica, pectina, goma de nuez de la India, carboximetilcelulosa y k-carragenina) para encapsular extractos fenólicos de canela, reportando una eficiencia de encapsulación del 66 al 72 %. Resultados similares (65-73 %) fueron reportados por Nori et al. (2011), los cuales emplearon proteína de soya y pectina para encapsular extractos fenólicos de propóleo. Bastos et al. (2020) mencionan que la relación en peso de los biopolímeros es importante, ya que deben ser suficientes para asegurar que la mayor cantidad de compuesto bioactivo queda encapsulada, presentando una mayor EE. Por lo anterior, los datos obtenidos de CC_{a/b} sugieren que la cantidad de biopolímeros en una relación en peso 5:1 (PA:PC) (76.25 %) fue la mejor para encapsular y garantizar que el EF estuviera protegido por la matriz polimérica.

4.4.3. Condiciones Gastrointestinales Simuladas (CGS)

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos puede verse disminuida por factores ambientales como exposición a la luz, oxígeno, cambios de temperatura y pH, estas condiciones tienen lugar en el estómago e intestino donde se da la mayor parte de los procesos de digestión y absorción de nutrimentos (Jia et al., 2016).

Se observó que los coacervados sin encapsulación de EF (CC_{2:1/0.0} y CC_{5:1/0.0}) presentaron actividad antioxidante (Cuadro 5), valores que fueron restados de sus respectivos tratamientos. Además, su % de inhibición fue bajo en comparación con el EF_{libre}.

La mayor parte de los nutrimentos se absorben en el intestino delgado, por lo que es importante que la encapsulación retarde la liberación prematura de los compuestos encapsulados (Jia et al., 2016). Los datos muestran que al

encapsular el EF hubo menor pérdida de la actividad antioxidante (1.4 a 30.3 %) en comparación con el EF_{libre} (> 80 %) al final del proceso de digestión.

Cuadro 5. Porcentaje de inhibición de ABTS⁺ después de condiciones gastrointestinales simuladas (CGS) de complejos coacervados y extracto fenólico.

CC _{a/b}	Inicial (% Inhibición)	Condiciones gástricas (% Inhibición)	Condiciones intestinales (% Inhibición)
CC _{2:1/0.0}	6.6 ± 0.2 ^e	6.2 ± 0.4 ^d	6.5 ± 0.2 ^c
CC _{2:1/0.1}	30.7 ± 0.8 ^c	27.9 ± 1.4 ^b	21.5 ± 1.5 ^b
CC _{2:1/0.5}	33.6 ± 0.8 ^{ab}	32.1 ± 1.6 ^a	27.3 ± 2.2 ^a
CC _{5:1/0.0}	12.2 ± 0.5 ^d	9.9 ± 0.3 ^{cd}	8.6 ± 0.4 ^c
CC _{5:1/0.1}	32.9 ± 0.7 ^b	25.6 ± 0.7 ^b	23.0 ± 1.4 ^b
CC _{5:1/0.5}	35.0 ± 0.7 ^a	32.6 ± 2.2 ^a	29.5 ± 1.1 ^a
EF _{libre}	34.9 ± 0.7 ^a	11.9 ± 1.5 ^c	6.0 ± 0.4 ^c

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre medias ($p \leq 0.05$).

Kashyap et al., (2022) reportaron una reducción de más del 50% de la capacidad antioxidante en extractos de orujo de cereza de Meghalayan después de CGS, sugiriendo que esta reducción puede deberse a que por el pH del intestino (6.5) se pueden formar pequeñas moléculas inestables debido a la hidrólisis llevada a cabo durante la digestión.

Además, los resultados mostraron que el CC a una relación en peso de 2:1 y 5:1 (PA:PC) con diferentes concentraciones de EF (0.1 y 0.5 % p / v) cuando se sometió a condiciones gástricas e intestinales, la actividad antioxidante del EF no se vio afectado. Por lo tanto, una menor relación de peso PA:PC (2:1 p / v) fue suficiente para proteger a la EF de estas condiciones gastrointestinales.

4.4.4. Determinación de la viscosidad aparente

La viscosidad es una propiedad funcional importante en la industria alimentaria; ya que determina la resistencia de una sustancia a fluir. Cuando la viscosidad real de una sustancia se ve afectada por factores como presión, temperatura,

velocidad de cizalla y tiempo de cizalla, los cuales pueden modificar su estructura, se hace referencia a la viscosidad aparente (Laurencio et al., 2017). La viscosidad aparente se determina en función de la velocidad de deformación, la cual es dependiente de la velocidad de corte (García de la Rosa et al., 2023). Vargas et al. (2021) mencionan que la viscosidad de los CC está asociada a diferentes propiedades moleculares como el tamaño de partícula, interacciones entre biopolímeros, flexibilidad molecular, pH, relación en peso proteína-polisacárido.

Los valores de viscosidad de los CC_{a/b} variaron significativamente de menor a mayor de la siguiente manera: CC_{2:1/0.0} (1007.2 ± 4.2 Pa.s) < CC_{2:1/0.1} (1075.1 ± 3.5 Pa.s) < CC_{2:1/0.5} (1176.3 ± 9.8 Pa.s) < CC_{5:1/0.0} (1943.3 ± 8.5 Pa.s) < CC_{5:1/0.1} (2227.5 ± 13.6 Pa.s) < CC_{5:1/0.5} (2326.0 ± 6.0 Pa.s). Los valores de viscosidad fueron aumentando conforme incrementó la relación en peso de PA:PC (2:1 a 5:1) y la concentración de EF (0.0 a 0.5 %). De acuerdo con Ghorbani-Gorji et al. (2014), los valores de la viscosidad de los CC tienden a aumentar cuando el tamaño de partícula es mayor; mencionan que esto se debe a que a un pH óptimo de formación ocurre la máxima interacción atractiva entre las moléculas de la mezcla polimérica generando CC más densos y compactos con una mejor estructura.

El CC_{5:1/0.5} fue el que exhibió el mayor valor de viscosidad, probablemente debido a que la presencia de mayores cantidades de moléculas de PA y EF aumentó la fuerza entre las interacciones electrostáticas con las moléculas de PC, al pH óptimo de formación, generando un CC mejor estructurado con mayor resistencia al flujo, en comparación con los CC formados a menores relaciones de peso AP:PC y menores concentraciones de EF.

4.4.5. Capacidad de formación de espuma

Las propiedades espumantes están relacionadas con la capacidad de las proteínas para formar dispersiones gas-líquido, lo anterior va a depender de la estructura molecular, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas y puentes disulfuro de la proteína (Vargas et al., 2021). La

capacidad de expansión de la espuma (CEE) de los CC_{a/b} varió de 81.3 ± 1.2 a 239.0 ± 3.0 %. Así mismo, la CEE aumentó significativamente conforme aumentó la concentración de EF y la relación PA:PC. Se pudo observar que la PA tuvo un % de CEE significativamente mayor que los CC que no contenían EF y el PEE fue menor (56.7 ± 2.7 %) en comparación con los CC_{a/b} (Cuadro 6).

El IV de los CC_{a/b} fue de menor a mayor conforme aumento la concentración de EF y la relación PA:PC, similar a lo reportado por Li et al. (2022), los cuales elaboraron espumas a partir de proteína de soya y coacervados con quitina, observaron que la estabilidad de la espuma es mayor en los coacervados.

De acuerdo con Vargas et al. (2021) la proteína puede migrar a la interfaz aire-agua debido a su flexibilidad molecular, dando como resultado una espuma con poros grandes y quebradiza; al añadir un polisacárido mejora la estabilidad de la espuma al formar una película alrededor de las burbujas que retiene el aire por más tiempo. El PEE de los CC_{a/b} disminuyó significativamente cuando se incrementó la relación en peso PA:PC, lo que podría indicar que al aumentar la relación de proteína el polisacárido no alcanza a proteger por completo la burbuja, desestabilizando de esta forma a la espuma (Susanti et al., 2021).

Los resultados fueron consistentes con los cambios estructurales de las espumas de los CC_{a/b} y PA como se muestra en las micrografías ópticas (Figura 6). Inicialmente se observaron espumas conformadas por burbujas esféricas, sin embargo, conforme pasó el tiempo comenzaron a fusionarse y presentaron una estructura poliédrica. En las espumas de PA, CC_{5:1/0.0}, CC_{5:1/0.1} y CC_{5:1/0.5} se puede apreciar un mayor número de espacios entre las burbujas, lo que pudo contribuir a su desestabilización (Vargas et al., 2021).

Cuadro 6. Capacidad espumante, emulsionante y solubilidad de complejos coacervados.

CC _{a/b}	Capacidad de formación de espuma			Capacidad emulsionante		Solubilidad
	IV (%)	PEE (%)	CEE (%)	IAE (m ² g ⁻¹)	IEE (min)	(%)
CC _{2:1/0.0}	68.7 ± 1.2 ^e	95.6 ± 1.7 ^a	81.3 ± 1.2 ^f	67.1 ± 0.6 ^c	279.8 ± 2.5 ^c	0.096 ± 0.000 ^a
CC _{2:1/0.1}	99.3 ± 1.1 ^c	92.4 ± 3.1 ^a	109.3 ± 1.2 ^d	65.8 ± 0.3 ^c	274.5 ± 1.1 ^c	0.074 ± 0.023 ^a
CC _{2:1/0.5}	102.7 ± 3.0 ^c	95.4 ± 0.8 ^a	113.0 ± 1.0 ^c	66.2 ± 1.5 ^c	276.4 ± 6.4 ^c	0.075 ± 0.023 ^a
CC _{5:1/0.0}	69.3 ± 2.3 ^e	71.1 ± 2.5 ^c	86.6 ± 1.2 ^e	74.3 ± 2.0 ^a	309.9 ± 8.5 ^a	0.073 ± 0.024 ^a
CC _{5:1/0.1}	143.3 ± 2.1 ^b	82.5 ± 1.1 ^b	187.7 ± 2.1 ^b	71.4 ± 1.7 ^{ab}	297.9 ± 7.1 ^{ab}	0.095 ± 0.001 ^a
CC _{5:1/0.5}	177.3 ± 3.0 ^a	80.4 ± 2.0 ^b	239.0 ± 3.0 ^a	69.2 ± 1.3 ^{bc}	288.8 ± 5.3 ^{bc}	0.098 ± 0.003 ^a
PA	96.6 ± 1.2 ^d	56.7 ± 2.7 ^d	116.3 ± 1.5 ^c	62.0 ± 0.2 ^d	258.8 ± 0.7 ^d	0.085 ± 0.001 ^a

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias ($p \leq 0,05$). PA= aislado de proteína de amaranto; IV = incremento de volumen; PEE = porcentaje de estabilidad de la espuma; CEE = capacidad de expansión de la espuma; IAE= Índice de actividad emulsionante; IEE = índice de estabilidad de la emulsión.

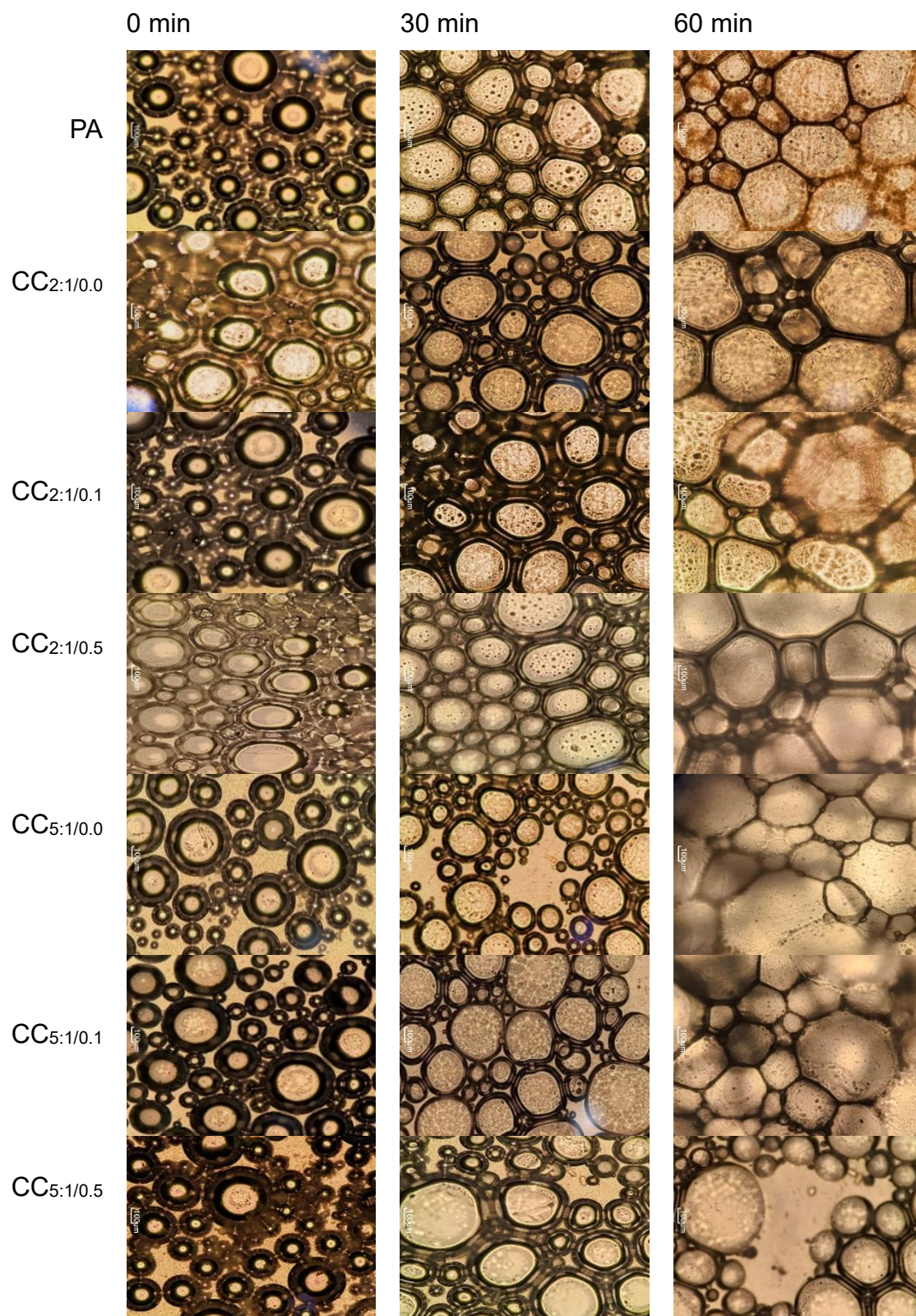


Figura 6. Micrografías ópticas (10x) de espumas de PA y CC_{a/b} a 0, 30 y 60 min.

4.4.6. Propiedades emulsionantes

Las emulsiones aceite-agua (O / W) se forman dispersando aceite en una fase continua (agua) mediante un homogeneizador. Generalmente, para estabilizar el sistema se añade un emulsificante, proteína o polisacárido que es adsorbido en la interfaz aceite-agua, rodeando a las gotitas de aceite (Dong et al., 2022). Las emulsiones tienden a desestabilizarse durante su almacenamiento dando lugar a diversos fenómenos como cremado, separación gravitacional, coalescencia, floculación y separación del aceite (Hu et al., 2024). Por lo anterior, varios autores han informado que la utilización de CC puede contribuir a la estabilización de emulsiones aceite-agua (Dong et al., 2022; Hu et al., 2024; Liu et al., 2023; Niu et al., 2016).

Los IAE, IEE y IC se emplean para determinar la capacidad que tienen las proteínas y CC de adsorberse en la interfaz agua-aceite, mantener una emulsión estable durante el tiempo de almacenamiento y cuantificar el grado de agregación de gotas de aceite o separación de fases, respectivamente (Hu et al., 2024; Pham et al., 2019). Las propiedades emulsionantes (IAE, IEE y IC) de los CC_{a/b} y PA se presentan en el Cuadro 6 y Figura 7.

Las emulsiones presentaron una inestabilidad progresiva con el paso del tiempo, siendo la emulsión estabilizada con PA la que presentó significativamente valores más bajos de IAE y IEE, así como un mayor porcentaje de IC y una menor capacidad emulsionante y estabilidad.

Los resultados mostraron que los CC_{a/b} produjeron capas interfaciales gruesas y compactas que recubrieron las gotas de aceite, proporcionando una mayor estabilización estérica. Hu et al. (2024) y Liu et al. (2021) mencionan que las emulsiones estabilizadas únicamente por proteínas tienden a una mayor inestabilidad a diferencia de emulsiones estabilizadas con CC, los cuales ayudan a ralentizar la coalescencia de las gotitas de aceite adyacentes, retardando la aparición de cremado y floculación.

Las emulsiones estabilizadas con CC que contenían EF en cada relación (2:1 o 5:1 PA:PC) presentaron valores menores en IAE y IEE, además de un mayor % de IC, lo cual podría atribuirse a la presencia de compuestos fenólicos que podrían interferir en el comportamiento de los CC en la interfaz aceite-agua, dando como resultado emulsiones más delgadas (Liu et al., 2023).

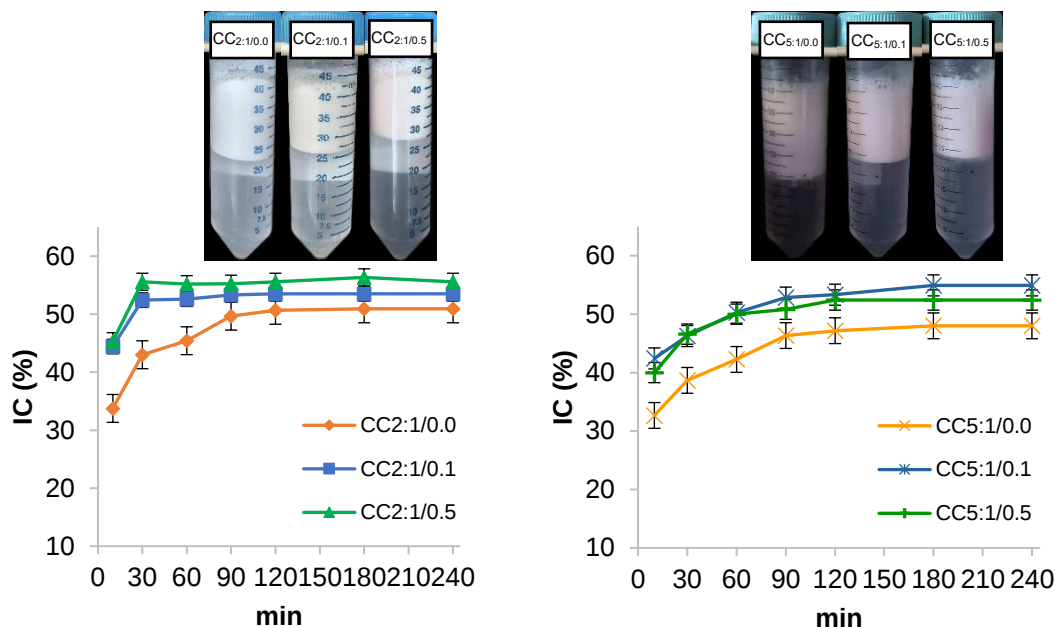


Figura 7. Variación del índice de cremado de CC_{a/b} en función del tiempo.

Niu et al. (2015) reportaron que la relación en peso proteína-polisacárido influye en la estabilidad de las emulsiones; a menores relaciones aumenta rápidamente la separación de la emulsión en una fase cremosa y otra sérica con el paso del tiempo. En los CC_{a/b} se observó que la relación en peso PA:PC influyó en los valores de IAE, IEE y IC; conforme aumentó la relación en peso PA:PC (2:1 a 5:1), las emulsiones presentaron valores mayores de IAE y IEE, así como menores % de IC, evidenciándose una mayor capacidad emulsionante y estabilidad, así como una menor separación de fases.

4.4.7. Determinación de la solubilidad

La solubilidad es la capacidad que posee una sustancia para disolverse en otra, basándose en un equilibrio entre interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas para formar un sistema homogéneo. Además, es una propiedad funcional muy importante que puede influir en otras como la gelificación, formación de espuma y emulsificación (Bolontrade et al., 2013). De acuerdo con Vargas et al. (2021) la carga superficial de las partículas y el pH, afectan su solubilidad e interacción con otras partículas.

Los valores obtenidos de solubilidad en los CC_{a/b} fueron bajos y no se observó diferencia estadística entre los tratamientos (Cuadro 6). Hu et al. (2024) mencionan que la formación de complejos coacervados entre proteínas y polisacáridos se lleva a cabo a un pH óptimo de formación en donde las cargas superficiales tienden a la neutralización, provocando una baja solubilización y por consecuencia la precipitación de la mezcla polimérica.

En particular, las proteínas son solubles cuando tiene una carga neta positiva, distante del punto isoelectrico (pI), generando fuerzas electrostáticas repulsivas favoreciendo una alta solubilidad. Sin embargo, al agregar al sistema un polisacárido con carga neta negativa, este interactúa con las proteínas afectando su estructura e inhibiendo las interacciones entre ellas, disminuyendo así su solubilidad (Vargas et al., 2021).

4.5. Conclusiones

Los CC_{a/b} proporcionaron al EF una protección adecuada contra condiciones gastrointestinales simuladas, promoviendo así una mayor protección durante su almacenamiento. Se observó que la relación en peso PA:PC y la concentración de EF fueron factores cruciales para determinar las propiedades funcionales de los CC_{a/b}. En este sentido, la relación en peso 5:1 (PA:PC) fue la mejor para encapsular y proteger al EF. El EF_{libre} presentó una marcada disminución en el porcentaje de actividad antioxidante durante el tiempo de almacenamiento y bajo

CGS. Además, la coacervación compleja entre PA y PC mostró una mayor capacidad espumante cuando la relación en peso aumentó de 2:1 a 5:1 (PA:PC). También se confirmó que el CC en una relación en peso 5:1 (PA:PC) presentó mayor actividad emulsionante y proporcionó mayor estabilidad en las emulsiones, así como una menor separación de fases reflejada en una disminución del % de CI. El CC_{a/b} presentó valores bajos de % de solubilidad, lo que se esperaba debido a las interacciones electrostáticas entre las moléculas al pH de formación. El CC_{5:1/0.5} fue el que presentó mayor resistencia al flujo debido a que exhibió el valor de viscosidad más alto. Con base en lo anterior, los CC_{a/b} podría tener un alto valor de aplicación como ingrediente en la industria alimentaria.

4.6. Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) de México por el apoyo financiero a través de la subvención No. 919623.

4.7. Literatura citada

- Aceituno-Medina, M., Mendoza, S., Rodríguez, B. A., Lagaron, J. M., & López-Rubio, A. (2015). Improved antioxidant capacity of quercetin and ferulic acid during in-vitro digestion through encapsulation within food-grade electrospun fibers. *Journal of Functional Foods*, 12, 332-341. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.11.028>
- Adegbaju, O. D., Otunola, G. A., & Afolayan, A. J. (2020). Effects of growth stage and seasons on the phytochemical content and antioxidant activities of crude extracts of *Celosia argentea* L. *Heliyon*, 6(6), e04086. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04086>
- Bastos, L. P. H., Dos Santos, C. H. C., de Carvalho, M. G., & Garcia-Rojas, E. E. (2020). Encapsulation of the black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil by lactoferrin-sodium alginate complex coacervates: Structural characterization and simulated gastrointestinal conditions. *Food Chemistry*, 316, 126345. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126345>
- Bolontrade, A. J., Scilingo, A. A., & Anon, M. C. (2013). Amaranth proteins foaming properties: adsorption kinetics and foam formation-part 1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 105, 319-327. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.039>

- Brito de Souza, V., Thomazini, M., Echalar Barrientos, M. A., Nalin, C. M., Ferro-Furtado, R., Genovese, M. I., & Favaro-Trindade, C. S. (2018). Functional properties and encapsulation of a proanthocyanidin-rich cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*) by complex coacervation using gelatin and different polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 77, 297-306. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.040>
- Cortés-Viguri, V., Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Cuevas-Bernardino, J. C., Hernández-Rodríguez, B. E., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2021). Annatto (*Bixa orellana* L.), a potential novel starch source: antioxidant, microstructural, functional, and digestibility properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(1), 637-651. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01228-7>
- Diniz, R. S., Coimbra, J., Teixeira, A., da Costa, A. R., Santos, I. J. B., Bressan, G. C., da Cruz Rodrigues, A. M., & da Silva, L. H. M. (2014). Production, characterization and foamability of alpha-lactalbumin/glycomacropeptide supramolecular structures. *Food Research International*, 64, 157-165. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.079>
- Dong, Y., Wei, Z., Wang, Y., Tang, Q., Xue, C., & Huang, Q. (2022). Oleogel-based Pickering emulsions stabilized by ovotransferrin-carboxymethyl chitosan nanoparticles for delivery of curcumin. *LWT - Food Science and Technology*, 157. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113121>
- Gaber Ahmed, G. H., Fernández-González, A., & Díaz García, M. E. (2020). Nano-encapsulation of grape and apple pomace phenolic extract in chitosan and soy protein via nanoemulsification. *Food Hydrocolloids*, 108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105806>
- García-de la Rosa, K., Lobato-Calleros, C., Hernández-Rodríguez, L., & Aguirre-Mandujano, E. (2023). Rheological and structural properties of complex coacervates of *Amaranthus hypochondriacus* protein-citrus pectin. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 22(1), 1-18. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim3003>
- Ghorbani-Gorji, S., Ghorbani Gorji, E., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.037>
- Gorji, S. G., Gorji, E. G., & Mohammadifar, M. A. (2014). Characterisation of gum tragacanth (*Astragalus gossypinus*)/sodium caseinate complex coacervation as a function of pH in an aqueous medium. *Food Hydrocolloids*, 34, 161-168. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.10.019>
- Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Pimentel-González, D. J., & Vernon-Carter, E. J. (2014). *Lactobacillus plantarum* protection by entrapment in whey protein isolate: kappa-carrageenan complex coacervates.

- Hu, J., Yang, R., Chen, R., Liu, C., Sha, X., Li, K., Guo, H., & Zhang, Y. (2024). Enhanced O/W emulsion stability and betanin protection using yeast protein and chitooligosaccharide: Comparative insights from complex coacervation and layer-by-layer methods. *Food Hydrocolloids*, 147. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109409>
- Jia, Z., Dumont, M.-J., & Orsat, V. (2016). Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. *Food Bioscience*, 15, 87-104. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.05.007>
- Jokic, S., Gagic, T., Knez, Z., Subaric, D., & Skerget, M. (2018). Separation of Active Compounds from Food by-Product (Cocoa Shell) Using Subcritical Water Extraction. *Molecules*, 23(6). <https://doi.org/10.3390/molecules23061408>
- Kashyap, P., Riar, C. S., & Jindal, N. (2022). Effect of extraction methods and simulated in vitro gastrointestinal digestion on phenolic compound profile, bio-accessibility, and antioxidant activity of Meghalayan cherry (*Prunus nepalensis*) pomace extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 153. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112570>
- Laurencio, A. H., Gilbert, H. A., & Retirado, M. Y. (2017). Modeling of apparent viscosity of a 11° API crude oil with non-Newtonian behavior. *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 25(4), 674-680.
- Li, X.-y., Li, G.-y., Zeng, Q.-z., Su, D.-x., He, S., Yang, X.-q., Nag, A., Li, J., & Yuan, Y. (2022). The formation of soy protein fibrils-chitin nanowhiskey complex coacervates: Relationship to mixed foam stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 652. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129783>
- Liu, B., Lai, L., Muhoza, B., & Xia, S. (2021). Complex coacervates based on gelatin and sodium carboxymethyl cellulose as carriers for cinnamaldehyde: Effect of gelatin Bloom values on coacervates formation and interfacial properties. *Food Bioscience*, 44. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101403>
- Liu, X., Xue, F., & Adhikari, B. (2023). Hemp protein isolate-polysaccharide complex coacervates and their application as emulsifiers in oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 137. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108352>
- Niu, F., Niu, D., Zhang, H., Chang, C., Gu, L., Su, Y., & Yang, Y. (2016). Ovalbumin/gum arabic-stabilized emulsion: Rheology, emulsion characteristics, and Raman spectroscopic study. *Food Hydrocolloids*, 52, 607-614. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.08.010>
- Nori, M. P., Favaro-Trindade, C. S., Matias de Alencar, S., Thomazini, M., de Camargo Balieiro, J. C., & Contreras Castillo, C. J. (2011).

- Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *LWT - Food Science and Technology*, 44(2), 429-435. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.09.010>
- Peña-Solis, K., Soriano-Santos, J., Sánchez, C., & Díaz-Godínez, G. (2022). Functional properties and antioxidant activity of protein fractions of spirulina (*Arthrospira maxima*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 22(1), 1-16. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio2967>
- Pham, L. B., Wang, B., Zisu, B., & Adhikari, B. (2019). Complexation between flaxseed protein isolate and phenolic compounds: Effects on interfacial, emulsifying and antioxidant properties of emulsions. *Food Hydrocolloids*, 94, 20-29. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.007>
- Shen, X., Zhao, C., & Guo, M. (2017). Effects of high intensity ultrasound on acid-induced gelation properties of whey protein gel. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 39, 810-815. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.05.039>
- Susanti, D. Y., Sediawan, W. B., Fahrurrozi, M., Hidayat, M., & Putri, A. Y. (2021). Encapsulation of red sorghum extract rich in proanthocyanidins: Process formulation and mechanistic model of foam-mat drying at various temperature. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 164. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2021.108375>
- Tasch-Holkem, A., & Favaro-Trindade, C. S. (2020). Potential of solid lipid microparticles covered by the protein-polysaccharide complex for protection of probiotics and proanthocyanidin-rich cinnamon extract. *Food Research International*, 136, 109520. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109520>
- Trujillo-Ramírez, D., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., Hernández-Rodríguez, L., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2018). Complexation with whey protein hydrolysate improves cacao pods husk pectin surface active and emulsifying properties. *Reactive and Functional Polymers*, 123, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.12.011>
- Vargas, S. A., Delgado-Macuil, R. J., Ruiz-Espinosa, H., Rojas-Lopez, M., & Amador-Espejo, G. G. (2021). High-intensity ultrasound pretreatment influence on whey protein isolate and its use on complex coacervation with *kappa* carrageenan: Evaluation of selected functional properties. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 70, 105340. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105340>

5. CONCLUSIONES GENERALES

Los residuos de la industria del cacao (*Theobroma cacao* L.) son una fuente rica en sustancias de interés alimenticio y nutricional como la pectina y los polifenoles. Mediante el método de hidrólisis ácida se obtuvo un alto rendimiento de pectina con alto contenido de metoxilo. De los extractos etanólicos de cáscara/cascarilla de cacao se identificaron compuestos fenólicos que presentan propiedades antioxidantes. Pectina y polifenoles extraídos de los residuos del cacao y aislado de proteína de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* spp.) fueron empleados para formar complejos coacervados ternarios, además de evaluar sus propiedades fisicoquímicas y funcionales.

Se observó que la relación en peso entre proteína de amaranto y pectina de cáscara de cacao (2:1 y 5:1), así como la concentración de extracto fenólico (0.0, 0.1 y 0.5 % p / v) influyeron significativamente en la formación de los coacervados. Se evidenció que a pH 3 el valor del potencial- ζ de la proteína fue positivo mientras que el de la pectina y extracto fenólico fue negativo, presentando una magnitud de carga similar con signos opuestos. Debido a las interacciones electrostáticas de los grupos funcionales presentes en los biopolímeros, el valor del potencial- ζ evidenció una tendencia a la neutralización de sus cargas. Lo anterior se confirmó mediante el análisis turbidimétrico en donde el valor de la absorbancia a este pH fue el más bajo, mostrando la máxima separación de fases.

En general, las distintas variedades de coacervados presentaron una morfología heterogénea y porosa con pequeños agregados esféricos regulares e irregulares que formaron una red tridimensional. Se observó un incremento en el tamaño de partícula (1070.3 ± 21.9 a 1893.0 ± 40.3 nm) cuando aumentó la relación en peso

entre proteína y pectina, al igual que la concentración de extracto fenólico, lo que influyó significativamente en el aumento de la viscosidad aparente de los coacervados (1007.2 ± 4.2 a 2326.0 ± 6.0 Pa.s).

Los coacervados tuvieron una predisposición de color hacia el rojo y amarillo debido a los compuestos fenólicos presentes en el extracto. El porcentaje de actividad antioxidante exhibido por los coacervados incrementó cuando la concentración de extracto fenólico aumentó (6.6 ± 0.2 a 35.0 ± 0.7 %). A pesar de que este porcentaje disminuyó (3.3 ± 2.8 a 17.6 ± 2.0 %) conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento (1 a 15 días), fue menor la pérdida de actividad antioxidante en comparación con el extracto fenólico no acomplexado, el cual presentó una disminución de actividad antioxidante mayor al 80 %. Por lo tanto, los complejos coacervados proporcionaron al extracto fenólico una protección adecuada durante el almacenamiento. Además, los coacervados a una mayor relación en peso entre proteína y pectina (5:1), mostraron una mayor capacidad espumante, actividad emulsionante y estabilidad en las emulsiones, así como una menor separación de fases reflejada en una disminución del porcentaje de índice de cremado.

Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionaron información sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales específicas de los coacervados con un alto valor de aplicación como ingredientes en el desarrollo de formulaciones de nuevos alimentos que contribuyan a la salud, además de aportar un valor agregado a los residuos de la industria agroalimentaria.