



Functional properties of plant-derived protein-pectin-polyphenol ternary complex coacervates

Propiedades funcionales de complejos coacervados ternarios formados por proteína-pectina-polifenol de origen vegetal

✉ [Karla García-de la Rosa](#)¹; ✉ [Landy Hernández-Rodríguez](#)^{1*};
 ✉ [Consuelo Lobato-Calleros](#)¹; ✉ [E. Jaime Vernon-Carter](#)²;
 ✉ [Juan Carlos Cuevas-Bernardino](#)³

¹Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Texcoco, Estado de México, C. P. 56230, México.

²Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. San Rafael Atlixco, núm. 186, col. Vicentina, Ciudad de México, C. P. 09340, México.

³SECIHTI-Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) Unidad Sureste. Tablaje Catastral 31264, carretera Sierra Papacal-Chuburná Puerto km 5.5, Mérida, Yucatán, C. P. 97302, México.

*Corresponding author: lhernandezr@chapingo.mx, tel. 5959521500 (ext. 5797)

Abstract

Introduction: The interaction among proteins, pectins, and polyphenols can induce the formation of coacervates with enhanced functional properties compared to their individual components.

Objective: To produce ternary complex coacervates (CC) from amaranth protein isolate (API), cocoa pod husk (CP) pectin and cocoa shell/husk phenolic extract (PE), and to evaluate their functional properties.

Methodology: CC were formed at different API:CP weight ratios and PE concentrations. Their antioxidant properties, encapsulation efficiency (EE), simulated gastrointestinal conditions (SGC), foaming and emulsifying properties, apparent viscosity, and solubility were determined.

Results: CC formulated with higher API:CP ratios and PE concentrations showed a greater capacity to neutralize ABTS^{••} and DPPH[•] radicals. After 15 days of storage, a decrease in antioxidant activity was observed; however, the loss was more significant in PE_{free} than in CC. Under SGC, CC showed a reduction in antioxidant activity. CC with higher ratio showed greater foam expansion (FE) capacity, emulsion stability index (ESI), and apparent viscosity, but a lower creaming index (CI).

Limitations of the study: The coacervates showed low solubility; therefore, further research is required to elucidate their interactions with food components.

Originality: This study focuses on extracting pectin and phenolic compounds from agro-industrial residues, as well as amaranth protein, highlighting their potential health benefits.

Conclusions: The coacervates showed functional properties suitable for their potential applications in food products.

Keywords: amaranth protein isolate, cocoa pod husk pectin, phenolic extract, antioxidant capacity, functional properties.

Resumen

Introducción: La interacción entre proteínas, pectinas y polifenoles puede inducir la formación de coacervados con propiedades funcionales mejoradas en comparación con sus componentes individuales.

Objetivo: Obtener complejos coacervados ternarios (CC) de aislado de proteína de amaranto (PA), pectina de cáscara de vaina de cacao (PC) y extracto fenólico de cáscara/cascarilla de cacao (EF), y evaluar sus propiedades funcionales.

Metodología: Se formaron CC con distintas relaciones en peso PA:PC y concentraciones de EF. Se determinaron sus propiedades antioxidantes, eficiencia de encapsulación (EE), condiciones gastrointestinales simuladas (CGS), propiedades espumantes y emulsionantes, viscosidad aparente y solubilidad.

Resultados: Los CC formulados con mayores relaciones PA:PC y concentraciones de EF mostraron una mayor capacidad para eliminar radicales ABTS^{••} y DPPH[•]. Después de 15 días de almacenamiento, se observó una disminución de la actividad antioxidante; sin embargo, la pérdida fue más pronunciada en el EF_{libre} que en los CC. Bajo CGS, los CC presentaron una reducción de actividad antioxidante. El CC, con proporción mayor, presentó mayor capacidad de expansión de espuma (CE), índice de actividad emulsionante (IAE), índice de estabilidad de la emulsión (IEE) y viscosidad aparente, pero un índice de cremado (IC) menor.

Limitaciones del estudio: Los coacervados presentaron baja solubilidad; por ello, se requieren estudios adicionales sobre su interacción con componentes alimentarios.

Originalidad: El estudio se enfoca en extraer pectina y extractos fenólicos de residuos agroindustriales, así como proteína de amaranto con beneficios para la salud.

Conclusiones: Los coacervados presentaron propiedades funcionales adecuadas para su potencial aplicación en productos alimenticios.

Palabras clave: aislado de proteína de amaranto, pectina de cáscara de cacao, extracto fenólico, capacidad antioxidante, propiedades funcionales.

Please cite this article as follows (APA 7): García-de la Rosa, K., Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E. J., & Cuevas-Bernardino, J. C. (2026). Functional properties of plant-derived protein-pectin-polyphenol ternary complex coacervates. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 18, e25035. <https://doi.org/10.5154/r.inagbi.2025.05.035>

Received: May 21, 2025 | Accepted: January 22, 2026 | Published online: June 8, 2026



Ingeniería Agrícola
y Biosistemas

<https://revistas.chapingo.mx/inagbi/>

Introduction

Complex coacervates (CC) are formed through interactions between oppositely charged biopolymers, primarily via electrostatic forces. Partial charge neutralization leads to the formation of a biphasic system at equilibrium, consisting of a biopolymer-rich phase (coacervates) and a biopolymer-poor phase. Coacervate formation commonly involves proteins of animal origin (e.g., gelatin, whey, and ovalbumin) and plant origin (e.g., legumes, cereals, and seeds), as well as polysaccharides (e.g., inulin, carrageenan, chitosan, carboxymethylcellulose, gum arabic, alginate, and pectin) (Muhoza et al., 2022), because these are common components of food matrices (Lan et al., 2020).

Coacervates have applications in the food industry as encapsulating materials, as well as thickening, emulsifying, and foaming agents, among others (You et al., 2018). Compared with individual biopolymers, protein-polysaccharide-polyphenol complexes have shown enhanced functional properties. However, due to the origin and chemical nature of the biopolymers, coacervates can display different properties. In this regard, the appropriate selection of biopolymers is essential for coacervate formation (Muriel-Mundo et al., 2020).

Amaranth protein isolate has been used to form CC with improved mechanical properties (García-de la Rosa et al., 2023). However, the literature on coacervation with this protein remains limited (Figuroa-González et al., 2025), despite its high nutritional value. Amaranth protein is notable for its content of essential aminoacids, such as lysine, tryptophan, and methionine, at concentrations higher than those reported in widely consumed cereals such as rice, wheat, and corn, and even some legumes (Hadidi et al., 2024; Nardo et al., 2018). Moreover, it has a low gliadin content (0.01 %) and high digestibility (75 %), positioning it as a superfood that, when incorporated into food matrices, enhances their nutritional value (Motta et al., 2019).

Additionally, pectin is an anionic polysaccharide widely used for its gelling, stabilizing, and emulsifying properties, with applications in the food and pharmaceutical sectors (Lan et al., 2020). Pectin is extracted from different botanical sources (sugar beet and apple pomace) and agro-industrial residues (citrus peels and cocoa pod husks). In particular, the use of cocoa by-products for pectin extraction represents a strategy to reduce environmental impact, minimize producers' economic losses, and add value to these residues (Santiago-Gómez et al., 2025).

In addition to pectin, cocoa by-products are rich in phenolic compounds with antioxidant, antimicrobial

Introducción

Los complejos coacervados (CC) se forman a partir de la interacción entre biopolímeros con cargas opuestas, principalmente mediante interacciones electrostáticas. La neutralización parcial de las cargas conduce a la formación de un sistema bifásico en equilibrio, compuesto por una fase rica en biopolímeros (o coacervados) y una pobre en biopolímeros. Para la formación de coacervados se utilizan comúnmente proteínas de origen animal (gelatina, suero de leche y ovoalbúmina) y vegetal (legumbres, cereales, semillas), así como polisacáridos (inulina, carragenina y quitosano, carboximetilcelulosa, goma arábica, alginato y pectina) (Muhoza et al., 2022), ya que son los componentes frecuentes de las matrices alimentarias (Lan et al., 2020).

Los coacervados tienen aplicaciones en la industria alimentaria como material encapsulante, agente espesante, emulsionante y espumante, entre otros (You et al., 2018). A diferencia de los biopolímeros individuales, las asociaciones proteína-polisacárido-polifenol han exhibido propiedades funcionales mejoradas. No obstante, debido al origen y a la naturaleza química de los biopolímeros, los coacervados han mostrado propiedades diferentes. En este sentido, es necesaria una selección adecuada de los biopolímeros para la formación de coacervados (Muriel-Mundo et al., 2020).

El aislado de proteína de amaranto se ha utilizado para la formación de CC con propiedades mecánicas mejoradas (García-de la Rosa et al., 2023). Sin embargo, la literatura sobre la coacervación con esta proteína aún es limitada (Figuroa-González et al., 2025), a pesar de su elevado valor nutricional. La proteína de amaranto destaca por su contenido de aminoácidos esenciales, como lisina, triptófano y metionina, en concentraciones superiores a las reportadas en cereales de mayor consumo como arroz, trigo y maíz, e incluso algunas leguminosas (Hadidi et al., 2024; Nardo et al., 2018). Asimismo, presenta bajo porcentaje de gliadina (0.01 %) y alta digestibilidad (75 %), posicionándola como un superalimento que, al ser agregado a matrices alimentarias, aporta mayor valor nutricional (Motta et al., 2019).

Por otra parte, la pectina es un polisacárido aniónico ampliamente utilizado por sus propiedades gelificantes, estabilizantes y emulsionantes, con aplicaciones en los sectores alimentario y farmacéutico (Lan et al., 2020). La extracción de pectina se realiza a partir de diferentes fuentes botánicas (pulpa de manzana y remolacha) y residuos agroindustriales (cáscara de cítricos y cáscara de mazorca de cacao). En particular, el uso de subproductos del cacao para la extracción de pectina se presenta como una medida para reducir el impacto ambiental, disminuir las pérdidas económicas de los productores y agregar valor a estos residuos (Santiago-Gómez et al., 2025).

and anti-inflammatory activity (Zhang et al., 2024). However, these compounds are highly susceptible to degradation due to factors such as pH, light, oxygen, and gastrointestinal conditions, which limits their bioavailability and functional efficacy. In this context, coacervation represents a viable strategy for their protection and controlled release by promoting encapsulation and stability under adverse conditions (Jia et al., 2016).

The purpose of forming ternary CC through electrostatic interactions among protein-pectin-polyphenols is to obtain novel ingredients for the formulation of healthy and sustainable food products. In this regard, understanding their functional properties may help identify their potential applications in various food matrices. Therefore, the objective of this study was to obtain ternary CC from *Amaranthus hypochondriacus* L. protein, pectin from *Theobroma cacao* L. pod husk, and a phenolic extract from cocoa husk/shell, and to evaluate their antioxidant properties, encapsulation efficiency, foaming and emulsifying properties, apparent viscosity, and solubility.

Materials and methods

Plant material and reagents

Seeds of *A. hypochondriacus* L. variety Revancha were provided by a producer from the community of San José Atlán, municipality of Huichapan, Hidalgo, Mexico (20° 20' 26.42" N and 99° 41' 39.73" W, 2150 m a. s. l.). Cocoa (*T. cacao* L.) by-products (pod husk and shell) were obtained from a producer in the community of Arena 2da sección, Municipality of Comalcalco, Tabasco, Mexico (18° 10' 35.2" N and 93° 23' 50.4" W, 40 m a. s. l.).

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 were purchased from J.T. Baker (Mexico). Hexane was supplied by MEYER® Chemical Reagents (Mexico). D-galacturonic, gallic acid, porcine bile, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 6-hydroxy-5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic (Trolox), and sodium dodecyl sulfate (SDS) were purchased from Sigma-Aldrich® (Mexico). Distilled and deionized water was used in all experiments.

Protein isolate production

Amaranth protein isolate (API) was obtained according to the methodology described by García-de la Rosa et al. (2023). Its protein content was 85.3 ± 1.0 %, determined by the Kjeldahl method (conversion factor 6.25).

Además de pectina, los subproductos del cacao son ricos en compuestos fenólicos con actividad antioxidante, antimicrobiana y antiinflamatoria (Zhang et al., 2024). No obstante, estos compuestos son altamente susceptibles a la degradación por factores como pH, luz, oxígeno y condiciones gastrointestinales, lo que limita su biodisponibilidad y eficacia funcional. En este sentido, la coacervación representa una estrategia viable para su protección y liberación controlada, al favorecer la encapsulación y estabilidad frente a condiciones adversas (Jia et al., 2016).

La finalidad de formar CC ternarios mediante la interacción electrostática entre proteína-pectina-polifenoles es obtener nuevos ingredientes para la formulación de productos alimenticios saludables y sostenibles. En este sentido, conocer sus propiedades funcionales puede contribuir a identificar su potencial de aplicación en diversas matrices alimentarias. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue obtener CC ternarios de proteína de *Amaranthus hypochondriacus* L., pectina de cáscara de vaina de *Theobroma cacao* L. y extracto fenólico de cáscara/cascarilla de cacao, y evaluar sus propiedades antioxidantes, eficiencia de encapsulación, propiedades espumantes y emulsionantes, viscosidad aparente y solubilidad.

Materiales y métodos

Material vegetal y reactivos

Las semillas de *A. hypochondriacus* L. variedad Revancha las proporcionó un productor de la comunidad de San José Atlán, municipio de Huichapan, Hidalgo, México (20° 20' 26.42" N y 99° 41' 39.73" O, a 2150 m s. n. m.). Los subproductos (cáscara y cascarilla) de *T. cacao* L. se obtuvieron de un productor de la comunidad Arena 2da sección, Municipio de Comalcalco, Tabasco, México (18° 10' 35.2" N y 93° 23' 50.4" O, a 40 m s. n. m.).

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 adquirieron de J.T. Baker (México). El hexano fue suministrado por MEYER® Chemical Reagents (México). El ácido D-galacturónico, ácido gálico, bilis porcina, ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ácido 6-hidroxi-5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) y dodecil sulfato de sodio (SDS) se adquirieron de Sigma-Aldrich® (México). Se utilizó agua destilada y desionizada en todos los experimentos.

Obtención del aislado de proteína

El aislado de proteína de amaranto (PA) se obtuvo de acuerdo con la metodología descrita por García-de la

Pectin extraction

Pectin (CP) was extracted from cocoa pod husk flour (PHF) by acid hydrolysis (Trujillo-Ramírez et al., 2018). The degree of esterification (DE) was determined according to the methodology proposed by García-de la Rosa et al. (2025), yielding a DE of $63.42 \pm 0.29 \%$.

Phenolic compound extraction

Phenolic extracts were obtained according to the methodology of Gaber-Ahmed et al. (2020) with modifications. Dried cocoa pod husks and shells were ground and sieved (0.8 mm) to obtain cocoa pod husk flour (PHF) and cocoa shell flour (CSF). Subsequently, 2.5 of PHF and 2.5 g of CSF were mixed in 100 mL of 75 % (v/v) ethanol. The mixture was kept under continuous stirring in the dark for 90 min. The solution was centrifuged for 5 min at $5000 \times g$ (5810 R, Eppendorf, Germany), and the supernatant was passed through a nylon filter (0.45 μm). The phenolic extract (PE) was stored in the dark at $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ until use.

Formation of complex coacervates

CC formation was carried out following the methodology proposed by Hernández-Rodríguez et al. (2014) with modifications. API ($0.01 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and CP ($0.01 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) solutions were dispersed in deionized water and maintained under constant stirring (600 rpm) at room temperature ($22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) for 12 h. The solutions were then stored at $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h to allow complete hydration. Subsequently, the API dispersion was added to the CP solution at different weight ratios (2:1 and 5:1, w/w) and stirred at 50 rpm for 3 min. Different PE concentrations (0.0, 0.1, and $0.5 \text{ g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) were selected and added to the API-CP mixtures at a 2:1 (w/w) ratio; the pH was adjusted to 3 using HCl (0.1 N), and the mixtures were stirred at 50 rpm for 2 min. The mixtures were maintained at $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ for 48 h and subsequently centrifuged at $121 \times g$ at room temperature ($22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) for 15 min to separate the CC (Thongkaew et al., 2014). The resulting CC were coded as $\text{CC}_{a/b}$, where "a" represents the API and CP weight ratio (2:1 and 5:1) and "b" the PE concentration (0.0, 0.1 and $0.5 \text{ g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) (Table 1).

Evaluation of functional properties of complex coacervates

Antioxidant activity

ABTS^{•+} and DPPH[•] assays were used to determine antioxidant activity at 5, 10, and 15 days of storage. The ABTS radical scavenging activity of API, CP, PE, and $\text{CC}_{a/b}$ was determined using the method described by Adeggbaju et al. (2020) with modification. The radical was generated by reacting ABTS (7 mM) with potassium

Rosa et al. (2023). Su contenido de proteína fue de $85.3 \pm 1.0 \%$, determinado por el método de Kjeldahl (factor de conversión 6.25).

Extracción de la pectina

La pectina (PC) se extrajo a partir de harina de cáscara de vaina de cacao (HCV) mediante hidrólisis ácida (Trujillo-Ramírez et al., 2018). El grado de esterificación (GE) se determinó según la metodología propuesta por García-de la Rosa et al. (2025), obteniéndose un GE de $63.42 \pm 0.29 \%$.

Obtención de extractos fenólicos

Los extractos fenólicos se obtuvieron de acuerdo con la metodología de Gaber-Ahmed et al. (2020) con modificaciones. Las cáscaras y cascarillas de cacao secas se molieron y se tamizaron (0.8 mm) para obtener HCV y harina de cascarillas de semillas de cacao (HCS). Posteriormente, se mezclaron 2.5 g de HCV y 2.5 g de HCS en 100 mL de etanol al 75 % (v/v). La mezcla se mantuvo en agitación continua y en oscuridad durante 90 min. La solución se centrifugó durante 5 min a $5000 \times g$ (5810 R, Eppendorf, Alemania) y el sobrenadante se pasó por un filtro de nailon (0.45 μm). El extracto fenólico (EF) se almacenó en oscuridad a $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

Formación de complejos coacervados

La formación de CC se realizó mediante la metodología propuesta por Hernández-Rodríguez et al. (2014) con modificaciones. Las soluciones de PA ($0.01 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y PC ($0.01 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) se dispersaron en agua desionizada y se mantuvieron en agitación constante (600 rpm) a temperatura ambiente ($22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 12 h. Las soluciones se almacenaron durante 24 h a $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ para permitir una hidratación completa. Posteriormente, la dispersión de PA se añadió a la solución de PC en diferentes relaciones en peso (2:1 y 5:1, p/p) y se agitó a 50 rpm durante 3 min. Se eligieron diferentes concentraciones de EF (0.0, 0.1 y $0.5 \text{ g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$), las cuales se adicionaron a las mezclas de PA y PC en una relación de 2:1 (p/p), se ajustó el pH a 3 con HCl (0.1 N) y se agitaron a 50 rpm durante 2 min. Las mezclas se mantuvieron a $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h; luego, se centrifugaron a $121 \times g$ a temperatura ambiente ($22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 15 min para separar los CC (Thongkaew et al., 2014). Estos últimos se codificaron como $\text{CC}_{a/b}$, donde "a" representa la relación en peso entre PA y PC (2:1 y 5:1) y "b" la concentración de EF (0.0, 0.1 y $0.5 \text{ g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) (Cuadro 1).

Evaluación de propiedades funcionales de los coacervados complejos

Actividad antioxidante

Se emplearon los ensayos ABTS^{•+} y DPPH[•] para determinar la actividad antioxidante a los 5, 10 y 15 días de

Table 1. Coding of the different complex coacervates combinations (CC_{a/b}).**Cuadro 1. Codificación de las distintas combinaciones de complejos coacervados (CC_{a/b}).**

a) API:CP ratio (w/w)/ a) Relación PA:PC (p/p)	b) PE concentration (g·100 mL ⁻¹)/ b) Concentración de EF (g·100 mL ⁻¹)	Ternary complex coacervates (CC _{a/b})/ Complejos coacervados ternarios (CC _{a/b})
2:1	0.0	CC _{2:1/0.0}
	0.1	CC _{2:1/0.1}
	0.5	CC _{2:1/0.5}
5:1	0.0	CC _{5:1/0.0}
	0.1	CC _{5:1/0.1}
	0.5	CC _{5:1/0.5}

API: amaranth protein isolate; CP: cocoa pod husk pectin; PE: phenolic extract from cocoa pod husk and shell.

PA: aislado de proteína de amaranto; PC: pectina de cáscara de cacao; EF: extracto fenólico de cáscara y cascarilla de cacao.

persulfate (2.45 mM) in equal volumes. The solution was kept in the dark for 18 h at room temperature (22 ± 2 °C); it was then diluted with ethanol to obtain an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm.

CC_{a/b} were centrifuged at 3000 rpm for 10 min, and the precipitate was retained. Subsequently, 1 mL of sterile saline solution (0.009 g·mL⁻¹ NaCl) was added, and the mixture was stirred at 50 rpm for 2 min to disrupt the CC_{a/b} and release the PE. Then, 10 µL of the CC_{a/b} supernatant was mixed with 990 µL of the ABTS^{••} solution and kept in the dark for 7 min. Absorbance was measured at 734 nm using a spectrophotometer (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific Fisher, USA). The percentage inhibition of ABTS^{••} was calculated using the following equation:

$$ABTS^{••} \text{ inhibition } (\%) = \left(\frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \right) \times 100 \quad (1)$$

where $A_{control}$ is the absorbance of ABTS^{••} and A_{sample} is the absorbance of ABTS^{••} plus the sample or standard.

The DPPH[•] assay was determined according to the methodology proposed by Cortés-Viguri et al. (2021) with modifications. After disruption of the CC_{a/b}, 20 µL of the supernatant from CC_{a/b}, API, CP or PE was mixed with 2 mL of an ethanolic DPPH[•] solution (0.06 mM). The mixture was then vortexed and kept in the dark at 25 °C for 30 min. Absorbance was measured at 517 nm using a spectrophotometer. Antioxidant activity against the DPPH radical was calculated using a Trolox standard curve (Equation 2):

$$Inhibición \text{ de } DPPH^{\bullet} (\%) = \left(\frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} \right) \times 100 \quad (2)$$

where $A_{control}$ is the absorbance of DPPH[•] and A_{sample} is the absorbance of DPPH[•] plus the sample or standard.

Encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency (EE) is defined as the amount of PE incorporated into the structure of CC_{a/b} during their

almacenamiento. La actividad captadora de radicales ABTS de PA, PC, EF y CC_{a/b} se determinó mediante el método descrito por Adegbaaju et al. (2020) con modificaciones. El radical se formó con ABTS (7 mM) y persulfato de potasio (2.45 mM) en cantidades iguales. La solución se mantuvo en oscuridad durante 18 h a temperatura ambiente (22 ± 2 °C); posteriormente, se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 734 nm.

Los CC_{a/b} se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min y se conservó el precipitado, al cual se le añadió 1 mL de solución salina estéril (0.009 g·mL⁻¹ de NaCl) y se agitó durante 2 min a 50 rpm para romper los CC_{a/b} y liberar el EF. Se mezclaron 10 µL del sobrenadante de los CC_{a/b} con 990 µL de la solución ABTS^{••} y se mantuvo en oscuridad durante 7 min. La absorbancia se midió a 734 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific Fisher, EUA). El porcentaje de inhibición de ABTS^{••} se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$Inhibición \text{ de } ABTS^{••} (\%) = \left(\frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} \right) \times 100 \quad (1)$$

donde $A_{control}$ es la absorbancia del ABTS^{••} y $A_{muestra}$ es la absorbancia del ABTS^{••} más la muestra o patrón.

El ensayo DPPH[•] se determinó de acuerdo con la metodología propuesta por Cortés-Viguri et al. (2021) con modificaciones. Después del rompimiento de los CC_{a/b}, se mezclaron 20 µL de sobrenadante de CC_{a/b}, PA, PC o EF con 2 mL de solución 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 antioxidante contra el radical DPPH se calculó mediante una curva estándar de Trolox (Ecuación 2):

$$Inhibición \text{ de } DPPH^{\bullet} (\%) = \left(\frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} \right) \times 100 \quad (2)$$

donde $A_{control}$ es la absorbancia del DPPH[•] y $A_{muestra}$ es la absorbancia de DPPH[•] más muestra o patrón.

formation. The amount of PE in each $CC_{a/b}$ variation was determined using the procedure described by Aceituno-Medina et al. (2015) with modifications. One gram of $CC_{a/b}$ was mixed with 5 mL of sterile saline solution ($0.009 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ NaCl) and stirred at 50 rpm for 2 min to release the PE. To obtain EE (%), the total content of encapsulated phenolics was quantified following the methodology proposed by Murcia and Castañeda (2022) with modifications. After disruption of the $CC_{a/b}$ in the saline solution, 20 μL of sample was mixed with 450 μL of Folin-Ciocalteu reagent and allowed to stand for 10 min; subsequently, 450 μL of Na_2CO_3 ($0.2 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was added, and the mixture was kept in the dark for 90 min. Finally, absorbance was measured at 760 nm using a spectrophotometer. A calibration curve of gallic acid was obtained and expressed as mg of gallic acid equivalents per gram of dry mass ($\text{mg}_{\text{GAE}}\cdot\text{g}^{-1}$). EE was calculated using the following equation:

$$EE (\%) = \left(\frac{\text{TCFP}}{\text{TPC}} \right) \times 100 \quad (3)$$

where TCFP is the total content of free phenolics from $CC_{a/b}$ and TPC corresponds to the total phenolic content.

Simulated gastrointestinal conditions

To evaluate simulated gastrointestinal conditions (SGC), 1 g of $CC_{a/b}$ was placed in a tube containing 9 mL of simulated gastric juice solution (pH 3.0 and 0.1 N HCl). Samples were incubated at 37 °C for 3 h in an orbital shaking bath (Precision Scientific 360, USA). Subsequently, the samples were filtered (the filtrate was washed with sterile saline solution) and transferred into 9 mL of a sterile porcine bile extract solution ($1 \text{ g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) at pH 6.5. $CC_{a/b}$ were incubated at 37 °C for 3 h under continuous agitation (Hernández-Rodríguez et al., 2014). After this period, antioxidant capacity was determined using the ABTS^{•+} assay.

Apparent viscosity

The apparent viscosity of $CC_{a/b}$ was determined according to the methodology proposed by Ghorbani-Gorji et al. (2014) with modifications. A rheometer (Physica MCR 301, Anton Paar, Germany) equipped with a cone-plate geometry (1° , 50 mm diameter) was used at a constant shear rate of 5 s^{-1} and a temperature of 25 °C.

Foaming properties

Foaming properties were determined following the procedure described by Silva-Diniz et al. (2014) with modifications. Fifty milliliters of $CC_{a/b}$ and API dispersions (used as control) were prepared. Each sample was homogenized using an Ultra-Turrax[®] (T50 basic IKA, USA) operated at 10000 rpm for 1 min to generate foam. Immediately, total volume and foam

Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación (EE) se define como la cantidad de EF incorporado en la estructura de los $CC_{a/b}$ durante su formación. La cantidad de EF en cada variación de $CC_{a/b}$ se determinó mediante el procedimiento descrito por Aceituno-Medina et al. (2015) con modificaciones. A 1 g de $CC_{a/b}$ se le añadieron 5 mL de solución salina estéril ($0.009 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de NaCl) y se agitó durante 2 min a 50 rpm para liberar el EF. Para obtener la EE (%), se contabilizó el contenido total de fenoles encapsulados a partir de la metodología propuesta por Murcia y Castañeda (2022) con modificaciones. Después de la rotura de los $CC_{a/b}$ en la solución salina, se mezclaron 20 μL de muestra con 450 μL de Folin-Ciocalteu (1 N) y se dejó reposar por 10 min; después, se agregaron 450 μL de Na_2CO_3 ($0.2 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y se dejó en oscuridad durante 90 min. Finalmente, se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro. Se obtuvo una curva de calibración de ácido gálico expresado en mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de masa seca ($\text{mg}_{\text{EAG}}\cdot\text{g}^{-1}$). La EE se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \left(\frac{\text{CTFL}}{\text{CFT}} \right) \times 100 \quad (3)$$

donde CTFL es el contenido total de fenoles liberados de $CC_{a/b}$ y CFT corresponde al contenido fenólico total.

Condiciones gastrointestinales simuladas

Para analizar la condición gastrointestinal simulada (CGS), se colocó 1 g de $CC_{a/b}$ en un tubo con 9 mL de solución de jugo gástrico simulado (pH 3.0 y HCl 0.1 N). Las muestras se incubaron a 37 °C por 3 h en un baño de agitación orbital (Precision Scientific 360, EUA). Posteriormente, las muestras se filtraron (el filtrado se lavó con solución salina estéril) y se depositaron en 9 mL de una solución estéril ($1 \text{ g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) de extracto de bilis porcina a pH 6.5. Los $CC_{a/b}$ se incubaron a 37 °C por 3 h bajo agitación continua (Hernández-Rodríguez et al., 2014). Pasado este tiempo, se determinó la capacidad antioxidante mediante el ensayo ABTS^{•+}.

Viscosidad aparente

La viscosidad aparente de los $CC_{a/b}$ se determinó de acuerdo con la metodología propuesta por Ghorbani-Gorji et al. (2014) con modificaciones. Se utilizó un reómetro (Physica MCR 301, Anton Paar, Alemania) con geometría de placa cónica (1° , 50 mm de diámetro), velocidad de corte constante de 5 s^{-1} y temperatura de 25 °C.

Propiedades espumantes

Las propiedades espumantes se obtuvieron mediante el procedimiento descrito por Silva-Diniz et al. (2014) con modificaciones. Se tomaron 50 mL de dispersiones de

volume were measured. Changes in foam volume were recorded at 0, 1, 5, 10, 20, 30, and 60 min (t). The percentage of volume increase (VI), foam stability (FS), and foam expansion capacity (FE) were calculated using Equations 4, 5, and 6, respectively.

$$VI (\%) = \frac{VS_2 - VS_1}{SV_1} \times 100 \quad (4)$$

where VS_2 is the volume of the sample suspension after agitation (mL) and VS_1 is the volume of the sample suspension before agitation (mL).

$$FS (\%) = \frac{V_{Ft}}{V_{F0}} \times 100 \quad (5)$$

where V_{F0} is the foam volume at time zero (mL) and V_{Ft} is the foam volume after time t (mL).

$$FE (\%) = \frac{V_{F0}}{V_{id}} \times 100 \quad (6)$$

where V_{F0} is the foam volume at time zero (mL) and V_{id} is the initial volume of the dispersion (mL).

The microstructure of API and $CC_{a/b}$ foams was observed at 10× magnification using an optical microscope (Olympus BX53F, Olympus Optical, Japan) coupled to a camera (Moticam 2500, Motic®, China) with Motic Images Plus 2.0 (Motic®, China).

Emulsifying properties

Emulsions were prepared based on the methodology proposed by Vargas et al. (2021) with modifications. First, the dispersed phase (10 mL of sunflower oil) was added dropwise under continuous agitation (8000 rpm for 3 min) to the continuous phase (40 mL of API or $CC_{a/b}$ 1 % [w/w]) using a high-shear homogenizer (Ultra-Turrax® T50 basic, IKA, USA). Subsequently, a 10 µL aliquot was added to 5 mL of SDS solution (0.001 g·mL⁻¹) and vortexed for 10 s. Absorbance was measured at 500 nm using a spectrophotometer. After 10 min, a second 10 µL aliquot of the emulsion was taken and the same procedure was followed. The emulsifying activity index (EAI), emulsion stability index (ESI), and creaming index (CI) were determined using Equations 7, 8, and 9, respectively.

$$EAI (m^2 \cdot g^{-1}) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times N}{C \times \phi \times 10\,000} \quad (7)$$

$$ESI (min) = \frac{A_0}{\Delta A} \times t \quad (8)$$

where A_0 is the absorbance of the diluted emulsion, N is the dilution factor (500 ×), C is the weight of sample per unit volume before emulsion formation (g·mL⁻¹), ϕ is the oil volume fraction of the emulsion, ΔA is the change in absorbance between 0 and 10 min ($A_0 - A_{10}$), and t is the time interval of 10 min.

$CC_{a/b}$ y PA (como control). Cada muestra se homogeneizó con un Ultra-Turrax® (T50 basic IKA, EUA) operado a 10000 rpm durante 1 min para formar espuma. Inmediatamente, se midió el volumen total y el volumen de espuma. Se registró la variación del volumen de espuma a los 0, 1, 5, 10, 20, 30 y 60 min (t). El porcentaje de incremento de volumen (IV), la estabilidad de la espuma (PE) y la capacidad de expansión de la espuma (CE) se calcularon mediante las Ecuaciones 4, 5 y 6, respectivamente.

$$IV (\%) = \frac{VS_2 - VS_1}{SV_1} \times 100 \quad (4)$$

donde VS_2 es el volumen de suspensión de la muestra después de la agitación (mL) y VS_1 es el volumen de suspensión de la muestra antes de la agitación (mL).

$$PE (\%) = \frac{V_{Et}}{V_{E0}} \times 100 \quad (5)$$

donde V_{E0} es el volumen de espuma en el tiempo cero (mL) y V_{Et} es el volumen de espuma después del tiempo t (mL).

$$CE (\%) = \frac{V_{E0}}{V_{id}} \times 100 \quad (6)$$

donde V_{E0} es el volumen de espuma en el tiempo cero (mL) y V_{id} es el volumen inicial de la dispersión (mL).

La microestructura de las espumas de PA y $CC_{a/b}$ se observó con aumento de 10× en un microscopio óptico (Olympus BX53F, Olympus Optical, Japón) conectado a una cámara (Moticam 2500, Motic®, China) con el programa Motic Images Plus 2.0 (Motic®, China).

Propiedades emulsionantes

Las emulsiones se prepararon con base en la metodología propuesta por Vargas et al. (2021) con modificaciones. Primero, se incorporó la fase dispersa (10 mL de aceite de girasol) gota a gota con agitación constante (8000 rpm por 3 min) a la fase continua (40 mL de PA o $CC_{a/b}$ 1 % [p/p]) con la ayuda de un homogeneizador de alto cizallamiento (Ultra-Turrax® T50 basic, IKA, EUA). Posteriormente, se colocó una alícuota de 10 µL en 5 mL de SDS a 0.001 g·mL⁻¹ y se agitó durante 10 s en Vortex. La absorbancia se midió a 500 nm en un espectrofotómetro. Después de 10 min se tomó una segunda alícuota de 10 µL de la emulsión y se siguió 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 Ecuaciones 7, 8 y 9, respectivamente.

$$IAE (m^2 \cdot g^{-1}) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times N}{C \times \phi \times 10\,000} \quad (7)$$

$$E (min) = \frac{A_0}{\Delta A} \times t \quad (8)$$

$$CI (\%) = \frac{H_1}{H_0} \times 100 \quad (9)$$

where H_1 is the height of the serum layer and H_0 is the total height of the emulsion. This parameter was recorded every 30 min for 120 min; subsequently every 60 min up to 240 min.

Solubility

Powders of $CC_{a/b}$ and API (used as a control) were dispersed ($0.01 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in deionized water at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ and stirred at 110 rpm for 30 min. The samples were centrifuged at 4000 rpm for 5 min; subsequently, aliquots of each supernatant were collected, transferred to pre-weighed aluminum plates, and dried to constant weight in an oven at $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Solubility was calculated from the weight difference using the following equation (Vargas et al., 2021):

$$\text{Solubility} (\%) = \frac{SCC}{TCC} \times 100 \quad (10)$$

where SCC is the mass of the $CC_{a/b}$ supernatant obtained after drying (g) and TCC is the initial total mass of the $CC_{a/b}$ powder (g).

Statistical analysis

A completely randomized design with three independent experiments was established. All measurements were performed in triplicate. Data were subjected to ANOVA and Tukey's mean comparison test ($\alpha = 0.05$). Results were reported as mean \pm standard deviation. Statgraphics 7 software was used for data analysis.

Results and discussion

Antioxidant activity

Table 2 shows the percentage inhibition of $ABTS^{*+}$ and $DPPH^*$ radicals in $CC_{a/b}$ as a function of storage time (5, 10 and 15 days at $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$). In general, no significant differences ($p > 0.05$) were observed in inhibition percentages between 5 and 10 days of storage for the same $CC_{a/b}$ formulation; however, a significant decrease ($p > 0.05$) was recorded after 15 days. This behavior is consistent with that reported by Tasch-Holkem and Favaro-Trindade (2020), who encapsulated cinnamon extract using CC formed from whey protein and gum arabic. These authors observed a gradual reduction in phenolic compound content during storage, attributed to the polymerization of polyphenols under acidic conditions, as well as to ongoing protein-polyphenol interactions at the optimal pH for coacervate formation.

$CC_{a/b}$ without the addition of PE ($CC_{2.1/0.0}$ and $CC_{5.1/0.0}$) showed significantly lower inhibition percentages compared to those containing PE. In contrast, $CC_{a/b}$

donde A_0 es la absorbancia de la emulsión diluida, N es factor de dilución ($500 \times$), C es el peso de muestra por volumen antes de la formación de la emulsión ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), ϕ es la fracción del volumen de aceite de la emulsión, ΔA es el cambio de absorbancia entre 0 y 10 min ($A_0 - A_{10}$), t es el intervalo de tiempo de 10 min.

$$IC (\%) = \frac{H_1}{H_0} \times 100 \quad (9)$$

donde H_1 es la altura de la capa del suero y H_0 es la altura total de la emulsión. Este parámetro se registró cada 30 min durante 120 min; posteriormente, cada 60 min hasta 240 min.

Solubilidad

Se dispersaron polvos ($0.01 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de $CC_{a/b}$ y PA (como control) en agua desionizada a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y se agitaron a 110 rpm durante 30 min. Las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 min; después, se tomaron alícuotas de cada sobrenadante, se transfirieron a placas de aluminio previamente pesadas y se secaron hasta peso constante en una estufa a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. La solubilidad se calculó a partir de la diferencia de peso mediante la siguiente ecuación (Vargas et al., 2021):

$$\text{Solubilidad} (\%) = \frac{SCC}{TCC} \times 100 \quad (10)$$

donde SCC es la masa del sobrenadante de $CC_{a/b}$ obtenida después del secado (g) y TCC es la masa total inicial del polvo de $CC_{a/b}$ (g).

Análisis estadístico

Se estableció un diseño completamente al azar de tres experimentos independientes. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Los datos se sometieron a análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$). Los resultados se reportaron como medias \pm desviación estándar. Para el análisis de datos se utilizó el programa Statgraphics 7.

Resultados y discusión

Actividad antioxidante

El Cuadro 2 presenta los porcentajes de inhibición de $ABTS^{*+}$ y $DPPH^*$ de los $CC_{a/b}$ en función del tiempo de almacenamiento (5, 10 y 15 días a $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$). En general, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el porcentaje de inhibición entre 5 y 10 días de almacenamiento para una misma formulación de $CC_{a/b}$; sin embargo, se registró una disminución significativa ($p < 0.05$) después de 15 días. Este comportamiento coincide con lo reportado por Tasch-Holkem y Favaro-Trindade (2020), quienes encapsularon extracto de canela mediante CC formados con proteína

Table 2. Comparison of means ABTS and DPPH' inhibition percentages as a function of storage time for complex coacervates (CC_{a/b}) and non-encapsulated phenolic extract (PE_{free}).**

Cuadro 2. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de ABTS y DPPH' en función del tiempo de almacenamiento de complejos coacervados (CC_{a/b}) y extracto fenólico no encapsulado (EF_{libre}).**

CC _{a/b}	ABTS** (%)			DPPH' (%)		
	5 days/5 días	10 days/10 días	15 days/15 días	5 days/5 días	10 days/10 días	15 days/15 días
CC _{2:1/0.0}	6.2 ± 0.4 dA	5.7 ± 0.5 dA	5.8 ± 0.6 eA	18.0 ± 0.5 fA	18.2 ± 0.9 eA	15.1 ± 0.7 dB
CC _{2:1/0.1}	28.6 ± 1.3 bA	27.4 ± 1.9 bA	22.0 ± 0.8 cB	33.6 ± 1.1 dA	35.8 ± 1.0 cA	31.0 ± 1.1 cB
CC _{2:1/0.5}	33.1 ± 1.6 aA	32.1 ± 1.3 aA	24.5 ± 1.1 bcB	40.7 ± 1.3 bB	45.1 ± 1.3 bA	42.5 ± 1.9 bAB
CC _{5:1/0.0}	11.1 ± 0.8 cA	11.0 ± 0.5 cA	10.2 ± 0.6 dB	33.3 ± 0.5 deA	31.7 ± 0.6 dA	31.4 ± 0.4 cA
CC _{5:1/0.1}	32.0 ± 3.3 abA	28.3 ± 0.3 bA	25.9 ± 1.4 bB	37.2 ± 1.0 cA	36.7 ± 1.4 cA	32.2 ± 0.5 cB
CC _{5:1/0.5}	34.7 ± 0.1 aA	33.2 ± 1.2 aA	28.9 ± 0.9 aB	52.5 ± 0.8 aA	50.8 ± 1.4 aA	45.5 ± 0.5 aB
PE _{free} /EF _{libre}	7.2 ± 0.4 cdA	5.7 ± 0.2 dAB	6.4 ± 0.6 eB	31.0 ± 0.5 eA	17.1 ± 1.0 eB	19.7 ± 0.3 dC

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between means (Tukey, $p \leq 0.05$). Different uppercase letters in the same row for each variable indicated significant differences between means (Tukey, $p \leq 0.05$).

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$). Letras mayúsculas diferentes en la misma fila para cada variable indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

systems with an API:CP ratio of 5:1 and higher PE concentrations displayed the greatest antioxidant activity, regardless of the analytical method applied. Liu et al. (2019) reported the development of protein-polysaccharide-polyphenol complexes consisting of lactoferrin, hyaluronic acid, and epigallocatechin gallate at different ratios, demonstrating that antioxidant activity is influenced by the aggregation state of the complexes. They further observed that at pH 3, a macroscopic gel was formed with lower antioxidant activity, whereas at pH 5, a soluble complex exhibiting higher activity was obtained. This behavior was attributed to the formation of hydrogels, which act as physical barriers limiting the diffusion of free radicals in the aqueous phase toward the polyphenols entrapped within the matrix.

This phenomenon is attributed to the binding of polyphenols to protein molecules, primarily through non-covalent interactions that depend on protein conformation and pH, particularly near the isoelectric point (pI). These interactions promote molecular aggregation and precipitation due to increased electrostatic coupling and the exposure of hydrophobic residues on the protein surface, which favors the structural organization of the protein-polyphenol complex. As a result, polyphenols become encapsulated, enhancing their protection under adverse conditions. In contrast, complexes formed at pH values far from the protein's pI lead to more unfolded protein chains, exposing hydrophilic residues that facilitate interactions between the biopolymeric mixture and the surrounding medium (Pang et al., 2025).

In the present study, the results suggest that increasing PE concentration and a higher protein proportion

de suero y goma arábica. Estos autores observaron una reducción gradual del contenido de compuestos fenólicos durante el almacenamiento, atribuida a la polimerización de polifenoles en condiciones ácidas, así como a interacciones continuas proteína-polifenol en el pH óptimo de la formación de los coacervados.

Los CC_{a/b} sin adición de EF (CC_{2:1/0.0} y CC_{5:1/0.0}) mostraron porcentajes de inhibición significativamente menores que sus contrapartes que contenían EF. Asimismo, los CC_{a/b} con una relación PA:PC de 5:1 y mayor concentración de EF presentaron los valores más elevados de actividad antioxidante, independientemente del método analítico empleado. Liu et al. (2019) desarrollaron complejos de proteína-polisacárido-polifenol compuestos por lactoferrina, ácido hialurónico y galato de (-)-epigallocatequina en diferentes proporciones y observaron que la actividad antioxidante de los complejos dependía de su estado de agregación. Además, mencionan que a pH 3 se formó un gel macroscópico con menor actividad antioxidante que a pH 5, en donde se formó un complejo soluble. Este efecto lo atribuyeron a que los hidrogeles actúan como barreras que inhiben el acceso de los radicales libres generados en la fase acuosa a los polifenoles atrapados en su interior.

Lo anterior se debe a que los polifenoles se unen a las moléculas de proteína, principalmente mediante interacciones no covalentes que dependen de la conformación de la proteína y el pH (en particular cuando se acerca al punto isoelectrónico [pI]). Estas uniones inducen la agregación y precipitación de las moléculas debido al aumento del acoplamiento electrostático y a la exposición de residuos hidrofóbicos en la superficie proteica, lo que favorece el plegamiento del complejo

in the API:CP ratio (5:1) enhanced PE encapsulation. Consequently, the release of PE from the $CC_{a/b}$ improved free scavenging capacity compared to PE_{free} .

It is important to mention that the inhibition percentage of PE_{free} was equal to or higher than that of $CC_{2:1/0.0}$, but significantly lower ($p < 0.05$) than that of $CC_{5:1/0.0}$ at all storage times. This behavior may be attributed to the fact that phenolic extracts contain chemical structures (unsaturated bonds and hydroxyl groups) that make them susceptible to degradation by various factors (such as light, oxygen, storage time, enzymes, temperature, and pH variations) which in turn, affect their antioxidant activity (Ferreira et al., 2023).

Encapsulation efficiency

EE (%) varied significantly among formulations: $CC_{5:1/0.5}$ (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). According to Shahidi and Dissanayaka (2023), the type of protein used as the structural material influences the encapsulation capacity of phenolic compounds. Proteins with a higher content of proline residues (such as gelatin, casein, and β -lactoglobulin) showed greater affinity for polyphenols. Likewise, the chemical structure of phenolic compounds plays a determining role in the formation of these complexes. Depending on the nature of the phenol, different types of interactions with proteins may be established: monosite (one phenol with one protein site), multisite (multiple phenols interacting with a single protein molecule), or multidentate (one phenol with several sites or several protein molecules) The strength of these interactions also depends on the protein-polyphenol molar ratio and the type of interaction (covalent or non-covalent).

Brito-de Souza et al. (2018) used coacervates formed with gelatin and different polysaccharides (gum arabic, pectin, cashew gum, carboxymethylcellulose, and k-carrageenan) to encapsulate cinnamon phenolic extracts and reported EE values between 65 and 85 %. These values are slightly higher than those observed in the present study. However, the results obtained are comparable to those reported by Nori et al. (2011), who employed soy protein-pectin complexes to encapsulate propolis phenolic extracts, achieving efficiencies ranging from 66 to 72 %. The observed differences may be attributed to the fact that amaranth protein contains a lower proportion of proline than gelatin, but a similar amount to that found in soy protein (Toimbayeva et al., 2025). A similar interaction between phenolic extracts and protein would be expected, as cinnamon extract (Klejdus & Kováčik, 2013), propolis (Wozniak et al., 2023), and cocoa husk/shell (García-de la Rosa et al., 2025) contain similar phenolic compounds.

Heckert-Bastos et al. (2020) reported that the

proteína-polifenol y da lugar a la encapsulación de los polifenoles e incrementa su protección ante condiciones adversas. Por el contrario, los complejos formados a un pH alejado del pI de la proteína dan lugar a cadenas de proteína desplegadas, lo que expone residuos hidrofílicos que favorecen la interacción de la mezcla biopolimérica con el medio (Pang et al., 2025).

En el presente estudio, los resultados sugieren que el incremento de la concentración de EF y la mayor proporción de proteína en la relación PA:PC (5:1) favorecieron la encapsulación de EF. En consecuencia, la liberación del EF de los $CC_{a/b}$ aumentó la capacidad captadora de radicales libres en comparación con el EF_{libre} .

Cabe destacar que el porcentaje de inhibición del EF_{libre} fue mayor o igual al del $CC_{2:1/0.0}$, pero significativamente menor ($p < 0.05$) que el de $CC_{5:1/0.0}$ en cualquier momento de almacenamiento. Lo anterior se puede deber a que los extractos fenólicos contienen estructuras químicas (enlaces insaturados y grupos OH) que los hacen susceptibles a la degradación por diversos factores (como luz, oxígeno, tiempo de almacenamiento, enzimas, temperatura y variaciones en el pH) e influyen en la actividad antioxidante (Ferreira et al., 2023).

Eficiencia de encapsulación

La EE (%) varió significativamente entre las diferentes formulaciones: $CC_{5:1/0.5}$ (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). De acuerdo con Shahidi y Dissanayaka (2023), el tipo de proteína utilizada como material estructural influye en la capacidad de encapsulación de compuestos fenólicos. En particular, las proteínas con mayor contenido de residuos de prolina (como gnetina, caseína y β -lactoglobulina) presentan una mayor afinidad por los polifenoles. Asimismo, la estructura química de los compuestos fenólicos desempeña un papel determinante en la formación de estos complejos. Dependiendo de la naturaleza del fenol, se pueden establecer distintos tipos de interacción con las proteínas: monositio (un fenol con un sitio de la proteína), multisitio (varios fenoles con una molécula de proteína) o multidentada (un fenol con varios sitios o varias moléculas de proteína). La intensidad de estas interacciones también depende de la relación molar proteína-polifenol y del tipo de interacción (covalente o no covalente).

Brito-de Souza et al. (2018) utilizaron coacervados formados con gelatina y diferentes polisacáridos (goma arábica, pectina, goma de anacardo, carboximetilcelulosa y k-carragenina) para encapsular extractos fenólicos de canela y reportaron una EE entre 65 y 86 %. Estos valores son ligeramente superiores a los observados en este trabajo. Sin embargo, los resultados obtenidos son comparables con los reportados por Nori et al. (2011), quienes emplearon complejos de proteína de soya y

biopolymer weight ratio is an important factor, because an appropriate proportion enhances the encapsulation of phenolic compounds. In the present study, $CC_{a/b}$ with an API:CP ratio of 5:1 showed significantly higher EE values ($p < 0.05$) than those with a lower ratio (2:1). This behavior suggests that increasing the protein proportion promotes protein-polyphenol and protein-pectin interactions, thereby providing more available sites for the incorporation of the phenolic extract within the matrix.

Assessment of simulated gastrointestinal conditions

Multiple environmental factors, such as exposure to light, oxygen, temperature fluctuations, and pH changes, can reduce the stability and antioxidant capacity of phenol compounds. These conditions occur during the digestive process, particularly in the stomach and small intestine, where most digestion and nutrient absorption take place. In this context, encapsulation systems must be able to protect bioactive compounds and delay their premature release (Jia et al., 2016).

Table 3 shows the percentage of ABTS^{•+} inhibition after SGC. Complexes prepared without PE ($CC_{2:1/0,0}$ and $CC_{5:1/0,0}$) exhibited significantly lower antioxidant activity than their counterparts containing PE. According to Pham et al. (2021), protein-polyphenol association may reduce the rate of protein digestion, which would explain the behavior observed in the present study.

On the other hand, under SGC, no significant differences ($p > 0.05$) were observed in the percentage of antioxidant activity of $CC_{a/b}$ formed at 2:1 and 5:1 (API:CP) ratios at the same phenolic extract concentration (0.1 o 0.5 g·100 mL⁻¹). According to

pectina para encapsular extractos fenólicos de propóleo, con eficiencias de 66 a 72 %. Las diferencias detectadas se pueden deber a que la proteína de amaranto contiene una proporción de prolina menor que la proteína de gelatina, pero similar a la cantidad encontrada en la soya (Toimbayeva et al., 2025). Se esperaría que la interacción entre los extractos fenólicos y la proteína sea similar, ya que el extracto de canela (Klejduš & Kováčik, 2013), el propóleo (Wozniak et al., 2023) y la cáscara/cascarilla de cacao (García-de la Rosa et al., 2025) contienen compuestos fenólicos similares.

Heckert-Bastos et al. (2020) mencionan que la relación en peso de los biopolímeros es importante, ya que una proporción adecuada favorece la encapsulación de compuestos fenólicos. En el presente estudio, los $CC_{a/b}$ con una relación PA:PC de 5:1 presentaron valores de EE significativamente mayores ($p < 0.05$) que los de una relación menor (2:1). Este comportamiento sugiere que el incremento en la proporción de proteína favorece las interacciones proteína-polifenol y proteína-pectina, lo que proporciona más sitios disponibles para la incorporación del EF dentro de la matriz.

Evaluación de las condiciones gastrointestinales simuladas

Diversos factores ambientales, como la exposición a la luz, oxígeno, variaciones de temperatura y pH, pueden reducir la estabilidad y la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos. Estas condiciones se presentan durante el proceso digestivo, particularmente en el estómago y el intestino delgado, donde ocurren la mayoría de los procesos de digestión y absorción de nutrientes. En este contexto, los sistemas de encapsulación deben ser capaces de proteger a los compuestos bioactivos y retrasar su liberación prematura (Jia et al., 2016).

Table 3. Comparison of means ABTS^{•+} inhibition percentages after simulated gastrointestinal conditions (SGC) in complex coacervates ($CC_{a/b}$) and non-encapsulated phenolic extract (PE_{free}).

Cuadro 3. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de ABTS^{•+} después de condiciones gastrointestinales simuladas (CGS) de complejos coacervados ($CC_{a/b}$) y extracto fenólico no encapsulado (EF_{libre}).

$CC_{a/b}$	Gastric conditions (% inhibition)/ Condiciones gástricas (% inhibición)	Gastric conditions (% inhibition)/ Condiciones intestinales (% inhibición)
$CC_{2:1/0,0}$	6.2 ± 0.4 d	6.5 ± 0.2 c
$CC_{2:1/0,1}$	27.9 ± 1.4 b	21.5 ± 1.5 b
$CC_{2:1/0,5}$	32.1 ± 1.6 a	27.3 ± 2.2 a
$CC_{5:1/0,0}$	9.9 ± 0.3 cd	8.6 ± 0.4 c
$CC_{5:1/0,1}$	25.6 ± 0.7 b	23.0 ± 1.4 b
$CC_{5:1/0,5}$	32.6 ± 2.2 a	29.5 ± 1.1 a
PE_{free}	11.9 ± 1.5 c	6.0 ± 0.4 c

Different letters in the same column indicate significant differences between means Tukey, $p \leq 0.05$.

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

Anal et al. (2019), during digestion, the biopolymeric matrix encapsulating bioactive compounds undergoes progressive degradation. In the gastric phase, hydrochloric acid promotes partial hydrolysis of biopolymers, whereas in the small intestine, the action of bile salts and digestive enzymes accelerates this process. As a result, small amounts of phenolic compounds may be gradually released during the gastric phase; however, the greatest release occurs in the intestinal phase, where the compounds migrate into the intestinal lumen and are subsequently absorbed (Xiao, 2022). In this regard, the results obtained suggest that the protein-pectin mixture acted as a protective barrier for PE under digestive conditions, indicating that the level of protection is independent of the weight ratio.

No significant differences ($p > 0.05$) were observed in the percentage of inhibition shown by $CC_{a/b}$ without PE and PE_{free} after the digestive process. However, when the loss of antioxidant activity was compared with respect to the initial values (day 1), it was observed that $CC_{a/b}$ with PE showed a considerably lower reduction, with decreases of 29.9 % ($CC_{2:1/0.1}$), 18.7 % ($CC_{2:1/0.5}$), 30.0 % ($CC_{5:1/0.1}$) and 15.7 % ($CC_{5:1/0.5}$), while PE_{free} exhibited a loss of 82.8 % (data previously reported by García-de la Rosa et al., 2025).

Kashyap et al. (2022) observed a reduction greater than 40 % in the antioxidant capacity of cherry pomace extracts after SGC. These authors suggest that the decrease may be attributed to hydrolysis during digestion, because unstable molecules can form in the extract due to the intestinal pH (6.5). They also note that the formation of complexes with other components present in the digestive medium reduces the availability of compounds capable of interacting with free radicals.

Aceituno-Medina et al. (2015) found a loss greater than 60 % in the antioxidant activity of non-encapsulated phenolic compounds after *in vitro* digestion, while compounds encapsulated in amaranth protein isolate-pullulan matrices maintained an antioxidant activity twice as high as that of free compounds. These results demonstrate that biopolymeric matrices can protect bioactive compounds under gastrointestinal conditions by preserving their antioxidant capacity, which is consistent with the findings of the present study.

Determination of apparent viscosity

Viscosity is a key functional property in the food industry, as it determines a substance's resistance to flow. In complex systems, the actual viscosity may vary depending on factors such as pressure, temperature, shear rate, and shear time, which can modify its structure. In such cases, the term apparent

El Cuadro 3 presenta el porcentaje de inhibición de $ABTS^{*+}$ después de CGS. Los complejos preparados sin EF ($CC_{2:1/0.0}$ y $CC_{5:1/0.0}$) presentaron actividad antioxidante significativamente menor que sus contrapartes que incluían EF. De acuerdo con Pham et al. (2021), la asociación proteína-polifenol puede disminuir la tasa de digestión proteica, lo que explicaría el comportamiento observado en el presente estudio.

Por otra parte, bajo CGS no se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el porcentaje de actividad antioxidante de los $CC_{a/b}$ formados con relaciones 2:1 y 5:1 (PA:PC) a una misma concentración de EF (0.1 o 0.5 g·100 mL⁻¹). Según Anal et al. (2019), durante la digestión, la matriz biopolimérica que encapsula los compuestos bioactivos comienza a degradarse progresivamente. En la fase gástrica, el ácido clorhídrico favorece la hidrólisis parcial de los biopolímeros, mientras que en el intestino delgado la acción de las sales biliares y las enzimas digestivas aceleran este proceso. Como consecuencia, pequeñas cantidades de compuestos fenólicos se pueden liberar gradualmente desde la fase gástrica; no obstante, la mayor liberación ocurre en la fase intestinal, donde los compuestos migran hacia la luz intestinal y posteriormente son absorbidos (Xiao, 2022). En este sentido, los resultados obtenidos sugieren que la mezcla proteína-pectina actuó como una barrera protectora del EF frente a las condiciones digestivas, lo que evidenció que el nivel de protección es independiente de la relación en peso.

No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el porcentaje de inhibición exhibido por los $CC_{a/b}$ sin EF y el EF_{libre} después del proceso digestivo. Sin embargo, cuando se comparó la pérdida de actividad antioxidante con respecto a los valores iniciales (día 1), se observó que los $CC_{a/b}$ con EF presentaron una reducción considerablemente menor, con disminuciones de 29.9 % ($CC_{2:1/0.1}$), 18.7 % ($CC_{2:1/0.5}$), 30.0 % ($CC_{5:1/0.1}$) y 15.7 % ($CC_{5:1/0.5}$), mientras que el EF_{libre} presentó una pérdida de 82.8 % (datos reportados previamente por García-de la Rosa et al., 2025).

Kashyap et al. (2022) reportaron una reducción superior al 40 % en la capacidad antioxidante de extractos de orujo de cereza después de CGS. Estos autores sugieren que la disminución se pudo deber a la hidrólisis durante la digestión, ya que se pueden formar moléculas inestables en el extracto debido al pH (6.5) del intestino. Asimismo, mencionan que la formación de complejos con otros constituyentes presentes en el medio digestivo reduce la disponibilidad de compuestos capaces de interactuar con radicales libres.

Aceituno-Medina et al. (2015) obtuvieron una pérdida superior al 60 % en la actividad antioxidante de compuestos fenólicos no encapsulados después de someterlos a digestión *in vitro*, mientras que los

viscosity is used, defined as the viscosity measured under specific conditions of deformation rate or shear rate (García-de la Rosa et al., 2023). In CC, viscosity is influenced by several molecular and structural factors, such as particle size, interactions between biopolymers, molecular flexibility, pH, and the protein-polysaccharide weight ratio (Vargas et al., 2021).

The viscosity values of $CC_{a/b}$ varied significantly ($p < 0.05$) as the API:CP weight ratio increased (2:1 to 5:1) and PE concentration increased (0.1 to 0.5 g·100 mL⁻¹): $CC_{2:1/0.0}$ (1 007.2 ± 4.2 Pa·s) < $CC_{2:1/0.1}$ (1 075.1 ± 3.5 Pa·s) < $CC_{2:1/0.5}$ (1 176.3 ± 9.8 Pa·s) < $CC_{5:1/0.0}$ (1 943.3 ± 8.5 Pa·s) < $CC_{5:1/0.1}$ (2 227.5 ± 13.6 Pa·s) < $CC_{5:1/0.5}$ (2 326.0 ± 6.0 Pa·s). In addition, a similar trend was observed in the particle size of $CC_{a/b}$, ranging from 1 070.3 to 1 893.0 nm (García-de la Rosa et al., 2025). According to Ghorbani-Gorji et al. (2014), particle size determines the degree of viscosity of CC; that is, the larger the particle size in the biopolymeric mixture, the higher the viscosity. The increase in size is associated with crosslinking among proteins, polysaccharides, and phenolic compounds, where maximum attractive interactions between molecules occur at the optimal coacervation pH. Under these conditions, three-dimensional network-like structures are formed, which subsequently dehydrate due to phase separation. As a result, denser, more compact, and less hydrated coacervates are generated.

$CC_{5:1/0.5}$ showed the highest apparent viscosity value. This behavior is likely associated with the greater availability of API and PE molecules, which promote the formation of electrostatic interactions that contribute to the generation of stronger and better-structured CC compared to those formed at lower weight ratios (2:1) or reduced PE concentrations (0.0 and 0.1 g·100 mL⁻¹). These results are consistent with those reported by Pacheco et al. (2018), who evaluated the apparent viscosity of ternary gallic acid-chitosan-corn starch solutions and observed that a higher phenolic compound concentration significantly increased viscosity. This behavior was attributed to greater intra- and intermolecular interactions between chitosan and the polyphenol during complex formation.

Foaming capacity

Foaming properties are related to the ability of proteins or other stabilizing molecules (such as CC) to form gas-liquid dispersions and to ensure bubble resistance to coalescence. The parameters commonly used to characterize this behavior include VI, FS and FE, which reflect both the initial air incorporation and the structural stability of the foam over time. These properties are influenced by factors such as protein molecular structure, hydrophobic interactions, hydrogen bonding, electrostatic forces, and disulfide

compuestos encapsulados en matrices de aislado de proteína de amaranto-pululano mantuvieron una actividad antioxidante dos veces mayor que la de los compuestos libres. Estos resultados evidencian que las matrices biopoliméricas pueden proteger a los compuestos bioactivos frente a condiciones gastrointestinales al preservar su capacidad antioxidante, lo cual concuerda con lo reportado en el presente trabajo.

Determinación de la viscosidad aparente

La viscosidad es una propiedad funcional clave en la industria alimentaria, ya que determina la resistencia de una sustancia a fluir. En sistemas complejos, la viscosidad real puede variar en función de factores como la presión, temperatura, velocidad de cizalla y tiempo de cizalla, los cuales pueden modificar su estructura. En estos casos, se emplea el término viscosidad aparente, definida como la viscosidad medida bajo condiciones específicas de velocidad de deformación o velocidad de corte (García-de la Rosa et al., 2023). En CC, la viscosidad está influenciada por diversos factores moleculares y estructurales, como el tamaño de partícula, las interacciones entre biopolímeros, la flexibilidad molecular, el pH y la relación en peso proteína-polisacárido (Vargas et al., 2021).

Los valores de viscosidad de los $CC_{a/b}$ variaron significativamente ($p < 0.05$) conforme incrementó la relación en peso de PA:PC (2:1 a 5:1) y la concentración de EF (0.1 a 0.5 g·100 mL⁻¹): $CC_{2:1/0.0}$ (1 007.2 ± 4.2 Pa·s) < $CC_{2:1/0.1}$ (1 075.1 ± 3.5 Pa·s) < $CC_{2:1/0.5}$ (1 176.3 ± 9.8 Pa·s) < $CC_{5:1/0.0}$ (1 943.3 ± 8.5 Pa·s) < $CC_{5:1/0.1}$ (2 227.5 ± 13.6 Pa·s) < $CC_{5:1/0.5}$ (2 326.0 ± 6.0 Pa·s). Aunado a lo anterior, se observó una tendencia similar en el tamaño de partícula de los $CC_{a/b}$, al mostrar una variación de 1 070.3 a 1 893.0 nm (García-de la Rosa et al., 2025). De acuerdo con Ghorbani-Gorji et al. (2014), el tamaño de partícula determina el grado de viscosidad de los CC; es decir, a mayor tamaño de partícula en la mezcla biopolimérica, mayor viscosidad. El aumento de tamaño está relacionado con la reticulación entre proteínas, polisacáridos y fenoles, en donde la máxima interacción atractiva entre las moléculas se presenta a un pH óptimo de coacervación. Bajo estas condiciones, se generan estructuras tridimensionales tipo red, las cuales posteriormente se deshidratan debido a la separación de fases. Como resultado, se generan coacervados más densos, compactos y menos hidratados.

El $CC_{5:1/0.5}$ exhibió el mayor valor de viscosidad aparente. Este comportamiento probablemente está asociado con la mayor disponibilidad de moléculas de PA y EF, las cuales favorecen la formación de interacciones electrostáticas que contribuyen a la generación de CC más fuertes y mejor estructurados en comparación con los CC formados con relaciones en peso menores (2:1) o concentraciones reducidas de EF (0.0 y 0.1 g·100 mL⁻¹).

bond formation (Salais-Obregón et al., 2022).

VI and FS of $CC_{a/b}$ without PE were significantly lower ($p < 0.05$) than those of API (Table 4). In contrast, $CC_{a/b}$ with PE showed significantly higher ($p < 0.05$) VI and FS values than API. Both VI and FE exhibited an upward trend with higher PE concentration and API:CP weight ratio. This behavior is consistent with that reported by Li et al. (2022) for foams of soy protein-chitin complexes, in which CC showed greater stability than foams formed solely by protein.

According to Badjona et al. (2024), proteins can migrate to the air-water interface due to their molecular flexibility (unfolding and conformational rearrangement); however, foams formed solely by proteins typically exhibit limited stability. The incorporation of polysaccharides can significantly improve this stability by promoting protein-protein interactions and forming a protective layer around the bubbles. Dang et al. (2025) reported that phenolic compounds can contribute to film stabilization by interacting with proteins and polysaccharides. These interactions may reduce interfacial tension and promote the formation of a thicker and more resilient interfacial layer. Nevertheless, the concentration of phenolic compounds must be maintained within an appropriate range, as high concentration may block protein-protein interaction sites and compromise foam stability.

On the other hand, the FS of $CC_{a/b}$ increased significantly as the API:CP weight ratio decreased, suggesting that a higher relative proportion of polysaccharide enhances foam stability by providing greater resistance to

Estos resultados son consistentes con lo reportado por Pacheco et al. (2018), quienes evaluaron la viscosidad aparente de soluciones ternarias de ácido gálico-quitosano-almidón de maíz y observaron que una mayor concentración de compuesto fenólico influía significativamente en el aumento de la viscosidad. Este comportamiento lo atribuyeron a una mayor interacción intra e intermolecular entre el quitosano y el polifenol en la formación de los complejos.

Capacidad de formación de espuma

Las propiedades espumantes están relacionadas con la capacidad de las proteínas o de otras moléculas estabilizantes (como los CC) para formar dispersiones gas-líquido y garantizar la resistencia de las burbujas a la coalescencia. Los parámetros utilizados comúnmente para caracterizar este comportamiento incluyen el IV, la PE y la CE, los cuales reflejan tanto la incorporación inicial de aire como la estabilidad estructural de la espuma a lo largo del tiempo. Dichas propiedades están influenciadas por factores como la estructura molecular de las proteínas, las interacciones hidrofóbicas, los puentes de hidrógeno, las fuerzas electrostáticas y la formación de puentes disulfuro (Salais-Obregón et al., 2022).

El IV y la PE de los $CC_{a/b}$ sin EF fueron significativamente menores ($p < 0.05$) que los de la PA (Cuadro 4). En contraste, los $CC_{a/b}$ con EF mostraron valores significativamente mayores ($p < 0.05$) de IV y PE que la PA. Tanto el IV como el CE aumentaron conforme incrementó la concentración de EF y la relación en peso de PA:PC. Este comportamiento es similar a lo reportado por Li et al. (2022) para espumas de

Table 4. Comparison of mean foaming capacity, emulsifying capacity, and solubility of complex coacervates ($CC_{a/b}$) and amaranth protein isolate (API).

Cuadro 4. Comparación de medias de la capacidad espumante, emulsionante y solubilidad de complejos coacervados ($CC_{a/b}$) y aislado de proteína de amaranto (PA).

$CC_{a/b}$	Foaming capacity/ Capacidad espumante			Emulsifying capacity/ Capacidad emulsionante		Solubility (%)/ Solubilidad (%)
	VI (%) / IV (%)	FS (%) / PE (%)	FE (%) / CE (%)	EAI ($m^2 \cdot g^{-1}$) / IAE ($m^2 \cdot g^{-1}$)	ESI (min) / 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
API / 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

VI: foam volume increase; FS: foam stability at 60 min; FE: foam expansion capacity; EAI: emulsifying activity index; ESI: emulsion stability index. Different letters in the same column indicate significant differences between means (Tukey, $p \leq 0.05$).

IV: incremento de volumen de la espuma; PE: estabilidad de la espuma a los 60 min; CE: capacidad de expansión de la espuma; IAE: índice de actividad emulsionante; IEE: índice de estabilidad de la emulsión. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

coalescence (Susanti et al., 2021). Chen et al. (2024) demonstrated that systems with higher protein content and greater concentrations of phenolic compounds may increase the initial foaming capacity but reduce foam stability over time. This behavior is attributed to the fact that, during foam formation, the solubility of phenolic compounds in the aqueous phase increases, leading to molecular unfolding and enabling proteins to diffuse more efficiently to the air-water interface; however, the foam subsequently collapses more rapidly.

Another factor influencing foaming properties is viscosity. An increase in viscosity can limit the migration of proteins to the air-water interface, thereby reducing air incorporation and, consequently, decreasing bubble formation. However, higher viscosity can also reduce the drainage rate of liquid surrounding the bubbles, which contributes to improved foam stability (Li et al., 2022). In this study, $CC_{a/b}$ formed at an API:CP ratio of 5:1 and with an PE concentration of $0.5 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ exhibited higher viscosity values, which were associated with lower FS.

The above results are consistent with the structural changes observed in the foam micrographs (Figure 1). Initially, the foams were composed of spherical bubbles; however, over time, they began to thicken, coalesce, and adopt a polyhedral morphology. Fameau et al. (2023) reported similar behavior, showing that bubbles in faba bean protein foams exhibited a distorted polyhedral shape, with thickening and an increase in bubble size after 30 min.

Bubble size also plays an important role in foam stability. Foam formed with API, $CC_{5:1/0.0}$, $CC_{5:1/0.1}$ and $CC_{5:1/0.5}$ exhibited lower FS values, which favored disruption of the air-water interface. This phenomenon was reflected in the coalescence of small bubbles, giving rise to larger, less dense structures, thereby contributing to foam destabilization (Wen et al., 2024). Additionally, it has been reported that systems with greater volume increase and expansion capacity tend to form larger bubbles, which is consistent with the observations from the micrographs of $CC_{a/b}$ and API (Li et al., 2022).

Emulsifying properties

Oil-in-water (O/W) emulsions are formed by dispersing an oil phase into an aqueous phase using a homogenizer. Typically, an emulsifier (protein or polysaccharide) adsorbs at the oil-water interface and forms a film around the oil droplets, providing kinetic stabilization against aggregation phenomena (Dong et al., 2022). However, during storage, emulsion tends to destabilize, leading to processes such as creaming, gravitational separation, flocculation, coalescence, and phase separation. In this context, CCs have been shown

complejos de proteína de soya-quitina, en las cuales los CC mostraron mayor estabilidad que las espumas formadas únicamente por proteína.

De acuerdo con Badjona et al. (2024), las proteínas pueden migrar a la interfaz aire-agua debido a su flexibilidad molecular (desdoblamiento y reorganización conformacional); sin embargo, las espumas formadas únicamente por proteínas suelen presentar estabilidad limitada. La incorporación de polisacáridos puede mejorar significativamente esta estabilidad al promover las interacciones proteína-proteína y formar una capa protectora alrededor de las burbujas. Dang et al. (2025) mencionan que los compuestos fenólicos pueden contribuir a la estabilización de la película al interactuar con proteínas y polisacáridos. Estas interacciones pueden reducir la tensión interfacial y favorecer la formación de una interfase más gruesa y resistente. No obstante, la concentración de compuestos fenólicos se debe mantener en un rango adecuado, ya que concentraciones elevadas pueden bloquear sitios de interacción proteína-proteína y comprometer la estabilidad de la espuma.

Por otro lado, la PE de los $CC_{a/b}$ aumentó significativamente cuando disminuyó la relación en peso de PA:PC, lo que sugiere que una mayor proporción relativa de polisacárido favorece la estabilidad de la espuma al proporcionar una mayor resistencia a la coalescencia (Susanti et al., 2021). Chen et al. (2024) evidenciaron que sistemas con mayor contenido de proteína y mayor concentración de compuestos fenólicos pueden incrementar la capacidad inicial de formación de espuma, pero disminuir su estabilidad a lo largo del tiempo. Lo anterior debido a que al formar la espuma incrementa la solubilidad de los fenoles en el agua, lo que conduce al despliegue de la estructura molecular y permite que la proteína se difunda de forma más eficiente en la interfase aire-agua; sin embargo, la espuma disminuye rápidamente.

Otro factor que influye en las propiedades espumantes es la viscosidad. Un incremento en la viscosidad puede limitar la migración de las proteínas hacia la interfase, lo que reduce la incorporación de aire y, por lo tanto, disminuye la formación de burbujas. No obstante, una mayor viscosidad puede disminuir la velocidad de drenaje del líquido que rodea las burbujas, lo que contribuye a mejorar la estabilidad de la espuma (Li et al., 2022). En este estudio, los $CC_{a/b}$ formados con una relación PA:PC de 5:1 y con una concentración de EF de $0.5 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ presentaron valores de viscosidad mayores, lo que se asoció con una menor PE.

Los resultados anteriores concuerdan con los cambios estructurales observados en las micrografías de las espumas (Figura 1). Inicialmente, las espumas estaban formadas por burbujas esféricas; sin embargo, con el tiempo, comenzaron a engrosarse, fusionarse y adquirir una morfología poliédrica. Fameau et al. (2023)

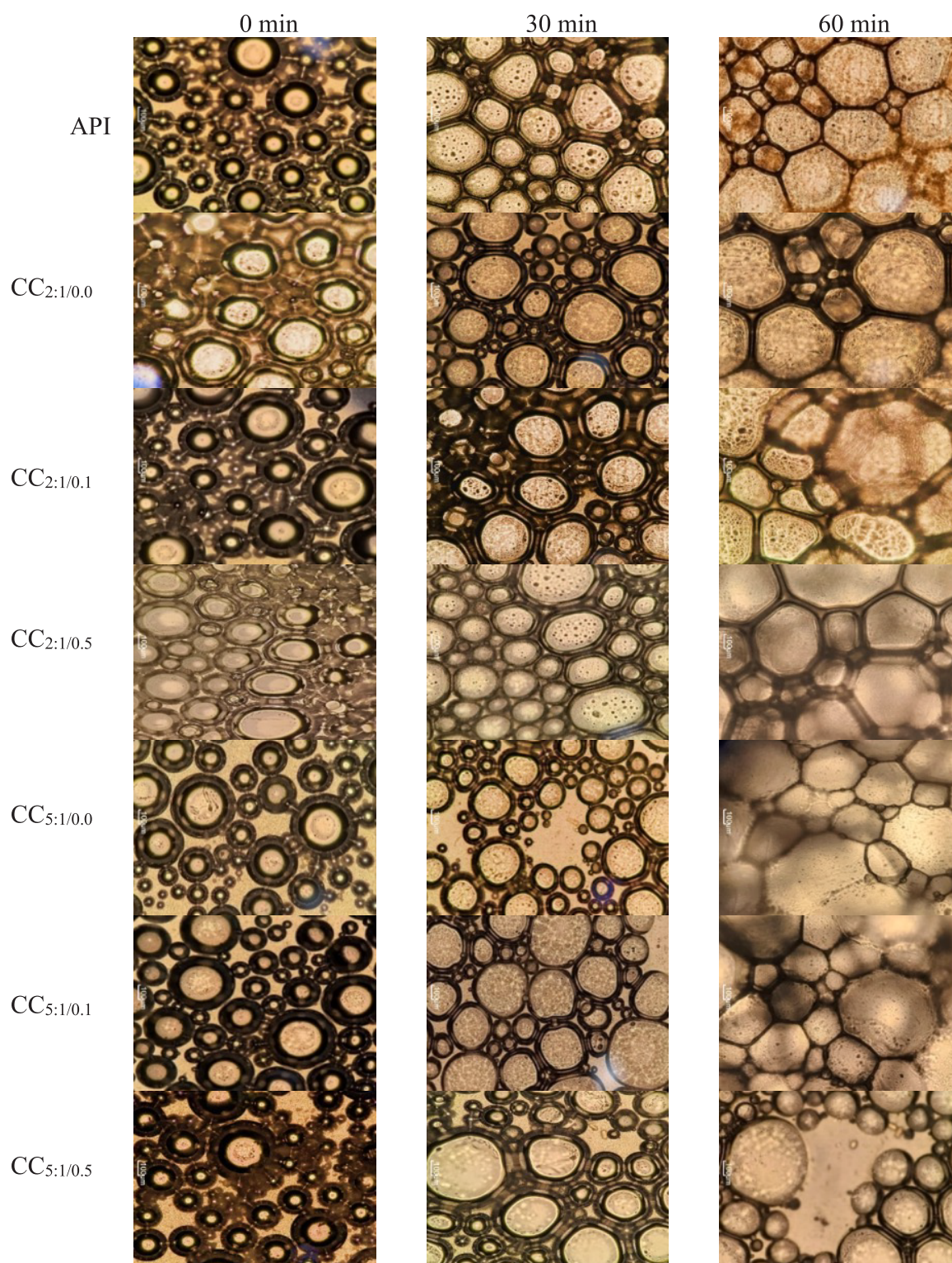


Figure 1. Optical micrographs (10 ×) of foams prepared from amaranth protein isolate (API) and different complex coacervates (CC_{a/b}) after 0, 30 and 60 min.

Figura 1. Micrografías ópticas (10 ×) de espumas de aislado de proteína de amaranto (PA) y diferentes complejos coacervados (CC_{a/b}) después de 0, 30 y 60 min.

to be effective systems for improving the stability of oil-in-water emulsion (Hu et al., 2024).

EAI, ESI and CI are used to estimate the ability of proteins and CC to become adsorbed at the oil-water interface, the stability of the emulsion, and the degree of aggregation or phase separation, respectively (Pham et al., 2019).

All emulsions showed a progressive decrease in EAI and ESI values during storage (data not shown), which were lower for API than for any $CC_{a/b}$. Regarding the initial results (Table 4), $CC_{5,1/b}$ showed higher EAI ($m^2 \cdot g^{-1}$) and ESI (min) values than $CC_{2,1/b}$. These results suggest that $CC_{a/b}$ promoted the formation of thicker and more compact films around the oil droplets, particularly at higher API:CP ratios and greater PE concentrations. In this regard, Hu et al. (2024) reported that protein-stabilized emulsions exhibit greater instability than those stabilized by CC, due to the ability of coacervates to delay interactions between adjacent oil droplets.

The EAI and ESI results are consistent with those observed for CI (Figure 2). The emulsions exhibited

observaron un comportamiento similar, al evidenciar que las burbujas de espumas de proteína de haba exhibieron una forma poliédrica distorsionada, con engrosamiento y aumento en el tamaño de las burbujas después de 30 min.

El tamaño de burbuja también desempeña un papel importante en la estabilidad de la espuma. Las espumas formadas con PA, $CC_{5,1/0,0}$, $CC_{5,1/0,1}$ y $CC_{5,1/0,5}$ mostraron valores menores de PE, lo que favoreció la separación de la interfase aire-agua. Este fenómeno se reflejó en la coalescencia de burbujas pequeñas, dando lugar a estructuras de mayor tamaño y menor densidad, lo cual contribuyó a la desestabilización de la espuma (Wen et al., 2024). Asimismo, se ha reportado que sistemas con mayor incremento de volumen y capacidad de expansión tienden a formar burbujas de mayor tamaño, lo cual coincide con lo observado en las micrografías de los $CC_{a/b}$ y la PA (Li et al., 2022).

Propiedades emulsionantes

Las emulsiones aceite-agua (O/W) se forman al dispersar una fase oleosa en una fase acuosa mediante un

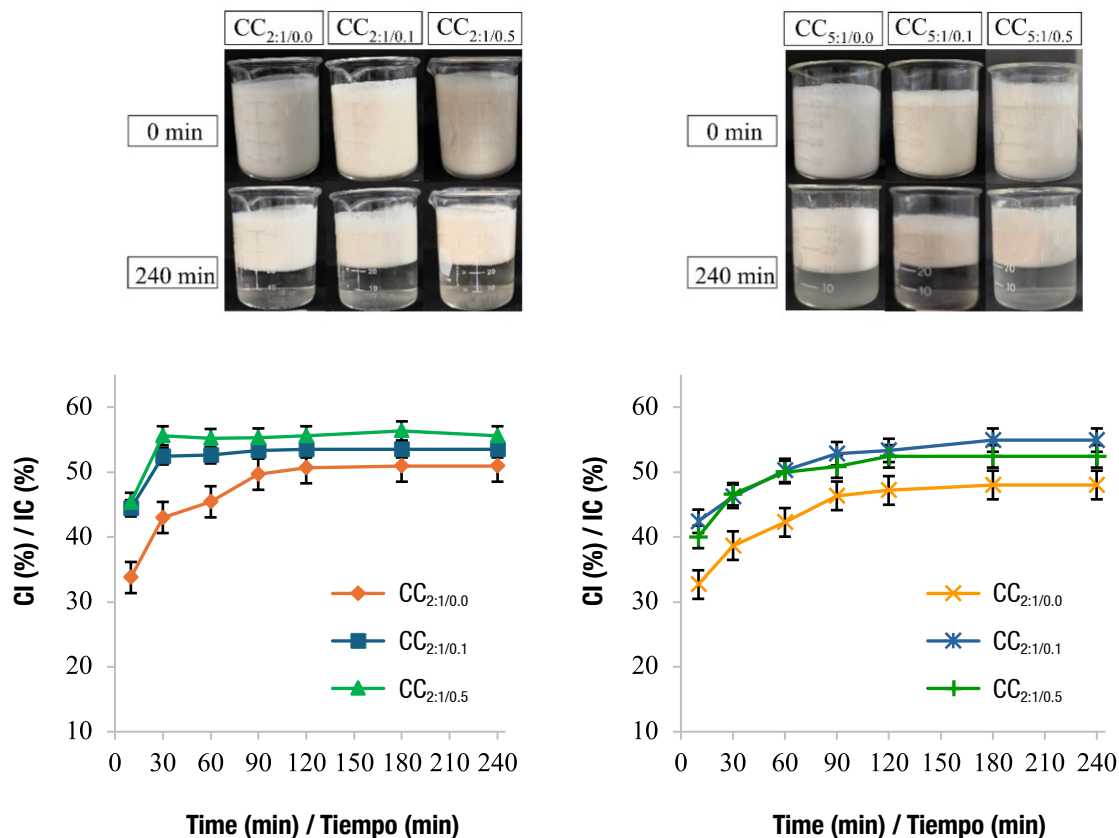


Figure 2. Variation in the creaming index (CI) of different complex coacervates ($CC_{a/b}$) over time.

Figura 2. Variación del índice de cremado (IC) de diferentes complejos coacervados ($CC_{a/b}$) en función del tiempo.

higher CI values at lower API:CP ratios and lower PE concentrations. This behavior may be partly attributed to differences in the viscosity of the continuous aqueous phase. The apparent viscosity of $CC_{a/b}$ increased significantly with increasing API:CP ratio and PE concentration. An increase in the viscosity of the continuous phase generally reduces the creaming rate by decreasing the upward movement of oil droplets, which have a relatively lower density than the aqueous phase. Additionally, the movement of droplets of different sizes can lead to stratification within the emulsion layers, which may result in variation in color tone (Lo et al., 2019). In this regard, Niu et al. (2016) reported that the protein-polysaccharide ratio influences emulsion stability, as lower proportions promote faster separation into a cream phase and a serum phase during storage.

Solubility determination

Solubility describes the ability of a substance to dissolve in another and form a homogeneous system, resulting from the balance between hydrophilic and hydrophobic interactions present in the molecules. In food systems, this property is relevant because it influences other attributes, such as gelation, foaming capacity, and emulsion stability (Bolontrade et al., 2013). In ternary coacervate systems, solubility is closely related to the structural and physicochemical characteristics of the biopolymers involved, including their molecular weight, structural conformation, surface charge, pH of formation, relative concentration of the components, and the chemical nature of the proteins, polysaccharides, and phenolic compounds present in the system (Xue et al., 2024).

The solubility values obtained of the $CC_{a/b}$ were low, and no significant differences ($p > 0.05$) were observed among treatments (Table 4). Vargas et al. (2021) report that proteins are soluble when they exhibit a net positive charge, away from the pI, which generates electrostatic repulsive forces between molecules and promotes their dispersion in the aqueous medium. However, during the formation of protein-polysaccharide coacervates, a pH close to neutral is generally used, which results in low solubility and, consequently, precipitation of the biopolymeric mixture (Hu et al., 2024).

In addition to the above, the decrease in the solubility of the $CC_{a/b}$ can also be attributed to cross-linking processes and non-covalent interactions among proteins, polysaccharides, and phenolic compounds. In these processes, the saturation of internal voids within the polymeric matrix leads to the association of nonpolar regions of the molecules, resulting in reduced water absorption and increased hydrophobicity

homogeneizador. Generalmente, un emulsionante (proteína o polisacárido) se adsorbe en la interfase aceite-agua y forma una película alrededor de las gotas de aceite, lo que proporciona estabilización cinética frente a los fenómenos de agregación (Dong et al., 2022). Sin embargo, durante el almacenamiento las emulsiones se desestabilizan y dan lugar a fenómenos como cremado, separación gravitacional, floculación, coalescencia y separación de fases. En este contexto, los CC han demostrado ser sistemas eficaces para mejorar la estabilidad de emulsiones aceite-agua (Hu et al., 2024).

Los IAE, IEE y IC permiten estimar la capacidad de las proteínas y los CC para adsorberse en la interfase aceite-agua, la estabilidad de la emulsión y el grado de agregación o separación de las fases, respectivamente (Pham et al., 2019).

Todas las emulsiones mostraron una disminución progresiva de los valores de IAE e IEE durante el almacenamiento (datos no mostrados), los cuales fueron más bajos para la PA que para cualquier $CC_{a/b}$. En cuanto a los resultados iniciales (Cuadro 4), los $CC_{5.1/b}$ presentaron valores más elevados de IAE ($m^2 \cdot g^{-1}$) e IEE (min) que los $CC_{2.1/b}$. Estos resultados sugieren que los $CC_{a/b}$ favorecieron la formación de películas más gruesas y compactas alrededor de las gotitas de aceite, particularmente con relaciones PA:PC más altas y concentraciones de EF mayores. En este sentido, Hu et al. (2024) mencionan que las emulsiones estabilizadas con proteínas presentan mayor inestabilidad que las emulsiones estabilizadas con CC, debido a la capacidad de los coacervados para retardar la interacción entre gotas de aceite adyacentes.

Los resultados de IAE e IEE son congruentes con los observados en el IC (Figura 2). Las emulsiones presentaron valores más altos de IC cuando la relación PA:PC y la concentración de EF fueron menores. Este comportamiento se pudo deber, en parte, a la diferencia en la viscosidad de la fase acuosa continua. La viscosidad aparente de los $CC_{a/b}$ aumentó significativamente al incrementar la relación PA:PC y la concentración de EF. Un aumento en la viscosidad de la fase continua generalmente reduce la velocidad de cremado al reducir la velocidad de ascenso de las gotitas de aceite, las cuales poseen una densidad relativamente menor que la fase acuosa. Adicionalmente, el movimiento de gotas de diferentes tamaños puede producir estratificación de las capas de la emulsión, lo que puede resultar en un tono de color diferente (Lo et al., 2019). En este sentido, Niu et al. (2016) reportaron que la relación en peso proteína-polisacárido influye en la estabilidad de las emulsiones, ya que proporciones menores favorecen una separación más rápida entre una fase cremosa y una fase sérica durante el almacenamiento.

(Pacheco et al., 2018). Hydrophobicity plays an important role in the formation and stability of the three-dimensional network in coacervates (Huang & Laaser, 2021). In this context, the obtained results suggest that electrostatic interactions promoted the formation of interconnected and stable structures, leading to increased hydrophobicity and low solubility of the $CC_{a/b}$.

Conclusions

$CC_{a/b}$ provided adequate protection to the PE during storage and under simulated gastrointestinal conditions compared to the free extract. The API:CP weight ratio and PE concentration significantly influenced the functional properties of $CC_{a/b}$. In this regard, the 5:1 ratio showed the best performance in terms of encapsulation, emulsifying activity, and antioxidant stability.

Similarly, the $CC_{a/b}$ exhibited superior foaming and emulsifying properties compared to the protein alone, as well as higher viscosity and emulsion stability. The low solubility observed was attributed to electrostatic interactions among proteins, pectin, and phenolic compounds during the formation of the coacervate network.

This study demonstrates the potential of CC as functional ingredients for food applications, while also contributing to the valorization of agro-industrial byproducts as a source of bioactive compounds.

Acknowledges

The authors thank the Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) of Mexico for the funding support through grant no. 919623.

End of English version

References / Referencias

- 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>
- Anal, A. K., Shrestha, S., & Sadiq, M. B. (2019) Biopolymeric-based emulsions and their effects during processing, digestibility

Determinación de la solubilidad

La solubilidad describe la capacidad de una sustancia para disolverse en otra y formar un sistema homogéneo, resultado del equilibrio entre interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas presentes en las moléculas. En sistemas alimentarios, esta propiedad es relevante porque influye en otros atributos, como la gelificación, la capacidad espumante y la estabilidad de las emulsiones (Bolontrade et al., 2013). En sistemas coacervados ternarios, la solubilidad está estrechamente relacionada con las características estructurales y fisicoquímicas de los biopolímeros involucrados, incluyendo su peso molecular, conformación estructural, carga superficial, pH de formación, concentración relativa de los componentes y la naturaleza química de proteínas, polisacáridos y compuestos fenólicos presentes en el sistema (Xue et al., 2024).

Los valores de solubilidad obtenidos para los $CC_{a/b}$ fueron bajos y no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 4). Vargas et al. (2021) mencionan que las proteínas son solubles cuando presentan una carga neta positiva, distante del pI, lo que genera fuerzas electrostáticas repulsivas entre las moléculas y favorece su dispersión en el medio acuoso. No obstante, durante la formación de CC proteína-polisacárido se usa generalmente un pH cercano al neutro, lo cual provoca baja solubilidad y, como consecuencia, precipitación de la mezcla biopolimérica (Hu et al., 2024).

Además de lo anterior, la disminución de la solubilidad de los $CC_{a/b}$ también se puede atribuir a procesos de reticulación e interacciones no covalentes entre proteínas, polisacáridos y compuestos fenólicos. En estos procesos, la saturación de huecos internos de la matriz polimérica origina una asociación de regiones apolares de las moléculas, lo que lleva a la disminución de la absorción de agua y al aumento de la hidrofobicidad (Pacheco et al., 2018). La hidrofobicidad desempeña un papel importante en la formación y estabilidad de la red tridimensional en los CC (Huang & Laaser, 2021). En este sentido, los resultados obtenidos sugieren que las interacciones electrostáticas promovieron la formación de estructuras interconectadas y estables, lo cual generó un aumento en la hidrofobicidad y una baja solubilidad de los $CC_{a/b}$.

Conclusiones

Los $CC_{a/b}$ proporcionaron una protección adecuada al EF durante el almacenamiento y bajo las CGS en comparación con el extracto libre. La relación en peso PA:PC y la concentración del EF influyeron significativamente en las propiedades funcionales de los $CC_{a/b}$. En este sentido, la relación 5:1 presentó

- and bioaccessibility of bioactive compounds in food systems. *Food Hydrocolloids*, 87, 691-702. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.008>
- Badjona, A., Bradshaw, R., Millman, C., Howarth, M., & Dubey, B. (2024). Faba beans protein as an unconventional protein source for the food industry: Processing influence on nutritional, techno-functionality, and bioactivity. *Food Reviews International*, 40(7), 1999-2023. <https://doi.org/10.1080/087559129.2023.2245036>
- Bolontrade, A. J., Scilingo, A. A., & Añon, 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>
- Chen, N., Jiao, Z., Xie, K., Liu, J., Yao, P., Luo, Y., Zhang, T., Cheng, K., & Zhao, C. (2024). Effects of protein on green tea quality in a milk-tea model during heat treatment: Antioxidant activity, foaming properties, and unbound small-molecule metabolome. *Journal of Dairy Science*, 107, 10462-10480. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25167>
- Cortés-Viguri, V., Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Cuevas-Bernardino, J. C., Hernández-Rodríguez, B. E., Álvarez-Ramírez, 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>
- Dang, T. T., Rode, T. M., Skipnes, D., Sivertsvik, M., & Noriega-Fernández, E. (2025). Rheological, foaming, and emulsifying properties of liquid whole egg fortified with green tea extract and treated with high pressure. *Food Chemistry*, 485, 144442. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144442>
- 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, 113121. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113121>
- Fameau, A. L., Guzmán, E., Ritacco, H. A., & Saint-Jalmes, A. (2023). Interfacial properties of protein particles at fluid/fluid interfaces and relationship with the stability of foams and emulsions. *Frontiers in Soft Matter*, 3, 1016061. <https://doi.org/10.3389/frsfm.2023.1016061>
- Ferreira, S., Bottini, R., & Fontana, A. (2023). Temperature and light conditions affect stability of phenolic compounds of stored grape cane extracts. *Food Chemistry*, 405, 134718. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134718>
- Figueroa-González, J. J., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E. J., Aguirre-Mandujano, E., López-Monterrubio, D. I., & Alvarez-Ramírez, J. (2025). Physicochemical characterization and in vitro digestibility of modified amaranth protein/el mejor desempeño en términos de encapsulación, actividad emulsionante y estabilidad antioxidante.
- Asimismo, los CC_{ab} exhibieron propiedades espumantes y emulsionantes superiores a las de la proteína sola, además de una mayor viscosidad y estabilidad de emulsión. La baja solubilidad observada se atribuyó a las interacciones electrostáticas entre proteína, pectina y compuestos fenólicos durante la formación de la red coacervada.
- Esta investigación evidencia el potencial de los CC como ingredientes funcionales para aplicaciones alimentarias, además de contribuir a la valorización de subproductos agroindustriales como fuente de compuestos bioactivos.
- ### Agradecimientos
- Los autores agradecen a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) de México por el apoyo financiero a través de la subvención núm. 919623.
- Fin de la versión en español*
- octenyl succinic anhydride-modified corn starch insoluble complexes. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, 24(1), 47-65. <http://doi.org/10.17306/J.AFS.001268>
- 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/10.1016/j.foodhyd.2020.105806>
- García-de la Rosa, K., Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E. J., & Cuevas-Bernardino, J. C. (2025). Amaranth protein-cacao pectin/phenolic extract complex. *Italian Journal of Food Science*. 37(4), 279-294. <https://doi.org/10.15586/ijfs.v37i4.3132>
- 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>
- 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/10.1016/j.foodchem.2023.138164>
- Heckert-Bastos, L. P., Corrêa-dos Santos, C. H., 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>
- 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/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, 109409. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109409>
- Huang, J., & Laaser, J. E. (2021). Charge density and hydrophobicity-dominated regimes in the phase behavior of complex coacervates. *ACS Macro Letters*, 10(8), 1029-1034. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.1c00382>
- 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>
- 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, 112570. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112570>
- Klejdus, B., & Kováčik, J. (2016). Quantification of phenols in cinnamon: A special focus on "total phenols" and phenolic acids including DESI-Orbitrap MS detection. *Industrial Crops and Products*, 83, 774-780. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.060>
- 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/10.1016/j.foodhyd.2019.105556>
- Li, X., Li, G., Zeng, Q., Su, D., He, S., Yang, X., Nag, A., Li, J., & Yuan, Y. (2022). The formation of soy protein fibrils-chitin nanowhisker complex coacervates: Relationship to mixed foam stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 652, 129783. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129783>
- Liu, R., Yan, X., Liu, Z., McClements, D. J., Liu, F., & Liu, X. (2019). Fabrication and characterization of functional protein-polysaccharide-polyphenol complexes assembled from lactoferrin, hyaluronic acid and (-)-epigallocatechin gallate. *Food & Function*, 10(2), 1098-1108. <https://doi.org/10.1039/C8FO02146E>
- Lo, C. C., Eyres, G. T., & Birch, E. J. (2019). Protein-stabilised emulsions. *Encyclopedia of Food Chemistry*, 404-409. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22490-6>
- 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., 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, 107239. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107239>
- Murcia, K. S., & Castañeda, M. R. (2022). Evaluación del contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante de extractos etanólicos de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 13(2), 53-65. <https://doi.org/10.22490/21456453.4717>
- Muriel-Mundo, 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/10.1016/j.foodres.2019.108781>
- Nardo, A. E., Añon, M. C., & Parisi, G. (2018). Large-scale mapping of bioactive peptides in structural and sequence space. *PLoS One*, 13(1), e0191063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191063>
- 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-Balheiro, 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>
- Pacheco, N., Naal-Ek, M. G., Ayora-Talavera, T., Shirai, K., Román-Guerrero, A., Fabela-Morón, M. F., & Cuevas-Bernardino, J. C. (2018). Effect of bio-chemical chitosan and gallic acid into rheology and physicochemical properties of ternary edible films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 149-158. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.060>
- Pang, X., Liu, W., Guo, C., Yang, M., Zhang, L., Chu, Y., Zhang, T., & Tian, Y. (2025). Complex coacervates and interaction mechanisms of flaxseed gum, flaxseed protein, and major milk proteins. *LWT - Food Science and Technology*, 231, 118286. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.118286>
- 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>
- Pham, L. B., Wang, B., Zisu, B., Truong, T., & Adhikari, B. (2021). In-vitro digestion of flaxseed oil encapsulated in phenolic compound adducted flaxseed protein isolate-flaxseed gum complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 112, 106325. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106325>
- 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/23437/1/03.pdf>
- Santiago-Gómez, I., Carrera-Lanestosa, A., González-Alejo, F. A., Guerra-Que, Z., García-Alamilla, R., Rivera-Armenta, J. L., & García-Alamilla, P. (2025). Pectin extraction process from cocoa pod husk (*Theobroma cacao L.*) and characterization by Fourier transform infrared spectroscopy. *ChemEngineering*, 9(2), 25. <https://doi.org/10.3390/chemengineering9020025>
- Shahidi, F., & Dissanayaka, C. S. (2023). Phenolic-protein interactions: insight from in-silico analyses – a review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 5(2), 1-21. <https://doi.org/10.1186/s43014-022-00121-0>
- Silva-Diniz, R., dos Reis-Coimbra, J., Teixeira, A., da Costa, A. R., Santos, I. J. B., Bressan, G. C., da Cruz-Rodrigues, A. M., & Meller-da Silva, L. H. (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>
- 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, 108375. <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>
- 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/10.1016/j.foodhyd.2014.02.006>
- Toimbayeva, D., Saduakhasova, S., Kamanova, S., Kiykbay, A., Tazhina, S., Temirova, I., Muratkhan, M., Shaimenova, B., Murat, L., Khamitova, D., & Ospankulova, G. (2025). Prospects for the use of amaranth grain in the production of functional and specialized food products. *Foods*, 14(9), 1603. <https://doi.org/10.3390/foods14091603>
- 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-Macuill, 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>
- Wen, H., Zhang, D., Ning, Z., Li, Z., Zhang, Y., Liu, J., Yu, T., & Zhang, T. (2024). Effect of benzoic acid-based and cinnamic acid-based polyphenols on foaming properties of ovalbumin at acidic, neutral and alkaline pH conditions. *Food Hydrocolloids*, 153, 109998. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.109998>
- Wozniak, M., Sip, A., Mrówczyńska, L., Broniarczyk, J., Waskiewicz, A., & Ratajczak, I. (2023). Biological activity and chemical composition of propolis from various regions of Poland. *Molecules*, 28(1), 1-19. <https://doi.org/10.3390/molecules28010141>
- Xiao, J. (2022). Recent advances on the stability of dietary polyphenols. *eFood*, 3(3), e21. <https://doi.org/10.1002/efd2.21>
- Xue, H., Du, X., Fang, S., Gao, H., Xie, K., Wang, Y., & Tan, J. (2024). The interaction of polyphenols-polysaccharides and their applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 278, 134594. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134594>
- 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, 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/10.1016/j.jff.2024.106126>