

Microencapsulation of grape seed oil by spray drying using whey protein and hawthorn pectin

Microencapsulación de aceite de semilla de uva mediante secado por aspersión utilizando proteína de suero lácteo y pectina de tejocote

Juan Carlos Cuevas-Bernardino¹; Cesar Pérez-Alonso²;
Raúl Nieto-Ángel³; Eleazar Aguirre-Mandujano^{3*}

¹Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Parque Científico Tecnológico de Yucatán, Carretera Sierra Papacal-Chuburná Puerto km 5.5, Mérida, Yucatán, C. P. 97302, MÉXICO.

²Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón esq. Paseo Tollocan s/n, col. Residencial Colón, Toluca, Estado de México, C. P. 50120, MÉXICO.

³Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO.

*Corresponding author: eleagman@yahoo.com, tel. +52 (595) 95 70 572.

Abstract

Introduction: Grape seed oil (GSO) contains unsaturated fatty acids that make it susceptible to degradation, causing it to deteriorate. In this sense, microencapsulation in biopolymer matrices is a good alternative to protect it.

Objective: To microencapsulate GSO by spray drying of emulsions stabilized with biopolymer complexes formed from whey protein concentrate (WPC) and hawthorn pectin (HP) from two different cultivars.

Methodology: Emulsions were developed with different wall material: GSO ratios (2:1 and 3:1) and percentage of total solids (30 and 40 %). The wall materials were WPC-citrus pectin and WPC-HP from two cultivars (HP55 and HP100, with an esterification degree of 70.3 and 61 %, respectively). The factors evaluated were viscosity, mean surface diameter ($d_{3,2}$) and morphology of the emulsions, and $d_{3,2}$, microencapsulation efficiency (MEE) and electron microscopy of the microcapsules.

Results: The $d_{3,2}$ of the emulsions ranged from 1.45 to 2.54 μm , where $E_{\text{WPC-HP100,3:1}}$ exhibited the smallest $d_{3,2}$. These values were related to the type of pectin and were inversely proportional to the viscosity and solids content. The highest MEE was presented by $M_{\text{WPC-HP100,3:1}}$ (71.29 %), which had the highest viscosity and the lowest $d_{3,2}$ in the emulsion.

Study limitations: The behavior of only two hawthorn cultivars is presented.

Originality: There are no reports of the use of HP biopolymer complexes from national cultivars and WPC as wall materials for the protection of bioactive materials.

Conclusions: The use of novel biopolymers such as HP (HP55 and HP100) allowed obtaining microcapsules with adequate morphology and high MEE.

Resumen

Introducción: El aceite de semilla de uva (ASU) contiene ácidos grasos insaturados que lo hacen susceptible a la degradación, provocando su deterioro. En este sentido, la microencapsulación en matrices biopoliméricas es una buena alternativa para protegerlo.

Objetivo: Microencapsular ASU mediante secado por aspersión de emulsiones estabilizadas con complejos biopoliméricos formados a partir de concentrado de proteína de lactosuero (WPC) y pectina de tejocote (PT) de dos cultivares diferentes.

Metodología: Se elaboraron emulsiones con diferentes relaciones de material de pared:ASU (2:1 y 3:1) y porcentaje de sólidos totales (30 y 40 %). Los materiales de pared fueron WPC-pectina cítrica y WPC-PT de dos cultivares (PT55 y PT100, con grado de esterificación de 70.3 y 61 %, respectivamente). Los factores evaluados fueron viscosidad, diámetro medio superficial ($d_{3,2}$) y morfología de las emulsiones, y $d_{3,2}$, eficiencia de microencapsulación (EME) y microscopía electrónica de las microcápsulas.

Resultados: El $d_{3,2}$ de las emulsiones varió de 1.45 a 2.54 μm , donde $E_{\text{WPC-PT100,3:1}}$ presentó el $d_{3,2}$ más pequeño. Estos valores estuvieron relacionado con el tipo de pectina y fueron inversamente proporcional a la viscosidad y al contenido de sólidos. La EME más alta la presentó $M_{\text{WPC-PT100,3:1}}$ (71.29 %), la cual tuvo la viscosidad más alta y el menor $d_{3,2}$ en la emulsión.

Limitaciones del estudio: Solo se presenta el comportamiento de dos cultivares de tejocote.

Originalidad: No existen reportes del uso de complejos biopoliméricos de PT de cultivares nacionales y WPC como materiales de pared para la protección de bioactivos.

Conclusiones: El uso de biopolímeros novedosos como PT (PT55 y PT100) permitió obtener microcápsulas con morfología adecuada y alta EME.

Keywords: hawthorn biopolymers, microcapsules, O/W emulsions.

Palabras clave: biopolímeros de tejocote, microcápsulas, emulsiones O/W.

Please cite this article as follows (APA 6): Cuevas-Bernardino, J. C., Pérez-Alonso, C., Nieto-Ángel, R., & Aguirre-Mandujano, E. (2019). Microencapsulation of grape seed oil by spray drying using whey protein and hawthorn pectin. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 11(2), 00-00. doi: 10.5154/r.inagbi.2019.01.005

Received: December 4, 2018 / Accepted: May 30, 2019



Ingeniería Agrícola
y Biosistemas

www.chapingo.mx/revistas/inagbi

Introduction

Edible oils have been used throughout the world since ancient times and their production sources are very diverse, which generates a high variation in the characteristics of each oil type. An important source of oil is grape (*Vitis vinifera* L.) seed, as the world production of this fruit is estimated at 66 million tons per year. Generally, the fruit of the grape is consumed fresh or used to make jams, jellies, raisins, vinegar, and about 70 to 80 % of the total harvest is used in winemaking, where it is obtained as a by-product of the seeds of the fruit (de Haro, Izarra, Rodríguez, Pérez, & Carmona, 2016; Rombaut et al., 2015). These seeds represent 20 to 25 % of the biomass generated by the wine industry, so more than 3 million tons of grape seeds are discarded worldwide every year, making them an important agro-industrial waste (Coelho, Filipe, Robalo, & Stateva, 2018; Fernández, Casal, Cruz, Pereira, & Ramalhosa, 2013).

Due to the health benefits of grape seed oil (GSO), such as a protector against cardiovascular diseases and as an anti-inflammatory, antioxidant, and blood cholesterol reducing agent, among others, its production has been proposed as an alternative to take advantage of the residues of wine companies. The oil content in grape seed is 10 to 20 %, with high concentrations of unsaturated fatty acids such as linoleic (58 to 78 %), oleic (3 to 15 %) and linolenic (0.3 %) (Kim et al., 2010), as well as tocopherols and tocotrienols (from 499 to 1575 mg·kg⁻¹ of γ -tocotrienol, from 85.5 to 244 mg·kg⁻¹ of α -tocopherol and from 69 to 319 mg·kg⁻¹ of α -tocotrienol) (Choi & Lee, 2009; Fernández et al., 2013); therefore, it is considered as an alternative for the development of new products in the food and pharmaceutical industry (Davidov-Pardo & McClements, 2015; Peng et al., 2010).

GSO is chemically unstable and susceptible to deterioration by oxidation due to its high degree of unsaturation, especially when exposed to oxygen, light, moisture and high temperatures (Tonon, Grosso, & Hubinger, 2011). An alternative to protect it and increase its shelf life is microencapsulation, which consists of generating a physical barrier to protect it from environmental conditions (Ahn et al., 2008). During this process a film is formed on the surface of the oil droplet, while the water droplets are evaporated. There are several techniques for the microencapsulation of materials, although, in general, the methods are divided into three types: chemical, physico-chemical and physico-mechanical. Among the last-mentioned is spray drying, which is widely used in the food industry because it has short drying times and great economic potential for scaling up processes (Jyothi et al., 2010; Shishir & Chen, 2017).

There are several reports related to the microencapsulation of oils (fish, rapeseed, canola,

Introducción

Los aceites comestibles se han utilizado en todo el mundo desde tiempos remotos y las fuentes de obtención son muy diversas, lo que genera una alta variación en las características de cada tipo aceite. Una fuente importante de aceite es la semilla de uva (*Vitis vinifera* L.), ya que la producción mundial de esta fruta se estima en 66 millones de toneladas por año. Generalmente, el fruto de la uva es consumido en fresco o utilizado para elaborar mermelada, gelatina, pasas, vinagre, y cerca de 70 a 80 % de la cosecha total se utiliza en la elaboración de vino, donde se obtienen como subproducto las semillas de la fruta (de Haro, Izarra, Rodríguez, Pérez, & Carmona, 2016; Rombaut et al., 2015). Estas semillas representan de 20 a 25 % de la biomasa generada por la industria del vino, por lo que más de 3 millones de toneladas de semillas de uva son desechadas en todo el mundo anualmente, lo que las convierte en un residuo agroindustrial importante (Coelho, Filipe, Robalo, & Stateva, 2018; Fernández, Casal, Cruz, Pereira, & Ramalhosa, 2013).

Debido a los beneficios que aporta el aceite de semilla de uva (ASU) para la salud (protector de enfermedades cardiovasculares, antiinflamatorio, antioxidante, reducción de colesterol en sangre, entre otras), su producción se ha propuesto como alternativa para aprovechar los residuos de las empresas vinícolas. El contenido de aceite en la semilla de uva es de 10 a 20 %, con altas concentraciones de ácidos grasos insaturados, como linoleico (58 a 78 %), oleico (3 a 15 %) y linolénico (0.3 %) (Kim et al., 2010), además de tocoferoles y tocotrienoles (de 499 a 1575 mg·kg⁻¹ de γ -tocotrienol, de 85.5 a 244 mg·kg⁻¹ de α -tocopherol y de 69 a 319 mg·kg⁻¹ de α -tocotrienol) (Choi & Lee, 2009; Fernández et al., 2013); por ello, es considerado como una alternativa para el desarrollo de nuevos productos en la industria alimentaria y farmacéutica (Davidov-Pardo & McClements, 2015; Peng et al., 2010).

El ASU es químicamente inestable y susceptible al deterioro por oxidación debido a su alto grado de insaturación, especialmente cuando se le expone al oxígeno, luz, humedad y altas temperaturas (Tonon, Grosso, & Hubinger, 2011). Una alternativa para protegerlo e incrementar su vida de anaquel es la microencapsulación, la cual consiste en generar una barrera física que lo proteja de condiciones ambientales (Ahn et al., 2008). Durante este proceso se forma una película sobre la superficie de la gota de aceite, mientras que las gotas de agua son evaporadas. Existen varias técnicas para la microencapsulación de materiales, aunque, en general, los métodos se dividen en tres tipos: químicos, físico-químicos y físico-mecánicos. Dentro de estos últimos se encuentra el secado por aspersión, que es utilizado ampliamente en la industria alimentaria debido a que presenta tiempos

orange and mint) where different biopolymers are used as encapsulating agents: whey protein concentrate (Bonilla, Azuara, Beristain, & Vernon-Carter, 2010), gum arabic, mesquite gum (Rodríguez-Huezo, Pedraza-Islas, Prado-Barragán, Beristain, & Vernon-Carter, 2004), maltodextrin, inulin (Saéñz, Tapia, Chávez, & Robert, 2009), gelatin (Madene, Jacquot, Scher, & Desobry, 2006) and pectin. The last-mentioned is used as wall material in the microencapsulation of bioactive and nutraceutical compounds (Humblet-Hua, Scheltens, van der Linden, & Sagis, 2011; Polavarapu, Oliver, Ajlouni, & Augustin, 2011). With proteins and phenolic compounds derived from plant extracts, pectin forms highly protective protein-polyphenol-pectin complexes that generate stable capsules that can be added to functional foods (Faridi, Jafari, & Assadpour, 2017).

In recent years, the hawthorn (*Crataegus* spp.) fruit has attracted special attention because it is rich in phenolic compounds, flavonoids and procyanidins. In China, Mexico and several European countries, hawthorn has been widely used as a medicinal material for its health benefits (reduced risk of cardiovascular disease and respiratory problems), for its great potential in the development of functional foods (Huang et al., 2018; Zhu et al., 2013) and for being an important source of pectin (Li, Huang, Dong, Zhu, & Li, 2017; Liu, Kallio, & Yang, 2011).

The genus *Crataegus* is native to the temperate regions of the northern hemisphere, and is composed of approximately 280 species (Vivar-Vera, Salazar-Montoya, Calva-Calva, & Ramos-Ramírez, 2007; Zhu et al., 2013). Of these, Mexico has about 15 species, most of them native to the central and southern parts of the country, all with phytochemical content associated with the antioxidant activity of hawthorn fruits, although this activity is little known (García-Mateos, Ibarra-Estrada, & Nieto-Ángel, 2013). The germplasm bank of the *Universidad Autónoma Chapingo*, Mexico, unique in the world, contains 140 accessions of hawthorn (*Crataegus* spp.) collected from seven regions of Mexico (central and southern parts of the country) (Betancourt-Olvera, Nieto-Ángel, Urbano, & González-Andrés, 2017; Nieto-Ángel, Pérez-Ortega, Núñez-Colín, Martínez-Solís, & González-Andrés, 2009).

Hawthorn fruits are rich in vitamin C, carotenes and mineral salts, mainly calcium, phosphorus, and iron, and are consumed fresh or processed in products such as cakes, quince pastes, jams, juices, canned foods, liquors and beverages; in addition, they are used in the food industry as a source of pectin, vitamin C and dietary compounds (Edwards, Brown, Talent, Dickinson, & Shipley, 2012; Nieto-Ángel et al., 2009; Vivar-Vera et al., 2007). Zhu et al. (2013) note that pectin isolated from hawthorn fruit has a viscosity four to six times higher than commercial apple and lemon pectins. Due

de secado cortos y gran potencial económico para el escalamiento de procesos (Jyothi et al., 2010; Shishir & Chen, 2017).

Existen varios reportes relacionados con la microencapsulación de aceites (pescado, colza, canola, naranja y menta) en donde utilizan diferentes biopolímeros como agentes encapsulantes: concentrado de proteína de suero (Bonilla, Azuara, Beristain, & Vernon-Carter, 2010), goma arábiga, goma de mezquite (Rodríguez-Huezo, Pedraza-Islas, Prado-Barragán, Beristain, & Vernon-Carter, 2004), maltodextrina, inulina (Saéñz, Tapia, Chávez, & Robert, 2009), gelatina (Madene, Jacquot, Scher, & Desobry, 2006) y pectina. Este último es utilizado como material de pared en la microencapsulación de compuestos bioactivos y nutraceuticos (Humblet-Hua, Scheltens, van der Linden, & Sagis, 2011; Polavarapu, Oliver, Ajlouni, & Augustin, 2011). Con proteínas y compuestos fenólicos derivados de extractos de plantas, la pectina forma complejos proteína-polifenol-pectina de alta protección que generan cápsulas estables que pueden ser adicionadas en alimentos funcionales (Faridi, Jafari, & Assadpour, 2017).

En los últimos años, ha surgido especial interés en el fruto de tejocote (*Crataegus* spp.) debido a que es rico en compuestos fenólicos, flavonoides y procianidinas. En China, México y varios países europeos, el tejocote ha sido usado ampliamente como material medicinal por sus beneficios a la salud (reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares y problemas respiratorios), por su gran potencial en el desarrollo de alimentos funcionales (Huang et al., 2018; Zhu et al., 2013) y por ser una fuente importante de pectina (Li, Huang, Dong, Zhu, & Li, 2017; Liu, Kallio, & Yang, 2011).

El género *Crataegus* es originario de las regiones templadas del hemisferio norte, y está compuesto por aproximadamente 280 especies (Vivar-Vera, Salazar-Montoya, Calva-Calva, & Ramos-Ramírez, 2007; Zhu et al., 2013), de las cuales, México cuenta con alrededor de 15 especies, la mayoría autóctonas de la parte central y sur del país, y todas ellas con contenido de fitoquímicos asociados con la actividad antioxidante de frutos de tejocote, aunque esta actividad es poco conocida (García-Mateos, Ibarra-Estrada, & Nieto-Ángel, 2013). El banco de germoplasma de la Universidad Autónoma Chapingo, México, único en el mundo, contiene 140 accesiones de tejocote (*Crataegus* spp.) colectadas de seis regiones de México (parte central y sur del país) (Betancourt-Olvera, Nieto-Ángel, Urbano, & González-Andrés, 2017; Nieto-Ángel, Pérez-Ortega, Núñez-Colín, Martínez-Solís, & González-Andrés, 2009).

Los frutos de tejocote son ricos en vitamina C, carotenos y sales minerales, principalmente calcio, fósforo, hierro, y se consumen en fresco o procesados en productos como

to its characteristics, hawthorn pectin (HP) can be used as a wall material for microencapsulating bioactive compounds, which gives this fruit great economic importance; however, its potential has not been studied. In recent years, studies on hawthorn pectins have been limited to physical-chemical characterization, phenolic compound content, optimization methods, gel formation and emulsion stability (Cuevas-Bernardino, Lobato-Calleros, Román-Guerrero, Álvarez-Ramírez, & Vernon-Carter, 2016; Linares-García, Ramos-Ramírez, & Salazar-Montoya, 2015; Uysal & Yildirim, 2014).

Recent research related to the encapsulation of bioactive compounds (chia seed oil, fish oil and folic acid) by spray drying reports the use of emulsions and nanoemulsions stabilized with whey protein concentrate, whey protein hydrolysate and commercial citrus pectins (Assadpour, Jafari, & Maghsoudlou, 2017; Noello, Carvalho, Silva, & Hubinger, 2016; Tamm, Härter, Brodkord, & Drusch, 2016). So far, there are no reports on the use of HP-whey protein concentrate (WPC) biopolymer complexes as wall materials for the protection of bioactive compounds. Therefore, the aim of this work was to microencapsulate GSO by spray drying oil/water (O/W) emulsions stabilized with novel biopolymer complexes formed from WPC and HP from two different cultivars, and determine their effect on the morphology and efficiency of microencapsulation.

Materials and methods

The GSO was provided by Vid® (Extractos Naturales Vista al Mar, S.P.R. de R.L., Ensenada, Baja California, Mexico), and the hawthorn (*Crataegus* spp.) accessions (55 and 100) were obtained from the Germplasm Bank of the *Universidad Autónoma Chapingo* (Texcoco, State of Mexico, Mexico). In addition, we used WPC (Hilmar 8000, Hilmar Ingredients®, USA, with an isoelectric point of 4.2 ± 0.1 , 83.7 % protein and 6.4 % fat), commercial citrus pectin (CP; Cedrosa, Mexico, with a 70 % esterification degree), hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide (NaOH), ammonium hydroxide (NH₄OH), petroleum ether and ethyl ether (all analytical grade, Sigma Aldrich®, Mexico). The water used for all experiments was deionized.

Composition of grape seed oil

The fatty acid composition of the GSO was determined in a gas chromatograph (G1530A, Agilent, USA) equipped with an automatic injection turret (model 7683B), a flame ionization detector and a CP-Sil 88 column (100 m × 0.25 mm × 0.39 mm). The initial temperature of the column was 90 °C and increased to 165 °C (20 °C·min⁻¹). The temperature was kept constant for 1 min and then increased to 225 °C (1.5 °C·min⁻¹). The carrier gas was helium with a flow of

pasteles, ates, mermeladas, jugos, alimentos enlatados, licores y bebidas, además, en la industria alimentaria son fuente de pectina, vitamina C y compuestos dietéticos (Edwards, Brown, Talent, Dickinson, & Shipley, 2012; Nieto-Ángel et al., 2009; Vivar-Vera et al., 2007). Zhu et al. (2013) mencionan que la pectina aislada de fruta de tejocote posee una viscosidad de cuatro a seis veces mayor que las pectinas comerciales de manzana y limón. Por sus características, la pectina de tejocote (PT) puede ser utilizada como material de pared para microencapsular compuestos bioactivos, lo que hace a este fruto de gran importancia económica; sin embargo, su potencial no ha sido estudiado. En los últimos años, estudios sobre pectinas de tejocote han sido limitados a la caracterización físico-química, contenido de compuestos fenólicos, métodos de optimización, formación de geles y estabilidad de emulsiones (Cuevas-Bernardino, Lobato-Calleros, Román-Guerrero, Álvarez-Ramírez, & Vernon-Carter, 2016; Linares-García, Ramos-Ramírez, & Salazar-Montoya, 2015; Uysal & Yildirim, 2014).

Investigaciones recientes relacionados con la encapsulación de compuestos bioactivos (aceite de semillas de chía, aceite de pescado y ácido fólico) mediante secado por aspersión reportan el uso de emulsiones y nanoemulsiones estabilizadas con concentrado de proteína de suero, hidrolizado de proteína de suero y pectinas cítricas comerciales (Assadpour, Jafari, & Maghsoudlou, 2017; Noello, Carvalho, Silva, & Hubinger, 2016; Tamm, Härter, Brodkord, & Drusch, 2016). Hasta el momento, no hay reportes sobre el uso de complejos biopoliméricos de PT-concentrado proteína de lactosuero (WPC) como materiales de pared para la protección de compuestos bioactivos. Por ello, el objetivo de este trabajo fue microencapsular ASU mediante secado por aspersión de emulsiones aceite/agua (O/W) estabilizadas con complejos biopoliméricos novedosos formados a partir de WPC y PT de dos cultivares diferentes, y determinar su efecto sobre la morfología y eficiencia de microencapsulación.

Materiales y métodos

El ASU fue proporcionado por Vid® (Extractos Naturales Vista al Mar, S.P.R. de R.L., Ensenada, Baja California, México), y las accesiones de tejocote (*Crataegus* spp.) (55 y 100) se obtuvieron del Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma Chapingo (Texcoco, Estado de México, México). Además, se utilizó WPC (Hilmar 8000, Hilmar Ingredients®, EUA, con punto isoelectrónico de 4.2 ± 0.1 , 83.7 % de proteína y 6.4 % de grasa), pectina cítrica comercial (PC; Cedrosa, México, con grado de esterificación de 70 %), ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de amonio (NH₄OH), éter de petróleo y éter etílico (todos de grado analítico, Sigma Aldrich®, México). El agua utilizada para todos los experimentos fue desionizada.

0.7 mL·min⁻¹, and methyltridecanoate (C13:0) was used as an internal standard.

Extraction of hawthorn pectin

Pectin was extracted from the accessions (HP55 and HP100) according to the method proposed by Cuevas-Bernardino et al. (2016), with some modifications. First, 100 g of hawthorn fruit pulp were mixed with 1000 mL of HCl 0.1 N, at 85 ± 1 °C for 60 min and constant stirring. The resulting extract was cooled to room temperature and filtered with Whatman no. 1 paper. Absolute ethanol was then added at a 1:1 (v/v) ratio, and left to stand for 24 h at 4 ± 1 °C. The precipitated pectins were separated by filtration, with the same type of paper, and washed twice with 70 % ethanol at a 1:1 (v/v) ratio, for which the mixture was centrifuged at 1700 g for 15 min (Sorvall RC-5B, Marshall Scientific, USA). The precipitates were purified with a dialysis membrane (MWCO = 15 000; Spectrum®, USA). Finally, the pectins were dried in a circulating air drying oven (HPP750-230V, Wisconsin Oven Distributors, USA) for 12 h at 30 ± 0.5 °C. The dry-basis HP yield was 4.27 ± 0.32 % and 3.62 ± 0.41 %, for HP55 and HP100, respectively.

Methylesterification degree of hawthorn pectin

Methylesterification degree was determined by the direct titration method described by Jiang et al. (2012), for which CP was used as a reference. First, 500 mg of dehydrated HP and 2 mL of ethanol were dissolved in 100 mL of CO₂-free water. The solution was titrated with 0.5 N NaOH, using phenolphthalein as indicator. The volume consumed was established as V_A. Subsequently, saponification was performed with 10 mL of NaOH 0.5 N and vigorous stirring; the reaction was carried out for 15 min. Saponification was stopped by adding 10 mL of 0.5 N HCl. The excess HCl was titrated with 0.5 N NaOH, and the consumed volume was established as V_B (titration volume B). The esterification degree (ED, %) was calculated from the following equation:

$$ED = \frac{V_B}{V_A + V_B} \times 100 \quad (1)$$

Emulsion preparation

The O/W emulsions were prepared using WPC-CP or WPC-HP (22.2 and 33.3 % [w/w], respectively) in solution as continuous phase and GSO as oily phase. First, 0.3 % sodium azide was added as an antimicrobial agent. The solutions were left to stand for 12 h at 4 ± 1 °C to obtain complete hydration of the biopolymers. A completely random experimental design with three replicates was established to determine the effect of the treatments (Table 1) on the characteristics of the emulsions and microcapsules. The emulsions were made with two total biopolymers:GSO ratios (2:1 and 3:1 w/w) and two

Composición del aceite de semilla de uva

La composición de ácidos grasos del ASU se determinó en un cromatógrafo de gases (G1530A, Agilent, EUA) equipado con una torreta de inyección automática (modelo 7683B), un detector de ionización de flama y una columna CP-Sil 88 (100 m × 0.25 mm × 0.39 mm). La temperatura inicial de la columna fue de 90 °C e incrementó hasta 165 °C (20 °C·min⁻¹). La temperatura se mantuvo constante durante 1 min y después incrementó hasta 225 °C (1.5 °C·min⁻¹). El gas acarreador fue helio con un flujo de 0.7 mL·min⁻¹, y como estándar interno se utilizó metiltridecanoato (C13:0).

Extracción de pectina de tejocote

La extracción de pectina de las accesiones (PT55 y PT100) se realizó de acuerdo con el método propuesto por Cuevas-Bernardino et al. (2016), con algunas modificaciones. Se mezclaron 100 g de pulpa de los frutos de tejocote con 1000 mL de HCl 0.1 N, a 85 ± 1 °C durante 60 min y agitación constante. El extracto resultante se enfrió a temperatura ambiente y se filtró con papel Whatman no. 1. Posteriormente, se adicionó etanol absoluto en una relación 1:1 (v/v), y se dejó reposar durante 24 h a 4 ± 1 °C. Las pectinas precipitadas se separaron por filtración, con el mismo tipo de papel, y se lavaron dos veces con etanol al 70 % en una relación 1:1 (v/v), para lo cual, la mezcla se centrifugó a 1700 g durante 15 min (Sorvall RC-5B, Marshall Scientific, EUA). Los precipitados se purificaron con una membrana de diálisis (MWCO = 15 000; Spectrum®, EUA). Finalmente, las pectinas se secaron en una estufa de secado de aire circulante (HPP750-230V, Wisconsin Oven Distributors, EUA) durante 12 h a 30 ± 0.5 °C. El rendimiento de la PT en base seca fue de 4.27 ± 0.32 % y 3.62 ± 0.41 %, para PT55 y PT100, respectivamente.

Grado de metilesterificación de la pectina de tejocote

El grado de metilesterificación se determinó por el método de titulación directa descrito por Jiang et al. (2012), para lo cual se usó PC como referencia. Se disolvieron 500 mg de PT deshidratada y 2 mL de etanol en 100 mL de agua libre de CO₂. La solución se tituló con NaOH 0.5 N, utilizando fenolftaleína como indicador. El volumen consumido fue establecido como V_A. Posteriormente, se llevó a cabo una saponificación con 10 mL de NaOH 0.5 N y agitación vigorosa; la reacción se llevó a cabo por 15 min. La saponificación se detuvo adicionando 10 mL de HCl 0.5 N. El exceso de HCl se tituló con NaOH 0.5 N, y el volumen consumido se estableció como V_B (volumen de titulación B). El grado de esterificación (GE, %) se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$GE = \frac{V_B}{V_A + V_B} \times 100 \quad (1)$$

Table 1. Composition of emulsions and microcapsules.
Cuadro 1. Composición de las emulsiones y microcápsulas.

Emulsion (E)/Emulsión (E)	Microcapsules (M)/ Microcápsulas (M)	WPC ¹ -P:GSO ratio/ Relación WPC ¹ -P:ASU	TS (%) / ST (%)
E _{WPC-CP,2:1} / E _{WPC-PC,2:1}	M _{WPC-CP,2:1} / M _{WPC-PC,2:1}	2:1	30
E _{WPC-HP55,2:1} / E _{WPC-PT55,2:1}	M _{WPC-HP55,2:1} / M _{WPC-PT55,2:1}	2:1	30
E _{WPC-HP100,2:1} / E _{WPC-PT100,2:1}	M _{WPC-HP100,2:1} / M _{WPC-PT100,2:1}	2:1	30
E _{WPC-CP,3:1} / E _{WPC-PC,3:1}	M _{WPC-CP,3:1} / M _{WPC-PC,3:1}	3:1	40
E _{WPC-HP55,3:1} / E _{WPC-PT55,3:1}	M _{WPC-HP55,3:1} / M _{WPC-PT55,3:1}	3:1	40
E _{WPC-HP100,3:1} / E _{WPC-PT100,3:1}	M _{WPC-HP100,3:1} / M _{WPC-PT100,3:1}	3:1	40

¹WPC = whey protein concentrate; P = pectin; CP = citrus pectin; HP55 = hawthorn pectin from accession 55; HP100 = hawthorn pectin from accession 100; TS = total solids.

¹WPC = concentrado de proteína de lactosuero; P = pectina; PC = pectina cítrica; PT55 = pectina de tejocote de la accesión 55; PT100 = pectina de tejocote de la accesión 100; ST = sólidos totales.

concentrations of total solids (TS; 30 and 40 %). The GSO was incorporated dropwise into the biopolymer solutions (WPC-HP55, WPC-HP100 and WPC-CP) with continuous stirring in a homogenizer (Ultra-Turrax T50 Basic, IKA®, USA) operated at 5200 rpm for 5 min at 30 °C. The emulsions were stored at 4 ± 1 °C until analysis.

Viscosity of emulsions

For viscosity measurements, a Physica MCR 301 dynamic stress rheometer (Physica Messtechnik, Germany) was used, equipped with a cone-plate geometry, in which the rotary cone was 50 mm in diameter and the cone angle 1°. The samples of each emulsion were carefully placed in the measuring system, and the apparent viscosity was determined at 20 °C, for which a shear rate of 10³ to 10³ s⁻¹ was used. The data were plotted on a logarithmic scale of apparent viscosity as a function of the shear rate.

Emulsion droplet size and morphology

The mean surface diameter ($d_{3,2}$) distribution of the emulsions was determined by a laser diffraction particle size analyzer (Mastersizer 3000, Malvern Instruments Ltd., UK); for this, the emulsion was dispersed in water within the measuring unit (Hydro EV, Malvern Panalytical, UK) until reaching a darkening rate of 10 to 20 %. The refractive indices of GSO (1.468) and water (1.330), as dispersion medium, were determined with a refractometer (44-501, ABBE, USA). The results were reported as $d_{3,2}$, which is defined as:

$$d_{3,2} = \frac{\sum_i z_i d_i^3}{\sum_i z_i d_i^2} \quad (2)$$

where z_i is the number of droplets with diameter d_i .

The emulsion droplets were examined under an optical microscope (BX41, Olympus Optical, Japan) coupled to a digital camera (Infinity 1, Lumenera Corp., Canada)

Preparación de emulsiones

Las emulsiones O/W se prepararon utilizando WPC-PC o WPC-PT (22.2 y 33.3 % [p/p], respectivamente) en solución como fase continua y ASU como fase oleosa. Se adicionó 0.3 % de azida de sodio como agente antimicrobiano. Las soluciones se dejaron en reposo durante 12 h a 4 ± 1 °C para obtener una completa hidratación de los biopolímeros. Se estableció un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones para determinar el efecto de los tratamientos (Cuadro 1) sobre las características de las emulsiones y las microcápsulas. Las emulsiones se elaboraron con dos relaciones de biopolímeros totales:ASU (2:1 y 3:1 p/p) y dos concentraciones de sólidos totales (ST; 30 y 40 %). El ASU se incorporó gota a gota a las soluciones de biopolímeros (WPC-PT55, WPC-PT100 y WPC-PC) con agitación continua en un homogeneizador (Ultra-Turrax T50 Basic, IKA®, EUA) operado a 5200 rpm durante 5 min a 30 °C. Las emulsiones se almacenaron a 4 ± 1 °C hasta su análisis.

Viscosidad de las emulsiones

Para realizar las mediciones de viscosidad, se utilizó un reómetro Physica MCR 301 (Physica Messtechnik, Alemania) equipado con una geometría cono-plato, en el cual el cono rotatorio fue de 50 mm de diámetro y el ángulo de cono de 1°. Las muestras de cada emulsión se colocaron cuidadosamente en el sistema de medición, y la viscosidad aparente se determinó a 20 °C, para lo cual se empleó una tasa de corte de 10⁻³ a 10³ s⁻¹. Los datos se graficaron en escala logarítmica de viscosidad aparente como una función de la tasa de corte.

Tamaño y morfología de gota de las emulsiones

La distribución del diámetro medio superficial ($d_{3,2}$) de las emulsiones se determinó mediante un analizador de tamaño de partícula de difracción laser (Mastersizer 3000, Malvern Instruments Ltd., RU); para ello, la

and Image-Pro Plus ver. 7.0 software (Media Cybernetics, USA). Prior to the analysis, the emulsion was diluted in distilled water (1:10 v/v), after which a small sample of the dilution was taken, placed on a glass slide with a coverslip and observed under the microscope.

Preparation of microcapsules

The emulsions were spray-dried (Nichols/Niro, Turbo Spray PLA, USA) at an air inlet and outlet temperature of 170 ± 5 and 85 ± 5 °C, respectively, and atomization pressure at 4 bar (Rodea-González et al., 2012). The emulsions were pumped to the spray dryer at a feed rate of $40 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The dried powders were stored in glass jars wrapped in aluminum foil at 4 ± 1 °C until analysis.

Encapsulation efficiency of grape seed oil

The microencapsulation efficiency (MEE) was calculated from the GSO extractable from the microcapsules with solvent. The free oil was extracted using the method described by Polavarapu et al. (2011). The powder microcapsules (1 g) were added to 10 mL of petroleum ether in a flask; the mixture was stirred in the dark at 25 °C for 15 min and filtered with Whatman paper no. 541. The powder collected in the filter paper was washed three times with 10 mL of petroleum ether; the solvent was then evaporated in a rotary evaporator at 30 °C. The non-encapsulated oil (extractable GSO) was determined by the difference between the initial weight of the bottle without sample and the final weight of the bottle containing the residue of the extracted oil. The total microencapsulated GSO was determined according to the Ross-Gotlieff method (Association of Official Analytical Chemists [AOAC], 1995). The MEE was calculated according to the following equation:

$$MEE = \frac{(GSO_t - GSO_e)}{(GSO_t)} \times 100 \quad (3)$$

where GSO_t is the total oil content and GSO_e is the extractable surface oil content.

Particle size distribution

To determine the average diameter of the microcapsules, they were rehydrated in water to obtain reconstituted emulsions (REE), with a total solids content similar to emulsions. The solution was magnetically stirred for 180 min at 70 °C; the REEs were then left to stand at room temperature (20 °C) and the particle size distribution was determined in the same way as with the emulsions.

Scanning electron microscopy

The morphology of the microcapsules was determined using the method proposed by Guadarrama-Lezama

emulsión se dispersó en agua dentro de la unidad de medición (Hydro EV, Malvern Panalytical, RU) hasta alcanzar una tasa de oscurecimiento de 10 a 20 %. Los índices de refracción del ASU (1.468) y agua (1.330), como medio de dispersión, se determinaron con un refractómetro (44-501, ABBE, EUA). Los resultados se reportaron como $d_{3,2}$, que es definido como:

$$d_{3,2} = \frac{\sum_i z_i d_i^3}{\sum_i z_i d_i^2} \quad (2)$$

donde z_i es el número de gotas con diámetro d_i .

Las gotas de las emulsiones se examinaron en un microscopio óptico (BX41, Olympus Optical, Japón) acoplado a una cámara digital (Infinity 1, Lumenera Corp., Canadá) y al programa Image-Pro Plus ver. 7.0 (Media Cybernetics, EUA). Previo al análisis, la emulsión se diluyó en agua destilada (1:10 v/v), de la dilución se tomó una pequeña muestra, se colocó sobre un portaobjetos de vidrio con cubreobjetos y se observó en el microscopio.

Preparación de las microcápsulas

Las emulsiones se secaron por aspersión (Nichols/Niro, Turbo Spray PLA, EUA) a una temperatura de entrada y salida del aire de 170 ± 5 y 85 ± 5 °C, respectivamente, y presión de atomización de 4 bar (Rodea-González et al., 2012). Las emulsiones se bombearon al secador por aspersión a una tasa de alimentación de $40 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Los polvos secos se almacenaron en frascos de vidrio envueltos con papel aluminio a 4 ± 1 °C hasta su análisis.

Eficiencia de encapsulación del aceite de semillas de uva

La eficiencia de microencapsulación (EME) se calculó a partir del ASU extraíble de las microcápsulas con solvente. La extracción del aceite libre se llevó a cabo por el método descrito por Polavarapu et al. (2011). Las microcápsulas en polvo (1 g) se adicionaron a 10 mL de éter de petróleo en un matraz; la mezcla se agitó en la oscuridad a 25 °C durante 15 min y se filtró con un papel Whatman no. 541. El polvo colectado en el papel filtro se lavó tres veces con 10 mL de éter de petróleo; posteriormente, el solvente se evaporó en un rotavapor a 30 °C. El aceite no encapsulado (ASU extraíble) se determinó por diferencia entre el peso inicial del frasco sin muestra y el peso final de frasco que contenía el residuo del aceite extraído. El total de ASU microencapsulado se determinó de acuerdo con el método Ross-Gotlieff (Association of Official Analytical Chemists [AOAC], 1995). La EME se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$EME = \frac{(ASU_t - ASU_e)}{(ASU_t)} \times 100 \quad (3)$$

et al. (2012). The microcapsules were observed under a scanning electron microscope (JSM-6390/LGS, JEOL, Japan) operated at 10 kV, for which a carbon adhesive tape was placed on the brass sample holder. The samples of the microcapsules were fixed on the sample holder with the aid of a brush and metallized with a thin layer of gold/palladium (80/20) with a metal ionizer (JEOL Fine Coat JFC/1100, JEOL, Japan). The samples were observed under the microscope with magnifications of 500, 2700, 3000 and 5000 x.

Statistical analysis

The data obtained were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison test ($P \leq 0.05$) in the Statgraphics plus 5.1 statistical program (Statistical Graphics, Manugistics, USA). The results were expressed as the mean \pm standard deviation.

Results and discussion

Composition of grape seed oil

The fatty acid composition in the GSO was obtained from the peak area of the chromatograms. The oil used consists of 17 fatty acids, of which the most abundant were: linoleic acid (C18:2), oleic acid (C18:1), palmitic acid (C16:0) and stearic acid (C18:0), with 72.3, 14.6, 7.4 and 4.5 %, respectively; the rest had concentrations lower than 2.2 %. The values obtained are very similar to those reported by Bail, Stuebiger, Krist, Unterweger, and Buchbauer (2008) and Coelho et al. (2018).

Esterification degree of hawthorn pectin

The EG of HP55 and HP100 was 70.25 ± 0.90 and 61.01 ± 0.19 %, respectively, indicating that more than 50 % of the pectin carboxyl groups were esterified; therefore, the HP of both accessions was classified as high methoxyl pectin. These results are relevant because pectins with different degrees of methoxylation can be obtained from hawthorn, possibly providing them with different functionality. There are reports in which it is stated that the carboxylic groups of the galacturonic acid chain of pectins can be more or less esterified with methoxyl groups depending on the botanical origin, the location of the pectin (cell wall or middle lamella), the climate and the type of extraction process (Fissore, Rojas, & Gerschenson, 2012; Joye & Luzio, 2000).

Viscosity of grape seed oil emulsions

The apparent viscosity versus shear rate curves of the emulsions (Figure 1) indicated that all emulsions exhibited a similar viscous response, which was associated with a typical pseudoplastic shear-thinning behavior, characteristic of flocculated emulsions and polymeric fluids (Rodea-González et

donde ASU_i es el contenido total de aceite y ASU_e es el contenido de aceite superficial extraíble.

Distribución del tamaño de partícula

Para determinar el diámetro medio de las microcápsulas, estas se rehidrataron en agua hasta obtener emulsiones reconstituidas (ERE), con un contenido de sólidos totales similar a las emulsiones. La solución se agitó magnéticamente durante 180 min a 70 °C; posteriormente, las ERE se dejaron reposar a temperatura ambiente (20 °C) y se determinó la distribución de tamaño de partícula de la misma manera que con las emulsiones.

Microscopia electrónica de barrido

La morfología de las microcápsulas se determinó a partir del método propuesto por Guadarrama-Lezama et al. (2012). Las microcápsulas se observaron en un microscopio electrónico de barrido (JSM-6390/LGS, JEOL, Japón) operado a 10 kV, para ello se colocó una cinta adhesiva de carbón sobre el portamuestras de latón. Las muestras de las microcápsulas se fijaron sobre el portamuestras con ayuda de un pincel y se metalizaron con una delgada capa de oro/paladio (80/20) con un ionizador de metales (JEOL Fine Coat JFC/1100, JEOL, Japón). Las muestras se observaron en el microscopio con magnificaciones de 500, 2700, 3000 y 5000 x.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA) y a una prueba de comparación de medias de Fisher ($P \leq 0.05$) en el programa estadístico Statgraphics plus 5.1 (Statistical Graphics, Manugistics, EUA). Los resultados se presentaron como la media \pm desviación estándar.

Resultados y discusión

Composición del aceite de semillas de uva

La composición de ácidos grasos en el ASU se obtuvo a partir del área de los picos de los cromatogramas. El aceite utilizado está constituido por 17 ácidos grasos, de los cuales, los más abundantes fueron: ácido linoleico (C18:2), ácido oleico (C18:1), ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0), con 72.3, 14.6, 7.4 y 4.5 %, respectivamente; el resto tuvo concentraciones menores de 2.2 %. Los valores obtenidos son muy similares a los reportados por Bail, Stuebiger, Krist, Unterweger, y Buchbauer (2008) y Coelho et al. (2018).

Grado de esterificación de la pectina de tejocote

El GE de PT55 y PT100 fue de 70.25 ± 0.90 y 61.01 ± 0.19 %, respectivamente, lo que indicó que más de

al., 2012). The application of shear forces modifies the macromolecular organization and the rupture of structural units by the action of hydrodynamic forces (Rao, 2007). The curves show a Newtonian behavior at a low shear rate, in which there are ruptures and formation of bonds within the network in a balanced manner, so that there is no net change in molecular organization, and the apparent viscosity remains constant. At high shear rates, bond rupture predominates over the formation of new structures, as molecules align in the direction of flow and apparent viscosity decreases with increasing shear rates (Sittikijyothin, Torres, & Gonçalves, 2005).

As expected, emulsions with higher TS content (40 %) had higher viscosity values across the shear rate range than those containing 30 %. The $E_{WPC-HP55,3:1}$ treatment had the highest apparent viscosity, while the rest had viscosities in the following order: $E_{WPC-HP100,3:1} > E_{WPC-CP,3:1} > E_{WPC-HP55,2:1} > E_{WPC-HP100,2:1} > E_{WPC-CP,2:1}$. These results are similar to those reported by Rodríguez-Huezo et al. (2004) in multiple emulsions, where the higher the solids content, the greater the apparent viscosities, regardless of the biopolymer mixture used.

50 % de los grupos carboxilo de la pectina estuvieron esterificados; por lo tanto, la PT de ambas accesiones se clasificó como pectina de alto metoxilo. Estos resultados son relevantes debido a que a partir del tejocote se pueden obtener pectinas con grados de metoxilación diferentes, lo que posiblemente les proporcione una funcionalidad diferente. Existen reportes en los que se menciona que los grupos carboxílicos de la cadena de ácido galacturónico de las pectinas pueden estar más o menos esterificadas con grupos metoxilo dependiendo del origen botánico, la localización de la pectina (pared celular o lamela media), el clima y el tipo de proceso de extracción (Fissore, Rojas, & Gerschenson, 2012; Joye & Luzio, 2000).

Viscosidad de las emulsiones de aceite de semillas de uva

Las curvas de viscosidad aparente contra la tasa de corte de las emulsiones (Figura 1) indicaron que todas las emulsiones exhibieron una respuesta viscosa similar, la cual estuvo asociada con un comportamiento pseudoplástico típico con adelgazamiento al corte, característico de las emulsiones floculadas y fluidos

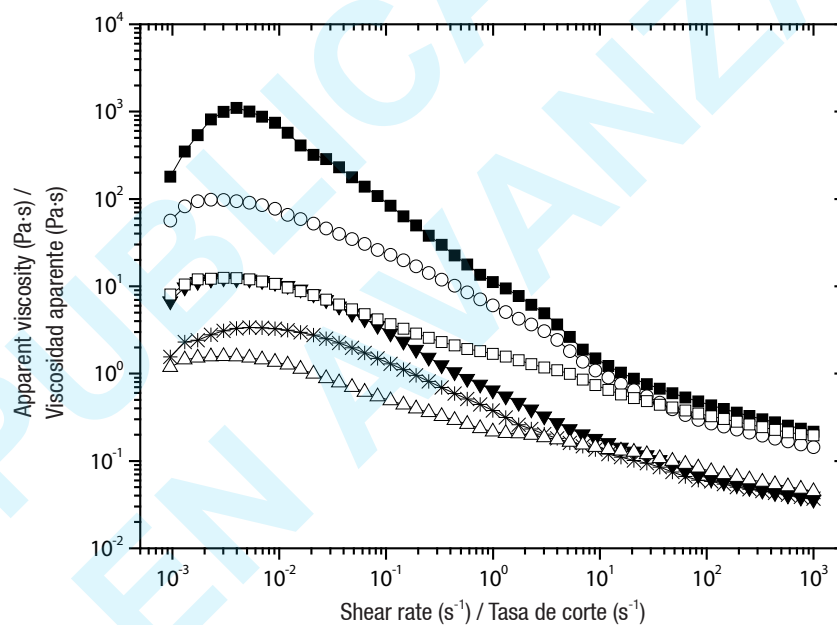


Figure 1. Apparent viscosity against the shear rate of grape seed oil emulsions (30 and 40 % total solids), prior to spray drying: $E_{WPC-CP,3:1}$ (\square); $E_{WPC-HP55,3:1}$ (\blacksquare); $E_{WPC-HP100,3:1}$ (\circ); $E_{WPC-CP,2:1}$ (Δ); $E_{WPC-HP55,2:1}$ (\blacktriangledown); $E_{WPC-HP100,2:1}$ (*). E = emulsion; WPC = whey protein concentrate; CP = citrus pectin; HP55 = hawthorn pectin from accession 55; HP100 = hawthorn pectin from accession 100; 3:1 = ratio of total biopolymers:oil (w/w); 2:1 = ratio of total biopolymers:oil (w/w).

Figura 1. Viscosidad aparente contra la tasa de corte de emulsiones de aceite de semilla de uva (30 y 40 % de sólidos totales), previo al secado por aspersión: $E_{WPC-PC,3:1}$ (\square); $E_{WPC-PT55,3:1}$ (\blacksquare); $E_{WPC-PT100,3:1}$ (\circ); $E_{WPC-PC,2:1}$ (Δ); $E_{WPC-PT55,2:1}$ (\blacktriangledown); $E_{WPC-PT100,2:1}$ (*). E = emulsión; WPC = concentrado de proteína de lactosuero; PC = pectina cítrica; PT55 = pectina de tejocote de la accesión 55; PT100 = pectina de tejocote de la accesión 100; 3:1 = relación de biopolímeros totales:aceite (p/p); 2:1 = relación de biopolímeros totales:aceite (p/p).

The variation of apparent viscosity against the emulsion shear rate can be predicted by the Carreau model (Equation 4), which has been used for fitting gel flow curves. The original model contains four parameters: η_0 , η_∞ , λ and N (Sittikijyothin et al., 2005).

$$\eta = \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{(1 + ((\lambda\dot{\gamma}))^2)^N} + \eta_\infty \quad (4)$$

where η_∞ is the viscosity at high shear rates (Pa·s), η_0 is the initial viscosity at zero shear rate (Pa·s), λ is a time constant related to the relaxation time (s), $\dot{\gamma}$ is the shear rate (Pa) and N is the flow behavior index (dimensionless) (Rao, 2007). Because Newtonian viscosity at high shear rates was not reached in the experiments, Equation 4 was simplified to three parameters, this considering that $\eta_0 - \eta_\infty \approx \eta_0$ and that $\eta - \eta_\infty \approx \eta$, which has been considered by several authors (Dolz, Hernández, Delegido, Alfaro, & Muñóz, 2007; Sittikijyothin et al., 2005). Considering the above, the final expression used was:

$$\eta = \frac{\eta_0}{(1 + ((\lambda\dot{\gamma}))^2)^N} \quad (5)$$

The emulsions showed significant differences in the parameter values of the modified Carreau model (Table 2). These results indicate that the amount of total solids in the emulsions caused the formation of different structural arrangements related to the macromolecules and the dispersed phase. Relaxation times (λ) are directly related to the rupture and recovery time of the system links. The $E_{WPC-CP,2,1}$ treatment was the one with the significantly ($P < 0.05$) lower λ value, and $E_{WPC-HP5,3,1}$ had the highest λ value. By decreasing λ , the emulsion requires less time and less energy for the flocs to be disintegrated (breakdown of interactions) or smaller flocs to form. As the shear rate increases, the droplets become deformed and the interactions between them are lost. Logaraj, Bhattacharya, Udaya-Sankar, and Venkateswaran (2008) established that the action of the shear rate during the measurement of the rheological properties mainly affects the weak forces or weak interparticle interactions (hydrogen bridges and van der Waals forces), which allows a continuous deformation, where the viscosity decreases progressively.

Parameter N is a dimensionless exponent that is related to the flow behavior index and reflects how close the emulsions come to a Newtonian behavior. If $N=1$ the system behaves as a Newtonian fluid, $N < 1$ the fluid presents a shear-thinning behavior and $N > 1$ the fluid shows a shear-thickening behavior (Erçelebi & Ibanoglu, 2009; Rao, 2007). In this case, all emulsions had N values lower than 1; that is, they presented a pseudoplastic shear-thinning behavior, which can be considered as the result of structural modifications in the macromolecular network. This means that

poliméricos (Rodea-González et al., 2012). La aplicación de esfuerzos cortantes modifica la organización macromolecular y la ruptura de unidades estructurales por la acción de fuerzas hidrodinámicas (Rao, 2007). Las curvas presentan un comportamiento Newtoniano a una tasa de corte baja, en la cual existen rupturas y formación de enlaces dentro de la red de manera balanceada, por lo que no ocurre un cambio neto en la organización molecular y la viscosidad aparente permanece constante. En tasas de corte altas, la ruptura de enlaces predomina sobre la formación de nuevas estructuras, ya que las moléculas se alinean en dirección al flujo y la viscosidad aparente disminuye al aumentar la tasa de corte (Sittikijyothin, Torres, & Gonçalves, 2005).

Como se esperaba, las emulsiones con mayor contenido de ST (40 %) presentaron valores de viscosidad más elevados en todo el rango de tasas de corte que aquellas que contenían 30 %. El tratamiento $E_{WPC-PT55,3,1}$ fue el que presentó la viscosidad aparente más alta, mientras que el resto presentó viscosidades en el siguiente orden: $E_{WPC-PT100,3,1} > E_{WPC-PC,3,1} > E_{WPC-PT55,2,1} > E_{WPC-PT100,2,1} > E_{WPC-PC,2,1}$. Estos resultados son similares a los reportados por Rodríguez-Huezo et al. (2004) en emulsiones múltiples, donde a mayor contenido de sólidos exhibieron mayores viscosidades aparentes, independientemente de la mezcla de biopolímeros usada.

La variación de la viscosidad aparente contra la tasa de corte de emulsiones puede ser predicha mediante el modelo de Carreau (Ecuación 4), el cual ha sido utilizado para el ajuste de curvas de flujo de geles. El modelo original contiene cuatro parámetros: η_0 , η_∞ , λ y N (Sittikijyothin et al., 2005).

$$\eta = \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{(1 + ((\lambda\dot{\gamma}))^2)^N} + \eta_\infty \quad (4)$$

donde η_∞ es la viscosidad a tasas de corte altas (Pa·s), η_0 es la viscosidad inicial a tasa de corte cero (Pa·s), λ es una constante de tiempo relacionada con el tiempo de relajación (s), $\dot{\gamma}$ es la tasa de corte (Pa) y N es el índice de comportamiento de flujo (adimensional) (Rao, 2007). Debido a que la viscosidad Newtoniana a tasas de corte altas no fue alcanzada en los experimentos, la Ecuación 4 se simplificó a tres parámetros, esto considerando que $\eta_0 - \eta_\infty \approx \eta_0$ y que $\eta - \eta_\infty \approx \eta$, lo cual ha sido considerado por varios autores (Dolz, Hernández, Delegido, Alfaro, & Muñóz, 2007; Sittikijyothin et al., 2005). Considerando lo anterior, la expresión final utilizada fue:

$$\eta = \frac{\eta_0}{(1 + ((\lambda\dot{\gamma}))^2)^N} \quad (5)$$

Las emulsiones presentaron diferencias significativas en los valores de los parámetros del modelo modificado

Table 2. Parameter values of the modified Carreau model of emulsions after storage at 20 °C for 1 day.
Cuadro 2. Valores de los parámetros del modelo modificado de Carreau de las emulsiones después de almacenadas a 20 °C por 1 día.

Emulsion code/ Código de la emulsión	λ^1 (s)	η_0 (Pa·s)	N (dimensionless)/ N (adimensional)
$E_{WPC-CP,2:1}/E_{WPC-PC,2:1}$	14.54 ± 0.22 e ^z	1.55 ± 0.32 e	0.15 ± 0.02 e
$E_{WPC-CP,3:1}/E_{WPC-PC,3:1}$	93.35 ± 0.61 c	10.44 ± 0.21 c	0.17 ± 0.02 e
$E_{WPC-HP55,2:1}/E_{WPC-PT55,2:1}$	127.32 ± 2.14 b	10.30 ± 0.71 c	0.26 ± 0.01 c
$E_{WPC-HP55,3:1}/E_{WPC-PT55,3:1}$	145.50 ± 4.41 a	956.53 ± 35.7 a	0.35 ± 0.02 a
$E_{WPC-HP100,2:1}/E_{WPC-PT100,2:1}$	35.68 ± 0.48 d	3.85 ± 0.17 d	0.21 ± 0.01 d
$E_{WPC-HP100,3:1}/E_{WPC-PT100,3:1}$	127.81 ± 2.99 b	102.71 ± 0.52 b	0.30 ± 0.01 b

¹ λ = relaxation times; η_0 = initial viscosity at zero shear; N = flow behavior index. ^zMeans with the same letter within each column do not differ statistically (Fisher, $P \leq 0.05$). Mean values \pm standard deviation.

¹ λ = tiempos de relajación; η_0 = viscosidad inicial a tasa de corte cero; N = índice de comportamiento de flujo. ^zMedias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Fisher, $P \leq 0.05$). Valores medios \pm desviación estándar.

by increasing the shear rate a greater number of intermolecular bonds and interactions are broken, with respect to the formation of new bonds. The applied stress forces the molecules to align in the direction of flow and the apparent viscosity decreases (Sittikijyothin et al., 2005). Similar results were reported by Logaraj et al. (2008) in avocado and watermelon oil emulsions, which behaved as non-Newtonian liquids, as they had shear-thinning characteristics with N values from 0.86 to 0.88 (Gharsallaoui et al., 2010).

Emulsion droplet size and morphology

In the droplet size distribution of the emulsions, two perfectly differentiated groups were detected (Figure 2). The group formed by $E_{WPC-CP,3:1}$, $E_{WPC-HP55,3:1}$ and $E_{WPC-HP100,3:1}$ (all with 40 % TS) exhibited a unimodal distribution, while the second group formed by $E_{WPC-CP,2:1}$, $E_{WPC-HP55,2:1}$ and $E_{WPC-HP100,2:1}$ (with 30 % TS) had a bimodal distribution. The treatments with the largest droplet diameters were $E_{WPC-HP100,2:1}$ and $E_{WPC-HP55,2:1}$, as a result of the aggregation of the oil droplets. The microscopic analysis (Figure 3) indicated that the large diameters result from the presence of large oil droplets generated by flocculation, which increases as the TS and pectin content decreases; in addition, the formation of a simple O/W emulsion was confirmed, composed of small spherical droplets of oil distributed individually in the continuous aqueous phase (Figure 3).

The $E_{WPC-HP100,3:1}$ treatment had the lowest $d_{3,2}$ value (1.45 μm). Small droplet diameter values may be due to a combined effect of the high availability of the emulsifier, as it favors a larger oil droplet surface area to be covered with the protein-pectin complex and therefore generates a strong electrostatic repulsion between drops (Neiryneck, van der Meeren, Lukaszewicz-Lausecker, Verbeken, & Dewettinck, 2007). The type of pectin added affected the $d_{3,2}$ value, this considering that the $E_{WPC-HP55,3:1}$ droplets were larger than the $E_{WPC-HP100,3:1}$

de Carreau (Cuadro 2). Estos resultados indican que la cantidad de sólidos totales en las emulsiones provocó la formación de distintos arreglos estructurales relacionados con las macromoléculas y la fase dispersa. Los tiempos de relajación (λ) están relacionados directamente con la ruptura y el tiempo de recuperación de los enlaces del sistema. El tratamiento $E_{WPC-PC,2:1}$ fue el que presentó el valor de λ significativamente ($P < 0.05$) más bajo, y $E_{WPC-PT55,3:1}$ tuvo el valor de λ más alto. Al disminuir λ , la emulsión requiere menor tiempo y menor energía para que los flóculos sean disgregados (rompimiento de interacciones) o se formen flóculos más pequeños. Conforme aumenta la tasa corte, las gotas se van deformando y se van perdiendo las interacciones que hay entre gota y gota. Logaraj, Bhattacharya, Udaya-Sankar, y Venkateswaran (2008) establecieron que la acción de la tasa de corte durante la medición de las propiedades reológicas afecta principalmente las fuerzas débiles o interacciones débiles interpartículas (puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals), lo que permite una deformación continua, donde la viscosidad disminuye de manera progresiva.

El parámetro N es un exponente adimensional que está relacionado con el índice de comportamiento de flujo y refleja qué tanto se acercan las emulsiones a un comportamiento newtoniano. Si $N = 1$ el sistema se comporta como fluido newtoniano, $N < 1$ el fluido presenta un comportamiento de adelgazamiento al corte y $N > 1$ el fluido presenta un comportamiento de espesamiento al corte (Erçelebi & Ibanoglu, 2009; Rao, 2007). En este caso, todas las emulsiones presentaron valores de N menores de 1; es decir, presentaron un comportamiento pseudoplástico de adelgazamiento al corte, el cual puede ser considerado como el resultado de modificaciones estructurales en la red macromolecular. Esto significa que al incrementar la tasa de corte se rompe un mayor número de enlaces e interacciones intermoleculares, con respecto a la formación de nuevos enlaces. El esfuerzo aplicado

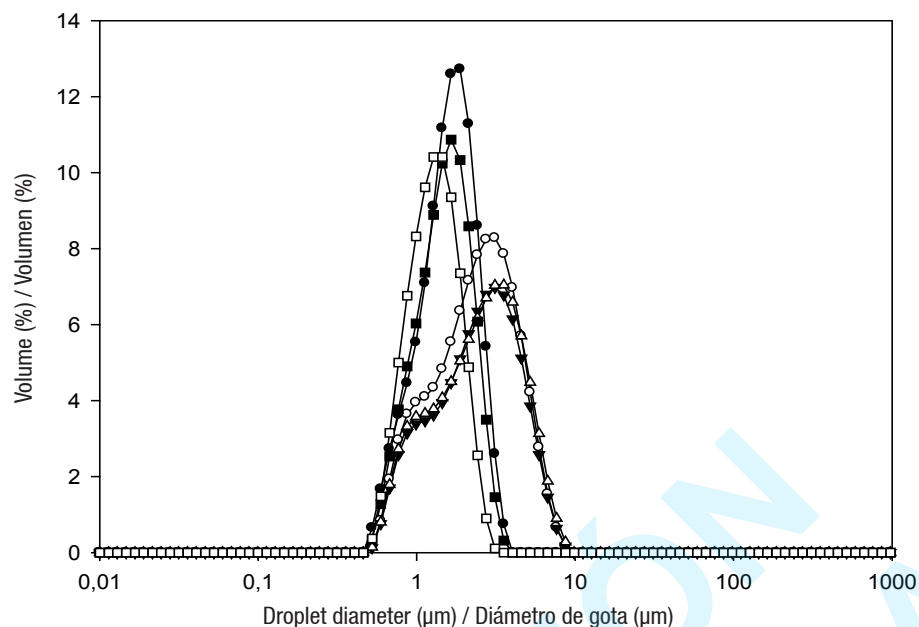


Figure 2. Droplet size distribution of grape seed oil emulsions (30 and 40% total solids) prior to spray drying: $E_{WPC-CP,3:1}$ (●); $E_{WPC-HP55,3:1}$ (■); $E_{WPC-HP100,3:1}$ (□); $E_{WPC-CP,2:1}$ (○); $E_{WPC-HP55,2:1}$ (Δ); $E_{WPC-HP100,2:1}$ (▼). E = emulsion; WPC = whey protein concentrate; CP = citrus pectin; HP55 = hawthorn pectin from accession 55; HP100 = hawthorn pectin from accession 100; 3:1 = ratio of total biopolymers:oil (w/w); 2:1 = ratio of total biopolymers:oil (w/w).

Figura 2. Distribución del tamaño de gota de emulsiones de aceite de semilla de uva (30 y 40 % de sólidos totales) previo al secado por aspersión: $E_{WPC-PC,3:1}$ (●); $E_{WPC-PT55,3:1}$ (■); $E_{WPC-PT100,3:1}$ (□); $E_{WPC-PC,2:1}$ (○); $E_{WPC-PT55,2:1}$ (Δ); $E_{WPC-PT100,2:1}$ (▼). E = emulsión; WPC = concentrado de proteína de lactosuero; PC = pectina cítrica; PT55 = pectina de tejocote de la accesión 55; PT100 = pectina de tejocote de la accesión 100; 3:1 = relación de biopolímeros totales:aceite (p/p); 2:1 = relación de biopolímeros totales:aceite (p/p).

ones. This could be related to the fact that HP55 had a higher ED (70.25 %) than HP100 (61.01 %), since the latter contains a higher number of -COOH groups in its chain and generates a higher number of interactions with the protein, which favors that a higher amount of emulsifier is present on the surface of the oil droplets.

The results also indicated that the viscosity of the emulsion had an effect on droplet diameter. The $E_{WPC-CP,2:1}$ treatment had the largest droplet size, lowest viscosity and lowest TS content. The droplet size of the emulsion depends on the concentration of biopolymers in the aqueous phase, since the higher the concentration of biopolymer mixtures, the higher the viscosity and the smaller the size of the droplets (Rodríguez-Huezo et al., 2004). Carneiro, Tonon, Grosso, and Hubinger (2013) reported the same behavior in the droplet size of their emulsions, indicating that the higher the viscosity, the greater the resistance of the droplets to movement, which avoids coalescence and results in smaller droplets. Generally, reducing the droplet size of the emulsion represents an increase in stability and retention of active material. Gharsallaoui et al. (2010) found that oil droplets covered by protein-pectin complexes showed better emulsion stability than those covered only with protein; this stabilizing effect of pectin could be attributed to steric repulsion.

obliga a que las moléculas se alineen en dirección al flujo y la viscosidad aparente disminuye (Sittikijyothin et al., 2005). Resultados similares fueron reportados por Logaraj et al. (2008) en emulsiones de aceite de aguacate y sandía, las cuales se comportaron como líquidos no newtonianos, ya que tuvieron características de adelgazamiento al corte con valores de N de 0.86 a 0.88 (Gharsallaoui et al., 2010).

Tamaño y morfología de gotas de las emulsiones

En la distribución del tamaño de gotas de las emulsiones se detectaron dos grupos perfectamente diferenciados (Figura 2). El grupo formado por $E_{WPC-PC,3:1}$, $E_{WPC-PT55,3:1}$ y $E_{WPC-PT100,3:1}$ (todas con 40 % de ST) presentó una distribución unimodal, mientras que el segundo grupo formado por $E_{WPC-PC,2:1}$, $E_{WPC-PT55,2:1}$ y $E_{WPC-PT100,2:1}$ (con 30 % de ST) tuvo una distribución bimodal. Los tratamientos que presentaron los diámetros de gota más grandes fueron $E_{WPC-PT100,2:1}$ y $E_{WPC-PT55,2:1}$, como resultado de la agregación de las gotas de aceite. El análisis microscópico (Figura 3) indicó que los diámetros grandes son resultado de la presencia de grandes gotas de aceite generadas por la floculación, la cual incrementa al disminuir el contenido de ST y pectina; además, se confirmó la formación de una emulsión simple O/W, compuesta por pequeñas gotas esféricas

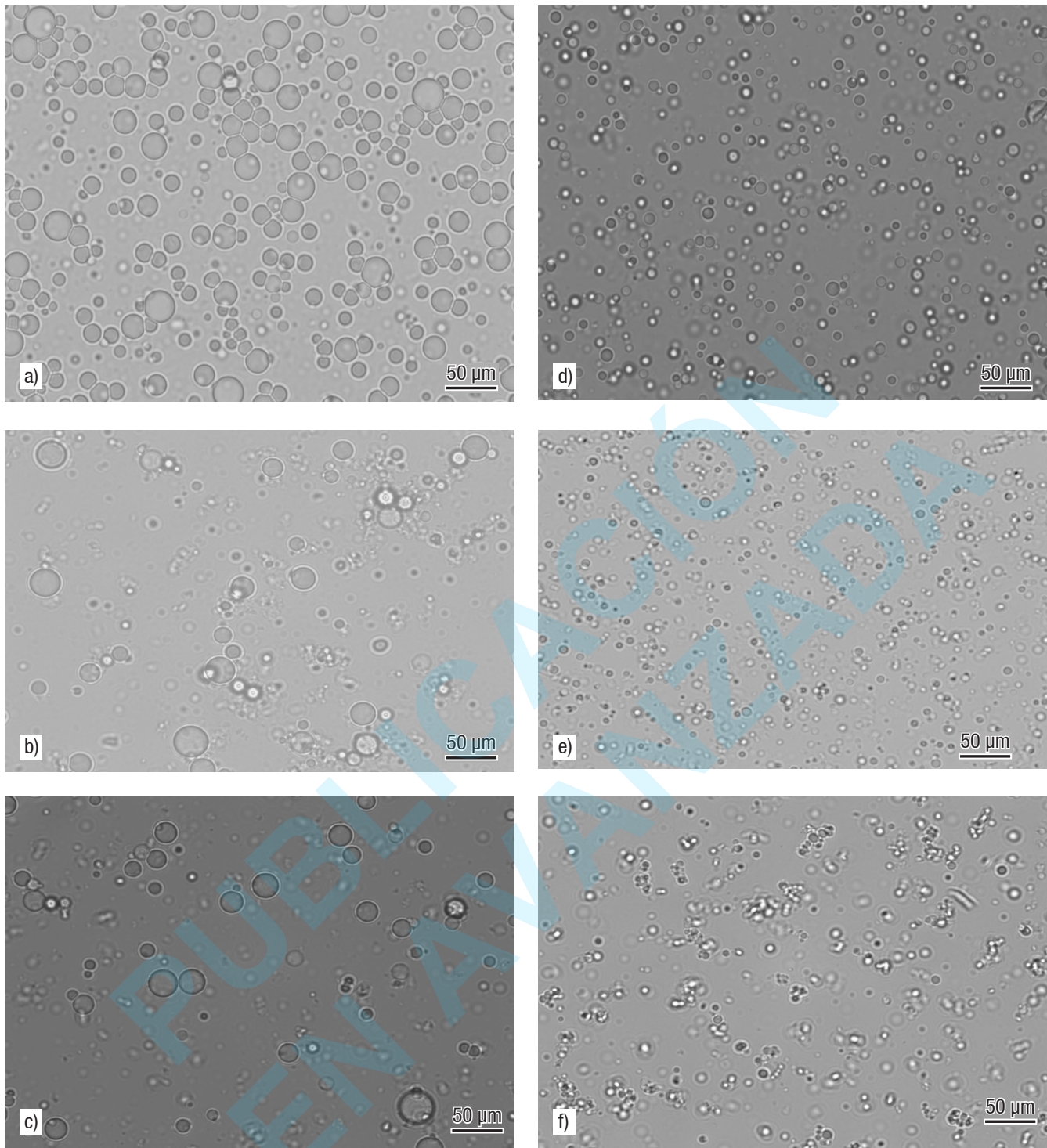


Figure 3. Optical micrographs of oil-in-water emulsions after 1 day of storage: a) $E_{WPC-CP,2:1}$, b) $E_{WPC-HP55,2:1}$, c) $E_{WPC-HP100,2:1}$, d) $E_{WPC-CP,3:1}$, e) $E_{WPC-HP55,3:1}$ and f) $E_{WPC-HP100,3:1}$. E = emulsion; WPC = whey protein concentrate; CP = citrus pectin; HP55 = hawthorn pectin from accession 55; HP100 = hawthorn pectin from accession 100; 3:1 = ratio of total biopolymers:oil (w/w); 2:1 = ratio of total biopolymers:oil (w/w).

Figura 3. Micrografías ópticas de emulsiones aceite-en-agua después de 1 día de almacenamiento: a) $E_{WPC-PC,2:1}$, b) $E_{WPC-PT55,2:1}$, c) $E_{WPC-PT100,2:1}$, d) $E_{WPC-PC,3:1}$, e) $E_{WPC-PT55,3:1}$ y f) $E_{WPC-PT100,3:1}$. E = emulsión; WPC = concentrado de proteína de lactosuero; PC = pectina cítrica; PT55 = pectina de tejocote de la accesión 55; PT100 = pectina de tejocote de la accesión 100; 3:1 = relación de biopolímeros totales:aceite (p/p); 2:1 = relación de biopolímeros totales:aceite (p/p).

Encapsulation efficiency

The main requirement for a wall material in microencapsulation is that it has a good ability to retain and seal the core material during processing and storage (Jiménez, García, & Beristain, 2006). The microcapsules had a MEE of 64.97 to 71.29 % and, according to Table 3, the MEE of the GSO was significantly ($P < 0.05$) influenced by the type of pectin used and the amount of TS (30 to 40 %), with the best being those made with CP and with HP100, both with high solids content. In other words, emulsions with higher TS content, higher viscosity values and smaller droplet diameters presented the highest MEE. Likewise, it was observed that the most stable emulsion was the one that had the highest MEE, which coincides with what was reported by Carneiro et al. (2013). These authors also note that MEE may be related to droplet sizes and emulsion viscosities, which depends on the botanical origin of the pectin used as wall material.

Rodea-González et al. (2012) reported similar MEE values for chia essential oil with WPC-polysaccharide matrices. On the other hand, Lim, Tan, Bakar, and Ng (2011) obtained an efficiency of 77.61 to 85.3 % using different wall materials to microencapsulate pitaya seed (*Hylocereus polyrhizus*) oil. Considering both works, it can be said that the values obtained for GSO are within the reported range. Tonon et al. (2011) indicate that treatments with higher solids content showed higher MEE, which were associated with higher emulsion viscosities and smaller droplet size.

Micromorphology of microcapsules

Figure 4 shows the SEM micrographs of the powders produced with different combinations of wall material. All microcapsules showed a similar external topography, characterized by rounded shapes and a continuous wall

de aceite distribuidas individualmente en la fase acuosa continua (Figura 3).

El tratamiento $E_{WPC-PT100,3:1}$ presentó el menor valor de $d_{3,2}$ (1.45 μm). Los valores pequeños del diámetro de las gotas pueden deberse a un efecto combinado de la alta disponibilidad del emulsificante, ya que favorece que una mayor superficie de las gotas de aceite se cubra con el complejo proteína-pectina y, por lo tanto, se genera una repulsión electrostática fuerte entre gotas (Neirynek, van der Meeren, Lukaszewicz-Lausecker, Verbeke, & Dewettinck, 2007). El tipo de pectina adicionada afectó el valor del $d_{3,2}$, esto considerando que las gotas de $E_{WPC-PT55,3:1}$ fueron más grandes que las de $E_{WPC-PT100,3:1}$. Lo anterior pudiera estar relacionado con que la PT55 presentó un GE mayor (70.25 %) que la PT100 (61.01 %), esto debido a que la segunda contiene una mayor cantidad de grupos -COOH en su cadena y genera una mayor cantidad de interacciones con la proteína, lo cual favorece que una mayor cantidad de emulsificante esté presente en la superficie de las gotas de aceite.

Los resultados también indicaron que la viscosidad de la emulsión tuvo un efecto en el diámetro de las gotas. La $E_{WPC-PC,2:1}$ fue la que presentó el mayor tamaño de gota, menor viscosidad y menor contenido de ST. El tamaño de gota de la emulsión depende de la concentración de biopolímeros en la fase acuosa, a mayor concentración de mezclas de biopolímeros incrementa su viscosidad y el tamaño de gota tiende a ser más pequeño (Rodríguez-Huezo et al., 2004). Carneiro, Tonon, Grosso, y Hubinger (2013) reportaron el mismo comportamiento en el tamaño de gota de sus emulsiones, indicando que a mayor viscosidad mayor resistencia de las gotas al movimiento, lo que evita la coalescencia y resulta en gotas de menor tamaño. Generalmente, la reducción del tamaño de gota de la emulsión representa un incremento en la estabilidad y en la retención de material activo. Gharsallaoui et

Table 3. Mean surface diameter and microencapsulation efficiency of reconstituted grape seed oil microcapsules. Cuadro 3. Diámetro superficial medio y eficiencia de microencapsulación de microcápsulas de aceite de semilla de uva reconstituidas.

Microcapsules / Microcápsulas	$d_{3,2}$ (μm)	MEE (%) / EME (%)
${}^1M_{WPC-CP\ 2:1} / {}^1M_{WPC-PC\ 2:1}$	$1.84 \pm 0.01\ b^z$	$66.84 \pm 0.98\ c$
$M_{WPC-CP\ 3:1} / M_{WPC-PC\ 3:1}$	$2.23 \pm 0.01\ d$	$70.33 \pm 1.09\ ab$
$M_{WPC-HP55\ 2:1} / M_{WPC-PT55\ 2:1}$	$2.59 \pm 0.01\ e$	$64.97 \pm 0.80\ c$
$M_{WPC-HP55\ 3:1} / M_{WPC-PT55\ 3:1}$	$1.60 \pm 0.01\ a$	$69.13 \pm 0.91\ b$
$M_{WPC-HP100\ 2:1} / M_{WPC-PT100\ 2:1}$	$2.08 \pm 0.02\ c$	$65.92 \pm 0.97\ c$
$M_{WPC-HP100\ 3:1} / M_{WPC-PT100\ 3:1}$	$1.86 \pm 0.01\ b$	$71.29 \pm 0.14\ a$

¹M = microcapsule; $d_{3,2}$ = mean surface diameter; MEE = microencapsulation efficiency; WPC = whey protein concentrate; CP = citrus pectin; HP55 = hawthorn pectin from accession 55; HP100 = hawthorn pectin from accession 100; 3:1 = ratio of total biopolymers:oil (w/w); 2:1 = ratio of total biopolymers:oil (w/w). ^zMeans with the same letter within each column do not differ statistically (Fisher, $P \leq 0.05$). Mean values \pm standard deviation.

¹M = microcápsula; $d_{3,2}$ = diámetro superficial medio; EME = eficiencia de microencapsulación; WPC = concentrado de proteína de lactosuero; PC = pectina cítrica; PT55 = pectina de tejocote de la accesión 55; PT100 = pectina de tejocote de la accesión 100; 3:1 = relación de biopolímeros totales:aceite (p/p); 2:1 = relación de biopolímeros totales:aceite (p/p). ^zMedias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Fisher, $P \leq 0.05$). Valores medios \pm desviación estándar.

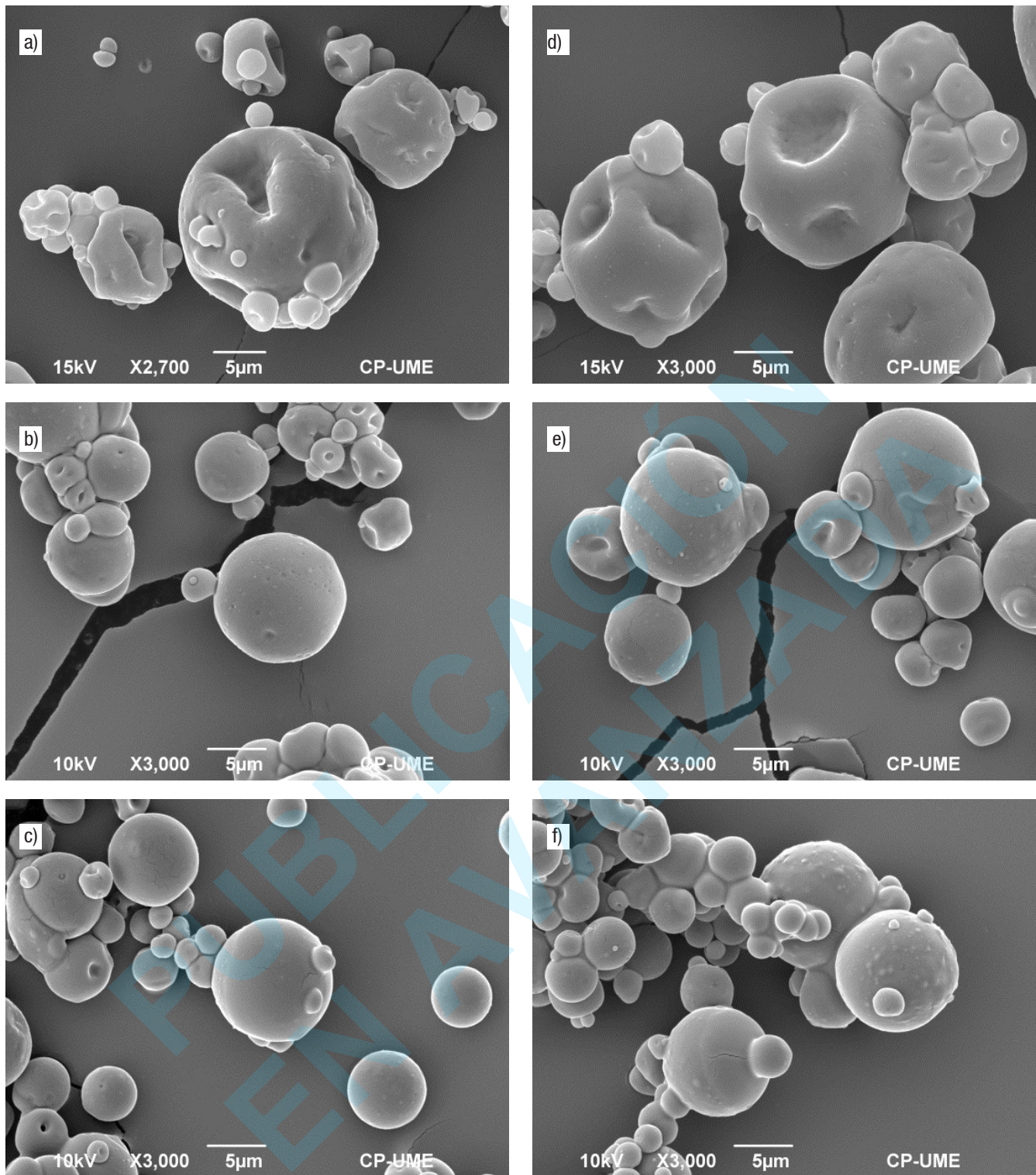


Figure 4. Micrographs of grape seed oil microcapsules: a) $M_{WPC-CP,2:1}$, b) $M_{WPC-HP55,2:1}$, c) $M_{WPC-HP100,2:1}$, d) $M_{WPC-CP,3:1}$, e) $M_{WPC-HP55,3:1}$ and f) $M_{WPC-HP100,3:1}$. M = microcapsule; WPC = whey protein concentrate; CP = citrus pectin; HP55 = hawthorn pectin from accession 55; HP100 = hawthorn pectin from accession 100; 3:1 = ratio of total biopolymers:oil (w/w); 2:1 = ratio of total biopolymers:oil (w/w).

Figura 4. Micrografías de las microcápsulas de aceite de semilla de uva: a) $M_{WPC-PC,2:1}$, b) $M_{WPC-PT55,2:1}$, c) $M_{WPC-PT100,2:1}$, d) $M_{WPC-PC,3:1}$, e) $M_{WPC-PT55,3:1}$ y f) $M_{WPC-PT100,3:1}$. M = microcápsula; WPC = concentrado de proteína de lactosuero; PC = pectina cítrica; PT55 = pectina de tejocote de la accesión 55; PT100 = pectina de tejocote de la accesión 100; 3:1 = relación de biopolímeros totales:aceite (p/p); 2:1 = relación de biopolímeros totales:aceite (p/p).

with no apparent cracks or fissures on the outer surface, providing lower gas permeability and better protection and retention of the GSO. In addition, shriveled areas, with depressions or hollows, can be seen on the outer surface, a typical characteristic of particles produced by spray drying (Carneiro et al., 2013). The presence of voids is common in drying processes, and is related to the formation of vacuoles within the solid crust of the particle. When the temperature reaches the boiling point of water, the crust expands and traps water vapor and air along with the active material (Tonon et al., 2011). This expansion process is associated with the composition and viscosity of the emulsion fed to the dryer (Gharsallaoui et al., 2010).

Microcapsules made with CP ($M_{WPC-CP,2:1}$ and $M_{WPC-CP,3:1}$) showed larger depressions on the outer surface than those made with HP. On the other hand, microcapsules made with $E_{WPC-HP100,3:1}$ showed smaller depressions because this emulsion had higher apparent viscosity and lower $d_{3,2}$ values. This behavior is similar to that obtained by Rodríguez-Huezo et al. (2004) in carotenoid microencapsulates when using multiple emulsions with different solids contents. Other researchers reported morphological characteristics similar to those obtained by spray drying in this work, also in microcapsules (Favaro-Trindade, Santana, Monterrey-Quintero, Trindale, & Netto, 2010; Loksuan, 2007; Rodea-González et al., 2012).

Conclusions

The use of O/W emulsions with well-functioning wall materials, such as whey protein and pectin from different origins, allows stabilization and protection of bioactive ingredients. The HP-protein interaction allowed the formation of thicker physical barriers, with high MEE and adequate morphology, which can stabilize GSO against oxidation processes. The GSO's MEE was influenced by the TS content and the type of pectin used. The emulsions with hawthorn pectin from accessions 55 and 100, with 40 % TS, had the highest viscosities in the whole shear rate range. The $E_{WPC-HP100,3:1}$ treatment produced microcapsules with the highest MEE (71.29 %) and the smallest emulsion droplet diameter ($d_{3,2} = 1.45 \mu\text{m}$). Generally, a reduction in droplet size is associated with greater stability for possible use in food matrices. The morphology of the capsules was affected by the type of biopolymer and the concentration of the wall materials. Microcapsules with HP100 had spherical particles with smaller dents on the outer surface than those formulated with CP.

Acknowledgments

The authors are deeply grateful to Dr. Hilda Araceli Zavaleta Mancera and biologist Greta Hanako Rosas of

al. (2010) encontraron que las gotas de aceite cubiertas por complejos proteína-pectina presentaron mejor estabilidad de la emulsión que aquellas cubiertas solo con proteína, dicho efecto estabilizante de la pectina pudo ser atribuido a la repulsión estérica.

Eficiencia de encapsulación

El principal requisito de un material de pared en la microencapsulación es que tenga una buena capacidad para retener y sellar el material del centro durante el procesamiento y almacenamiento (Jiménez, García, & Beristain, 2006). Las microcápsulas presentaron una EME de 64.97 a 71.29 % y, de acuerdo con el Cuadro 3, la EME del ASU fue influenciada significativamente ($P < 0.05$) por el tipo de pectina usada y la cantidad de ST (30 a 40 %), siendo las mejores las elaborados con PC y con PT100, ambas con alto contenido de sólidos. Es decir, las emulsiones que tenían mayor contenido de ST, valores de viscosidad mayores y diámetros de gota menores, presentaron la mayor EME. Asimismo, se observó que la emulsión más estable fue la que presentó la EME más alta, lo cual coincide con lo reportado por Carneiro et al. (2013). Estos autores también mencionan que la EME puede estar relacionada con los tamaños de gota y las viscosidades de las emulsiones, lo cual depende del origen botánico de la pectina utilizada como material de pared.

Rodea-González et al. (2012) reportaron valores similares en la EME de aceite esencial de chía con matrices de WPC-polisacárido. Por su parte, Lim, Tan, Bakar, y Ng (2011) obtuvieron una eficiencia de 77.61 a 85.3 % utilizando diferentes materiales de pared para microencapsular aceite de semilla de pitaya (*Hylocereus polyrhizus*). Considerando ambos trabajos, se puede decir que los valores obtenidos para el ASU están dentro de lo reportado. Tonon et al. (2011) señalan que tratamientos con mayor contenido de sólidos mostraron mayor EME, lo cual asociaron con mayor viscosidad de la emulsión y menor tamaño de gota.

Micromorfología de las microcápsulas

La Figura 4 muestra las micrografías de MEB de los polvos producidos con diferentes combinaciones de material de pared. Todas las microcápsulas mostraron una topografía externa similar, caracterizada por formas redondeadas y una pared continua sin grietas ni fisuras aparentes en la superficie externa, lo que proporciona una menor permeabilidad a los gases, y una mejor protección y retención del ASU. Además, se pueden observar superficies arrugadas, con abolladuras o huecos en la superficie externa, característica típica de partículas producidas mediante secado por aspersión (Carneiro et al., 2013). La presencia de huecos es habitual en los procesos de secado, y está relacionada con la formación de vacuolas dentro de la corteza sólida de la partícula.

the Microscopy Unit of the *Colegio de Postgraduados* for their support in obtaining the micrographs.

End of English version

References / Referencias

- Ahn, J. H., Kim, Y. P., Lee, Y. M., Seo, E. M., Lee, K. W., & Kim, H. S. (2008). Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. *Food Chemistry*, 107(1), 98-105. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.07.067
- Assadpour, E., Jafari, S. M., & Maghsoudlou, Y. (2017). Evaluation of folic acid release from spray dried powder particles of pectin-whey protein nano-capsules. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 238-247. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.023
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1995). *Official methods of analysis*. Arlington: Author.
- Bail, S., Stuebiger, G., Krist, S., Unterweger, H., & Buchbauer, G. (2008). Characterization of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 108(3), 1122-1132. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.11.063
- Betancourt-Olvera, M., Nieto-Ángel, R., Urbano, B., & González-Andrés, F. (2017). Analysis of the biodiversity of hawthorn (*Crataegus* spp.) from the morphological, molecular, and ethnobotanical approaches, and implications for genetic resource conservation in scenery of increasing cultivation: the case of Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65(3), 897-916. doi: 10.1007/s10722-017-0583-4
- Bonilla, E., Azuara, E., Beristain, C. I., & Vernon-Carter, E. J. (2010). Predicting suitable storage conditions for spray-dried microcapsules formed with different biopolymer matrices. *Food Hydrocolloids*, 24(6-7), 633-640. doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.02.010
- Carneiro, H. C., Tonon, R. V., Grosso, C. R., & Hubinger, M. D. (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, 15(4), 443-451. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.03.033
- Choi, Y., & Lee, J. (2009). Antioxidant and antiproliferative properties of tocotrienol-rich fraction from grape seeds. *Food Chemistry*, 114(4), 1386-1390. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.018
- Coelho, J. P., Filipe, R. M., Robalo, M. P., & Stateva, R. P. (2018). Recovering value from organic waste materials: Supercritical fluid extraction of oil from industrial grape seeds. *The Journal of Supercritical Fluids*, 141, 68-77. doi: 10.1016/j.supflu.2017.12.008
- Cuevas-Bernardino, J. C., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., Álvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2016). Physicochemical characterization of hawthorn pectins and their performing in stabilizing oil-in-water emulsions. *Reactive and Functional Polymers*, 103, 63-71. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2016.03.024

Cuando la temperatura alcanza el punto de ebullición del agua, la corteza se expande y atrapa vapor de agua y aire junto con el material activo (Tonon et al., 2011). Este proceso de expansión está asociado con la composición y la viscosidad de la emulsión alimentada al secador (Gharsallaoui et al., 2010).

Las microcápsulas elaboradas con PC ($M_{WPC-PC,2:1}$ y $M_{WPC-PC,3:1}$) mostraron abolladuras más grandes en la superficie externa que las elaboradas con PT. Por su parte, las microcápsulas elaboradas con la $E_{WPC-PT100,3:1}$ presentaron abolladuras más pequeñas debido a que esta emulsión presentó mayores valores de viscosidad aparente y $d_{3,2}$ menores. Este comportamiento es similar al obtenido por Rodríguez-Huezo et al. (2004) en microencapsulados de carotenoides al utilizar emulsiones múltiples con diferentes contenidos de sólidos. Otros investigadores reportaron características morfológicas similares a las obtenidas mediante secado por aspersión en este trabajo, también en microcápsulas (Favaro-Trindade, Santana, Monterrey-Quintero, Trindale, & Netto, 2010; Lokuwan, 2007; Rodea-González et al., 2012).

Conclusiones

El uso de emulsiones O/W con materiales de pared de adecuada funcionalidad, como la proteína de suero lácteo y la pectina de diferentes orígenes, permite estabilizar y proteger ingredientes bioactivos. La interacción PT-proteína permitió formar barreras físicas más gruesas, con alta EME y adecuada morfología, las cuales pueden estabilizar el ASU contra los procesos de oxidación. La EME del ASU estuvo influenciada por el contenido de ST y el tipo de pectina utilizado. Las emulsiones con pectina de tejocote de las accesiones 55 y 100, con 40 % de ST, tuvieron las viscosidades más altas en todo el rango de tasa de corte. La $E_{WPC-PT100,3:1}$ produjo microcápsulas con la EME más alta (71.29 %) y el menor diámetro de gota de emulsión ($d_{3,2} = 1.45 \mu\text{m}$). Generalmente, una reducción en el tamaño de las gotas está asociada con una mayor estabilidad para su posible uso en matrices alimentarias. La morfología de las cápsulas fue afectada por el tipo de biopolímero y la concentración de los materiales de pared. Las microcápsulas con PT100 presentaron partículas esféricas con abolladuras más pequeñas en la superficie externa que aquellas formuladas con PC.

Agradecimientos

Los autores agradecen profundamente a la Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera y a la Bióloga Greta Hanako Rosas de la Unidad de Microscopía del Colegio de Postgraduados por su apoyo en la obtención de las micrografías.

Fin de la versión en español

- Davidov-Pardo, G., & McClements, D. J. (2015). Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Food Chemistry*, 167, 205-212. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.082
- De Haro, J. C., Izarra, I., Rodríguez, J. F., Pérez, A., & Carmona, M. (2016). Modelling the epoxidation reaction of grape seed oil by peracetic acid. *Journal of Cleaner Production*, 138, 70-76. doi: 10.1016/j.jclepro.2016.05.015
- Dolz, M., Hernández, M. J., Delegido, J., Alfaro, M. C., & Muñoz, J. (2007). Influence of xanthan gum and locust bean gum upon flow and thixotropic behavior of food emulsions containing modified starch. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 179-176. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2006.10.020
- Edwards, J. E., Brown, P. N., Talent, N., Dickinson, T. A., & Shipley, P. (2012). A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry*, 79, 5-26. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.04.006
- Erçelebi, E. A., & Ibanoglu, E. (2009). Characterization of phase separation behavior, emulsion stability, rheology, and microstructure of egg white-polysaccharide mixtures. *Journal of Food Science*, 74(6), 506-512. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01252.x
- Faridi, E. A., Jafari, S. M., & Assadpour, E. (2017). Preparation of multiple emulsion based on pectin-whey protein complex for encapsulation of saffron extract nanodroplets. *Food Chemistry*, 221, 1962-1969. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.11.149
- Favaro-Trindade, C. S., Santana, A. S., Monterrey-Quintero, E. S., Trindade, M. A., & Netto, E. M. (2010). The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 336-340. doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.10.012
- Fernández, L., Casal, S., Cruz, R., Pereira, J. A., & Ramalhosa, E. (2013). Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Research International*, 50(1), 161-166. doi: 10.1016/j.foodres.2012.09.039
- Fissore, E. N., Rojas, A. M., & Gerschenson, L. N. (2012). Rheological performance of pectin-enriched products isolated from red beet (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva*) through alkaline and enzymatic treatments. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 249-260. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.06.004
- García-Mateos, R., Ibarra-Estrada, E., & Nieto-Ángel, R. (2013). Antioxidant compounds in hawthorn fruits (*Crataegus* spp.) of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(4), 1298-1304. doi: 10.7550/rmb.35675
- Gharsallaoui, A., Saurel, R., Chambin, O., Cases, E., Voilley, A., & Cayot, P. (2010). Utilisation of pectin coating to enhance spray-dry stability of pea protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 122(2), 447-454. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.017
- Guadarrama-Lezama, A. Y., Dorantes-Álvarez, L., Jaramillo-Flores, M. E., Pérez-Alonso, C., Niranjana, K., Gutiérrez-López, G. F., & Alamilla-Beltrán, L. (2012). Preparation and characterization of non-aqueous extracts from chilli (*Capsicum annuum* L.) and their microencapsulates obtained by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 112(1-2), 29-37. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.03.032
- Huang, X. X., Ren, Q., Song, X. Y., Zhou, L., Yao, G. D., Wang, X. B., & Song, S. J. (2018). Seven new sesquiterpene lactones isolated from the seeds of hawthorn and their neuroprotective activities. *Fitoterapia*, 125, 6-12. doi: 10.1016/j.fitote.2017.12.010
- Humblet-Hua, K. N., Scheltens, G., van der Linden, E., & Sagis, L. M. (2011). Encapsulation systems based on ovalbumin fibrils and high methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 569-576. doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.06.008
- Jiang, Y., Du, Y., Zhu, X., Xiong, H., Woo, M. W., & Hu, J. (2012). Physicochemical and comparative properties of pectins extracted from *Akebia trifoliata* var. *australis* peel. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1663-1669. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.09.064
- Jiménez, M., García, H. S., & Beristain, C. I. (2006). Spray-dried encapsulation of conjugated linoleic acid (CLA) with polymeric matrices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(14), 2431-2437. doi: 10.1002/jsfa.2636
- Joye, D. D., & Luzio, G. A. (2000). Process for selective extraction of pectins from plant material by differential pH. *Carbohydrate Polymers*, 43(4), 337-342. doi: 10.1016/S0144-8617(00)00191-0
- Jyothi, N. V., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., & Srawan, G. Y. (2010). *Journal of Microencapsulation*, 27(3), 187-197. doi: 10.3109/02652040903131301
- Kim, D. J., Jeon, G., Sung, J., Oh, S. K., Hong, H. C., & Lee, J. (2010). Effect of grape seed oil supplementation on plasma lipid profiles in rats. *Food Science Biotechnology*, 19(1), 249-252. doi: 10.1007/s10068-010-0035-9
- Li, S., Huang, Z., Dong, Y., Zhu, R., & Li, T. (2017). Haw pectin pentagacturonide inhibits fatty acid synthesis and improves insulin sensitivity in high_fat_fed mice. *Journal of Functional Foods*, 34, 440-446. doi: 10.1016/j.jff.2017.04.030
- Lim, H. K., Tan, C. P., Bakar, J., & Ng, S. P. (2012). Effects of different wall materials on the physicochemical properties and oxidative stability of spray-dried microencapsulated red-fleshed pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) seed oil. *Food Bioprocess Technology*, 5(4), 1220-1227. doi: 10.1007/s11947-011-0555-1
- Linares-García, J. A., Ramos-Ramírez, E. G., & Salazar-Montoya, J. A. (2015). Viscoelastic properties and textural characterization of high methoxyl pectin of hawthorn (*Crataegus pubescens*) in gelling system. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(6), 1484-1493. doi: 10.1111/ijfs.12792
- Liu, P., Kallio, H., & Yang, B. (2011). Phenolic compounds in hawthorn (*Crataegus grayana*) fruits and leaves and changes during fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 11141-11149. doi: 10.1021/jf202465u
- Logaraj, T. V., Bhattacharya, S., Udaya-Sankar, K., & Venkateswaran, G. (2008). Rheological behavior of

- emulsions of avocado and watermelon oils during storage. *Food Chemistry*, 106(3), 937-943. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.07.004
- Loksuwan, J. (2007). Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, 21(5-6), 928-935. doi: 10.1016/j.foodhyd.2006.10.011
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release-a review. *International Journal of Food Science Technology*, 41(1), 1-21. doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x
- Neiryneck, N., van der Meeren, P., Lukaszewicz-Lausecker, M., Verbeken, D., & Dewettinck, K. (2007). Influence of pH and biopolimer ratio on whey protein-pectin interactions in aqueous solutions and in O/W emulsions. *Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 298(1-2), 99-107. doi: 10.1016/j.colsurfa.2006.12.001
- Nieto-Ángel, R., Pérez-Ortega, S. A., Núñez-Colín, C. A., Martínez-Solís, J., & González-Andrés, F. (2009). Seed and endocarp traits as markers of the biodiversity of regional sources of germplasm of tejocote (*Crataegus* spp.) from Central and Southern Mexico. *Scientia Horticulturae*, 121(2), 166-170. doi: 10.1016/j.scienta.2009.01.034
- Noello, C., Carvalho, A. G., Silva, V. M., & Hubinger, M. D. (2016). Spray dried microparticles of chia oil using emulsion stabilized by whey protein concentrate and pectin by whey protein concentrate and pectin by electrostatic deposition. *Food Research International*, 89(1), 549-557. doi: 10.1016/j.foodres.2016.09.003
- Peng, X., Ma, J., Cheng, K. W., Jiang, Y., Chen, F., & Wang, M. (2010). The effects of grape seed extract fortification on the antioxidant activity and quality attributes of bread. *Food Chemistry*, 119(1), 49-53. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.05.083
- Polavarapu, S., Oliver, C. M., Ajlouni, S., & Augustin, M. A. (2011). Physicochemical characterization and oxidative stability of fish oil and fish oil-extra virgin, olive oil microencapsulated by sugar beet pectin. *Food Chemistry*, 127(4), 1694-1705. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.02.044
- Rao, M. A. (2007). *Rheology of fluid and semisolid foods. Principles and applications*. New York, USA: Springer Science Business.
- Rodea-González, D. A., Cruz-Olivares, J., Román-Guerrero, A., Rodríguez-Huezo, M. E., Vernon-Carter, E. J., & Pérez-Alonso, C. (2012). Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 102-109. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.01.020
- Rodríguez-Huezo, M. E., Pedraza-Islas, R., Prado-Barragán, L. A., Beristain, C. I., & Vernon-Carter, E. J. (2004). Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. *Journal of Food Science*, 69(7), 351-359. doi: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb13641.x
- Rombaut, N., Savoie, R., Thomasset, B., Castello, J., van Hecke, E., & Lanoisellé, J. L. (2015). Optimization of oil yield and oil total phenolic content during grape seed cold screw pressing. *Industrial Crops and Products*, 63, 26-33. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.10.001
- Saéñz, C., Tapia, S., Chávez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114(2), 616-622. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.095
- Shishir, M. R., & Chen, W. (2017). Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. *Trends in Food Science & Technology*, 65, 49-67. doi: 10.1016/j.tifs.2017.05.006
- Sittikijyothin, W., Torres, D., & Gonçalves, M. P. (2005). Modelling the rheological behavior of galactomannan aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 59(3), 339-350. doi: 10.1016/j.carbpol.2004.10.005
- Tamm, F., Härter, C., Brodkord, A., & Drusch, S. (2016). Functional and antioxidant properties of whey protein hydrolysate/pectin complexes in emulsions and spray-dried microcapsules. *LWT – Food Science and Technology*, 73, 524-527. doi: 10.1016/j.lwt.2016.06.053
- Tonon, R. V., Grosso, C. R., & Hubinger M. D. (2011). Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. *Food Research International*, 44(1), 282-289. doi: 10.1016/j.foodres.2010.10.018
- Uysal, S. Y., & Yildirim, E. (2014). Extraction and characterisation of pectin from red hawthorn (*Crataegus* spp.) using citric acid and lemon juice. *Asian Journal of Chemistry*, 26(19), 6674-6678. doi: 10.14233/ajchem.2014.17590
- Vivar-Verá, M. A., Salazar-Montoya, J. A., Calva-Calva, G., & Ramos-Ramírez, E. G. (2007). Extraction, thermal stability and kinetic behavior of pectinmethylesterase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit. *LWT - Food Science and Technology*, 40(2), 278-284. doi: 10.1016/j.lwt.2005.10.005
- Zhu, R., Li, T., Dong, Y., Liu, Y., Li, S., Chen, G., Zhao, Z., & Jia, Y. (2013). Pectin pentasaccharide from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge. var. *major*) ameliorates disorders of cholesterol metabolism in high-fat diet fed mice. *Food Research International*, 54(1), 262-268. doi: 10.1016/j.foodres.2013.07.0