

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

**Monitoreo de la formación de complejos coacervados y emulsiones
O/W con el uso de espectroscopía de impedancia eléctrica y
voltametría cíclica**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Doctor en biotecnología

PRESENTA:

César Alberto Roldán Cruz

Director Dr. E. Jaime Vernon Carter

Co-Director Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez

Asesor Dra. Angélica Román Guerrero

Asesor Dr. Eliceo Sosa Hernández

CDMX, Enero de 2019

carc7_335@hotmail.com
carc7335@gmail.com

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con la referencia 001466.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Bioprocesos del Edificio W-107 del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, bajo la dirección del Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez y el Dr. E. Jaime Vernon Carter.

El trabajo experimental se llevó a cabo con el financiamiento parcial del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto número 236500 de Ciencia Básica.

Los estudios de posgrado del Doctorado en Biotecnología fueron posibles gracias al apoyo del CONACyT, a través de la beca número 401882.

Ciudad de México a 3 de Enero de 2019

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
tesis

**Monitoreo de la formación de complejos coacervados y emulsiones O/W con
el uso de espectroscopía de impedancia eléctrica y voltametría cíclica**

que presentó

César Alberto Roldán Cruz

Comité Tutorial:

Director: Dr. E. Jaime Vernon Carter 

Co-Director: Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez 

Jurado:

Presidente: Dr. Eliceo Sosa Hernández 

Secretaria: Dra. Angélica Román Guerrero 

Vocal: Dra. Nancy Velasco Álvarez 

Vocal: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero 

Agradecimientos

Al Ser Supremo por guiarme hasta aquí.

A mis padres y hermano por ser mi motor de vida.

A la persona con quien compartiré mi estancia en este mundo.

A mis amigos y asesores, los doctores Vernon y Álvarez, mentores académicos y de vida.

A mis asesores parte fundamental de este proceso.

A mis amigos de toda la vida y a quienes me trajeron hasta aquí.

A mi familia, tíos, tías, primos y primas.

A mis compañeros de laboratorio.

Para Elena, Javier, Javier y Ángeles, para todos los que siempre han estado junto a mí...

1. RESUMEN

El presente trabajo busca utilizar las técnicas electroquímicas de voltametría cíclica e impedancia eléctrica como métodos de apoyo alternativos para predecir la formación de coacervados complejos y emulsiones O/W. Para este fin, el presente trabajo se dividió en dos etapas:

En la primera etapa, se realizaron pruebas de espectroscopía de impedancia eléctrica (EIS) para estudiar el proceso de complejación entre goma arábica (GA; dispersión acuosa, pH 4.75, 1% p/p) y quitosano (Ch; dispersión de ácido acético, pH 3.5, 1% p/p) en solución. Los datos de EIS se obtuvieron para diferentes relaciones de masa GA/Ch ($R_{GA/Ch} = 1:1$ a $10:1$) en frecuencias que oscilan entre 1 y 1000 Hz. Se utilizó un circuito Randles de orden fraccional para estimar los parámetros de resistencia y capacitancia como función de $R_{GA/Ch}$. Los coacervados complejos se obtuvieron sometiendo la solución a centrifugación y cuantificando la velocidad y la altura de sedimentación. Los parámetros equivalentes del circuito mostraron cambios bruscos en el punto isoeléctrico de los coacervados complejos. La capacidad y la precisión de la EIS, se compararon con las obtenidas a través de las mediciones tradicionales de potencial- ζ . Los resultados indicaron que la técnica EIS se puede usar en rangos de frecuencia específicos como un método práctico para monitorear el proceso de complejación entre biopolímeros.

Por otro lado, en la segunda etapa del trabajo, se exploró el uso de la voltametría cíclica y la EIS para caracterizar la estabilidad de emulsiones O/W con el tensoactivo no iónico Tween-80. Para este fin, las emulsiones O/W con una fracción de fase oleosa 25% v/v se prepararon a varias concentraciones de surfactante, 0.25 a 4% v/v con respecto a la fase acuosa. Como paso previo, las emulsiones se caracterizaron en términos de diámetro medio de gota, tasa de cremado por centrifugación analítica y potencial- ζ . Como era de esperar, los resultados mostraron que el diámetro medio de las gotas y la velocidad de cremado disminuyeron a medida que se aumentó la concentración de tensoactivo. En contraste, el potencial- ζ mostró un comportamiento decreciente, probablemente causado por el desplazamiento de especies iónicas a partir de la interfase aceite/agua. En un segundo paso, se llevaron a cabo mediciones de voltametría

cíclica y EIS. La primera indica el aumento de la capacitancia del sistema con la incorporación de moléculas de tensoactivo. Un circuito equivalente Randles se utilizó para ajustar las mediciones de EIS, lo que indica que la resistencia de doble capa disminuye y la capacitancia incrementa con el aumento de la cantidad de tensoactivo para concentraciones de hasta 2% v/v. Para concentraciones más altas, los parámetros alcanzan un valor casi constante, que se interpretó como el alcance de la concentración de tensoactivo en la que se satura la interfase aceite/agua. De esta manera, se puede decir que la voltametría cíclica y la EIS son técnicas adecuadas para ayudar a la caracterización de la estabilidad de las emulsiones con tensoactivos no iónicos.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
3. CAPÍTULO I: Generalidades	5
3.1 Biopolímeros y su conjugación.....	6
3.2 Biopolímeros de interés científico	6
3.3 Interacción entre biopolímeros	7
3.3.1 Interacciones débiles	7
3.3.2 Interacciones fuertes	8
3.4 Emulsiones.....	8
3.5 Surfactantes	8
3.5.1 Clasificación de los surfactantes	9
3.5.2 Tween-80	10
3.5.3 Surfactantes en la interfase.....	10
3.6 Técnicas analíticas para el monitoreo de la formación de coacervados complejos y emulsiones.....	11
3.6.1 FTIR.....	11
3.6.2 Microscopía óptica	11
3.6.3 Centrifugación analítica	11
3.6.4 Potencial- ζ	12
3.7 Técnicas electroquímicas como herramientas complementarias en el monitoreo de la formación de coacervados complejos y emulsiones	13
3.7.1 Voltametría cíclica	13
3.7.2 Espectroscopía de impedancia eléctrica	15
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. OBJETIVOS	18

5.1	Objetivo general	18
5.2	Objetivos particulares	18
6.	HIPÓTESIS	19
7.	CAPÍTULO II: Materiales y métodos	20
7.1	Materiales.....	21
7.2	Preparación de dispersiones stock.....	21
7.3	Titulación protolítica	21
7.4	Titulación de la dispersión de quitosano con la dispersión de goma arábica 21	
7.5	Potencial- ζ	22
7.6	Microscopía óptica	22
7.7	Estabilidad acelerada	23
7.8	Conductividad DC	23
7.9	Preparación de emulsiones.....	23
7.10	Tamaño de gota.....	24
7.11	Voltametría cíclica.....	24
7.12	Espectroscopía de impedancia eléctrica (EIS).....	24
8.	CAPÍTULO III: Espectroscopía de impedancia eléctrica para controlar el proceso de complejación de goma arábica-quitosano en el seno de la solución	26
8.1	INTRODUCCIÓN	27
8.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
8.2.1	Estequiometría protolítica	29
8.2.2	Potencial- ζ	31
8.2.3	Morfología.....	32
8.2.4	Centrifugación Analítica.....	35

8.2.5	Espectroscopía de Impedancia Eléctrica (EIS).....	37
8.2.6	Implicaciones mecanicistas de la formación de complejos entre goma arábica y quitosano.....	46
8.3	CONCLUSIONES.....	47
9.	CAPÍTULO III: Evaluación de la estabilidad de emulsiones O/W basadas en Tween-80 con voltametría cíclica y espectroscopía de impedancia eléctrica.	49
9.1	Introducción.....	50
9.2	Resultados y discusión.....	52
9.2.1	Morfología y diámetro medio de las gotas de la emulsión	52
9.2.2	Estabilidad acelerada	54
9.2.3	Potencial- ζ	55
9.2.4	Voltametría cíclica	56
9.2.5	Espectroscopía de impedancia eléctrica (EIS)	58
9.2.6	Discusión	61
9.3	Conclusiones.....	62
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	64
11.	Anexo A. Estructuras químicas.....	69
11.1	Estructura química del quitosano de medio peso molecular	69
11.2	Estructura química de la goma arábica	69
11.3	Estructura química de Tween-80	70
	70
12.	Anexo B. Artículos	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de investigaciones publicadas por área (22,332) en el periodo comprendido del año 2000 al 2018 que incluyen la palabra biopolímero en el título, resumen o palabras clave del trabajo (Scopus) 29 de junio de 2018.	7
Figura 2. Tipos de tensoactivos.....	9
Figura 3. Señal típica de excitación para la voltametría cíclica (onda de potencial triangular con cambio en potenciales 0.8 y 0.2 contra SCE (Kissinger & Heineman, 1983).	14
Figura 4. Magnitudes de un voltamperograma cíclico de acuerdo al convenio planteado por la IUPAC.....	14
Figura 5. Curvas de titulación protolítica de las dispersiones de (a) quitosano (1% p/p) y (b) goma arábica (1% p/p).....	30
Figura 6. Trayectoria de titulación en el plano potencial- ζ -pH. El punto isoeléctrico se logra en alrededor de 5.5:1 relación de concentración.	32
Figura 7. Imágenes ópticas que ilustran la morfología de coacervados complejos formados en diferentes proporciones de polisacáridos. Imágenes de (a) a (j) corresponden con las $R_{GA/Ch}$ de 1:1 a 10:1, respectivamente. Magnificación 100x.	34
Figura 8. Altura de sedimentación (a) y velocidad (b) como función de la relación de concentración de polisacárido. La estabilidad óptima y la eficiencia fueron obtenidas a concentraciones en el rango de 5:1 a 6:1.....	37
Figura 9. Mediciones de EIS para las dispersiones stock de goma arábica y quitosano. Gráficas en formato Bode (a) y Nyquist (b).....	38
Figura 10. Diagrama que esquematiza el circuito Randles equivalente de orden fraccional.....	40
Figura 11. Circuito Randles de orden fraccional ajustado, usando los datos experimentales de EIS de la Fig. 9.....	42
Figura 12. Cambios de los parámetros del circuito Randles de orden fraccional con el coeficiente de concentración goma arábica-quitosano. La línea vertical punteada en rojo representa las condiciones en que se alcanza el punto isoeléctrico.	45

Figura 13. Conductividad DC en comparación con la resistencia de doble capa en función de la proporción de goma arábica-quitosano $R_{GA/Ch}$	46
Figura 14. Imágenes de microscopía óptica de emulsiones con diferentes cantidades de tensoactivo Tween- 80. (a) 0.25, (b) 1.0 y (c) 3.0% v/v. Es notable que a mayor concentración de tensoactivo, menor tamaño de diámetro de gota. 53	
Figura 15. Diámetro medio de gota ($D_{4,3}$) de emulsiones frescas (0 días) y emulsiones almacenadas (7 días).....	54
Figura 16. Tasa de cremado estimada de la centrifugación analítica. Un rápido decaimiento de la tasa de cremado es exhibido en concentraciones de tensoactivo cercanas a 2% v/v.	55
Figura 17. Potencial- ζ de las emulsiones en función de la cantidad de surfactante. Es notado que el potencial- ζ decrece conforme más tensoactivo es agregado. ...	56
Figura 18. (a) Ilustra los patrones de voltametría de tres diferentes concentraciones de Tween-80. La ausencia de picos de corriente es notable. (b) Capacitancia de la emulsión estimada por la integración del patrón de potencial de corriente.	58
Figura 19. (a) Gráfica de Nyquist de las mediciones de EIS para cinco diferentes concentraciones de tensoactivo. (b)-(d) Parámetros estimados (Rdl , α y Cdl) obtenidos por el ajuste de las mediciones de EIS a un circuito equivalente.	60
Figura 20. Diagrama esquemático de un circuito equivalente Randles usado en el ajuste de los datos de EIS.....	60
Figura 21. Comparación entre las mediciones de potencial- ζ y la capacitancia estimada de la doble capa.	61
Figura 22. Estructura química del quitosano de mediano peso molecular (Sigma-aldrich).	69
Figura 23. Estructura química de la goma arábica (Sigma-Aldrich).	69
Figura 24. Estructura química de Tween-80 (Sigma-Aldrich).	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de circuito Randles de orden fraccional para las muestras stock..... 42

2. INTRODUCCIÓN GENERAL

El uso de coacervados complejos y emulsiones es amplio en industrias tales como la farmacéutica, alimentaria, química, bioquímica, petroquímica, entre algunas más. Debido a la importancia que los coacervados complejos y emulsiones representan para estas industrias, se ha convertido en parte esencial en los procesos de fabricación contar con las técnicas ideales (rápidas, sencillas, de bajo costo y confiables) para conocer las condiciones a las cuales se obtiene el mayor rendimiento, la mejor estabilidad, la relación óptima de biopolímeros o la concentración crítica micelar (CMC) de emulsificantes. Por tal motivo, la caracterización de las propiedades fisicoquímicas de emulsiones y coacervados complejos ha sido durante muchos años un tema de interés para científicos e ingenieros (Ghasemi et al., 2014). Lo anterior surge de la necesidad de reducir los costos de producción y mejorar la eficiencia de los productos.

Partiendo de lo dicho antes, las investigaciones han encontrado que una característica central de la coacervación compleja es la atracción electrostática entre polielectrolitos cargados opuestamente. Por lo tanto, se sabe que las mediciones de la movilidad de las cargas dentro de los dominios del coacervado proporcionan información valiosa como complemento de otros métodos, dentro de los procesos de complejamiento (Butstraen & Salaün, 2014). En este sentido, técnicas como potencial- ζ , microscopía óptica, o centrifugación analítica han sido empleadas para caracterizar fisicoquímicamente los coacervados complejos y monitorear sus procesos de formación.

Respecto a las emulsiones, evaluar la CMC es crítico en la polimerización de la emulsión y otros procesos similares donde la CMC desempeña roles cruciales en la estabilidad coloidal, afinidad de enlace, procesos de nucleación y cinéticas de reacción entre otros. Por lo tanto, conocer la concentración óptima de emulsificante es importante en el proceso para obtener el producto deseado (Gilbert, 1995). En la CMC, varias propiedades fisicoquímicas, tales como tensión superficial, turbidez y conductividad eléctrica son sometidas a cambios sustanciales (Adamson & Gast, 1967). Así, numerosas técnicas han sido desarrolladas para medir la CMC en sistemas coloidales y por tanto estimar la estabilidad, por ejemplo: la medición de

tensión interfacial, conductividad eléctrica, presión osmótica, índice de refracción, viscosidad o reología (Frindi, Michels, Levy, & Zana, 1994).

Aunque muchas de las técnicas usadas en el monitoreo de las propiedades fisicoquímicas de coacervados complejos y emulsiones han sido aceptadas por muchos años, en la actualidad se vuelven difíciles de ejecutar, esto debido a que necesitan de mucho tiempo o son muy costosas. Ante ello, el uso de técnicas que puedan ser igual de confiables y repetibles se ha vuelto necesario. Atendiendo a esta necesidad, se ha explorado el uso de técnicas electroquímicas como la espectroscopía de impedancia eléctrica (EIS por sus siglas en inglés) o la voltametría cíclica (Galia et al., 2007; Oliveira et al., 20011; (H. P. de Oliveira & de Melo, 2011; Galia, Scialdone, Begue, Piazza, & Filardo, 2007; Ghasemi et al., 2014; Macdonald & Barsoukov, 2005).

La idea detrás de EIS es la estimación de la impedancia eléctrica de un medio como función de una frecuencia variable. En lo que concierne a la voltametría cíclica, se estima como la concentración de tensoactivo en el que la corriente anódica/catódica exhibe una transición brusca.

En consecuencia, en este trabajo se exploró la aplicación de EIS y voltametría cíclica como técnicas alternativas para evaluar el proceso de coacervación compleja y estimar la estabilidad de emulsiones O/W en función de la CMC.

3. CAPÍTULO I: Generalidades

3.1 Biopolímeros y su conjugación

El término biopolímero se refiere a moléculas de cadena larga que se producen naturalmente, pero también a materiales que se derivan de estos o de monómeros de base biológica (Song, Murphy, Narayan, & Davies, 2009). Los biopolímeros provienen de cuatro grandes fuentes: origen animal (colágeno/gelatina), origen marino (quitina/quitosano), origen vegetal (ceras, gomas, proteínas, polisacáridos) y origen microbiano (ácido poliláctico, pululano) (Tharanathan, 2003). El uso individual de ellos es importante, pero su interacción es indispensable en el mejoramiento, desarrollo e innovación de materiales para su uso en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmetológica entre otras.

3.2 Biopolímeros de interés científico

Actualmente los biopolímeros están atrayendo la atención de la comunidad científica e industrial, ya que entre otras características, son biodegradables, biocompatibles, de bajo costo, provienen de fuentes naturales y renovables (Davis & Song, 2006). Debido a estas características el interés (industrial y científico) por ellos se ha incrementado de forma importante. Prueba de ello, es que, en los últimos 20 años, el número total de investigaciones publicadas relacionadas con biopolímeros es de 22,332, las cuales son en diversas áreas tecnológicas (Figura 1). Entre los biopolímeros de alto valor tecnológico e industrial, encontramos almidón (Roldan-Cruz, Garcia-Hernandez, Vernon-Carter, & Alvarez-Ramirez, 2017), pectina (Seslija et al., 2018), gelatina (M. Li, Guo, Wei, MacDiarmid, & Lelkes, 2006), colágeno (Avila Rodríguez, Rodríguez Barroso, & Sánchez, 2018), alginato (Rhim, Lee, & Hong, 2006), carragenina (L. Li, Ni, Shao, & Mao, 2014), goma guar (Muldoon, Loughlin, Sweeney, & Boyd, 2018), proteína de suero de leche (Douglas et al., 2018), goma arábiga (Salih, 2018) y quitosano (M Ways, Lau, & Khutoryanskiy, 2018). (Roldan-Cruz et al., 2016)

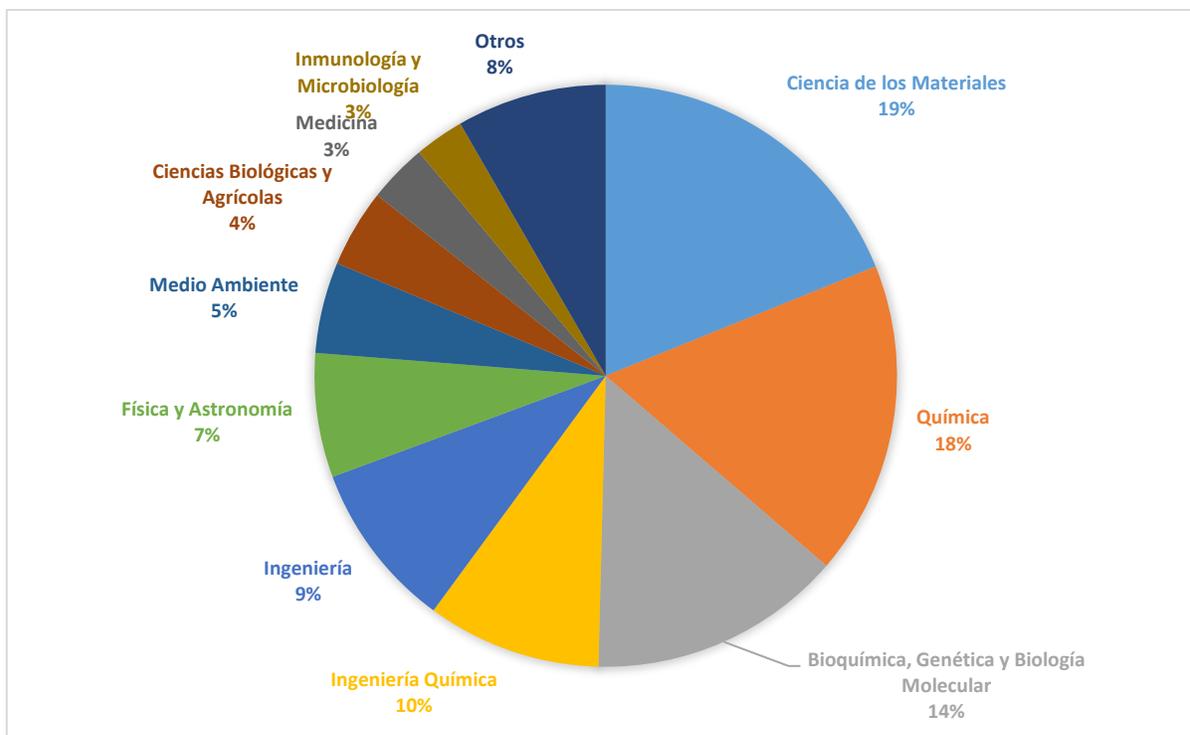


Figura 1. Porcentaje de investigaciones publicadas por área (22,332) en el periodo comprendido del año 2000 al 2018 que incluyen la palabra biopolímero en el título, resumen o palabras clave del trabajo (Scopus) 29 de junio de 2018.

3.3 Interacción entre biopolímeros

Los biopolímeros con carga opuesta en solución pueden interactuar para formar estructuras más complejas a través de interacciones electrostáticas y fenómenos de transferencia de carga. A las estructuras formadas entre los biopolímeros se les llama coacervados (Schatz et al., 2004). Entonces, el proceso de coacervación se define como la separación en dos fases líquidas en sistemas coloidales, donde la fase más concentrada en el componente coloidal es el coacervado y la otra fase es la solución en equilibrio (IUPAC, 1997). La interacción entre biopolímeros se puede clasificar como débil o fuerte.

3.3.1 Interacciones débiles

Las interacciones débiles conducen a la formación de complejos solubles vistos como una solución turbia, así como también geles débiles. Este tipo de interacción se puede formar por dos mecanismos: el primero cuando los biopolímeros involucrados comparten el mismo tipo de carga aunque no necesariamente la

misma magnitud (McClements, 2006); y el segundo cuando la diferencia entre la magnitud de cargas es muy amplia (Klein, Aserin, Ishai, & Garti, 2010).

3.3.2 Interacciones fuertes

Las interacciones fuertes tienen como resultado la formación de un precipitado en el que participan biopolímeros con cargas diferentes. Cuando existen biopolímeros con carga opuesta, estos tienden a buscar el equilibrio protolítico por medio de atracción electrostática, llevando con ello a la formación de un precipitado (González-Martínez et al., 2017).

3.4 Emulsiones

Las emulsiones son dispersiones inestables desde el punto de vista termodinámico, sin embargo bajo la presencia de tensoactivos pueden convertirse en cinéticamente estables (Kronberg & Lindman, 2003). El tamaño de diámetro de las gotas líquidas que se encuentran dispersas está en el rango de 0.1 a 20 μm (Aranberri, Binks, Clint, & Fletcher, 2006). En la mayoría de las emulsiones una de las fases es acuosa y la otra un aceite apolar. Las emulsiones con el aceite como fase dispersa se conocen como emulsiones de aceite en agua (oil-in-water, O/W) y las emulsiones con agua como fase dispersa se conocen como emulsiones de agua en aceite (water-in-oil, W/O).

3.5 Surfactantes

Los agentes tensoactivos (SURface ACTive AgeNT), son moléculas con una estructura muy característica (una parte polar y otra apolar) y que presentes en bajas concentraciones en un sistema, tienen la propiedad de absorberse en superficies e interfases de este y así alterar la energía libre (Rosen & Kunjappu, 2012).

La parte polar o hidrófila de la molécula puede llevar una carga positiva o negativa, y es esta parte la que define al agente tensoactivo como catiónico o aniónico respectivamente. Otros agentes tensoactivos en cambio, no muestran carga iónica (no-iónicos).

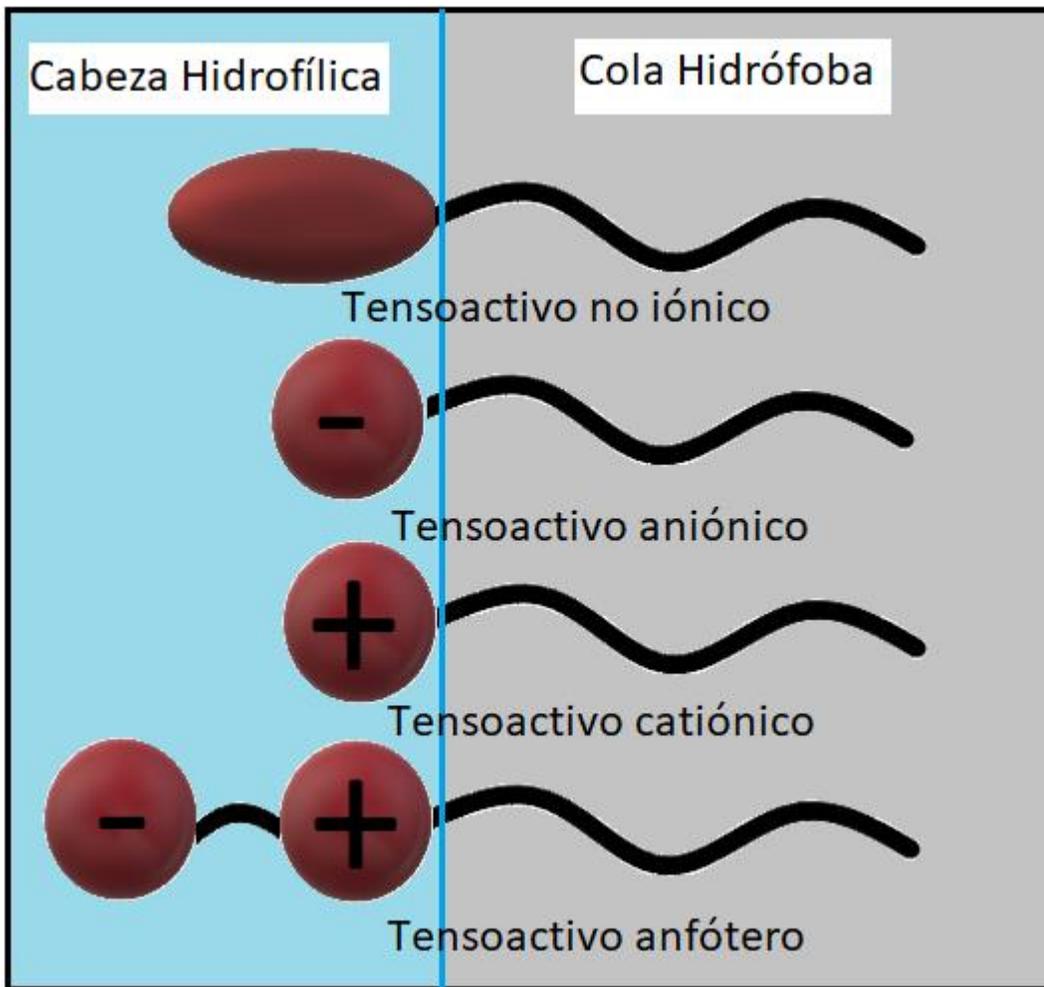


Figura 2. Tipos de tensoactivos

3.5.1 Clasificación de los surfactantes

Los agentes tensoactivos se pueden clasificar en función de la naturaleza iónica de la cabeza (Figura 2): i) No-iónicos: Los no-iónicos carecen de grupos polares cargados, pero poseen grupos como los etoxilatos, $-(OCH_2-CH_2)_m OH$, que muestran gran afinidad hacia las moléculas de agua debido a las fuertes interacciones dipolo-dipolo en los enlaces de hidrógeno; ii) Aniónicos: se trata de los agentes tensoactivos que presentan la cabeza hidrófila con carga negativa. Todos ellos poseen un contra-ion positivo que suele ser el Na^+ ; iii) Catiónicos: Los agentes tensoactivos presentan una cabeza positiva, como por ejemplo el ion trimetil amonio $(-N(CH_3)_3^+)$ y contra-iones negativos como el Br^- ; iv) Zwitteriónicos o anfóteros: Estos agentes tensoactivos contienen cargas positivas y negativas en

la misma molécula, convirtiéndola en moléculas neutras sin contra-iones (de Guertechin, 2009).

3.5.2 Tween-80

Un surfactante no-iónico muy usado en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética es el Tween-80. Este surfactante origina emulsiones de fase externa acuosa (O/W), estables y de textura fina, poco afectados por altas concentraciones de electrolitos o por cambios de pH ligeros. Se utilizan en farmacia para la preparación de cremas, pomadas lavables, y bases de supositorios, así como para emulsificar aceites, esencias, y vitaminas liposolubles, y como humectantes en suspensiones orales o parenterales. También se utilizan para incrementar la absorción de la dieta grasa en casos de esteatorrea, debida a trastornos celíacos y esprue. Se usan como surfactantes en spray, insecticidas y pesticidas, así como emulgentes en cremas cosméticas e industria alimentaria (Helenius, McCaslin, Fries, & Tanford, 1979). La parte hidrófoba del agente tensoactivo generalmente es una cadena simple de hidrocarburo la cual contiene principalmente grupos olefínicos.

3.5.3 Surfactantes en la interfase

Debido a la baja solubilidad de las cadenas de los hidrocarburos en el agua, los agentes tensoactivos tienden a minimizar la interfase o la superficie de contacto agua-hidrocarburo en la disolución acuosa. Para ello, existen dos posibles mecanismos: 1) A bajas concentraciones de agente tensoactivo, las moléculas se acumulan en la interfase agua-aire, de manera que la parte hidrófoba pueda escapar del medio acuoso mientras que la parte hidrófila se mantiene inmersa en el agua; 2) sin embargo, por encima de cierta concentración, conocida como la concentración crítica micelar (CMC), la interfase se ocupa completamente de moléculas de agentes tensoactivos y éstas se asocian en el seno de la fase acuosa formando agregados.

La interacción entre las cadenas de hidrocarburo y el agua de la disolución se minimiza gracias a la formación de estas estructuras tridimensionales, en las cuales las cadenas apolares se direccionan hacia el centro del agregado y las cabezas polares hacia la disolución. Estos agregados, denominados micelas, pueden tomar

varias formas y tamaños en función de la concentración y naturaleza del tensoactivo (Aranberri et al., 2006).

3.6 Técnicas analíticas para el monitoreo de la formación de coacervados complejos y emulsiones

El monitoreo de la formación de coacervados complejos y emulsiones es una actividad importante, ya que con ello se puede intuir el mecanismo de interacción. El tipo de interacción, además que ayuda a establecer las condiciones necesarias para obtener el resultado deseado. Bajo esta idea, las técnicas analíticas usadas con mayor frecuencia son FTIR, microscopía, potencial- ζ y estabilidad acelerada.

3.6.1 FTIR

La espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) es una técnica que se basa en la información química de la muestra. Su principio de funcionamiento es hacer pasar radiación infrarroja a través de la muestra, entonces parte de la radiación es absorbida y otra parte es transmitida (Berthomieu & Hienerwadel, 2009). La señal resultante (interferograma) contiene toda la información referente (tipos de enlace) a los grupos funcionales de la muestra sobre todas las longitudes de onda. El espectro de la muestra se calcula del interferograma por transformada de Fourier. Este espectro representa una "huella dactilar" molecular del material analizado. Dicho lo anterior, la utilidad de la espectroscopía infrarroja surge porque las estructuras químicas (moléculas) arrojan espectros con "huellas dactilares" específicas (J. Schmitt & Flemming, 1998).

3.6.2 Microscopía óptica

La microscopía óptica es una técnica importante dentro del monitoreo de los procesos de emulsificación y coacervación. Con ella es posible seguir el comportamiento físico de los materiales, así como observar el resultado final de su interacción.

3.6.3 Centrifugación analítica

La caracterización del estado disperso de suspensiones y emulsiones es esencial para aplicaciones técnicas en diversos campos industriales y científicos. A menudo necesario medir la distribución del tamaño de partícula a una concentración más

alta, porque la dilución podría afectar las propiedades de las partículas y su interacción, por lo que la caracterización de la muestra a la concentración original es lo más razonable. En este sentido, determinar la distribución del tamaño de partícula por análisis la centrifugación tiene un gran potencial (Detloff, Sobisch, & Lerche, 2007). La medición de la estabilidad acelerada se da por medio de una centrifuga analítica. En esta medición, se hace pasar luz a través de la muestra que está siendo centrifugada, colectando perfiles de transmisión de luz y correlacionándolos con las propiedades físicas del sistema (Detloff, Sobisch, & Lerche, 2006). El someter la muestra a una fuerza centrífuga, ocasiona que exista una sedimentación acelerada, provocada por los fenómenos de agregación de las gotas. Dicha agregación, será dependiente del tiempo y de la velocidad de centrifugación, debido a que estos dos factores pueden acelerar el envejecimiento de la emulsión a través de la desorción de las moléculas tensoactivas en la interfase aceite-agua.

3.6.4 Potencial- ζ

El desarrollo de una carga neta en la superficie de la partícula afecta la distribución de iones en los alrededores de la región interfacial, resultando en un incremento de la concentración de iones contenidos (iones de carga opuesta a la de la partícula) cerca de la superficie. Así, una doble capa eléctrica existe alrededor de cada partícula.

La capa líquida que rodea a la partícula existe como dos partes: una región interior llamada capa de Stern, donde los iones son fuertemente ligados y una región externa difusa donde ellos están menos firmemente unidos. Dentro de la capa difusa hay un límite teórico dentro del cual los iones y las partículas forman una entidad estable. Cuando una partícula se mueve (por ejemplo, debido a la gravedad), los iones no viajan con la partícula. Este límite es llamado superficie de corte hidrodinámico o plano de deslizamiento.

El potencial que existe en este límite es conocido como potencial- ζ . La magnitud del potencial- ζ da una indicación del potencial de estabilidad de un sistema coloidal. Para medir el potencial- ζ se utiliza la combinación de técnicas: electroforesis y

electroforesis de laser Doppler. Este método mide que tan rápido se mueve una partícula en un medio líquido cuando un campo eléctrico es aplicado.

3.7 Técnicas electroquímicas como herramientas complementarias en el monitoreo de la formación de coacervados complejos y emulsiones

3.7.1 Voltametría cíclica

La voltametría cíclica (CV, por sus siglas en inglés) es quizás la técnica electroanalítica más versátil para el estudio de especies electroactivas. Su versatilidad, combinada con la facilidad de medición, ha dado lugar a un amplio uso de CV en los campos de la electroquímica, química inorgánica, química orgánica y bioquímica. La voltametría cíclica es a menudo el primer experimento realizado en el estudio electroquímico de un compuesto, un material biológico o la superficie de un electrodo. La efectividad de CV se debe a su capacidad para observar rápidamente el comportamiento redox en un amplio rango de potencial. El voltamograma resultante es análogo a un espectro convencional en que transmite información en función de un barrido de energía.

La CV consiste en ciclar el potencial de un electrodo, que se sumerge en una solución sin agitación, y medir la corriente resultante. El potencial de este electrodo de trabajo se controla frente a un electrodo de referencia, como un electrodo de calomel saturado (SCE) o un electrodo de cloruro de plata (Ag/AgCl). El potencial de control que se aplica a través de estos dos electrodos puede considerarse una señal de excitación (Kissinger & Heineman, 1983).

La señal de excitación para CV es un barrido de potencial lineal con una forma de onda triangular como se muestra en la Figura 3. Esta señal de excitación con potencial triangular barre el potencial del electrodo entre dos valores, a veces llamados los potenciales de cambio. La señal de excitación en la Figura 3 hace que el potencial primero se escanee negativamente de +0.80 a -0.20 V en comparación con SCE, momento en el que la dirección de barrido se invierte, provoca un barrido positivo de regreso al potencial original de +0.80V. La velocidad de escaneo, como es reflejado por la pendiente, es de 50 mV/s. Un segundo ciclo está indicado por la línea discontinua. Ciclos únicos o múltiples se pueden usar.

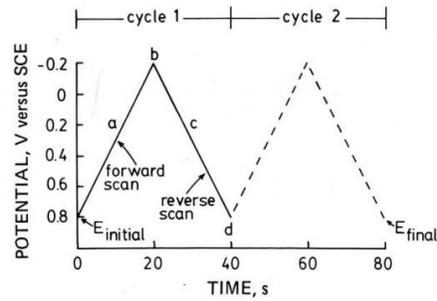


Figura 3. Señal típica de excitación para la voltametría cíclica (onda de potencial triangular con cambio en potenciales 0.8 y 0.2 contra SCE (Kissinger & Heineman, 1983).

Esta técnica permite electrolyzar una especie e invertir el potencial para comprobar la formación de su par redox, de esta forma es posible dilucidar mecanismos de reacción. Al variar la velocidad de barrido se puede estudiar la cinética de las reacciones o bien, detectar la aparición de especies intermedias en procesos redox. Si se analiza una muestra con dos o más analitos presentes, su comportamiento es particular, por lo que el voltamperograma resultante no es necesariamente la suma de los voltamperogramas individuales de cada analito. En la Figura 4 se muestran los parámetros de un voltamperograma cíclico, donde:

E_p^c = potencial de pico catódico.

E_p^a = potencial de pico anódico.

i_p^c = intensidad de corriente de pico catódico.

i_p^a = intensidad de corriente de pico anódico.

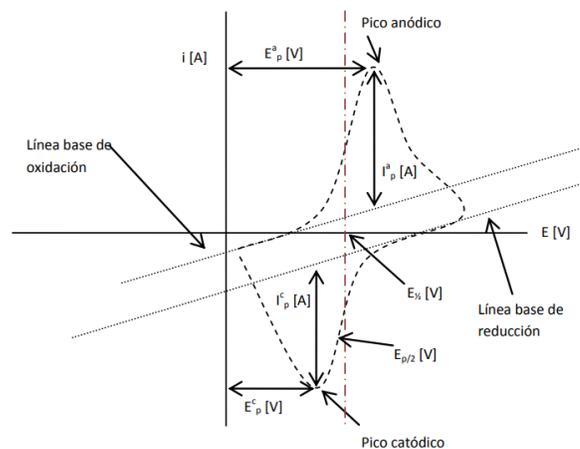


Figura 4. Magnitudes de un voltamperograma cíclico de acuerdo al convenio planteado por la IUPAC.

3.7.2 Espectroscopía de impedancia eléctrica

La espectroscopía de impedancia eléctrica (EIS) es una técnica directa y no destructiva para analizar sistemas coloidales. Para poner en contexto, se dará una breve descripción de los conceptos de la EIS de la siguiente manera (Macdonald & Barsoukov, 2005). La impedancia eléctrica se lleva a cabo normalmente utilizando pequeñas señales de excitación para obtener una respuesta pseudo-lineal. La señal de excitación es producida por el potencial aplicado a la celda electroquímica como $E(t) = E_0 \sin(\omega t)$, donde ω y E_0 son la frecuencia de excitación y la amplitud, respectivamente. Cabe recordar que la relación entre la frecuencia radial ω (expresada en rad/s) y la frecuencia f (expresada en Hz) está dada por $\omega = 2\pi f$. La señal de respuesta viene dada por la corriente en la forma $I(t) = I_0 \sin(\omega t + \phi)$, donde ϕ es el desfase entre el potencial de excitación y la respuesta de las señales de corriente. Con la relación de Euler $\exp(j\omega t) = \cos(\omega t) + j \sin(\omega t)$, se puede expresar la impedancia como una función compleja. El potencial de excitación está dado por $E(t) = E_0 \exp(j\omega t)$ y la corriente de respuesta como $I(t) = I_0 \exp(j\omega t - \phi)$. Mediante el uso de la ley de Ohm en el dominio complejo, se puede definir la impedancia como una versión dinámica del concepto de resistencia tradicional. Es decir, $Z(\omega) = E(t; \omega) / I(t; \omega)$. De esta manera, $Z(\omega) = Z_{\text{Re}}(\omega) + jZ_{\text{Im}}(\omega)$ donde $Z_{\text{Re}}(\omega) = Z_0(\omega) \cos(\phi)$ y $Z_{\text{Im}}(\omega) = Z_0(\omega) \sin(\phi)$ son, respectivamente, los módulos reales e imaginarios, y $Z_0(\omega) = |Z(\omega)|$ es la magnitud de la impedancia. Las partes real e imaginaria corresponden a los módulos de pérdida (o resistencia) y de almacenamiento (o reactancia). Un componente puramente reactivo no se disipa la energía. Esto significa que el componente alternativamente absorbe energía de la membrana límite del sistema, una reactancia pura no se disipará cualquier potencia. Finalmente, la magnitud de la impedancia está relacionada con la conductancia dependiente de la frecuencia $G(\omega)$ y la capacitancia $C(\omega)$ como sigue:

$$G(\omega) = |z|^{-1} \cos(\phi) \quad (1)$$

y

$$C(\omega) = (\omega|z|)^{-1} \sin(\phi) \quad (2)$$

respectivamente.

4. JUSTIFICACIÓN

El crecimiento de las industrias y el aumento en la demanda de sus productos, ha llevado a la comunidad científica y tecnología a desarrollar y emplear nuevas técnicas para caracterizar, optimizar y hacer más eficiente la fabricación de los productos.

En las industrias farmacéuticas, alimentarias, químicas, petroquímicas o biotecnológicas, el uso de materiales como biopolímeros o emulsionantes ha ido en aumento. Esto debido a que muchos productos de interés y de alto valor agregado para tales industrias son sensibles a cambios de luz, pH, presencia de oxígeno, enzimas, entre otros, y la necesidad de conservarlos se ha vuelto un reto interesante, que durante muchos años ha venido revolucionando las técnicas y tecnologías empleadas. Ejemplo de ello es el uso de coacervados complejos o emulsiones, donde se garantiza la protección y liberación específica de los compuestos de interés. Por lo tanto, la caracterización fisicoquímica y el monitoreo de la formación de estas dos tecnologías (coacervados complejos y emulsiones) juega un papel fundamental dentro del desarrollo industrial. Para ello se han buscado técnicas que cumplan con las necesidades que toda industria demanda: rapidez, confiabilidad, reproducibilidad y bajo costo. En este sentido se han utilizado técnicas como potencial- ζ , microscopía óptica, centrifugación analítica, reología y tensión interfacial, por mencionar algunas. El problema con ellas es que no satisfacen en su totalidad los atributos que la industria ha establecido, por ejemplo facilidad de medición, rapidez, repetitividad, bajo costo, por mencionar algunos. Y aquí es cuando surge la necesidad de encontrar técnicas alternativas que puedan ser complementarias o en algún punto suficientes para las demandas que la industria indica. Ejemplo de ellas son las técnicas electroquímicas (espectroscopía de impedancia eléctrica y voltametría cíclica), las cuales son rápidas, precisas, reproducibles y de bajo costo. Aunque su uso se ha incrementado y existen algunas investigaciones, estudios a partir de los cuales se pueda inferir su uso como técnica alternativa en el análisis de coacervados complejos y emulsiones, son necesarios. Por tal motivo el desarrollo del presente trabajo pretende atender a estas demandas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- ❖ Evaluar la sensibilidad de técnicas electroquímicas como herramientas auxiliares para estudiar la formación de coacervados c complejos y emulsiones O/W.

5.2 Objetivos particulares

Capítulo tres

- ❖ Verificar que la compatibilidad de ambos biopolímeros es la adecuada para llevar a cabo el proceso de coacervación.
- ❖ Encontrar la relación en concentración a la cual el coacervado alcanza su mayor rendimiento.
- ❖ Monitorear con métodos analíticos y gráficos la formación del complejo coacervado.
- ❖ Proponer y programar un modelo de circuito equivalente que ayude a predecir y monitorear el proceso de coacervación compleja entre quitosano y goma arábica.
- ❖ Probar la coacervación a partir del uso de otros biopolímeros y verificar la factibilidad de la EIS para monitorear el proceso de coacervación.

Capítulo cuatro

- ❖ Formular emulsiones O/W con diferente concentración de tensoactivo.
- ❖ Caracterizar las emulsiones en términos de diámetro medio de gota, tasa de cremado y potencial- ζ .
- ❖ Evaluar la estabilidad de emulsiones O/W, en función de la concentración de tensoactivo Tween-80.
- ❖ Efectuar mediciones de voltametría cíclica y espectroscopia de impedancia eléctrica (EIS) para conocer el comportamiento electroquímico de las emulsiones.
- ❖ Proponer un circuito eléctrico que ejemplifique correctamente los datos de las mediciones eléctricas.

6. HIPÓTESIS

- ❖ La espectroscopía de impedancia eléctrica y la voltametría cíclica son métodos alternativos tan eficientes como el potencial- ζ , tamaño de partícula o microscopía óptica, para predecir y monitorear la formación de coacervados quitosano-goma arábica y emulsiones O/W.

7. CAPÍTULO II: Materiales y métodos

7.1 Materiales

Quitosano de peso molecular medio (Ch, 92.2% grado de desacetilación) y goma arábica (GA; *Acacia Senegal*), fueron comprados de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ácido acético, ácido clorhídrico e hidróxido de sodio fueron comprados en J.T. Baker (Xalostoc, México). El emulsionante Tween-80 (número CAS 9005-65-6, peso molecular aprox. 1310, CMC 0.012 mM, densidad de 1.06 g/ml a 25°C) y aceite mineral (número CAS 8042-47-5, densidad de 0.84 g/ml a 25°C) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Toluca, México). Se usó agua desionizada para todos los ensayos experimentales.

7.2 Preparación de dispersiones stock

Las dispersiones stock de ambos polisacáridos fue preparada por la dispersión de quitosano (1% p/p) en agua desionizada con ácido acético (1% v/v) y la goma arábica se preparó en al 1% p/p en agua desionizada. Ambas dispersiones stock fueron agitadas por 12 horas a 20°C, para asegurar la completa hidratación de los biopolímeros.

7.3 Titulación protolítica

Se llevaron a cabo valoraciones protolíticas para estimar la relación estequiométrica entre las dispersiones de quitosano y goma arábica. Una muestra de dispersión de quitosano (20 ml) se tituló con NaOH (0.1 M) y se registró el pH (Vernier pH-BTA, Beaverton, OR, EE. UU.). Asimismo, se valoró una muestra de dispersión de goma arábica (20 ml) con HCl (0.1 M), con control continuo del pH. Los resultados de la titulación se contrastaron con los obtenidos para la solución de ácido acético (1% v/v) utilizada para la preparación de la dispersión de quitosano y para el agua desionizada utilizada en la preparación de la dispersión de goma arábica. Todas las titulaciones se realizaron por triplicado.

7.4 Titulación de la dispersión de quitosano con la dispersión de goma arábica

La dispersión de goma arábica fue lentamente adicionada a la dispersión de quitosano bajo condiciones de agitación moderada y 20°C. La evaluación de la interacción quitosano-goma arábica fue evaluada por el muestreo de la mezcla a

diferentes relaciones de concentración quitosano-goma arábica ([GA]/[Ch]), de 1:1 a 1:10. Las muestras fueron directamente medidas.

7.5 Potencial- ζ

Las mediciones de potencial- ζ , fueron realizadas usando el equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Las muestras de dispersión de los polisacáridos fueron transferidas al autotitulador MPT-2 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), para ajustar el pH de las dispersiones se utilizó HCl 0.1N o NaOH 0.1N. Los experimentos fueron realizados en un rango de pH de 2 a 7 cada 0.5 unidades con una resolución de pH de ± 0.05 unidades. Para las emulsiones no se realizó ningún ajuste en el pH. El potencial- ζ , fue determinado por la medición de la dirección y velocidad de la dispersión de los biopolímeros y las emulsiones mientras se movían en la dirección del campo eléctrico aplicado. El software del equipo convierte las mediciones de movilidad electroforética en valores de potencial zeta usando el modelo matemático de Smoluchowski.

7.6 Microscopía óptica

Las muestras de coacervados complejos fueron observadas con un microscopio óptico (Olympus BX45, Olympus Optical Co., Tokio, Japan) acoplado a un sistema analizador de imágenes (Cámara digital Olympus, C3030 y el software Imagen Pro plus versión 4.5, Media Cybernetics, Inc, Rockville, MD, USA). Seleccionando las mejores micrografías.

Para las emulsiones, las micrografías fueron tomadas una hora después de su preparación bajo el siguiente método: las muestras se colocaron en un micro-portaobjetos con cuidado para reducir la posible destrucción de las estructuras de la emulsión por la tensión de cizallamiento. Posteriormente, se cubrieron con un cubreobjetos y se sellaron usando grasa de vacío para minimizar la evaporación de agua. La intensidad de luz se mantuvo a valores mínimos para reducir el calentamiento de la muestra. Se presentan micrografías seleccionadas tomadas a 100 x.

7.7 Estabilidad acelerada

La estabilidad del proceso de coacervación y de las emulsiones fueron determinadas con un analizador de dispersiones LUMiSizer (L.U.M. GmbH, Berlin, Germany). Para el caso de los coacervados, se tomaron 0.4mL de la dispersión y se colocaron en una celda PC 110-131xx. Las mediciones se hicieron a 25°C, con una velocidad de 4000 rpm, durante 126 minutos. El LUMiSizer utiliza un método de sedimentación con la ayuda de la fuerza centrífuga, para determinar la estabilidad de la dispersión permitiendo simultáneamente medir la intensidad de la luz transmitida como una función del tiempo y la posición sobre la posición de la interfaz de separación a través de toda la longitud de la muestra. Para el análisis de los diferentes perfiles obtenidos se usó el software SEPView.

Respecto a las emulsiones, muestras (0.4 ml) de las emulsiones E_x se sometieron a las mismas condiciones de velocidad, tiempo y temperatura que los coacervados complejos. La tasa y la altura del cremado se obtuvieron con el software del equipo. La tasa de cremado se correlaciona con la estabilidad de la emulsión; es decir, entre mayor sea la tasa de cremado, menor será la estabilidad de la emulsión.

7.8 Conductividad DC

Para comparar los resultados del EIS con la conductividad eléctrica, se midió la conductividad de DC de las muestras con un medidor de conductividad (Orion Star, Thermo Scientific, EE. UU.). Todas las mediciones se realizaron a 20°C. Se realizaron tres mediciones para cada muestra.

7.9 Preparación de emulsiones

El Tween-80 se disolvió en agua desionizada utilizando agitación mecánica a 3500 rpm durante 2 minutos (Ultra-Turrax modelo T-25). Posteriormente, el aceite mineral (25% v/v) fue incorporado. Finalmente, la emulsión se forma con la ayuda de agitación mecánica (Ultra-Turrax modelo T-25) a 10,000 rpm durante 5 minutos. Todas las emulsiones se almacenaron a 4°C antes de la caracterización por un tiempo máximo de 1 hora. La caracterización de las emulsiones se centró en el efecto de la concentración de emulsionante Tween-80 en la estabilidad de la emulsión. Con este fin, las concentraciones de emulsionante fueron 0.25, 0.5, 1.0,

1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 4.0% v/v con respecto a la fase acuosa. Para efectos prácticos, las emulsiones fueron etiquetadas como E_x, donde el subíndice x representa la concentración de emulsionante.

7.10 Tamaño de gota

El diámetro medio de las gotas ($d_{4,3}$) de las diferentes emulsiones se estimó utilizando un Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, Reino Unido) usando agua desionizada (índice de refracción 1.333) como dispersante 1 hora después de la preparación.

7.11 Voltametría cíclica

Las emulsiones se caracterizaron electroquímicamente mediante la aplicación de un barrido de potencial en la dirección anódica. El montaje del análisis consistió en una celda típica (volumen=50ml) con tres electrodos, que consistía en un electrodo de referencia de sulfato de mercurio saturado Hg/Hg₂SO₄/K₂SO₄ (saturado), SSE, (E = 0.645 V/SHE, XR200 Radiometer), barra de grafito como contraelectrodo y una placa de platino como electrodo de trabajo. La celda se conecta a un potencióstato/galvanostato (PARSTAT, modelo 2273, Applied Research Princeton, Oak Ridge, TN, E.U.A.), y los voltamperogramas se obtuvieron a una tasa de escaneo a 100 mV/s, en un rango de potencial entre 1.0 y -1.0 V. Antes de cada experimento, la superficie del electrodo de trabajo fue pulida con polvo de alúmina Buehler (tamaño de grano final ≤ 0.05 μ m) para un acabado de espejo. A continuación, el electrodo se enjuagó con agua desionizada y se colocó en un baño ultrasónico durante 5 minutos.

7.12 Espectroscopía de impedancia eléctrica (EIS)

Se utilizó un potencióstato/galvanostato (PARSTAT, modelo 2273, Princeton Applied Research, Oak Ridge, TN, E.U.A.), las muestras se cargaron en una celda (volumen=50ml) equipada con una jaula de Faraday. Se obtuvieron mediciones de espectroscopía de impedancia eléctrica en condiciones de circuito abierto nominales (es decir, tensión de polarización cero DC) mediante el escaneo de la frecuencia potencial excitante de 1 a 1000 Hz. La celda estaba equipada con tres electrodos: (1) un electrodo de referencia saturado (sulfato de Hg/Hg₂SO₄/K₂SO₄),

SSE, ($E=0.645V/SHE$, XR200 Radiometer), (2) una barra de grafito como contraelectrodo, y (3) una placa de platino como electrodo de trabajo. Antes de cada experimento, la superficie del electrodo de trabajo fue pulido usando polvo de alúmina Buehler (tamaño de grano final $\leq 0,05 \mu m$) para un acabado de espejo. A continuación, el electrodo se enjuagó con agua desionizada y se colocó en un baño ultrasónico durante 5 min. La celda de reacción estaba equipada con un sistema de control de temperatura para mantener el sistema a $25^{\circ}C$.

8. CAPÍTULO III:

Espectroscopía de impedancia eléctrica para controlar el proceso de complejación de goma arábica-quitosano en el seno de la solución

8.1 INTRODUCCIÓN

Los biopolímeros cargados opuestamente en soluciones, pueden llevar a interacciones complejas que involucran atracción electrostática y fenómenos de transferencia de carga. La caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los complejos polielectrolíticos de biopolímeros, es un tema de vital importancia para la ingeniería y la ciencia, porque los complejos polielectrolíticos determinan en gran medida la textura, la morfología y la estabilidad mecánica de la materia coloidal (Schatz et al., 2004).

Las interacciones entre biopolímeros polielectrolíticos, puede manifestarse en varias formas. Interacciones débiles conducen a la formación de pequeños complejos solubles, reflejándose como soluciones turbias, así como también la formación de geles débiles. Por otro lado, interacciones fuertes conducen a la precipitación de los complejos coloidales, formado por ambos biopolímeros (Walstra, 2003). La naturaleza y alcance de la formación de complejos por los biopolímeros es afectada por las características moleculares (por ejemplo: densidad de carga y distribución de grupos reactivos), la concentración relativa de biopolímero y condiciones de solución (pH, fuerza iónica y temperatura).

La coacervación compleja, conduce a la formación de un precipitado de ambos biopolímeros, a lo cual se le ha encontrado una gran diversidad de aplicaciones tecnológicas en biotecnología, industria alimentaria y farmacéutica. Por ejemplo, los coacervados proteína/polisacárido han encontrado algunas aplicaciones en productos alimenticios (C. Schmitt, Turgeon, & science, 2011), con interesantes resultados para la estabilización de emulsiones (Butstraen & Salaün, 2014; Jiménez-Alvarado, Beristain, Medina-Torres, Román-Guerrero, & Vernon-Carter, 2009), inmovilización de probióticos (Hernández-Rodríguez, Lobato-Calleros, Pimentel-González, & Vernon-Carter, 2014) y dispositivos de microencapsulación (Dong et al., 2011). Métodos de coacervación simple han sido también propuestos para diseñar medios de encapsulación de liberación eficiente de fármacos (Rauck, Novosat, Oudega, & Wang, 2015; Shimokawa, Saegusa, Wada, Ishii, & Biointerfaces, 2013).

En general, el proceso de coacervación es afectado por el pH, fuerza iónica, densidad de carga, longitud de cadena y relación de carga (Kayitmazer, Koksall, & Iyilik, 2015). El monitoreo de la formación es un aspecto muy importante para determinar las condiciones óptimas en términos de morfología, rendimiento y propiedades funcionales. De hecho, se ha señalado que la aplicación de la coacervación compleja para producción a gran escala no es trivial, ya que la morfología y tamaño, son altamente afectados por las condiciones de proceso (Lemetter, Meeuse, & Zuidam, 2009). En este sentido, los métodos de monitoreo juegan un rol importante para especificar y realizar un seguimiento de variables observables que indican un cambio significativo en el proceso de coacervación. Debido a que la coacervación implica el autoensamblaje inducido por atracción electrostática y la formación de complejos entre polielectrolitos con cargas opuestas, el potencial zeta es ampliamente utilizado para asegurar la formación de morfologías complejas con propiedades deseadas (Espinosa-Andrews et al., 2013). Además, la coacervación toma lugar cuando las condiciones termodinámicas no son adecuadas para mantener la solubilidad de los polielectrolitos cargados. Por lo tanto, mediciones de turbidez han sido también usadas para monitorear el proceso de precipitación del coacervado (Ru, Wang, Lee, Ding, & Huang, 2012). Además, la microscopía es rutinariamente usada para la evaluación visual de la morfología del coacervado. La dispersión de bajo ángulo ha sido también propuesta para delimitar el tamaño y espaciamiento de los dominios del coacervado (Krogstad et al., 2014). Una característica central de la coacervación compleja es la atracción electrostática entre polielectrolitos cargados opuestamente. De esta manera, se ha considerado que las mediciones de la movilidad de las cargas dentro de los dominios del coacervado proporcionan información valiosa como complemento de otros métodos, dentro de los procesos de complejamiento (Butstraen & Salaün, 2014). Los métodos de conductividad eléctrica de corriente directa (DC) dan mediciones simples, rápidas y relativamente baratas de la movilidad de carga. Sin embargo, un inconveniente de DC es su baja sensibilidad y exactitud en muchas instancias, especialmente con medios despliega relativamente una alta conductividad (Ghasemi et al., 2014). En este sentido, la espectroscopía de impedancia eléctrica

(EIS por sus siglas en inglés) ha sido propuesta como una alternativa directa y no destructiva para mediciones de conductividad de DC en sistemas coloidales (H. De Oliveira, Andrade, de Melo, & science, 2008; H. de Oliveira, Oliveira, de Melo, & science, 2006; Wu, Ben, Chang, & Nanofluidics, 2005). La idea detrás de EIS es la estimación de la impedancia eléctrica de un medio como función de una frecuencia variable. El potencial de EIS para probar la evolución del sistema coloidal todavía está en exploración. Galia et al. (2007), estudió el comportamiento de autoensamblaje de anfífilos solubles en dióxido de carbono supercrítico utilizando EIS. Por otro lado, de Oliveira y Melo (2011) exploraron la relación entre impedancia eléctrica y la formación de agregados en soluciones acuosas de colorantes y surfactantes.

Scandurra, Tripodi, and Verzera (2013), reportaron que EIS es un método práctico y rápido para evaluar el origen floral de miel. Ghasemi et al. (2014), investigó cambios en impedancia eléctrica para determinar la concentración crítica micelar de emulsificantes iónicos. Recientemente Abdollahi, Darestani, Ghasemi, Gomes, and Science (2014), usaron EIS para explorar el comportamiento coloidal de emulsificantes no iónicos en solventes no polares.

En este trabajo, se exploró la aplicación de EIS para evaluar el proceso de coacervación compleja de dos polisacáridos, quitosano de mediano peso molecular y goma arábiga. Se usó la EIS para detectar la formación de coacervados complejos en el seno de la fase acuosa y se comparó la exactitud y sensibilidad de este enfoque con el método de potencial zeta, para determinar el punto de equivalencia.

8.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.2.1 Estequiometría protolítica

La Figura 5 presenta los resultados de las titulaciones protolíticas para las dispersiones de Ch (pH 3.5) y GA (pH 4.5) (Apéndice A). La Figura 5a corresponde a la dispersión de quitosano y los resultados se contrastaron con la solución de ácido acético utilizada para su preparación. Para lograr un valor de pH dado, la dispersión de quitosano requirió más adición de NaOH que la solución de ácido acético, lo que indica que las moléculas de quitosano estaban protonadas de manera efectiva. La protonación efectiva se puede expresar en términos del NaOH

agregado después de restar la adición correspondiente a la solución de ácido acético. Para el valor de pH en el que se produjo la formación del complejo (pH 3.5), la protonación de quitosano requirió 0.18 mL de la solución de titulación de NaOH 0.1 M/g de la dispersión de quitosano. Esto corresponde a 1.8×10^{-3} mol de NaOH/g de quitosano. De manera similar, la titulación de la dispersión de goma arábica (Figura 5b) resultó en 8×10^{-4} mol HCl/g goma arábica. De esta manera, la estequiometría de neutralización protolítica entre el quitosano y las soluciones de goma arábica puede representarse como la neutralización entre NaOH y HCl, correspondiente a una relación de aproximadamente 2.25. Es decir, se requerirán aproximadamente 2.25 g de dispersión de goma arábica para equilibrar 1 g de dispersión de quitosano.

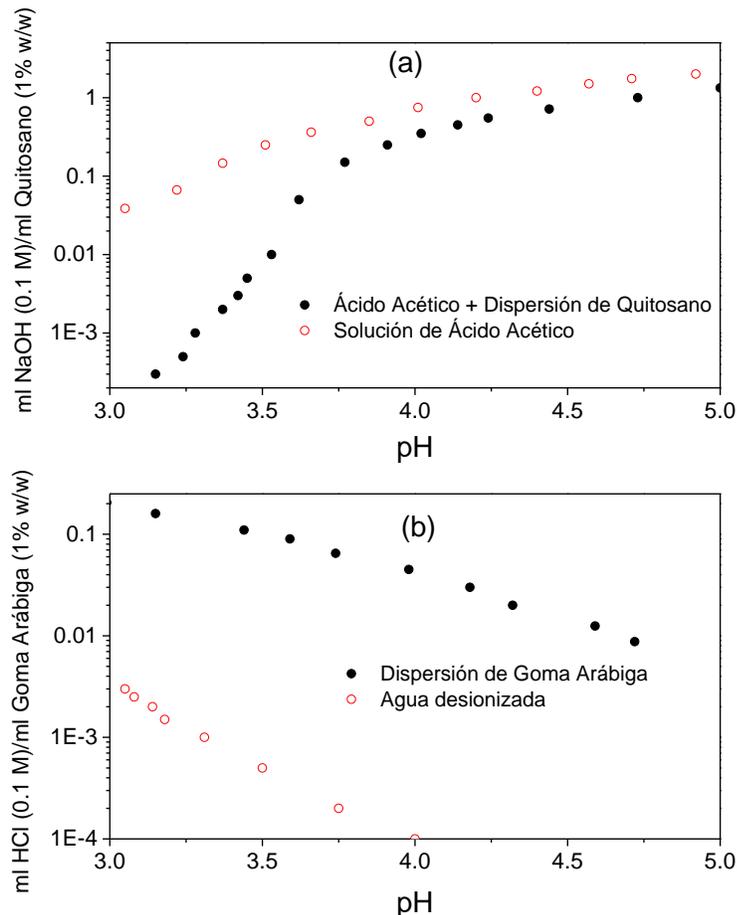


Figura 5. Curvas de titulación protolítica de las dispersiones de (a) quitosano (1% p/p) y (b) goma arábica (1% p/p).

8.2.2 Potencial- ζ

Dado que las interacciones entre polisacáridos aniónicos y catiónicos son principalmente debidas a interacciones electrostáticas, mediciones de potencial zeta son comúnmente usadas para probar la formación de complejos coacervados. La Figura 6 muestra los valores de potencial- ζ en función del pH para las dispersiones de quitosano (1% p/p) y goma arábica (1% p/p). Los grupos amino del quitosano se protonan en condiciones ácidas, lo que confiere un comportamiento catiónico a sus dispersiones. En contraste, la goma arábica contiene grupos carboxilo desprotonados, lo que lleva a un comportamiento aniónico de sus dispersiones. Por lo tanto, el quitosano exhibió valores de potencial- ζ siempre positivos, que se volvieron cada vez más positivos a medida que disminuía el pH, mientras que la goma arábica exhibió valores de potencial- ζ negativos, que se volvieron cada vez más negativos a medida que el pH aumentaba a valores neutros. Los valores de potencial de Ch variaron de aproximadamente de + 47 mV a pH 3 a +42 mV a pH 5, mientras que los de GA variaron de aproximadamente de -6 mV a pH 3 a -13 mV a pH 5. Dado que la interacción entre biopolímeros catiónicos y aniónicos involucran fuerzas electrostáticas, las mediciones del potencial- ζ se usan comúnmente para probar la formación de complejos de biopolímeros. La diferencia en la carga de protonación entre las moléculas de polisacáridos puede verse como la fuerza impulsora de las interacciones electrostáticas. El proceso de titulación comenzó cuando la dispersión de goma arábica (pH = 4.75) se agregaba gota a gota en la dispersión de quitosano (pH = 3.5). Los efectos de esto fueron un aumento gradual del pH de la mezcla de los biopolímeros, mientras que el valor positivo inicial de Ch se redujo a cero a medida que avanzaba la valoración con GA, hasta que finalmente se convirtió en un valor cada vez más negativo. La Figura 6 también muestra, la trayectoria de titulación seguida a medida que las relaciones de masa de los biopolímeros variaban de $R_{GA/Ch} = 1:1$ a $R_{GA/Ch} = 10:1$. Teniendo en cuenta que se logró un valor potencial de cero, considerado como el punto isoeléctrico, para un $R_{GA/Ch}$ de aproximadamente 5.5:1 y un pH de ~ 3.9 . La titulación protolítica en la Figura 5 indicó una relación $R_{GA/Ch}$ de aproximadamente 2:25 para lograr la neutralización. Esto significa que la interacción del biopolímero para $R_{GA/Ch}$

menor que 2:25 se debe a los mecanismos de neutralización. Para valores más altos de $R_{GA/Ch}$, la goma arábica está en un exceso estequiométrico en relación con el quitosano, incorporando cargas negativas en la estructura compleja. Entendiendo que el objetivo del exceso de biopolímero es estabilizar la estructura del coacervado complejo formando un entorno permeable.

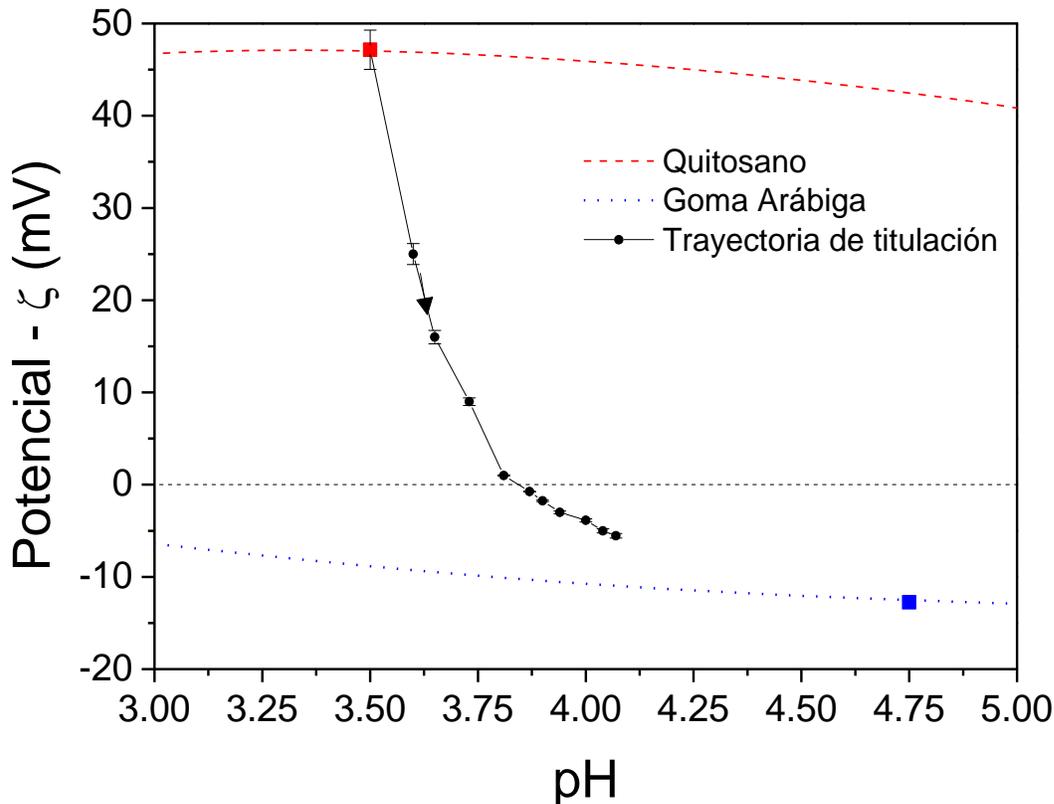


Figura 6. Trayectoria de titulación en el plano potencial- ζ -pH. El punto isoeléctrico se logra en alrededor de 5.5:1 relación de concentración.

8.2.3 Morfología

La Figura 7 muestra la formación de complejos [GA]/[Ch] hasta la relación 10:1. Para la relación 1:1 (Figura 7a) la concentración de goma arábica es tan baja, que solo son observadas las formaciones de estructuras incipientes con forma de oblea. La incorporación de más aniones de goma arábica incrementa la interacción electrostática con los cationes del quitosano lo cual es observado como agregados dispersos en el bulk del agua (Figura 7b y 7c). El surgimiento de una membrana similar, aunque fraccionada apareció en la relación 4:1 (Figura 7d). La morfología de este coacervado complejo fue consolidada con la adición de más moléculas de

goma arábica (Figura 7e). De hecho, la presencia de una membrana límite se observó fácilmente en la Figura 7f, en una relación 6:1 de concentración. El tamaño de estos coacervados complejos se encuentra entre 30-35 μm . La adición de más goma arábica conduce a la irrupción del complejo coacervado, dominando las cargas negativas, lo que afecta la distribución molecular de los enredos. De hecho, el interior del dominio del coacervado complejo se fracciona en varios subdominios (Figuras 7g y 7h).

La formación de una fase no coacervada dentro del coacervado es evidente a medida que la concentración se aumenta aproximadamente 9:1 y 10:1 (Figuras 7i y 7j).

La titulación de la dispersión de quitosano con la adición de goma arábica incrementa la complejidad de los agregados coloidales en la fase acuosa. Interacciones electrostáticas catión-anión, así como también polisacáridos cargados en agua son los responsables del surgimiento de complejos (Figura 7). Esta variedad de fases refleja las múltiples vías disponibles para los complejos goma arábica-quitosano.

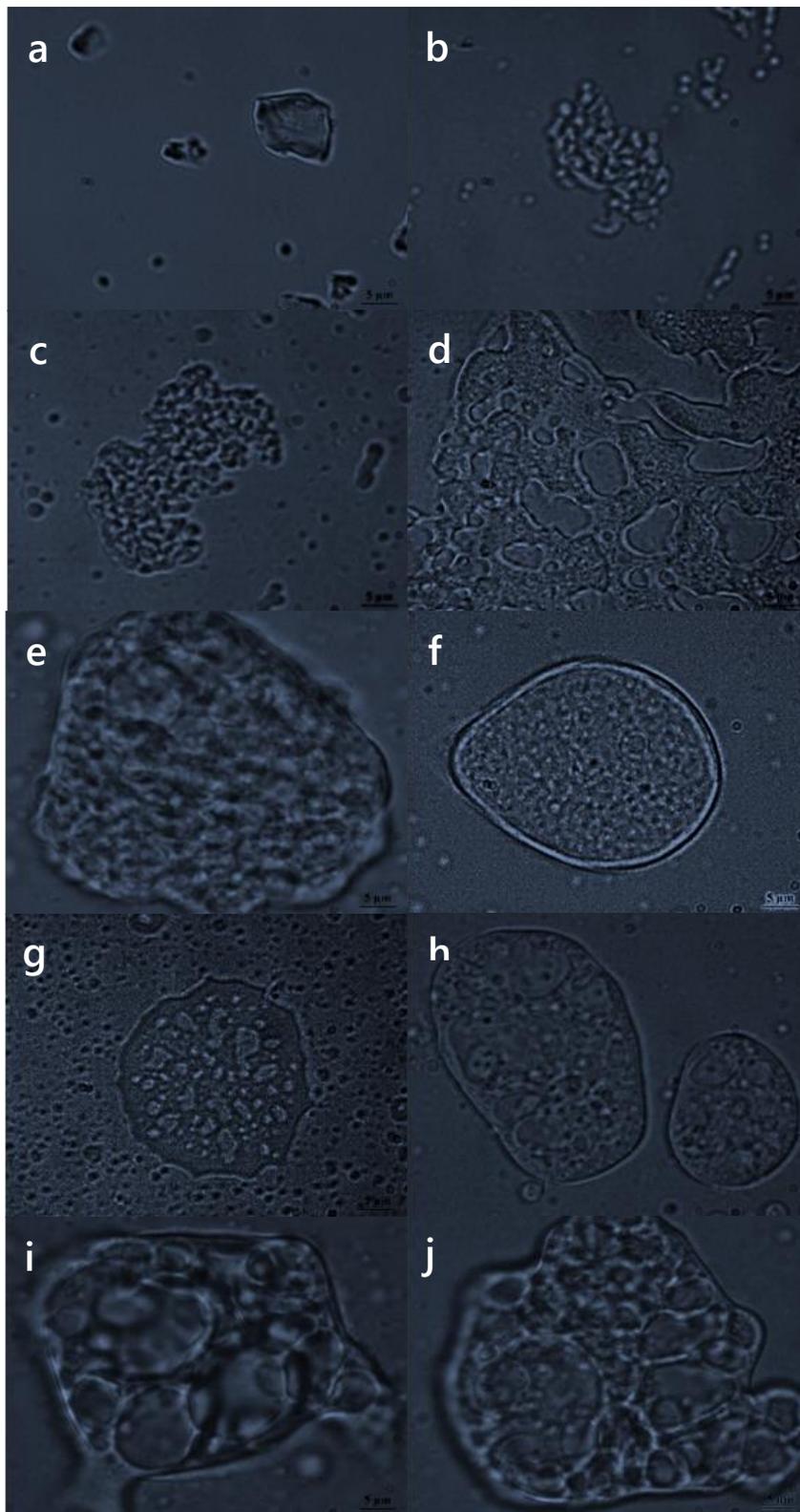


Figura 7. Imágenes ópticas que ilustran la morfología de coacervados complejos formados en diferentes proporciones de polisacáridos. Imágenes de (a) a (j) corresponden con las $R_{GA/Ch}$ de 1:1 a 10:1, respectivamente. Magnificación 100x.

8.2.4 Centrifugación Analítica

La complejación entre goma arábica y quitosano formó aislamientos y agregados de dimensiones coloidales que se reflejaron en dispersiones turbias. El rendimiento y la estabilidad de los complejos coloidales se pueden estudiar mediante centrifugación analítica. Los biopolímeros fuertemente complejados precipitan, mientras que los biopolímeros débilmente complejados se descomponen y permanecen solubles. La Figura 8a muestra la altura de sedimentación en función de $R_{GA/Ch}$. Esta altura es una medida del rendimiento del coacervado complejo, que alcanzó su valor máximo para $R_{GA/Ch}$ de 5:1. Esto está de acuerdo con informes anteriores en los que se obtuvo el máximo rendimiento para una proporción de masa de goma arábica/quitosano de 5:1 (Espinosa-Andrews, Báez-González, Cruz-Sosa, & Vernon-Carter, 2007). A medida que la relación de masa entre los biopolímeros se desviaba de este valor, el balance de densidad de carga entre los polisacáridos cargados de manera opuesta también se alejó de su valor estequiométrico y el balance eléctrico, lo que llevó a una producción reducida de coacervados complejos insolubles o la formación de ellos pero en menor tamaño.

La velocidad de sedimentación de los complejos insolubles se puede considerar como una medida de estabilidad (Detloff et al., 2006). Los valores altos de velocidad de sedimentación indicaron una alta estabilidad de los complejos de biopolímeros. Las velocidades de sedimentación más altas ocurrieron a $R_{GA/Ch}$ de 5:1 y 6:1 (Figura 8b). Las micrografías de la Figura 7 pueden relacionarse con los resultados de las Figuras 8a y 8b considerando en términos generales tres regiones distintivas con respecto al eje $R_{GA/Ch}$: a) $R_{GA/Ch}$ de ~1:1 a 4:1, caracterizado por una pequeña altura de sedimentación y una baja velocidad de sedimentación, donde los aniones de goma arábica no eran suficientes para formar enredos moleculares fuertes con los cationes de quitosano. Los complejos formados eran suficientemente pequeños para resistir la acción de la fuerza centrífuga (Figuras 7a a 7d). Después de la centrifugación, la dispersión se mantuvo como un líquido turbio. b) $R_{GA/Ch}$ de ~ 5:1 a 6:1, caracterizados por complejos agregados, densamente empaquetados y rodeados por una membrana límite (Figura 7e a 7g), que resistieron las tensiones de corte causadas por la fuerza centrífuga, produciendo un precipitado. Espinosa-

Andrews et al. (2007) informaron que los coacervados complejos de goma arábica-quitosano obtenidos en una relación de masa de 5:1 exhibían un comportamiento viscoelástico predominantemente líquido ya que el módulo de pérdida (G'') era mayor que el módulo de almacenamiento (G') en el rango de frecuencia de 1-100 rad/s, pero que había indicios claros de que un punto de cruce ($G' = G''$) podría ocurrir en frecuencias ligeramente superiores a 100 rad/s. Este comportamiento confirmó la presencia de una red reticulada, con características viscoelásticas más altas a pH 4.5 que a pH 6.0 y 3.0. Estos resultados coinciden estrechamente con la altura de sedimentación y las velocidades observadas para el $R_{GA/Ch}$ de ~ 5:1 a 6:1, y las micrografías (Figura 7e a 7g) de los complejos consolidados. c) $R_{GA/Ch}$ de 7:1 a 10:1, donde tanto la altura de sedimentación como la velocidad eran pequeñas. A pesar de los tamaños relativamente grandes de estas estructuras (Figura 7h a 7j), la disposición de celdas circundantes era inestable e incapaces de resistir el ataque de deformaciones externas por cizallamiento, causando el desmembramiento de los complejos agregados, en entidades coloidales de menor tamaño. El cual no precipitó bajo las condiciones de centrifugación aplicadas. El exceso de aniones de goma arábica probablemente introdujo fuerzas repulsivas dentro del dominio de los complejos, lo que dio lugar a la formación de subdominios fragmentados e incluso aislados.

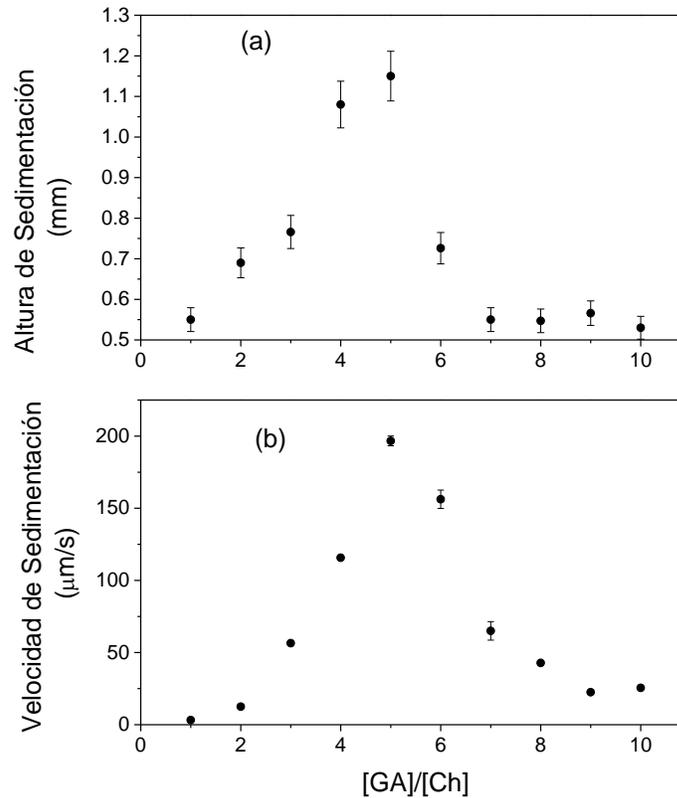


Figura 8. Altura de sedimentación (a) y velocidad (b) como función de la relación de concentración de polisacárido. La estabilidad óptima y la eficiencia fueron obtenidas a concentraciones en el rango de 5:1 a 6:1.

8.2.5 Espectroscopía de Impedancia Eléctrica (EIS)

La Figura 9 muestra los resultados de EIS en formatos de Bode (Figura 9a) y Nyquist (Figura 9b) para las dispersiones de goma arábiga y quitosano como función de una señal excitada de frecuencia. Es notado que los módulos eléctricos $Z_{\text{Re}}(\omega)$ y $Z_{\text{Im}}(\omega)$ están decayendo en función de la frecuencia. Este efecto es causado por la atenuación de los materiales probados en respuesta a la señal eléctrica alterna. La dispersión de quitosano muestra menores módulos de impedancia que la dispersión de goma arábiga sobre un amplio rango de frecuencias. Esto puede ser explicado desde que se preparó la dispersión de quitosano, la cual se hizo en condiciones ácidas usando ácido acético, que actúa como un electrolito.

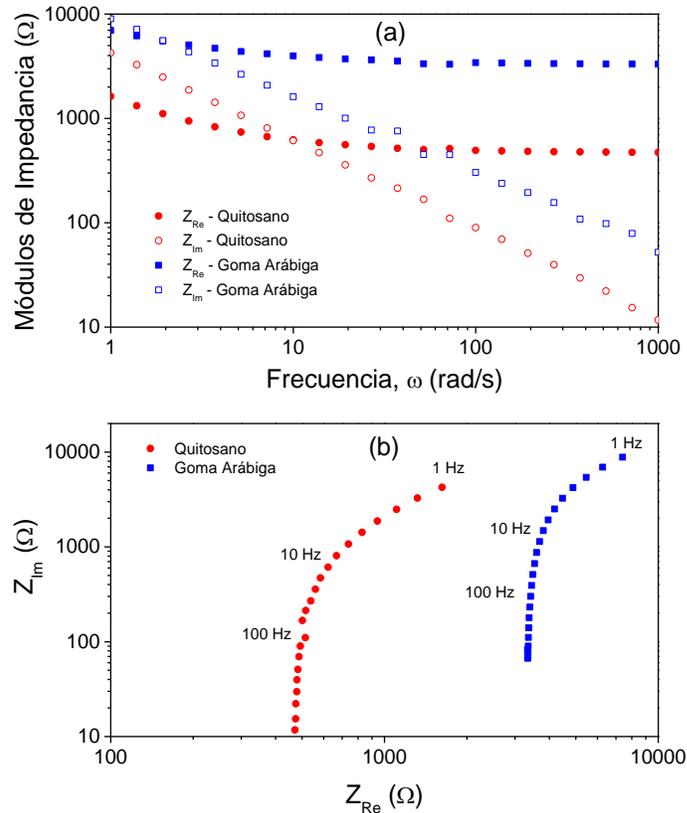


Figura 9. Mediciones de EIS para las dispersiones stock de goma arábica y quitosano. Gráficas en formato Bode (a) y Nyquist (b).

Los siguientes conceptos están en orden para guiar la discusión de los resultados de EIS mostrados en la Figura 9. La aplicación de un potencial alterno a un material excita un campo electromagnético inherente para la estructura del material. A su vez esto genera iones polarizados positivos y negativos, los cuales se mueven en dirección del campo eléctrico. El potencial eléctrico alterno conduce a un campo eléctrico alterno en el material, aunque con un retardo de tiempo que es consecuencia del tiempo de recuperación del estado de los iones. Es importante destacar que el retardo de tiempo es un retardo de tiempo de relajación que depende de la frecuencia de excitación y de las propiedades intrínsecas del material (Macdonald & Barsoukov, 2005). Uno tiene que valores pequeños de retardo de tiempo están relacionados con propiedades de resistencia eléctrica inherente del material.

Una pregunta interesante considerada en este trabajo es el estudio de la sensibilidad de las mediciones de EIS para la formación de coacervados complejos

quitosano-goma arábica. Para abordar esta pregunta, hagamos las siguientes observaciones relacionadas a los resultados de EIS mostrados en la Figura 9. En regiones de baja frecuencia (hasta aproximadamente 50 Hz), la pérdida o disipación del módulo $Z_{Re}(\omega)$ decae monótonamente. Mientras que, en la región de alta frecuencia estos módulos alcanzan un valor constante. En contraste, el módulo de almacenamiento $Z_{Im}(\omega)$ exhibe un patrón de decaimiento sin llegar a un valor asintótico. El patrón de decaimiento de los módulos EIS puede ser relacionado a cambios de capacitancia eléctrica del fluido que rodea el electrodo electroquímico.

De hecho, la impedancia eléctrica de un capacitor puro, está dado por $Z(\omega) = -j\omega^{-1}$ indicando un decaimiento en función con la frecuencia. Es bien conocido que la doble capa iónica aparece cuando un fluido electrolítico está en contacto con el electrodo. La primera capa, contiene iones absorbidos en la superficie debido a interacciones químicas (Redox) o por mecanismos de solubilidad. La segunda capa está compuesta de iones atraídos a la vecindad de la primera capa por las fuerzas de Coulomb. Esta capa no está firmemente anclada a la superficie del electrodo, pero es una capa suelta compuesta de iones que se mueven de forma difusiva bajo los efectos de la atracción eléctrica. De esta manera, la segunda capa se denomina como capa difusa. En una analogía con circuitos eléctricos, la estructura de doble capa comprende un efecto de capacitancia eléctrica debido a la acumulación de iones en la superficie y en la vecindad del electrodo. Además, la movilidad de los iones en la capa difusa puede estar vinculada a una resistencia de transporte debido a los efectos de difusión. En general, la capacitancia en la doble capa iónica depende de la constante dieléctrica del electrolito y el espesor de la doble capa.

Una técnica útil para estimar los parámetros de capacitancia y resistencia asociados a los datos EIS es determinar los parámetros de un circuito eléctrico equivalente.

Se puede observar que en la región de baja frecuencia de los módulos $Z_{Re}(\omega)$ y $Z_{Im}(\omega)$ decaen como $O(\omega^{-\alpha})$, con un exponente descomposición fraccional del orden de $\alpha \approx 0.8$. De esta manera, el potencial de polarización de las especies iónicas no se puede caracterizar con precisión mediante circuitos equivalentes simples de orden entero. Siguiendo a Westerlund, Ekstam, and Insulation (1994), la

doble capa iónica puede ser descrita con mayor precisión por una capacitancia de orden fraccional que por una de orden entero. En este caso, el circuito equivalente está compuesto por la resistencia R_m de un electrolito activo (medio), en serie con un arreglo en paralelo de una resistencia R_{dl} de la doble capa (o de transferencia de carga) y un elemento de fase constante (CP) que representa el condensador del orden fraccional (véase la Figura 10). La impedancia del circuito de orden fraccional equivalente está dada por:

$$Z(j\omega) = R_m + \frac{R_{dl}}{1 + (j\tau_{dl}\omega)^\alpha} \quad (3)$$

Donde τ_{dl} es la constante de tiempo de relajación de la doble capa dado por $\tau_{dl} = R_{dl}C_{dl}$. Donde, C_{dl} es la capacitancia de la doble capa. Este es valioso tener en cuenta que el condensador de orden fraccional $(j\tau_{dl}\omega)^{-\alpha}$ puede ser visto como un dispositivo electrónico situado entre un condensador puro ($\alpha = 1$) y un elemento de difusión Warburg ($\alpha = 0.5$).

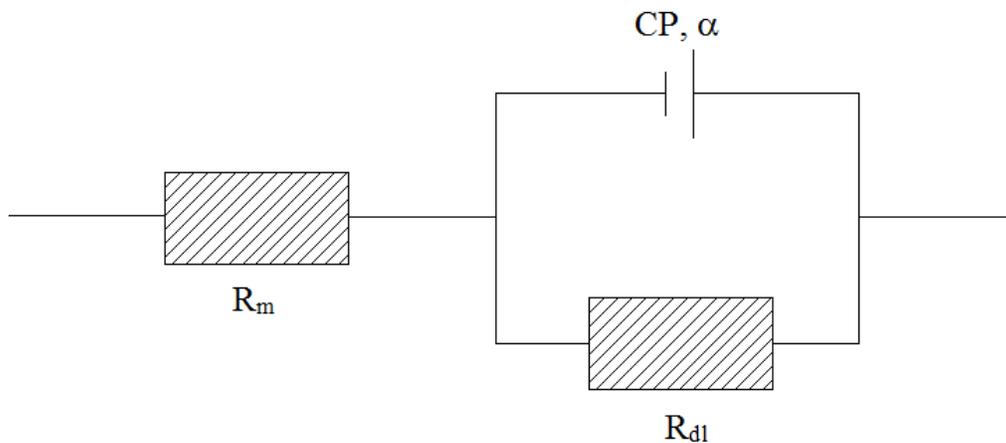


Figura 10. Diagrama que esquematiza el circuito Randles equivalente de orden fraccional.

Usando la fórmula de Euler, uno puede mostrar que los módulos de impedancia están dados por:

$$Z_{\text{Re}}(\omega) = R_m + \frac{R_{dl} \left(1 + \tau_{dl}^\alpha \omega^\alpha \cos\left(\frac{\alpha\pi}{2}\right) \right)}{\left(1 + \tau_{dl}^\alpha \omega^\alpha \cos\left(\frac{\alpha\pi}{2}\right) \right)^2 + \left(\tau_{dl}^\alpha \omega^\alpha \sin\left(\frac{\alpha\pi}{2}\right) \right)^2} \quad (4)$$

Y

$$Z_{\text{Im}}(\omega) = \frac{R_{dl} \tau_{dl}^{\alpha} \omega^{\alpha} \sin\left(\frac{\alpha\pi}{2}\right)}{\left(1 + \tau_{dl}^{\alpha} \omega^{\alpha} \cos\left(\frac{\alpha\pi}{2}\right)\right)^2 + \left(\tau_{dl}^{\alpha} \omega^{\alpha} \sin\left(\frac{\alpha\pi}{2}\right)\right)^2} \quad (5)$$

Se puede demostrar que el módulo imaginario decae $O(\omega^{-\alpha})$ como en la región de alta frecuencia (es decir, para las frecuencias $\omega \gg \tau_{dl}^{-1}$). Este comportamiento es coherente con el patrón mostrado por las dispersiones de quitosano y goma arábica en la Figura 9a. Las ecuaciones (4) y (5) se utilizaron para describir los datos experimentales de EIS en la Figura 9. Con este fin, se implementó un código informático Fortran adaptado para estimar el conjunto de parámetros $\{R_m, R_{dl}, \tau_{dl}, \alpha\}$ a través de la solución numérica de un problema de error de mínimos cuadrados. La Figura 11 compara las funciones ajustadas con los datos experimentales, que muestra una buena concordancia para ambos casos. Los parámetros estimados se exhiben en la Tabla 1. Como se esperaba, la dispersión de quitosano presenta valores de resistencia más pequeños que la dispersión de goma arábica. Sin embargo, la constante de tiempo de relajación para la dispersión de quitosano fue mayor (aproximadamente 70%) que el valor obtenido para la dispersión de goma arábica.

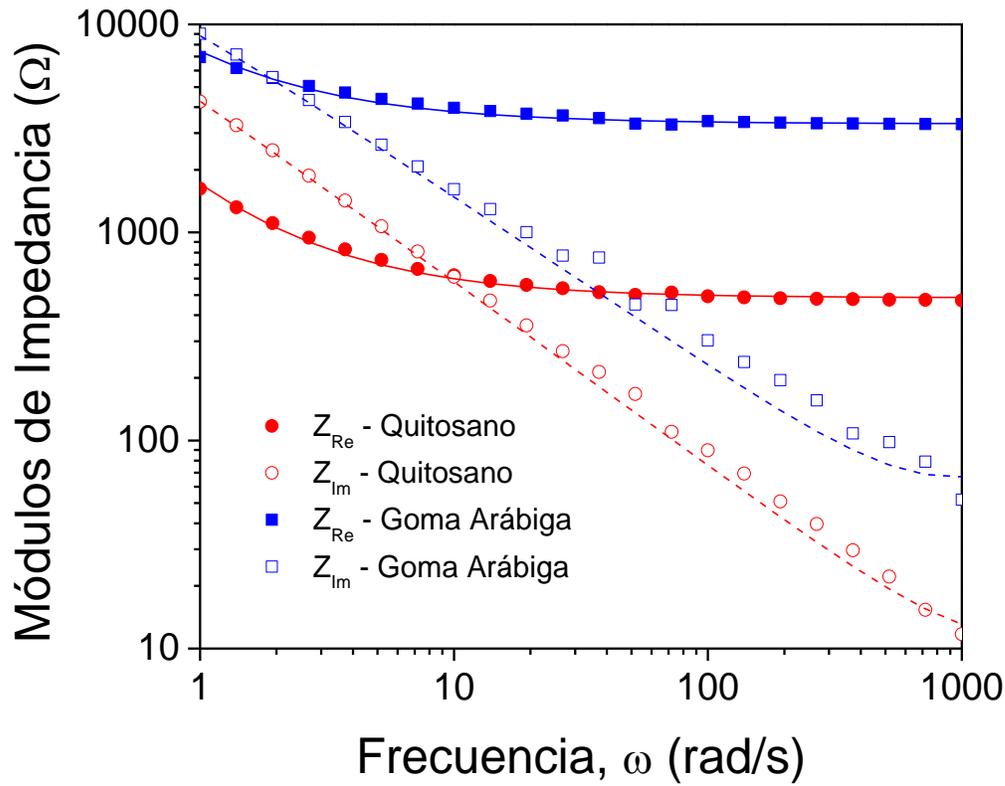


Figura 11. Circuito Randles de orden fraccional ajustado, usando los datos experimentales de EIS de la Fig. 9.

Dado que $\tau_{dl} = R_{dl}C_{dl}$, la resistencia es más pequeña y la constante de tiempo mayor, implican que la capa doble de la dispersión de quitosano es más capacitiva que la respectiva doble capa de la dispersión de goma arábica. El exponente fraccionario fue ligeramente mayor para la dispersión de quitosano que para la dispersión de goma arábica.

Tabla 1. Parámetros de circuito Randles de orden fraccional para las muestras stock.

Muestra	pH	R_m (kΩ)	R_{dl} (kΩ)	τ_{dl} (s)	α
Quitosano	3.55	0.48 ± 0.02	44.01 ± 1.23	16.86 ± 1.22	0.89 ± 0.02
Goma Arábica	4.75	3.23 ± 0.15	64.02 ± 2.75	9.37 ± 0.52	0.83 ± 0.03

Los valores son medias de triplicados \pm error estándar.

La prueba de EIS también se aplicó al proceso de coacervación compleja, con módulos de impedancia que exhiben un patrón similar a la de las dispersiones de

quitosano y goma arábica. De esta manera, las funciones de impedancia teóricas están dadas por las ecuaciones (4) y (5), las cuales se utilizaron para ajustar los datos experimentales de EIS. La Figura 10 muestra el cambio de los parámetros del circuito equivalente $\{R_m, R_{dl}, \tau_{dl}, \alpha\}$ con la relación de concentración goma arábica-quitosano. Acerca de esto, se puede comentar lo siguiente:

- La resistencia del medio electrolítico (R_m) aumentó con la adición de goma arábica. El aumento fue aparentemente lineal hasta $R_{GA/Ch}$ de 5:1, donde se muestra un punto de inflexión. La línea vertical punteada representa el valor al que la mezcla alcanza el punto isoeléctrico (Figura 6) y donde se obtuvo la máxima estabilidad del coacervado complejo (Figura 7). Para más adiciones de goma arábica, la resistencia del medio electrolítico también mostró un aumento sostenido, aunque con una tasa menor.
- La resistencia de doble capa (R_{dl}) también aumentó con la adición de goma arábica, hasta $R_{GA/Ch}$ de 5:1. En contraste con la resistencia medio electrolítico R_m , la resistencia de doble capa logra un valor máximo en el punto isoeléctrico para mostrar una ligera disminución de $R_{GA/Ch}$ mayores a 5:1.
- La constante de tiempo de relajación (t_{dl}) se redujo con la adición de goma arábica. Después de que el punto isoeléctrico que corresponde a aproximadamente a $R_{GA/Ch}$ de 5.5:1, la constante de tiempo alcanza un valor constante de alrededor de 11,75 segundos.
- El exponente de orden fraccional (α) muestra una ligera disminución con la adición de goma arábica. Parece que este exponente consigue un valor mínimo en las condiciones de punto isoeléctrico. La disminución mostrada por el exponente de orden fraccional indica que la adición de goma arábica dio lugar a una ligera disminución de los componentes capacitores del elemento de fase constante.

En todos los casos, el comportamiento de los parámetros del circuito equivalente cambia su comportamiento cerca del punto isoeléctrico, donde se obtuvo la máxima estabilidad y producción del coacervado complejo. Esto significa que los parámetros del circuito equivalente son sensibles a la formación de coacervados complejos quitosano-goma arábica. En términos generales, el punto de titulación al que la variación de los parámetros del circuito equivalente mostró un punto de ruptura,

corresponde con las condiciones óptimas para obtener la mayor cantidad con la máxima estabilidad del coacervado complejo.

Un tema interesante es cómo se relaciona el punto de ruptura de los parámetros del circuito con el mecanismo involucrado en la formación del complejo coacervado estable. El punto de partida es el quitosano dispersado homogéneamente en una solución de ácido acético. El quitosano exhibe tres tipos de sitios funcionales que pueden interactuar con otras moléculas por enlaces eléctricos o de hidrógeno; es decir, un grupo amino y grupos hidroxilo primarios y secundarios en las posiciones C-2, C-3 y C-6, respectivamente (Furusaki, Ueno, Sakairi, Nishi, & Tokura, 1996). Además, el grupo acetilo muestra un cierto grado de hidrofobicidad (Leite & Ribeiro, 2012). El polielectrolito activo estaba compuesto por una pequeña cantidad de iones obtenidos de la disociación del ácido acético, así como por los grupos amino protonados del quitosano. De esta manera, el quitosano actuó como un polication que podía transferir cargas y polarizarse frente a un potencial alternativo. Los grupos carboxilo desprotonados de la goma arábica interactuaron con los grupos amino protonados del quitosano interacciones electrostáticas y químicas (a través de reacciones redox), para formar complejos de biopolímeros en el centro de la dispersión. El resultado fue una disminución efectiva de los polielectrolitos activos, logrando un mínimo en el punto isoeléctrico donde los restos del grupo amina del quitosano estaban equilibrados por los restos del grupo carboxilo desprotonado de la goma arábica. Desde el punto de vista eléctrico, la reducción del electrolito activo en la dispersión de prueba se reflejó como un aumento de la resistencia eléctrica y una disminución de la capacitancia eléctrica. Estos cambios fueron detectados efectivamente por la respuesta EIS de los complejos de biopolímeros en la dispersión.

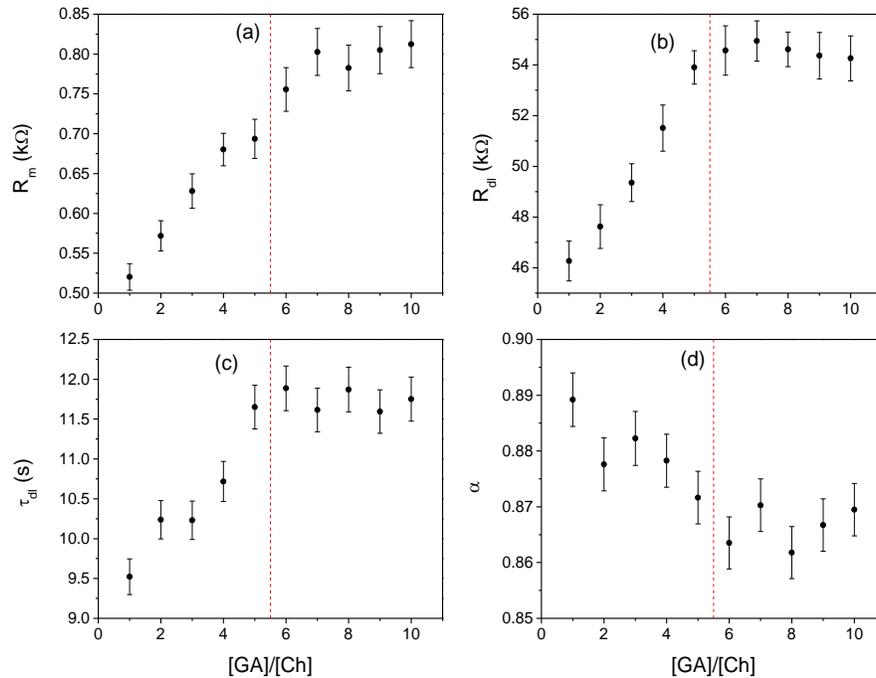


Figura 12. Cambios de los parámetros del circuito Randles de orden fraccional con el coeficiente de concentración goma arábigo-quitosano. La línea vertical punteada en rojo representa las condiciones en que se alcanza el punto isoeléctrico.

Los resultados obtenidos con el enfoque EIS se contrastaron con las mediciones de conductividad de DC. La Figura 13 muestra simultáneamente la resistencia de doble capa del circuito Randles y la conductividad de DC como funciones de la relación GA/Ch. La conductividad de DC disminuyó para proporciones pequeñas de GA/Ch, hasta aproximadamente 4:1. Posteriormente, la conductividad tendió a alcanzar un valor casi constante para proporciones de GA/Ch más altas. La disminución de la conductividad del sistema se puede atribuir a una disminución de los polielectrolitos disponibles en el medio a medida que el material se utiliza para la formación de complejos. A medida que se incorpora más goma arábigo, más allá del punto isoeléctrico de 5.5:1, la conductividad mostró un ligero aumento inducido por la mayor disponibilidad de iones libres de la goma arábigo. En relación con los resultados de las mediciones de IES donde la tasa de cambio de la resistencia de doble capa disminuyó bruscamente en el punto isoeléctrico, los resultados obtenidos con las mediciones de conductividad de DC no fueron claramente concluyentes. Aunque la conductividad exhibió un valor mínimo de aproximadamente 4:1, la falta de claridad en el cambio de conductividad con

respecto a la proporción de GA/Ch puede explicarse por la sensibilidad y precisión relativamente bajas en los medios que muestran una conductividad relativamente alta (Ghasemi et al., 2014). El problema se basa en el efecto de saturación en la superficie del electrodo, lo que conduce a distorsiones en la conductividad efectiva de las cargas en el medio. El uso de mediciones EIS disminuye los efectos de saturación ya que el voltaje de polarización permite la eliminación de adsorbatos en la superficie del electrodo.

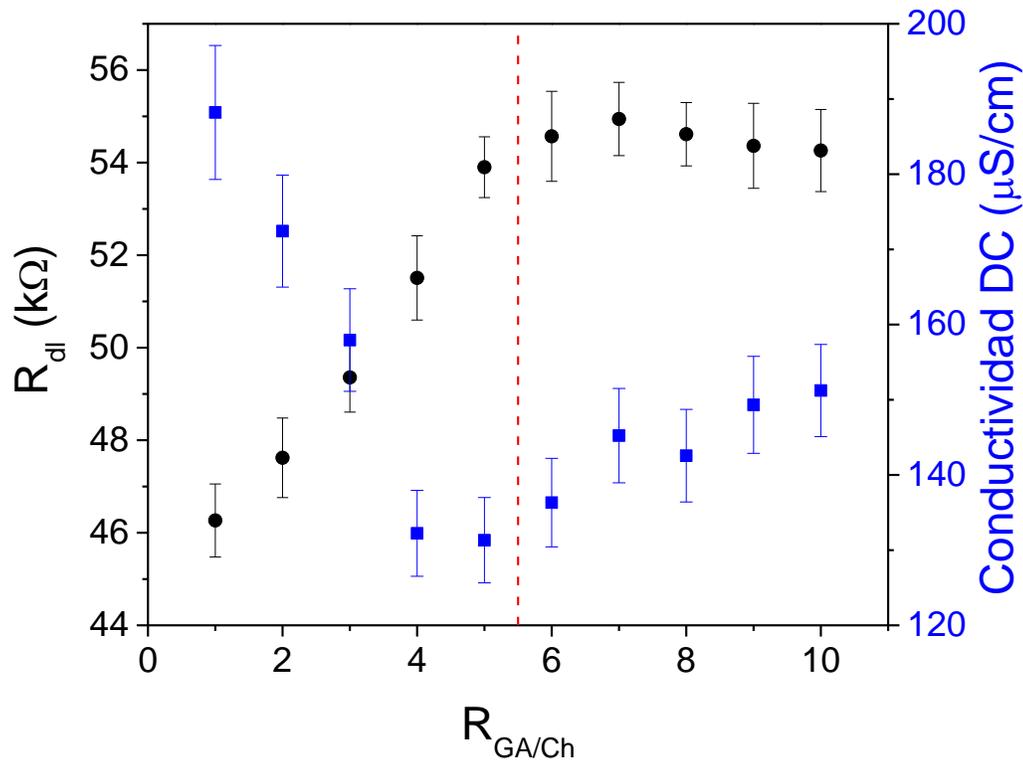


Figura 13. Conductividad DC en comparación con la resistencia de doble capa en función de la proporción de goma arábigo-quitosano $R_{GA/Ch}$.

8.2.6 Implicaciones mecanicistas de la formación de complejos entre goma arábigo y quitosano.

La Figura 7 muestra que la formación de complejo de GA/Ch depende de la proporción de biopolímero $R_{GA/Ch}$. Sobre la base de los resultados y la discusión descritos anteriormente, un mecanismo de formación de coacervados complejos se puede describir de la siguiente manera. Los mecanismos de equilibrio protolítico dominan la formación de complejos para valores pequeños de $R_{GA/Ch}$, hasta aproximadamente 2.5, donde la estequiometría juega un papel importante. La

relación estequiométrica refleja un equilibrio entre los grupos amina protonados de quitosano y los grupos carboxilo desprotonados de goma arábica. Es posible que los enlaces de hidrógeno y posiblemente las interacciones de Van der Waals estén involucradas en esta fase, manteniendo la cohesión de la microestructura compleja (Leite & Ribeiro, 2012). Los posibles mecanismos de interacción electrónica entre el quitosano y las moléculas de goma arábica pueden ser causados por enlaces de hidrógeno a través de grupos funcionales como los grupos hidroxilo, amino y carbonilo. Más allá del equilibrio estequiométrico, la mayor adición de goma arábica aumenta las fuerzas repulsivas electrostáticas negativas, promoviendo la formación de una membrana permeable circundante. En el punto isoeléctrico correspondiente a valores $R_{GA/Ch}$ de aproximadamente 5.5, las fuerzas electrostáticas se equilibran, lo que lleva a la consolidación de la microestructura compleja. Esto está en contexto con los estudios que sugieren que las fuerzas intermoleculares son más importantes que la neutralización protolítica en la formación de flóculos estables con quitosano (Furusaki et al., 1996; Strand, Nordengen, & Østgaard, 2002). Para valores más altos de $R_{GA/Ch}$, las fuerzas electrostáticas negativas inducidas por el exceso de goma arábica conducen al surgimiento de mecanismos de desestabilización, lo que lleva a microestructuras complejas frágiles que pueden romperse por fuerzas de corte.

8.3 CONCLUSIONES

La formación de coacervados complejos quitosano-goma arábica en fase acuosa fue monitoreada por espectroscopía de impedancia eléctrica (EIS). Se observó que los parámetros que caracterizan los datos EIS cambian en función de la relación de concentración de polisacárido y frecuencia. El cambio con la frecuencia refleja la atenuación de la polarización como proceso inducido por un potencial excitante alterno. En contraste, el cambio con la relación de concentración fue debido a las variaciones de las especies electrolíticas activas como consecuencia de la formación de estructuras del coacervado complejo. Con el fin de detectar cambios sensibles de los datos de EIS, se utilizó un circuito equivalente Randles de orden fraccional para describir los datos experimentales. Se encontró que la resistencia eléctrica en todo el rango de frecuencias (de 1 a 1000 Hz) era sensible a cambios

en los arreglos moleculares cuando se forman coacervados complejos. Se detectaron los cambios de resistencia como un punto de quiebre en las variaciones de los parámetros de resistencia involucrados en el circuito Randles de orden fraccional.

El enfoque de EIS fue capaz de determinar el punto en que se formaron coacervados quitosano-goma arábica. El método es relativamente simple de implementar y, junto con las mediciones de potencial- ζ , se convierte en una alternativa práctica para vigilar la evolución de coacervación compleja. El método requiere algunas mejoras, incluyendo pruebas con otros sistemas (por ejemplo, proteína-polisacáridos) y los efectos del orden de titulación (por ejemplo, añadir goma arábica a la dispersión de quitosano o viceversa).

9. **CAPÍTULO III: Evaluación de la
estabilidad de emulsiones O/W
basadas en Tween-80 con
voltametría cíclica y espectroscopía
de impedancia eléctrica.**

9.1 Introducción

Las emulsiones son ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética para el suministro de agentes bioactivos tales como antioxidantes, vitaminas, antibióticos, nutrición parenteral, fitoesteroles y ácidos grasos omega-3 (Cavazos-Garduño, Ochoa-Flores, Serrano-Niño, Beristain, & García, 2014; Cui, Cho, McClements, Decker, & Park, 2016; Tamnak et al., 2016; Zhang, Zhang, Zhang, Decker, & McClements, 2015). Las emulsiones elaboradas con tensoactivos de calidad alimentaria tales como di- y triglicéridos, polyoxylglycerides caprilcaproilo (Labrasol), polietilenglicol (25) éter -cetostearyl (Cremophor) y polioxietileno (20) sorbitan monooleato (Tween 80) son susceptibles a la desestabilización por factores del entorno, tales como pH, temperatura y fuerza iónica. La coalescencia, agregación, cremado y la inversión de fases son los principales mecanismos implicados en la inestabilidad de la emulsión. Por ejemplo, el cremado es causado por diferencias en la densidad de masa entre la fase dispersa y la fase continua. Por otro lado, la coalescencia se produce cuando las gotas se acercan por algún tiempo.

Atendiendo a estas razones, se han tomado algunos enfoques sistemáticos para evaluar la estabilidad de las emulsiones. La reología interfacial es un enfoque fundamental ya que el fenómeno interfacial se ha vinculado a la estabilidad de la emulsión (Krägel, Derkatch, & science, 2010). La idea subyacente es que el comportamiento de flujo interfacial es controlado por la presencia de compuestos (por ejemplo, tensoactivos, proteínas, monocapas insolubles, lípidos, macromoléculas o partículas) en la capa interfacial. La microestructura de la interfase está formada por la adsorción de moléculas activas interfaciales y la unión de partículas o mediante la difusión o formación de la capa de sustancias anfífilas insolubles. Aunque el uso de la medición de las propiedades interfaciales para predecir la estabilidad de la emulsión está en aumento, la interpretación de los resultados no es siempre una tarea fácil y directa. La estabilidad de las emulsiones ha sido tradicionalmente reportada como el cambio de tamaño de gota en el tiempo. En este sentido, la centrifugación analítica se ha considerado como una técnica fiable para obtener información en la estabilidad de la emulsión por efectos de

cremación, agregación y coalescencia (Detloff et al., 2006; Lerche, Sobisch, & Technology, 2011). La técnica se basa en mediciones de dispersión de la luz bajo centrifugación acelerada y la estabilidad de la emulsión se cuantifica en términos de fusión/formación de tasa de cremado. Por otra parte, métodos tomados de la electroquímica (por ejemplo, voltametría cíclica y espectroscopía de impedancia eléctrica (EIS)) también se han explorado para la caracterización de emulsiones (Perini, Prado, Sad, Castro, & Freitas, 2012). Los resultados mostraron que los parámetros de los circuitos eléctricos equivalentes utilizados para los ajustes de las mediciones de EIS pueden proporcionar información valiosa en la estabilidad de las emulsiones W/O.

Por otro lado, el Tween-80 es un tensoactivo no iónico sintético típico con amplias aplicaciones en la industria de alimentos y de polímeros. El mecanismo de estabilización reside en la capacidad del tensoactivo para reducir la tensión interfacial por períodos relativamente cortos. La molécula de Tween-80 es anfifílica, lo que significa que tiene cabezas hidrófobas e hidrófilas. Cuando se añade a una mezcla de aceite/agua, las moléculas de Tween-80 migran a la interfase para acomodar la cabeza hidrófila en la fase acuosa y la cola hidrófoba en la fase oleosa. El resultado es la reducción de la tensión interfacial, y por lo tanto la tendencia de la interfaz aceite/agua a colapsarse. La estabilidad de la emulsión se logra cuando las moléculas de tensoactivo cubren toda la interfase aceite/agua, evitando de esta manera la coalescencia de las gotas y la agregación de los efectos de repulsión eléctrica. Para una fracción dada de fase oleosa, una cuestión interesante es la cantidad mínima de agente tensoactivo necesario para alcanzar la máxima estabilidad de las emulsiones. La cuestión tiene también un aspecto económico ya que la concentración de tensoactivo excesiva no conduce necesariamente a una mayor estabilidad, aunque el costo de fabricación de emulsiones puede verse afectado negativamente.

Por lo expuesto anteriormente, el objetivo de ésta etapa del trabajo fue evaluar la estabilidad de emulsiones O/W, en función de la concentración de tensoactivo Tween 80. Con este fin, se utilizaron los métodos de electroquímica (Macdonald & Barsoukov, 2005) para caracterizar la estabilidad de las emulsiones de aceite/agua

con respecto a la cantidad de tensoactivo. La voltametría cíclica se ha utilizado para la determinación de la concentración micelar crítica (CMC), la cual fue estimada como la concentración de tensoactivo en el que la corriente anódica/catódica exhibe una transición brusca (Ma et al., 1998; Mandal, Nair, & Ramaswamy, 1988; Mandal & Nair, 1991). Se ha demostrado que las mediciones de EIS pueden proporcionar información valiosa de la estructura y la estabilidad de partículas coloidales (H. De Oliveira et al., 2008; H. P. de Oliveira & de Melo, 2011). La EIS se ha propuesto para la determinación de CMC (Ghasemi et al., 2014). En este trabajo la CMC se estimó como la concentración a la que los parámetros del circuito equivalente Randles exhiben una transición brusca. La EIS también se ha utilizado para la caracterización del comportamiento coloidal de emulsionantes iónicos en disolventes no polares (Abdollahi et al., 2014). La estabilidad de emulsiones agua-en-aceite (petróleo) se caracterizó por las mediciones de EIS in situ a través de parámetros estimados (resistencia y conductividad) de un circuito eléctrico equivalente (Perini et al., 2012).

9.2 Resultados y discusión

La estabilización de emulsiones a través de tensoactivos no iónicos se basa en la repulsión estérica como la interfase aceite/agua se cubre con la cabeza hidrofóbica apuntando hacia la fase acuosa. En lo que sigue, la estabilidad de la emulsión se discutirá en términos de cambios de diámetro medio de las gotas y tasa de cremado, además se compara con los resultados obtenidos a partir de voltametría y EIS.

9.2.1 Morfología y diámetro medio de las gotas de la emulsión

La Figura 14 presenta las imágenes de microscopía óptica ilustrativas de emulsiones para 0.25, 1.0 y 3% v/v de concentración de Tween-80. La figura 14a muestra que bajas concentraciones de tensoactivo (0.25% v/v) no conducen a una distribución de gotas uniforme. De hecho, gotas de diámetro pequeño y grande se pueden observar, lo que refleja la falta de moléculas de surfactante para cubrir la mayor área interfacial de las gotas de pequeño diámetro. Como era de esperar, una mayor cantidad de moléculas de tensoactivo permite la estabilización de una zona interfacial más grande, lo que lleva de esta manera a gotas de diámetro más pequeño (Figura 14b). Es evidente que el aumento de la concentración de

tensoactivo produce una emulsión más estable como el exceso de moléculas de tensoactivo permite un recubrimiento homogéneo de la interfase aceite/agua.

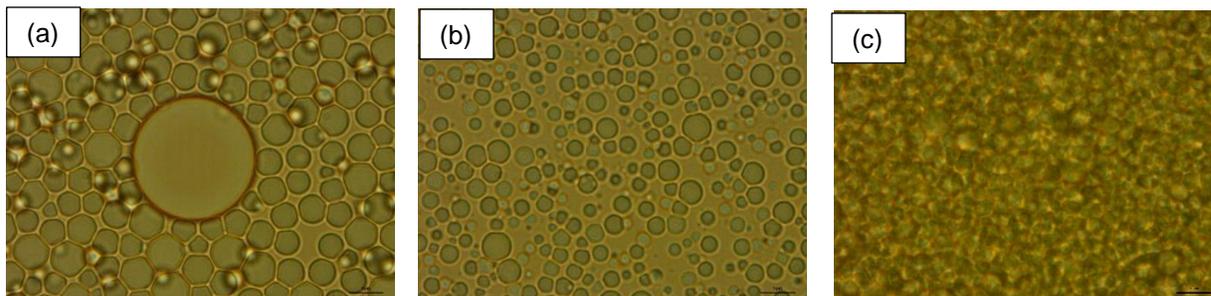


Figura 14. Imágenes de microscopía óptica de emulsiones con diferentes cantidades de tensoactivo Tween- 80. (a) 0.25, (b) 1.0 y (c) 3.0% v/v. Es notable que a mayor concentración de tensoactivo, menor tamaño de diámetro de gota.

La Figura 15 presenta el diámetro medio de las gotas en función de la concentración de tensoactivo para las emulsiones frescas (0 días) y después de 7 días. El diámetro medio de las gotas de la emulsión fresca exhibió un decaimiento exponencial con una tasa de decaimiento de aproximadamente 1.6 ± 0.2 (% v/v). Básicamente, el diámetro de gota cambió ligeramente sólo para concentraciones de tensoactivo superior a aproximadamente 2.0% v/v. Para concentraciones relativamente altas de surfactante, el diámetro de gota logró un diámetro medio casi constante de aproximadamente 0.75 micras. La reducción adicional del diámetro de las gotas por las moléculas de tensoactivo no iónico Tween-80 agregadas en exceso no es posible debido a la capacidad limitada para estabilizar la curvatura de las pequeñas gotas, según lo propuesto por la ecuación de Young-Laplace (Komaiko & McClements, 2015). Después de 7 días, el diámetro medio de las gotas de las emulsiones de baja concentración de agente tensoactivo muestra un importante cambio de aproximadamente 50%. Por el contrario, un aumento de la concentración de tensoactivo dio lugar a una estabilización de la emulsión O/W como el diámetro medio de las gotas aumentó sólo ligeramente. Una mayor cantidad de moléculas de tensoactivo permite un recubrimiento más uniforme de la interfaz, mejorando de esta manera los mecanismos estéricos.

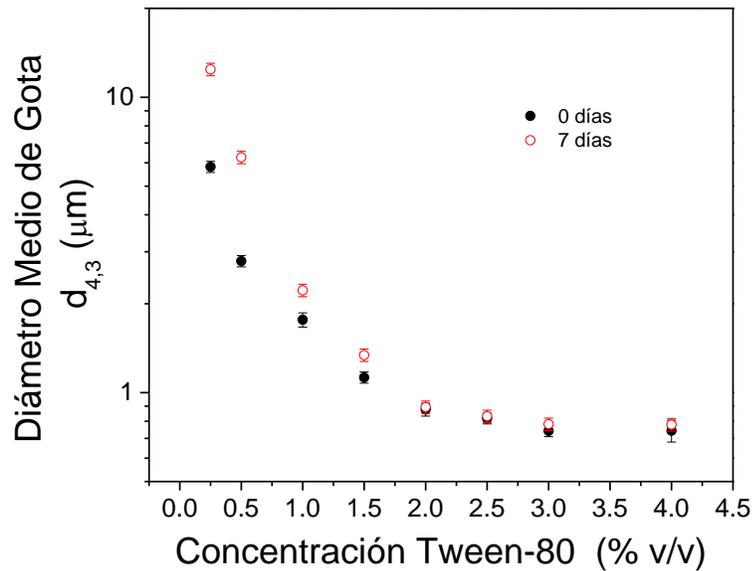


Figura 15. Diámetro medio de gota ($D_{4,3}$) de emulsiones frescas (0 días) y emulsiones almacenadas (7 días).

9.2.2 Estabilidad acelerada

Las emulsiones se sometieron a centrifugación analítica para evaluar la estabilidad en términos de la tasa de cremado. Los resultados se muestran en la Figura 16 como función de la concentración de tensoactivo. La tasa de cremado fue aprox. 450 $\mu\text{m}/\text{h}$ para concentraciones de tensoactivo de hasta 1.5% v/v. La tasa de cremado exhibió una fuerte reducción en a la concentración de tensoactivo alrededor de 2.0% v/v, para alcanzar un valor de aproximadamente 50 $\mu\text{m}/\text{h}$ para concentraciones de tensoactivo superiores. Los resultados anteriores indicaron que la emulsión O/W era inestable para bajas concentraciones de tensoactivo, hasta 1.5% v/v. En contraste, se obtuvo estabilización para concentraciones de tensoactivo superiores a 2% v/v. Es evidente que la estabilización de la emulsión se logró cuando la concentración de tensoactivo alcanzó un valor cercano a 2% v/v cuando la interfaz aceite/agua estaba totalmente cubierta por las moléculas de tensoactivo. Tal cubierta reduce drásticamente la coalescencia de las gotas y floculación en virtud de los efectos estéricos.

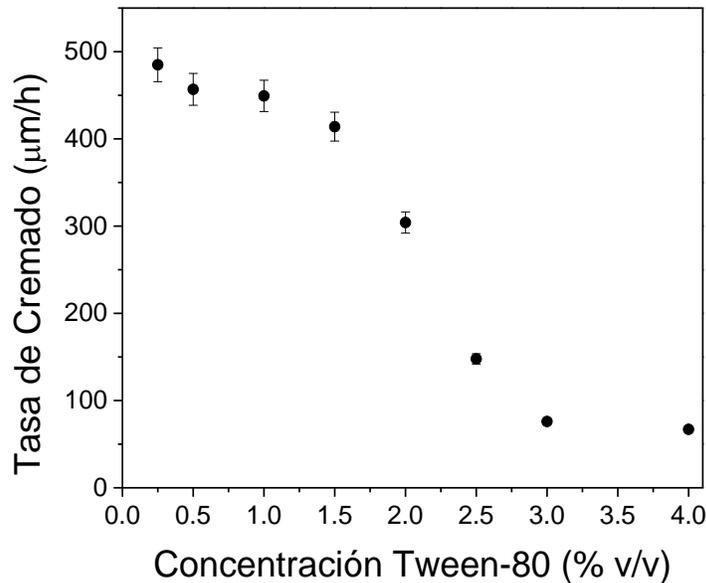


Figura 16. Tasa de cremado estimada de la centrifugación analítica. Un rápido decaimiento de la tasa de cremado es exhibido en concentraciones de tensoactivo cercanas a 2% v/v.

9.2.3 Potencial- ζ

La Figura 17 presenta la variación del potencial- ζ de emulsiones con respecto a la concentración de Tween-80. El potencial- ζ es negativo y su valor absoluto disminuyó con la concentración de tensoactivo. De hecho, el potencial- ζ era aproximadamente -42 mV para 0.25% v/v y cambió gradualmente a aproximadamente -15 mV para las altas concentraciones de tensoactivo. La Figura 17 también presenta la derivada del potencial- ζ con respecto a la concentración de Tween-80, que muestra que los cambios más importantes se produjeron para concentraciones de tensoactivo menores que 2% v/v. Para valores de concentración más altos, el potencial- ζ tiende a un valor constante como se refleja por acercarse el derivado de un valor cero. Los resultados en la Figura 17 mostraron una supresión de la carga superficial, medida en términos del potencial- ζ , sobre la adsorción tensoactivo.

La naturaleza de las cargas en la interfase aceite/agua no está claro en absoluto. Se ha postulado que la carga interfacial se puede atribuir al desequilibrio en la superficie de los iones producidos por el agua en sí misma (a saber, H^+ y OH^-). El desequilibrio es presumiblemente inducido por la adsorción preferencial de iones OH^- en las interfaces de agua (Exerowa, Zacharieva, Cohen, Platikanov, & Science,

1979; Manev & Pugh, 1991). Los iones producidos por el dióxido de carbono disuelto (HCO_3^- y CO_3^{2-}) podrían inducir un efecto adicional. Se ha postulado que el aumento de la adsorción de moléculas de tensoactivo puede conducir e inducir el desplazamiento de los iones desde la interfaz (Manev & Pugh, 1991). Este efecto sólo se produce en la cobertura relativamente alta de interfaz y resulta en una reducción de la carga de la interfaz y por lo tanto también de la magnitud del potencial- ζ . En este escenario, los resultados en la Figura 17 sugieren que la cobertura de interfaz casi completa por moléculas de tensoactivo se logró a concentraciones de aproximadamente 2% v/v. Moléculas de tensoactivo excesivo no se adsorben, dando lugar a la formación de estructuras micelares en la mayor parte de la fase acuosa.

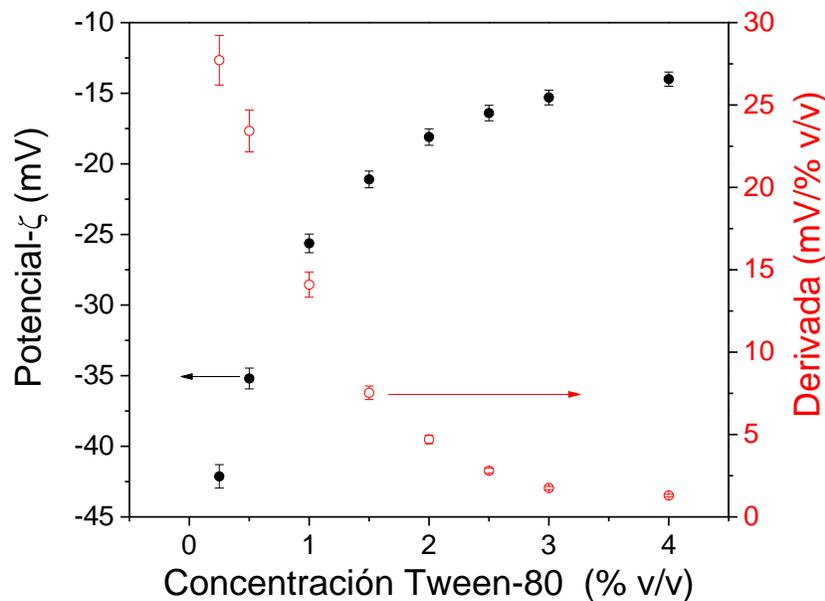


Figura 17. Potencial- ζ de las emulsiones en función de la cantidad de surfactante. Es notado que el potencial- ζ decrece conforme más tensoactivo es agregado.

9.2.4 Voltametría cíclica

Las mediciones de potencial- ζ sugirieron que la adsorción del tensoactivo no iónico podría modificar el equilibrio iónico en la mayor parte de la fase acuosa. A su vez, este efecto puede ser reflejado en las propiedades electrolíticas de la emulsión como especies más iónicas están contenidas en la fase acuosa. La Figura 18a presenta los resultados de voltametría cíclica para tres valores diferentes de la

concentración de tensoactivo. Curiosamente, el patrón de potencial de corriente no mostró picos apreciables de oxidación/reducción, lo que sugiere que el patrón se relaciona únicamente con transferencia de cargas iónicas del seno de la emulsión a la superficie del electrodo. Además, los picos de corriente anódica y catódica (a +1.0 y -1.0 voltios) aumentaron con la concentración de tensoactivo. En términos de los postulados por Manev y Pugh (1991), el incremento de la corriente podría estar vinculado a especies iónicas desplazadas de la interfase aceite/agua como más moléculas de tensoactivos son adsorbidas. La figura 18b presenta el pico de corriente catódica como función de la concentración de tensoactivo. La corriente anódica exhibió un patrón similar, como se ilustra en los patrones de la figura 18a. La corriente exhibió un comportamiento creciente monótono, con una tendencia a alcanzar un valor asintótico de alrededor de 0.07 mA para altas concentraciones de Tween-80. Por otro lado, la figura 18b también presenta la capacitancia de la doble capa obtenida por integración de la respuesta del potencial de corriente como sigue:

$$C_E = \frac{\int_{V_{\min}}^{V_{\max}} I(V) dV}{\nu(V_{\max} - V_{\min})} \quad (6)$$

donde ν es la velocidad de barrido, V_{\min} y V_{\max} son, respectivamente, el voltaje mínimo y máximo. Se observa que la capacitancia aumenta en línea con la corriente de pico catódico. Esta característica, en combinación con la falta de los picos de oxidación/reducción sugirió que el sistema actúa como un condensador débil donde la respuesta de voltametría cíclica refleja sólo la transferencia de carga de la fase acuosa a la doble capa eléctrica. Además, la capacitancia alcanza un valor máximo para concentraciones de tensoactivo superior a aproximadamente 2% v/v.

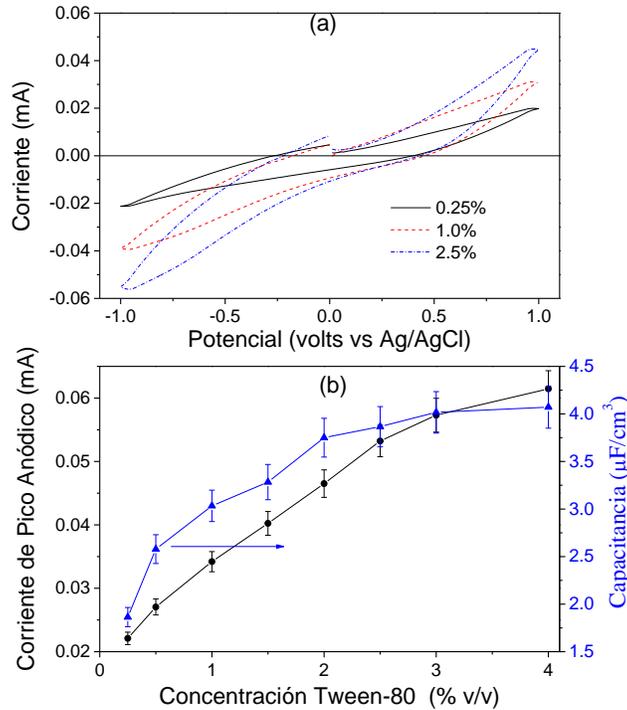


Figura 18. (a) Ilustra los patrones de voltametría de tres diferentes concentraciones de Tween-80. La ausencia de picos de corriente es notable. (b) Capacitancia de la emulsión estimada por la integración del patrón de potencial de corriente.

9.2.5 Espectroscopía de impedancia eléctrica (EIS)

La Figura 19a ilustra el comportamiento del diagrama de Nyquist para cinco valores diferentes de la concentración de Tween-80. En la región de baja frecuencia, un comportamiento de fase constante se puede observar, con la pendiente de fase constante que aumenta con la concentración de tensoactivo. Para todos los casos, se muestra un semi-círculo, lo que indica que hay una distribución homogénea de las constantes de tiempo en el rango de escrutinio de baja frecuencia. La propuesta de un circuito eléctrico equivalente para la respuesta EIS de emulsiones se muestra en la Figura 19a. Específicamente, la respuesta EIS fue descrita por el circuito Randles el cual se describe esquemáticamente en la Figura 20. El circuito Randles consta de una resistencia en serie con una configuración en paralelo de una resistencia y un elemento de fase constante (CPE) dada por:

$$CPE(j\omega) = \frac{a}{(j\omega)^\alpha} \quad (7)$$

junto con un condensador. El significado de un CPE no está claro en absoluto. Se observa que el CPE corresponde a un condensador ideal para $\alpha=1$. Se ha sugerido que CPE está relacionada con la superficie del electrodo no homogénea o difusión incluso anómala de especies iónicas en una zona de la superficie del electrodo (Westerlund et al., 1994). De hecho, el CPE se introduce comúnmente para tener en cuenta para la distribución no homogénea de las cargas en la superficie del electrodo. La resistencia está relacionada con la resistencia de la solución (R_s), mientras que el condensador en paralelo (C_{dl}) + CPE + resistencia (R_{dl}) está vinculada a la formación de una doble capa eléctrica sobre la superficie del electrodo.

Se utilizó un programa de mínimos cuadrados con regresión no lineal para ajustar los datos experimentales y estimar los parámetros del circuito equivalente. La resistencia de la solución (R_s) era insignificante con relación a la resistencia de doble capa (R_{dl}), lo que indica que los mecanismos de impedancia dominantes se pueden atribuir a la acumulación de cargas iónicas en una zona de la superficie del electrodo. Las figuras de 19b a 19d presentan los parámetros eléctricos estimados como función de la concentración de tensoactivo. La resistencia de doble capa disminuye monótonamente con la creciente cantidad de tensoactivo, indicando que la adición de tensoactivo mejora la conductancia de la solución debido tal vez a la incorporación de OH^- desplazados de la interfase aceite/agua. Por otro lado, el exponente de la CPE en la figura 19c mostró un fuerte aumento en alrededor de 2% v/v de concentración de tensoactivo. El origen del cambio abrupto del exponente CPE no está claro, aunque podría estar reflejando el bloqueo de cargas iónicas en la zona de electrodo. La capacitancia de doble capa estimada a partir de las mediciones de EIS se presenta en la Figura 19d como función de la cantidad de tensoactivo. La capacitancia mostró una sostenida creciente de concentraciones por debajo de 2% v/v. Para concentraciones más altas, la capacitancia exhibió una meseta a alrededor de 3.5 mF/cm². Por último, la Figura 21 compara las mediciones de potencial zeta con la capacitancia de doble capa estimado a partir del circuito equivalente, que muestra una relación inversa. Esto se podría esperar del mecanismo propuesto por Manev y Pugh (1991). De hecho, la adición de

tensoactivo no iónico desplaza especie iónica (principalmente OH⁻) de las interfaces de aceite/agua. A su vez, las especies iónicas desplazadas mejora la conductividad de la fase acuosa, que se refleja por un aumento de los valores de capacidad reducida y resistencia.

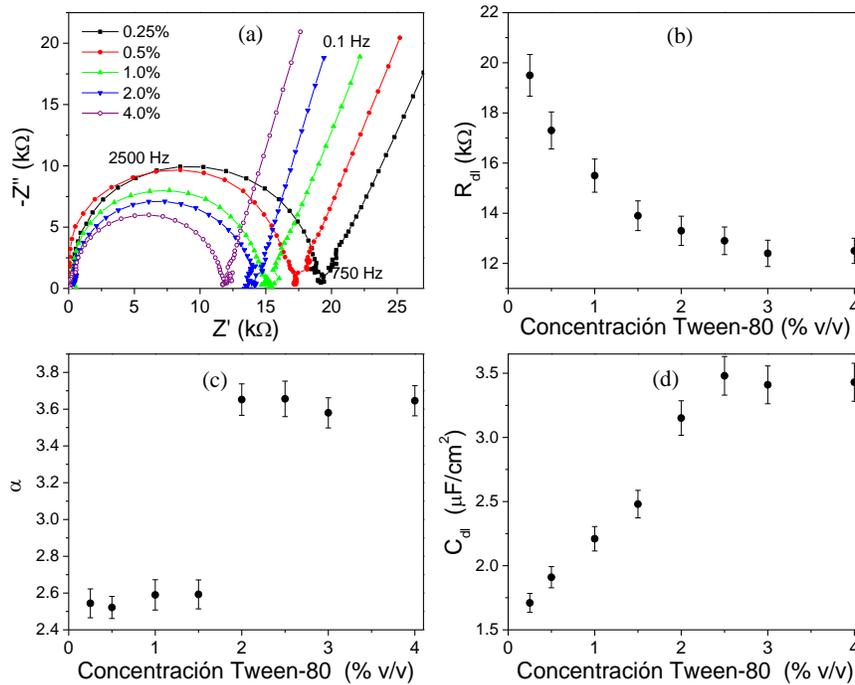


Figura 19. (a) Gráfica de Nyquist de las mediciones de EIS para cinco diferentes concentraciones de tensoactivo. (b)-(d) Parámetros estimados (R_{dl} , α y C_{dl}) obtenidos por el ajuste de las mediciones de EIS a un circuito equivalente.

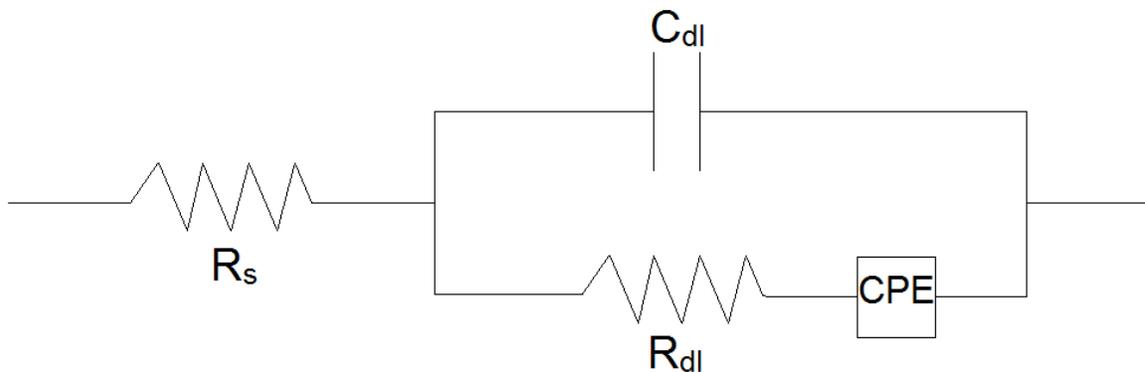


Figura 20. Diagrama esquemático de un circuito equivalente Randles usado en el ajuste de los datos de EIS.

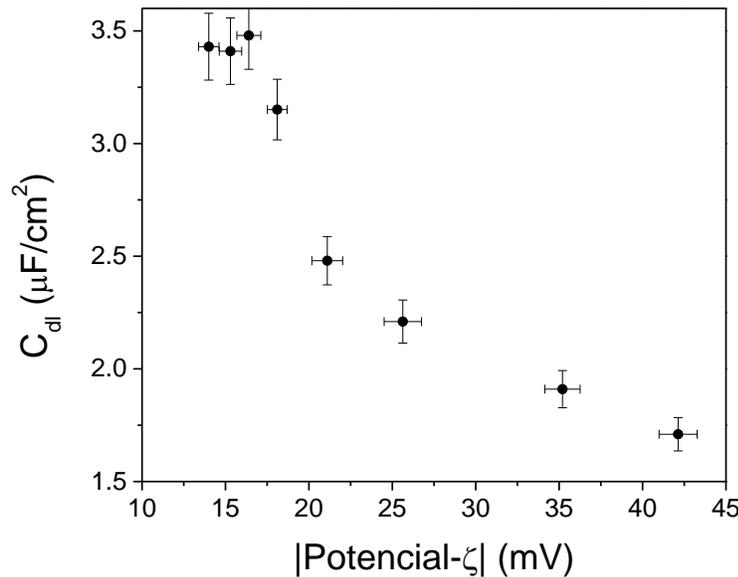


Figura 21. Comparación entre las mediciones de potencial- ζ y la capacitancia estimada de la doble capa.

9.2.6 Discusión

Los métodos tradicionalmente utilizados (por ejemplo, diámetro medio de gota y la tasa de cremado) para el seguimiento de la estabilidad, mostraron que la estabilidad de las emulsiones O/W se ve reforzada por el aumento de la cantidad de tensoactivo no iónico Tween-80. Se argumenta comúnmente que los efectos estéricos son responsables de la estabilidad de este tipo de emulsiones como la cabeza hidrófila de la molécula de tensoactivo actúa como una obstrucción para coalescencia y agregación de la gota (Rosen & Kunjappu, 2012). Las mediciones de potencial- ζ indicaron que las cargas de las partículas disminuyeron con la adición de moléculas de tensoactivo, lo que sugiere que la repulsión electrostática apenas se ve implicada en la estabilización de la emulsión. Sin embargo, la disminución del potencial- ζ plantea una cuestión interesante sobre el papel de las cargas iónicas que intervienen en la formación de emulsiones O/W. La cuestión tiene una relevancia importante como la magnitud del potencial- ζ mostró una disminución rápida de la concentración de Tween-80 menor que 2% v/v y, a continuación, alcanza un valor casi constante. Curiosamente, una concentración de Tween-80 de aproximadamente 2% v/v se utiliza ampliamente en la práctica para la formulación

de O/W con la fracción oleosa en el intervalo de 20 a 30% (Lv et al., 2014). Las mediciones de voltametría cíclica y de EIS mostraron transiciones rápidas de los parámetros subyacentes (por ejemplo, resistencia y capacitancia) parámetros en valores de concentración similares de Tween-80. De hecho, las capacitancias de solución y de doble capa aumentaron monótonamente con la concentración de Tween-80 para conseguir un valor casi constante para concentraciones superiores al 2% v/v. Del mismo modo, la resistencia de doble capa mostró una disminución sostenida de la concentración de tensoactivo menor que 2% v/v. Estos resultados sugieren que la concentración de Tween-80 de aproximadamente 2% v/v es un valor crítico para la estabilización de la emulsión O/W. Al apartarse de las ideas de Manev y Pugh (1991), la disminución de la resistencia y el aumento de la capacitancia se pueden vincular a la acumulación de especies iónicas desplazadas de la interfase aceite/agua a través de la adsorción de moléculas de tensoactivo. La transición de los parámetros del circuito equivalente (Randles) y del potencial- ζ a los valores casi constantes cercanos a 2% v/v indican que la adición adicional de moléculas de tensoactivo no contribuye a la cubierta de la interfaz. En este punto, la interfase aceite/agua está completamente cubierta por las moléculas de tensoactivo, que se refleja por una reducción de especies iónicas desplazadas como se detecta por voltametría cíclica y mediciones de EIS. De esta manera, ambas mediciones potencial- ζ y métodos electroquímicos pueden proporcionar una estimación de la concentración crítica del tensoactivo no iónico a la que se satura la interfase aceite/agua. La futura adición de moléculas de tensoactivo no conduce a una mejora significativa de la estabilidad de la emulsión.

9.3 Conclusiones

Los resultados de este trabajo mostraron que los métodos de electroquímica (voltametría cíclica y espectroscopía de impedancia eléctrica) pueden proporcionar información valiosa sobre el mecanismo y los fenómenos que intervienen en la formación y estabilidad de emulsiones O/W por tensoactivos no iónicos. En contraste con los tensoactivos iónicos, el mecanismo de estabilización de tensoactivo no iónico es principalmente de naturaleza estérica. Sin embargo, la transferencia de cargas iónicas por desplazamiento físico en la interfase aceite/agua

parece estar presente en la estabilización de la interfaz. Tales cargas iónicas eventualmente son acumuladas en la fase acuosa, cuyo comportamiento electrolítico puede caracterizarse por voltametría cíclica y mediciones de EIS. Curiosamente, los parámetros específicos derivados de estas mediciones proporcionan una estimación de la concentración de tensoactivo en el que la interfaz está totalmente cubierta. El enfoque utilizado en el presente trabajo tiene un interesante potencial práctico dada la facilidad de las mediciones electroquímicas incluso bajo condiciones in situ.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdollahi, Z., Darestani, M. T., Ghasemi, S., Gomes, V. G. J. C., & Science, P. (2014). Characterizing colloidal behavior of non-ionic emulsifiers in non-polar solvents using electrical impedance spectroscopy. *292*(10), 2695-2705.
- Adamson, A. W., & Gast, A. P. (1967). Physical chemistry of surfaces.
- Aranberri, I., Binks, B., Clint, J., & Fletcher, P. (2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensioactivos. *Revista iberoamericana de polímeros*, *7*(3), 211-231.
- Avila Rodríguez, M. I., Rodríguez Barroso, L. G., & Sánchez, M. L. (2018). Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *Journal of cosmetic dermatology*, *17*(1), 20-26.
- Berthomieu, C., & Hienerwadel, R. (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynthesis research*, *101*(2-3), 157-170.
- Butstraen, C., & Salaün, F. J. C. p. (2014). Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum Arabic and chitosan. *99*, 608-616.
- Cavazos-Garduño, A., Ochoa-Flores, A., Serrano-Niño, J. C., Beristain, C. I., & García, H. S. J. R. M. d. I. Q. (2014). Operating and compositional variables for preparation of betulinic acid nanoemulsions. *13*(3).
- Cui, L., Cho, H. T., McClements, D. J., Decker, E. A., & Park, Y. J. F. c. (2016). Effects of salts on oxidative stability of lipids in Tween-20 stabilized oil-in-water emulsions. *197*, 1130-1135.
- Davis, G., & Song, J. (2006). Biodegradable packaging based on raw materials from crops and their impact on waste management. *Industrial crops and products*, *23*(2), 147-161.
- de Guertechin, L. O. (2009). 71 Surfactants: Classification. *Cosmetic Science and Technology*, 769.
- De Oliveira, H., Andrade, C., de Melo, C. J. J. o. c., & science, i. (2008). Electrical impedance spectroscopy investigation of surfactant–magnetite–polypyrrole particles. *319*(2), 441-449.
- de Oliveira, H., Oliveira, E., de Melo, C. J. J. o. c., & science, i. (2006). Aggregation of methyl orange probed by electrical impedance spectroscopy. *303*(2), 444-449.
- de Oliveira, H. P., & de Melo, C. P. J. T. J. o. P. C. B. (2011). Use of electrical impedance spectroscopy as a practical method of investigating the formation of aggregates in aqueous solutions of dyes and surfactants. *115*(21), 6903-6908.
- Detloff, T., Sobisch, T., & Lerche, D. (2006). Particle size distribution by space or time dependent extinction profiles obtained by analytical centrifugation. *Particle & Particle Systems Characterization*, *23*(2), 184-187.
- Detloff, T., Sobisch, T., & Lerche, D. (2007). Particle size distribution by space or time dependent extinction profiles obtained by analytical centrifugation (concentrated systems). *Powder Technology*, *174*(1-2), 50-55.
- Dong, Z., Ma, Y., Hayat, K., Jia, C., Xia, S., & Zhang, X. J. J. o. F. E. (2011). Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. *104*(3), 455-460.

- Douglas, T. E., Vandrovcová, M., Kročilová, N., Keppler, J. K., Zárubová, J., Skirtach, A. G., & Bačáková, L. (2018). Application of whey protein isolate in bone regeneration: Effects on growth and osteogenic differentiation of bone-forming cells. *Journal of dairy science*, *101*(1), 28-36.
- Espinosa-Andrews, H., Báez-González, J. G., Cruz-Sosa, F., & Vernon-Carter, E. J. J. B. (2007). Gum arabic– chitosan complex coacervation. *8*(4), 1313-1318.
- Espinosa-Andrews, H., Enríquez-Ramírez, K. E., García-Márquez, E., Ramírez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C., & Vernon-Carter, J. J. C. p. (2013). Interrelationship between the zeta potential and viscoelastic properties in coacervates complexes. *95*(1), 161-166.
- Exerowa, D., Zacharieva, M., Cohen, R., Platikanov, D. J. C., & Science, P. (1979). Dependence of the equilibrium thickness and double layer potential of foam films on the surfactant concentration. *257*(10), 1089-1098.
- Frindi, M., Michels, B., Levy, H., & Zana, R. J. L. (1994). Alkanediyl-. alpha.,. omega.-bis (dimethylalkylammonium bromide) Surfactants. 4. Ultrasonic absorption studies of amphiphile exchange between micelles and bulk phase in aqueous micellar solution. *10*(4), 1140-1145.
- Furusaki, E., Ueno, Y., Sakairi, N., Nishi, N., & Tokura, S. J. C. P. (1996). Facile preparation and inclusion ability of a chitosan derivative bearing carboxymethyl- β -cyclodextrin. *29*(1), 29-34.
- Galia, A., Scialdone, O., Begue, G., Piazza, S., & Filardo, G. J. T. J. o. s. f. (2007). Utilization of impedance spectroscopy to investigate the self-assembly behavior of amphiphiles soluble in supercritical carbon dioxide: Preliminary results. *40*(2), 183-188.
- Ghasemi, S., Darestani, M. T., Abdollahi, Z., Hawkett, B. S., Gomes, V. G. J. C., Physicochemical, S. A., & Aspects, E. (2014). Electrical impedance spectroscopy for determining critical micelle concentration of ionic emulsifiers. *441*, 195-203.
- Gilbert, R. G. (1995). *Emulsion polymerization: a mechanistic approach*: Academic Pr.
- González-Martínez, D., Carrillo-Navas, H., Barrera-Díaz, C., Martínez-Vargas, S., Alvarez-Ramírez, J., & Pérez-Alonso, C. (2017). Characterization of a novel complex coacervate based on whey protein isolate-tamarind seed mucilage. *Food Hydrocolloids*, *72*, 115-126.
- Helenius, A., McCaslin, D. R., Fries, E., & Tanford, C. (1979). [63] Properties of detergents. In *Methods in enzymology* (Vol. 56, pp. 734-749): Elsevier.
- Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Pimentel-González, D. J., & Vernon-Carter, E. J. J. F. H. (2014). Lactobacillus plantarum protection by entrapment in whey protein isolate: κ -carrageenan complex coacervates. *36*, 181-188.
- IUPAC. (1997). *Compendium of Chemical Terminology* (A. D. M. a. A. Wilkinson Ed. 2nd ed. (the "Gold Book") ed.). Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Jiménez-Alvarado, R., Beristain, C., Medina-Torres, L., Román-Guerrero, A., & Vernon-Carter, E. J. F. H. (2009). Ferrous bisglycinate content and release in W1/O/W2 multiple emulsions stabilized by protein–polysaccharide complexes. *23*(8), 2425-2433.

- Kayitmazer, A., Koksai, A., & Iyilik, E. K. J. S. M. (2015). Complex coacervation of hyaluronic acid and chitosan: effects of pH, ionic strength, charge density, chain length and the charge ratio. *11*(44), 8605-8612.
- Kissinger, P. T., & Heineman, W. R. J. J. o. C. E. (1983). Cyclic voltammetry. *60*(9), 702.
- Klein, M., Aserin, A., Ishai, P. B., & Garti, N. (2010). Interactions between whey protein isolate and gum Arabic. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *79*(2), 377-383.
- Komaiko, J., & McClements, D. J. J. J. o. F. E. (2015). Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size. *146*, 122-128.
- Krägel, J., Derkatch, S. R. J. C. o. i. c., & science, i. (2010). Interfacial shear rheology. *15*(4), 246-255.
- Krogstad, D. V., Choi, S.-H., Lynd, N. A., Audus, D. J., Perry, S. L., Gopez, J. D., . . . Tirrell, M. V. J. T. J. o. P. C. B. (2014). Small angle neutron scattering study of complex coacervate micelles and hydrogels formed from ionic diblock and triblock copolymers. *118*(45), 13011-13018.
- Kronberg, B., & Lindman, B. (2003). *Surfactants and polymers in aqueous solution*: John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
- Leite, E. R., & Ribeiro, C. (2012). Basic Principles: Thermodynamics and Colloidal Chemistry. In *Crystallization and Growth of Colloidal Nanocrystals* (pp. 7-17): Springer.
- Lemetter, C., Meeuse, F., & Zuidam, N. J. A. J. (2009). Control of the morphology and the size of complex coacervate microcapsules during scale-up. *55*(6), 1487-1496.
- Lerche, D., Sobisch, T. J. J. o. D. S., & Technology. (2011). Direct and accelerated characterization of formulation stability. *32*(12), 1799-1811.
- Li, L., Ni, R., Shao, Y., & Mao, S. (2014). Carrageenan and its applications in drug delivery. *Carbohydrate polymers*, *103*, 1-11.
- Li, M., Guo, Y., Wei, Y., MacDiarmid, A. G., & Lelkes, P. I. (2006). Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications. *Biomaterials*, *27*(13), 2705-2715.
- Lv, G., Wang, F., Cai, W., Zhang, X. J. C., Physicochemical, S. A., & Aspects, E. (2014). Characterization of the addition of lipophilic Span 80 to the hydrophilic Tween 80-stabilized emulsions. *447*, 8-13.
- M Ways, T. M., Lau, W. M., & Khutoryanskiy, V. V. (2018). Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems. *Polymers*, *10*(3), 267.
- Ma, C., Li, G., Xu, Y., Wang, H., Ye, X. J. C., Physicochemical, S. A., & Aspects, E. (1998). Determination of the first and second CMCs of surfactants by adsorptive voltammetry. *143*(1), 89-94.
- Macdonald, J. R., & Barsoukov, E. J. H. (2005). Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications. *1*(8), 1-13.
- Mandal, A. B., Nair, B. U., & Ramaswamy, D. J. L. (1988). Determination of the critical micelle concentration of surfactants and the partition coefficient of an electrochemical probe by using cyclic voltammetry. *4*(3), 736-739.

- Mandal, A. B., & Nair, B. U. J. T. J. o. P. C. (1991). Cyclic voltammetric technique for the determination of the critical micelle concentration of surfactants, self-diffusion coefficient of micelles, and partition coefficient of an electrochemical probe. *95*(22), 9008-9013.
- Manev, E., & Pugh, R. J. L. (1991). Diffuse layer electrostatic potential and stability of thin aqueous films containing a nonionic surfactant. *7*(10), 2253-2260.
- McClements, D. J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology advances*, *24*(6), 621-625.
- Muldoon, B., Loughlin, R. G., Sweeney, G., & Boyd, E. K. (2018). Pharmaceutical soft gelatin capsule dosage form with modified guar gum. In: Google Patents.
- Perini, N., Prado, A., Sad, C., Castro, E., & Freitas, M. J. F. (2012). Electrochemical impedance spectroscopy for in situ petroleum analysis and water-in-oil emulsion characterization. *91*(1), 224-228.
- Rauk, B. M., Novosat, T. L., Oudega, M., & Wang, Y. J. A. b. (2015). Biocompatibility of a coacervate-based controlled release system for protein delivery to the injured spinal cord. *11*, 204-211.
- Rhim, J.-W., Lee, J.-H., & Hong, S.-I. (2006). Water resistance and mechanical properties of biopolymer (alginate and soy protein) coated paperboards. *LWT-Food Science and Technology*, *39*(7), 806-813.
- Roldan-Cruz, C., Carmona-Ascencio, J., Vernon-Carter, E., Alvarez-Ramirez, J. J. C., Physicochemical, S. A., & Aspects, E. (2016). Electrical impedance spectroscopy for monitoring the gum Arabic–chitosan complexation process in bulk solution. *495*, 125-135.
- Roldan-Cruz, C., Garcia-Hernandez, A., Vernon-Carter, E., & Alvarez-Ramirez, J. (2017). Impact of insoluble starch remnants on the behavior of corn starch/glycerol/LiCl solid electrolyte. *Ionics*, *23*(7), 1721-1732.
- Rosen, M. J., & Kunjappu, J. T. (2012). *Surfactants and interfacial phenomena*: John Wiley & Sons.
- Ru, Q., Wang, Y., Lee, J., Ding, Y., & Huang, Q. J. C. P. (2012). Turbidity and rheological properties of bovine serum albumin/pectin coacervates: effect of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio. *88*(3), 838-846.
- Salih, N. K. (2018). Applications of Gum Arabic in Medical and Health Benefits. In *Gum Arabic* (pp. 269-281): Elsevier.
- Scandurra, G., Tripodi, G., & Verzera, A. J. J. o. F. E. (2013). Impedance spectroscopy for rapid determination of honey floral origin. *119*(4), 738-743.
- Schatz, C., Lucas, J.-M., Viton, C., Domard, A., Pichot, C., & Delair, T. (2004). Formation and properties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers. *Langmuir*, *20*(18), 7766-7778.
- Schmitt, C., Turgeon, S. L. J. A. i. c., & science, i. (2011). Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *167*(1-2), 63-70.
- Schmitt, J., & Flemming, H.-C. (1998). FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *41*(1), 1-11.
- Seslija, S., Spasojević, P., Panić, V., Dobrzyńska-Mizera, M., Immirzi, B., Stevanović, J., & Popović, I. (2018). Physico-chemical evaluation of hydrophobically modified pectin derivatives: Step toward application. *International journal of biological macromolecules*, *113*, 924-932.

- Shimokawa, K.-i., Saegusa, K., Wada, Y., Ishii, F. J. C., & Biointerfaces, S. B. (2013). Physicochemical properties and controlled drug release of microcapsules prepared by simple coacervation. *104*, 1-4.
- Song, J., Murphy, R., Narayan, R., & Davies, G. (2009). Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *364*(1526), 2127-2139.
- Strand, S. P., Nordengen, T., & Østgaard, K. J. W. r. (2002). Efficiency of chitosans applied for flocculation of different bacteria. *36*(19), 4745-4752.
- Tamnak, S., Mirhosseini, H., Tan, C. P., Amid, B. T., Kazemi, M., & Hedayatnia, S. J. F. H. (2016). Encapsulation properties, release behavior and physicochemical characteristics of water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsion stabilized with pectin-pea protein isolate conjugate and Tween 80. *61*, 599-608.
- Tharanathan, R. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, *14*(3), 71-78.
- Walstra, P. J. S. P.-R. S. o. C. (2003). Studying food colloids: Past, present and future. *284*, 391-400.
- Westerlund, S., Ekstam, L. J. I. T. o. D., & Insulation, E. (1994). Capacitor theory. *1*(5), 826-839.
- Wu, J., Ben, Y., Chang, H.-C. J. M., & Nanofluidics. (2005). Particle detection by electrical impedance spectroscopy with asymmetric-polarization AC electroosmotic trapping. *1*(2), 161-167.
- Zhang, R., Zhang, Z., Zhang, H., Decker, E. A., & McClements, D. J. J. F. H. (2015). Influence of emulsifier type on gastrointestinal fate of oil-in-water emulsions containing anionic dietary fiber (pectin). *45*, 175-185.

11. Anexo A. Estructuras químicas

11.1 Estructura química del quitosano de medio peso molecular

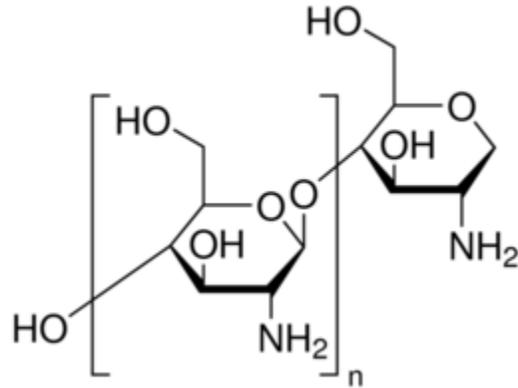


Figura 22. Estructura química del quitosano de mediano peso molecular (Sigma-aldrich).

11.2 Estructura química de la goma arábica

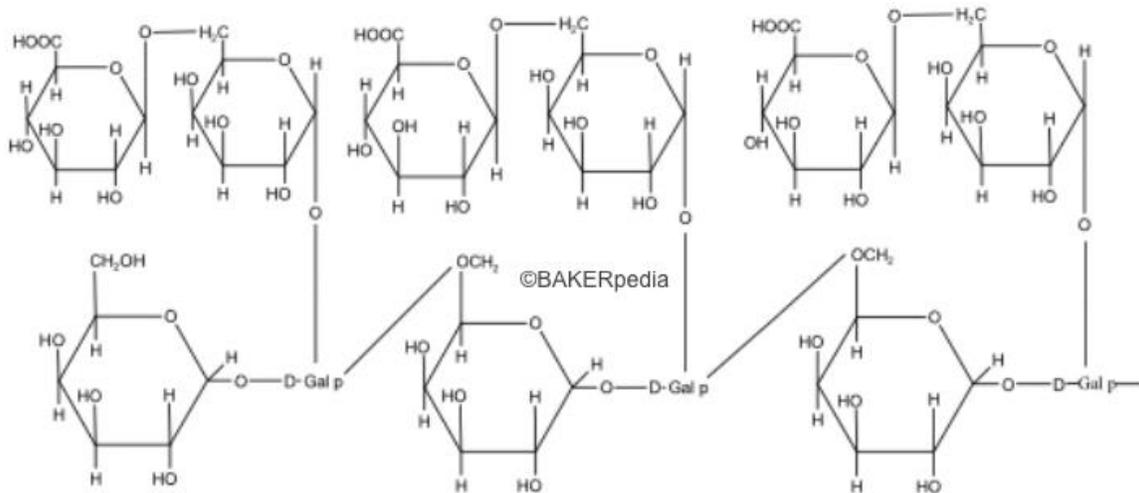


Figura 23. Estructura química de la goma arábica (Sigma-Aldrich).

11.3 Estructura química de Tween-80

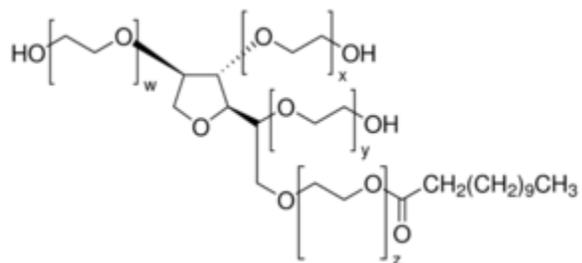


Figura 24. Estructura química de Tween-80 (Sigma-Aldrich).

12. Anexo B. Artículos



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfa

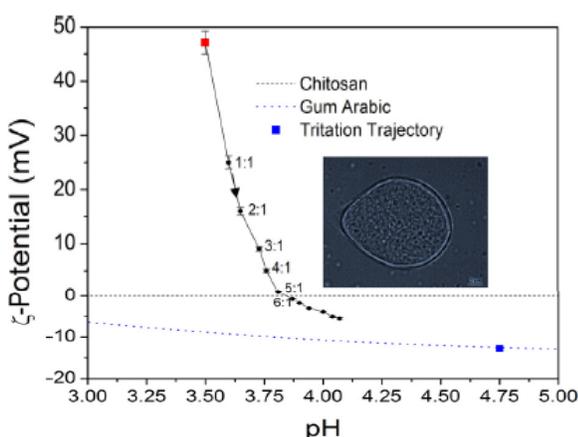
Electrical impedance spectroscopy for monitoring the gum Arabic–chitosan complexation process in bulk solution

C. Roldan-Cruz^a, J. Carmona-Ascencio^b, E.J. Vernon-Carter^b, J. Alvarez-Ramirez^{b,*}^a Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-534, Iztapalapa D.F. 09340, Mexico^b Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-534, Iztapalapa D.F. 09340, Mexico

HIGHLIGHTS

- Electrical impedance spectroscopy (EIS) tests were carried out to study the complexation process.
- Gum Arabic and chitosan in bulk solution were considered.
- Parameters from a fractional-order Randles circuit were used as indicators of coacervation changes.
- The EIS was compared with that obtained via traditional ζ -potential measurements

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 November 2015
 Received in revised form 1 February 2016
 Accepted 4 February 2016
 Available online 6 February 2016

Keywords:

Complex coacervation
 Electrical impedance spectroscopy
 ζ -Potential
 Isoelectric point

ABSTRACT

Electrical impedance spectroscopy (EIS) tests were carried out to study the complexation process between gum Arabic (GA; aqueous dispersion, pH 4.75, 1% w/w) and chitosan (Ch; acetic acid dispersion, pH 3.5, 1% w/w) in bulk solution. EIS data were obtained for different GA/Ch mass ratios ($R_{GA/Ch} = 1:1-10:1$) at frequencies ranging from 1 Hz to 1000 Hz. A fractional-order Randles circuit was used to estimate resistance and capacitance parameters as function of $R_{GA/Ch}$. Complex coacervates were obtained by subjecting the bulk solutions to centrifugation, and quantifying the sedimentation velocity and height. The equivalent circuit parameters showed sharp changes at the isoelectric point of the complex coacervates. The capability and accuracy of the EIS was compared with that obtained via traditional ζ -potential measurements. The results indicated that the EIS technique can be used at specific frequency ranges as a practical method for monitoring the complexation process between biopolymers.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Biopolymers with opposite charge in solution can engage in complex interactions involving electrostatic attraction and charge transfer phenomena. Characterizing the physicochemical prop-

* Corresponding author. Fax: +52 55 58044649.
 E-mail address: jjar@xanum.uam.mx (J. Alvarez-Ramirez).

erties of biopolymer complexes is a topic of vital importance to engineers and scientists because they can determine to a great extent the texture, morphology and mechanical stability of colloidal matter [1]. The interactions between polyelectrolyte biopolymers can be manifested in several forms. Weak interactions lead to the formation of small soluble complex reflected as murky solutions, as well to the formation of homogeneous weak gels. On the other hand, strong interactions can lead to the precipitation of the complex colloids formed by both biopolymers [2]. The nature and extent of biopolymers complex formation are affected by molecular characteristics (e.g., charge density and distribution of reactive groups), relative biopolymer concentration and solution conditions (e.g., pH, ionic strength and temperature).

Complex coacervation, leading to the formation of a precipitate of both biopolymers, has found a large diversity of technological applications in the biotechnology, food and pharmaceutical industries. Protein/polysaccharide and polysaccharide/polysaccharide coacervates have been used for stabilizing emulsions [3], for immobilizing probiotics [4], as milk-fat replacers [5], for the microencapsulation and controlled the release of bioactives and drugs [6–9], and in many other domains [10].

In general, the coacervation process is affected by pH, ionic strength, charge density, chain length and the charge ratio [11]. The monitoring of the coacervation formation is an important issue for determining optimal conditions in terms of morphology, yield and functional properties. In fact, it has been pointed out that scale-up of complex coacervation for large-scale production is not trivial since the morphology and size are highly dependent of the processing conditions [12]. In this regard, the monitoring methods play an important role for tracking significant variations in the coacervation process. Because coacervation involves self-assembly driven by protolytic equilibrium, electrostatic attraction and complexation between oppositely charged polyelectrolytes, zeta potential is widely used to assess the formation of complex morphologies with desired properties [13]. Also, coacervation takes place when the thermodynamic conditions are not adequate to sustain the solubility of the charged polyelectrolytes. Hence, turbidity measurements have been also used to monitor the coacervate precipitation process [14]. Besides, microscopy is routinely used for visual evaluation of coacervate morphology. Small angle scattering has been also proposed to delimitate the size and spacing of coacervate domains [15].

A central feature of complex coacervation is the electrostatic attraction between oppositely charged polyelectrolytes. In this way, it has been considered that measurements of the mobility of charges within the coacervate domains provide valuable insights, as a complement to other methods, regarding the complexation process [6]. The electrical DC conductivity methods give simple, rapid and relatively inexpensive measurements of charge mobility. However, a drawback of DC conductivity is its low sensitivity and accuracy in many instances, especially with media displaying relatively high conductivity [16]. Electrical impedance spectroscopy (EIS) has been proposed as a direct and non-destructive alternative to DC conductivity measurements in colloidal systems [17–19]. The idea behind EIS is to estimate the electrical impedance of a medium as function of variable frequency. The potential of EIS for testing the evolution of colloidal systems is still under exploration. Galia et al. [20] studied the self-assembly behavior of amphiphiles soluble in supercritical carbon dioxide using EIS. The link between electrical impedance and the formation of aggregates in aqueous solutions of dyes and surfactants was explored by de Oliveira et al. [21]. Scandurra et al. [22] reported that EIS was a practical and rapid method for assessing the floral origin of honey. Ghasemi et al. [16] investigated changes in electrical impedance for determining the critical micelle concentration of ionic emulsifiers. Recently, Abdollahi et al. [23] used EIS to study the colloidal behavior of non-ionic emulsi-

fiers in non-polar solvents. Interestingly, IES can be also used for estimating the size of microstructures [24].

In this work, EIS was used for evaluating the complexation process between low molecular weight chitosan (cationic) and gum Arabic (anionic) in the bulk of the aqueous phase. The EIS results were contrasted with those obtained using the traditional zeta potential method where the equivalence point between the biopolymers is determined.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Low molecular weight chitosan (Ch; 92.2% degree of deacetylation, DDA) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Chitosan is a cationic heterogeneous binary polysaccharide consisting primarily of 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranose and 2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranose residues [25]. Gum Arabic (GA; *Acacia senegal*) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). GA is a branched, neutral or slightly acidic, complex polysaccharide obtained as mixed calcium, magnesium and potassium salts [26]. Studies on the structure of GA indicate that the molecules consist of a β (1 \rightarrow 3) linked galactopyranose backbone chain with numerous branches linked through β (1 \rightarrow 6) galactopyranose residues and containing arabinofuranose, arabinopyranose, rhamnopyranose, glucuronic acid and 4-O-methyl-d-glucuronic acid, with small amount of proteinaceous material forming an integral part of the structure. Acetic acid, hydrochloric acid and sodium hydroxide were purchased from J.T. Baker (Xalostoc, State of Mexico, Mexico). Deionized water was used in all the experiments.

2.2. Preparation of biopolymer solutions

Chitosan (1% w/w) was dispersed in deionized water with acetic acid (1%, v/v) and gum Arabic (1% w/w) was dispersed in deionized water at 20 °C. The dispersions were gently stirred for 12 h and stored overnight at 4 °C to guarantee complete hydration of the biopolymers.

2.3. Protolytic titrations

Protolytic titrations were carried out to estimate the stoichiometric relation between chitosan and gum Arabic dispersions. A sample of chitosan dispersion (20 mL) was titrated with NaOH (0.1 M) and the pH was recorded (Vernier pH-BTA, Beaverton, OR, USA). Likewise, a sample of gum Arabic dispersion (20 mL) was titrated with HCl (0.1 M), with continuous monitoring of the pH. The titration results were contrasted with those obtained for the acetic acid solution (1% v/v) used for the preparation of the chitosan dispersion and for the deionized water used for the preparation of the gum Arabic dispersion. All titrations were made in triplicate.

2.4. Titration of chitosan dispersion with gum Arabic dispersion

The GA dispersion was slowly added into the Ch dispersion using gentle stirring conditions at 20 °C. The pH values for gum Arabic-chitosan mass ratios ($R_{GA/Ch}$) ranging from 1:1–10:1 were monitored with a Vernier pH-BTA (Beaverton, OR, USA) at 20 °C.

2.5. ζ -Potential

The ζ -potential measurements were performed with a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The pH of the GA and Ch dispersions (10 mL) was adjusted using either 0.1 N HCl or 0.1 N NaOH with the help of the MPT-2 equipment

autotitrator. Experiments were performed in a pH range from 2 to 5, every 0.5 units with a pH resolution of ± 0.05 units. The ζ -potential was determined by measuring the direction and velocity of the biopolymer dispersions as they moved in the direction of the applied electric field. The equipment software converted the electrophoretic mobility measurements into ζ -potential values using the Smoluchowsky mathematical model.

At this point, it is important to mention that a vast majority of published work regarding zeta potential measurements performed with the Zetasizer do not consider the softness of the analyzed material [27–29]. Electrophoretic mobility modifies the shape, and hence the effective radius and potential, of soft material. The reason is that a suitable procedure for correcting for these effects is not available. Theoretical computations for interpretation of electrokinetics measurements [28] are complex for most users and require parameters that are commonly unavailable in most cases. In this regard, zeta potential measurements should be taken in general with some care and awareness that conclusive results may not be drawn.

2.6. Optical microscopy

The murky dispersions of the biopolymer complexes formed at different $R_{GA/Ch}$ were observed with an optical microscope (Olympus BX45, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) coupled to an image analyzer system (digital Olympus camera C3030 and Image Pro-Plus version 4.5 software, Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA), prior to the formation of a precipitate, which could occur after a few minutes of the addition of GA dispersion to Ch dispersion at certain $R_{GA/Ch}$. Selected micrographs at $100\times$ are presented.

2.7. Analytical centrifugation

Samples (0.4 ml) of the biopolymer complexes dispersions at different $R_{GA/Ch}$ were subjected to centrifugal sedimentation at 4000 rpm for 126 min at 20°C , using a LUMiSizer dispersion analyzer (L.U.M. GmbH, Berlin, Germany). Under these conditions, relative strongly complexed biopolymers tend to precipitate as complex coacervates. The LUMiSizer enables to simultaneously measure the intensity of transmitted light as a function of time and position over the separation interface across the entire sample length. Sedimentation velocity and height of the complex coacervates was obtained with the SEPView equipment software.

2.8. Electrical impedance spectroscopy

As in the case of the titration experiments, Ch dispersion was loaded into a PARSTAT Potentiostat/Galvanostat (Princeton Applied Research, Oak Ridge, TN, USA) model 2273 cell (volume = 50 mL) equipped with a Faraday cage, and GA dispersion was added dropwise. Electrical impedance spectroscopy measurements were obtained for $R_{GA/Ch}$ ranging from 1:1 to 10:1 under nominal open-circuit conditions (i.e., zero DC bias voltage) by scanning the exciting potential frequency from 1 to 1000 Hz. The cell was equipped with three-electrodes: (1) a saturated sulfate reference electrode ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{SO}_4/\text{K}_2\text{SO}_4$), SSE, ($E = 0.645\text{ V}/\text{SHE}$, XR200 Radiometer), (2) a platinum foil as counter-electrode, and (3) a platinum plate as working electrode. Prior to each experiment, the surface of the working electrode was polished using Buehler alumina powder (final grain size $\leq 0.05\ \mu\text{m}$) to a mirror finish. The electrode was then rinsed with deionized water and placed in an ultrasonic bath for 5 min. The reaction cell was equipped with a temperature control system to maintain the system at 20°C .

For the sake of completeness, a brief description of EIS concepts will be given as follows. Electrical impedance is normally performed using small excitation signals to obtain a pseudo-linear

response. The excitation signal is carried out by the potential applied to the electrochemical cell as

$E(t) = E_0 \sin(\omega t)$, where ω and E_0 are the excitation frequency and amplitude, respectively. It should be recalled that the relationship between radial frequency ω (expressed in rad/s) and frequency f (expressed in Hz) is given by $\omega = 2\pi f$. The response signal is given by the current in the form $I(t) = I_0 \sin(\omega t + \phi)$, where ϕ is the phase shift between the exciting potential and the response current signals. With the Euler's relationship $\exp(j\omega t) = \cos(\omega t) + j \sin(\omega t)$, one can express the impedance as a complex function. The exciting potential is given by $E(t) = E_0 \exp(j\omega t)$ and the current response as $I(t) = I_0 \exp(j\omega t - \phi)$. By using an Ohm's law in the complex domain, one can define the impedance as a dynamical version of the traditional resistance concept. That is, $Z(\omega) = E(t; \omega)/I(t; \omega)$. In this way, $Z(\omega) = Z_{Re}(\omega) + jZ_{Im}(\omega)$, where $Z_{Re}(\omega) = Z_0(\omega) \cos(\phi)$ and $Z_{Im}(\omega) = Z_0(\omega) \sin(\phi)$ are respectively the real and imaginary modules, and $Z_0(\omega) = |Z(\omega)|$ is the impedance magnitude. The real and imaginary parts correspond to the loss (or resistance) and storage (or reactance) moduli. A purely reactive component does not dissipate energy. This means that the component alternatively absorbs energy boundary membrane system, a pure reactance will not dissipate any power. Finally, the magnitude of the impedance is related to the frequency-dependent conductance ($G(\omega)$) and capacitance ($C(\omega)$) as follows.

$$G(\omega) = |z|^{-1} \cos(\phi)$$

and

$$C(\omega) = (\omega|z|)^{-1} \sin(\phi)$$

respectively.

2.9. DC conductivity

To compare the EIS results with electrical conductivity, the DC conductivity of the samples was measured with a conductivity meter (Orion Star, Thermo Scientific, USA). All measurements were performed at 20°C . Three measurements were carried out for each sample.

3. Results and discussion

3.1. Protolytic stoichiometry

Fig. 1 presents the results of the protolytic titrations for the Ch and GA dispersions. Fig. 1a corresponds to the chitosan dispersion and the results were contrasted against the acetic acid solution used for its preparation. To achieve a given pH value, the chitosan dispersion required more NaOH addition than the acetic acid solution, indicating that chitosan molecules were effectively protonized. The effective protonation can be expressed in terms of the added NaOH after subtracting the corresponding addition to the acetic acid solution. For the pH value at which complex formation occurred (pH 3.5), the chitosan protonation required 0.18 mL of the 0.1 M NaOH titration solution per g of the chitosan dispersion. This corresponds to 1.8×10^{-3} mol NaOH/g of chitosan. Similarly, the titration of the gum Arabic dispersion (Fig. 1b) resulted in 8×10^{-4} mol HCl/g gum Arabic. In this way, the stoichiometry of the protolytic neutralization between the chitosan and the gum Arabic solutions can be represented as the neutralization between NaOH and HCl, corresponding to a ratio of about 2.25. That is, about 2.25 g of gum Arabic dispersion will be required to balance 1 g of chitosan dispersion.

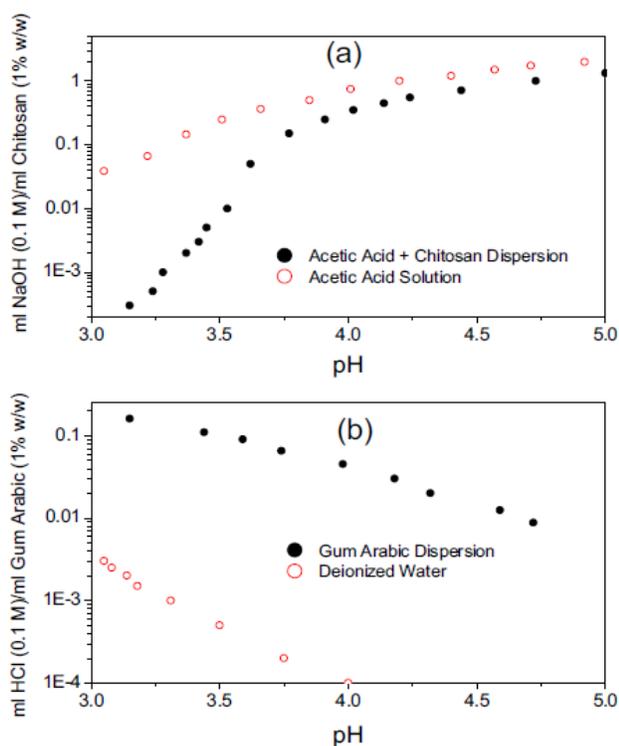


Fig. 1. Protolytic titration curves of chitosan (1% w/w) and gum Arabic (1% w/w) dispersions.

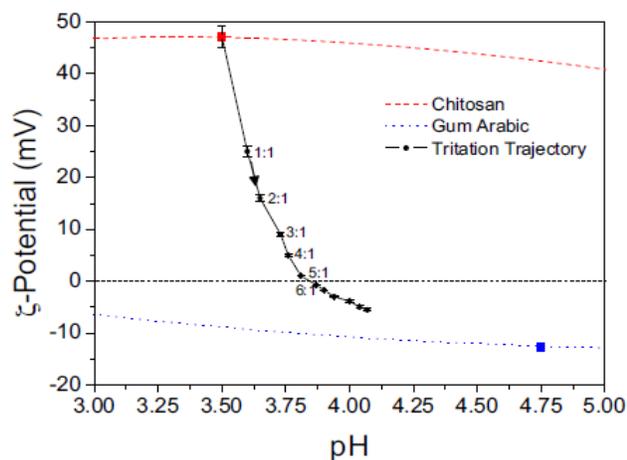


Fig. 2. Titration trajectory on the ζ -potential-pH plane. The isoelectric point was achieved at gum Arabic–chitosan mass ratio ($R_{GA/Ch}$) of about 5.5:1.

3.2. ζ -Potential

Fig. 2 shows the ζ -potential values as a function of pH for the chitosan (1% w/w) and gum Arabic (1% w/w) dispersions. The amine groups of chitosan are protonated under acidic conditions, conferring a cationic behavior to its dispersions. In contrast, gum Arabic contains deprotonated carboxyl groups, leading to an anionic behavior of its dispersions. Thus, chitosan exhibited always positive ζ -potential values which became increasingly positive as pH decreased, while gum Arabic exhibited always negative ζ -potential values which became increasingly negative as pH increased to neu-

tral values. The ζ -potential values of Ch varied from about +47 mV at pH 3 to +42 mV at pH 5, while those of GA varied from about –6 mV at pH 3 to –13 mV at pH 5. Since the interaction between cationic and anionic biopolymers involves electrostatic forces, ζ -potential measurements are commonly used to test the formation of biopolymer complexes. The difference in the protonation load between the polysaccharides molecules can be seen as the driving force for electrostatic interactions. The titration process started when gum Arabic (pH 4.75) dispersion was dripped into the chitosan (pH 3.5) dispersion. The effects of this were a gradual increase of biopolymers mixture pH, while the ζ -potential initial positive value of Ch was decreased towards zero as titration with GA proceeded, until, eventually it was turned into an increasingly negative value. Fig. 2 also shows, the titration trajectory followed as the biopolymers mass ratios varied from $R_{GA/Ch} = 1:1$ to $R_{GA/Ch} = 10:1$. Notice that a ζ -potential value of zero, considered as the isoelectric point, was achieved for a $R_{GA/Ch}$ of about 5.5:1 and a pH of ~ 3.9 . Protolytic titration in Fig. 1 indicates a ratio $R_{GA/Ch}$ of about 2:25 to achieve neutralization. This means that biopolymer interaction for $R_{GA/Ch}$ smaller than 2:25 is due to neutralization mechanisms. For higher $R_{GA/Ch}$ values, the gum Arabic is in stoichiometric excess relative to the chitosan, incorporating negative charges in the complex structure. The aim of the excess biopolymer is to stabilize the complex coacervate structure by forming a surrounding permeable.

3.3. Morphology

Fig. 3 shows illustrative instances of biopolymers complex formation at the different $R_{GA/Ch}$ ratios. At $R_{GA/Ch}$ of 1:1 only the formation of incipient amorphous structures is observed (Fig. 3a). As $R_{GA/Ch}$ is increased to 2:1 and 3:1, increasingly larger aggregates in the water bulk begin to emerge due to increased electrostatic interactions between the gum Arabic macro-anions and the chitosan macro-cations (Fig. 3b and c). At $R_{GA/Ch}$ of 4:1 membrane-like structures commenced to surge around individual complex aggregates (Fig. 3d). As $R_{GA/Ch}$ increased to 5:1, the individual complex aggregates tended to be consolidated into a whole, delineated by a common boundary (Fig. 3e). At $R_{GA/Ch}$ of 6:1, a clearly defined boundary membrane encloses complex aggregates tightly packed, reminding the morphology of single cell organisms (Fig. 3f). The size of these complex coacervate domains was about 30–35 μm . Further increases in $R_{GA/Ch}$, i.e., 7:1 and 8:1, led to the onset of biopolymers complexes disaggregation, probably due to the excess of gum Arabic macro-anions, whose negative charges affected the distribution of molecular entanglements. In fact, the interior of the biopolymers complexes domain became increasingly fractionated into several sub-domains (Fig. 3g and h). Eventually, at relatively very high $R_{GA/Ch}$ (9:1 and 10:1), the biopolymer complexes reverted to a morphology of individual aggregated structures (Fig. 3i and j). These figures illustrate the multiple pathways available to gum Arabic–chitosan complexes formation as a function of biopolymers mass ratios and relative opposing charge densities, which lead to the formation of complex spatial structure domains. Overall, the micrographs of Fig. 3 shows that well-defined complex coacervates are formed at $R_{GA/Ch}$ in between 5:1 and 6:1. These conditions correspond to those of the consolidated biopolymers complexes with well-defined boundary membranes observed in Fig. 3e and f. The results described above are in agreement with those reported by Espinosa-Andrews et al. [13,30], that found that maximum complex yield between gum Arabic and chitosan occurred at a 5:1 mass ratio. Colloidal micro-phases include “zipper” brushes, micelles and micellar networks [31]. Although the phenomenology of coacervation can be deduced from the observation of self-organized microscopic structures as illustrates in Fig. 3, the link between the

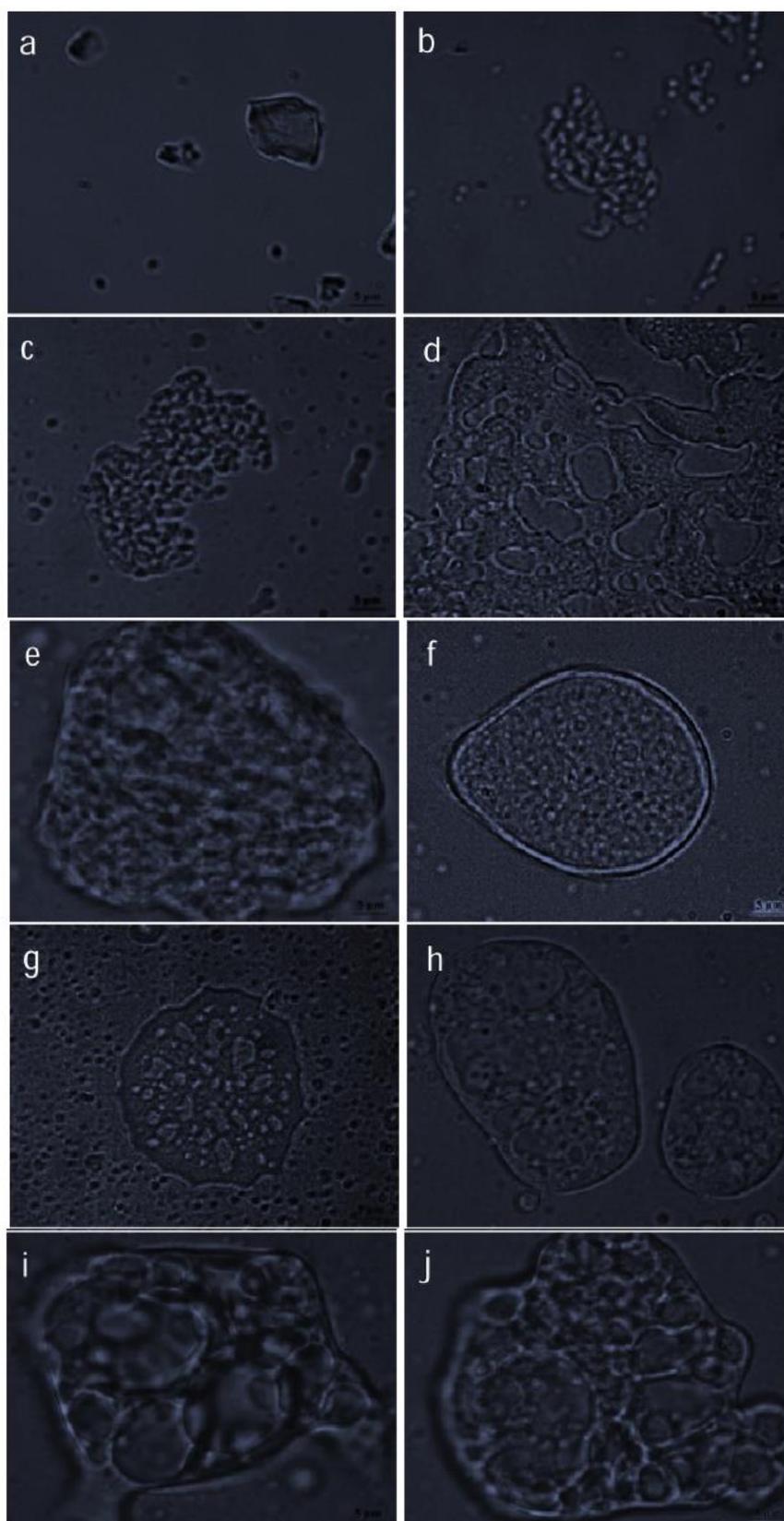


Fig. 3. Optical images illustrating the morphology of biopolymer complexes between gum Arabic and chitosan at different mass ratios ($R_{GA/Ch}$). Images from (a)–(j) correspond to $R_{GA/Ch}$ of 1:1–10:1, respectively.

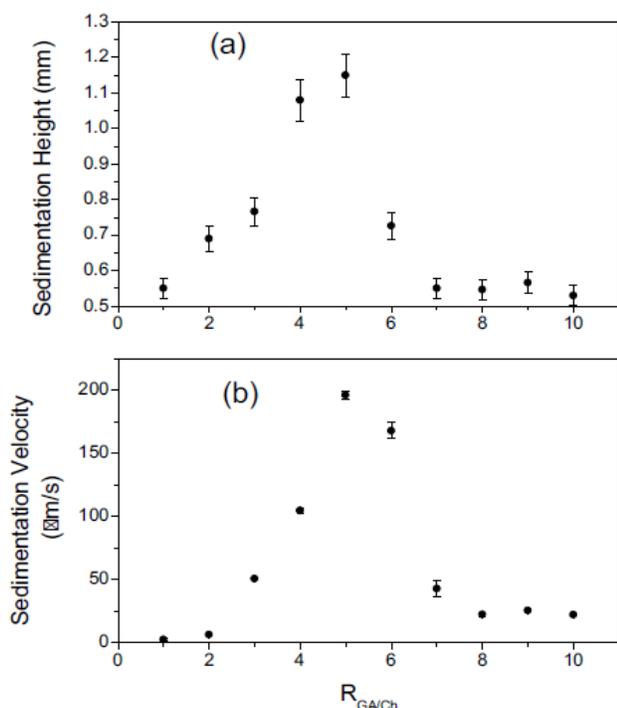


Fig. 4. Sedimentation height (a) and velocity as function of gum Arabic–chitosan mass ratio ($R_{GA/Ch}$). The optimal yield and stability were obtained at $R_{GA/Ch}$ from 5:1 to 6:1.

physics of coacervation and the resultant microstructure is an issue that is not clear at all [32].

3.4. Analytical centrifugation

The complexation between gum Arabic and chitosan formed isolates and aggregates of colloidal dimensions that were reflected in turbid dispersions. The yield and stability of the colloidal complexes can be studied by analytical centrifugation. Strongly complexed biopolymers precipitate, while weakly complexed biopolymers break down and remain soluble. Fig. 4a shows the sedimentation height as function of $R_{GA/Ch}$. This height is a measure of the complex coacervate yield, which achieved its maximum value for $R_{GA/Ch}$ of 5:1. This is in agreement with previous reports where the maximum yield was obtained for gum Arabic/chitosan mass ratio of 5:1 [30]. As the mass ratio between the biopolymers deviated from this value, the charge density balance between the oppositely charged polysaccharides also drifted far away from its stoichiometric value and the electrical balance, leading to a reduced production of insoluble complex coacervates.

The sedimentation velocity of the insoluble complexes can be considered as a measure of stability [33]. High sedimentation velocity values indicated high stability of the biopolymer complexes. The highest sedimentation velocities occurred at $R_{GA/Ch}$ of 5:1 and 6:1 (Fig. 4b). The micrographs of Fig. 3 can be related to the results of Fig. 4a and b by considering in general terms three distinctive regions respect the $R_{GA/Ch}$ axis: a) $R_{GA/Ch}$ from ~1:1 to 4:1, characterized by small sedimentation height and low sedimentation velocity, where the gum Arabic anions were not sufficient for forming strong molecular entanglements with the chitosan cations. The complexes formed were sufficiently small to resist the action of the centrifugal force (Fig. 3a–d). After centrifugation, the dispersion remained as a turbid liquid. (b) $R_{GA/Ch}$ from ~5:1 to 6:1, character-

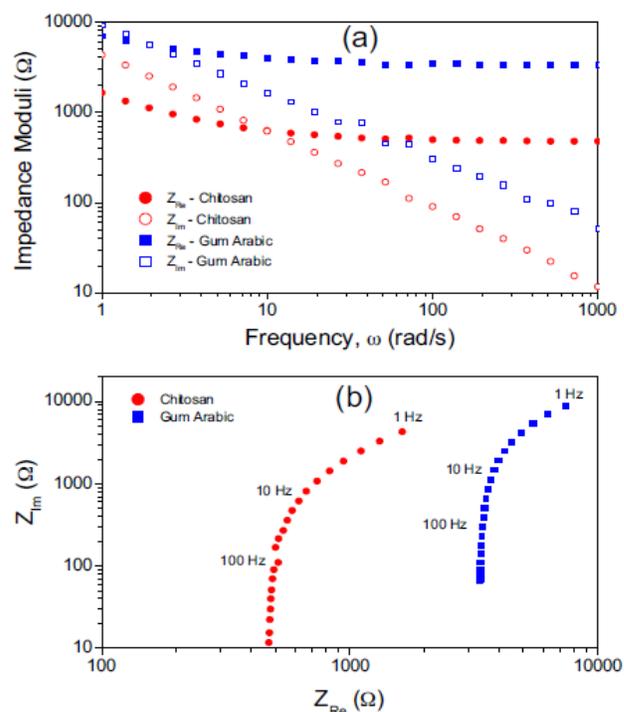


Fig. 5. EIS measurements for the gum Arabic and chitosan dispersions. (a) Bode and (b) Nyquist plot format.

ized by consolidated of aggregated complexes densely packed and surrounded by a boundary membrane (Fig. 3e–g), that withstood the shear stresses caused by centrifugal force, yielding a precipitate. Espinosa-Andrews et al. [34] reported that gum Arabic–chitosan complex coacervates obtained at a mass ratio of 5:1 exhibited a predominantly liquid viscoelastic behavior since the loss modulus (G'') was higher than the storage modulus (G') in the frequency range of 1–100 rad/s, but that there were clear indications that a cross-over point ($G' = G''$) could occur at frequencies slightly above 100 rad/s. This behavior confirmed the presence of a cross-linked network, with higher viscoelastic characteristics at pH 4.5 than at pH 6.0 and 3.0. These results are in close agreement with the sedimentation height and velocities observed for the $R_{GA/Ch}$ from ~5:1–6:1, and the micrographs (Fig. 3e–g) of the consolidated complexes. (c) $R_{GA/Ch}$ from 7:1 to 10:1, where both the sedimentation height and velocity were small. Despite the relative large sizes of these structures (Fig. 3h–j), the surrounding cell arrangement was unstable and incapable of resisting the onslaught of external shear deformations, causing the dismemberment of the aggregated complexes, into smaller-size colloidal entities which did not precipitate under the applied centrifugation conditions. The excess of gum Arabic anions probably introduced repulsive forces within the complexes domain, which resulted in the formation of fragmented subdomains and even isolates.

3.5. Electrical impedance spectroscopy

Fig. 5 shows the EIS results in Bode (Fig. 5a) and Nyquist (Fig. 5b) formats for the gum Arabic (1% w/w) and chitosan (1% w/w) dispersions as a function of the exciting signal frequency. It is noted that the electrical moduli $Z_{Re}(\omega)$ and $Z_{Im}(\omega)$ are decaying functions of frequency. This effect was caused by the attenuation of the materials tested in response to the alternating electrical signal. The

chitosan dispersion displayed smaller impedance moduli than the gum Arabic dispersion over the whole range of frequencies. This could be expected since chitosan was dispersed under acidic conditions using acetic acid, which acted as an electrolyte.

The following concepts are in order to guide the discussion on the EIS results shown in Fig. 5. The application of an alternating potential to a material excites the electromagnetic field inherent to the internal structure. In turn, this generates polarized positive and negative ions, which move in the direction of the electrical field. The alternating electrical potential leads to an alternating electrical field in the material, although with a time delay that is consequence of the time of recovering the status of ions. Importantly, the time delay is a relaxation time that depends on the exciting frequency and the intrinsic properties of the material [35]. One has that small time delay values are related to high inherent electrical resistance properties of the material.

An interesting consideration of this work was to establish if the EIS measurements had the sensitivity to detect the formation of gum Arabic–chitosan complexes in bulk solution. To address this question, let us make the following remarks relative to the EIS results in Fig. 5. In the low frequency region (up to about 50 Hz), the loss or dissipation modulus $Z_{Re}(\omega)$ decayed monotonically. On the other hand, in the high frequency region this modulus achieved a constant value. In contrast, the storage modulus $Z_{Im}(\omega)$ exhibited a decaying pattern without achieving an asymptotic value, which cannot be attributed to external noise since IES measurements were carried out under Faraday cage protection. The decaying pattern of the EIS moduli can be related to changes of the electrical capacitance of the fluid surrounding the electrochemical electrode. In fact, the electrical impedance of a pure capacitor is given by $Z(\omega) = -j\omega^{-1}$, indicating a decaying function with the frequency. It is well-known that an ionic double-layer appears when an electrolytic fluid is in contact with an electrode. The first layer contains ions adsorbed on the surface due to (redox) chemical interactions. The second layer is comprised of ions attracted to the neighborhood of the first layer by Coulombic forces. This layer is not firmly anchored to the electrode surface, but rather a loose layer composed of ions moving diffusively under the effects of electrical attraction. In this way, the second layer is termed as the diffuse layer. In an analogy with electrical circuitry, the double-layer structure comprises an electrical capacitance effect due to the accumulation of ions on the surface and in the neighborhood of the electrode. Besides, the mobility of ions in the diffuse layer can be linked to a transport resistance due to diffusion effects. In general, the capacitance in the ionic double-layer depends on the dielectric constant of the electrolyte and the thickness of the double layer.

A useful technique to estimate capacitance and resistance parameters associated to EIS data is to determine the parameters of an equivalent electrical circuit. Based on the double-layer structure describe above, plenty of work has been made in the equivalent-circuit modeling of dispersed material in electrolytic medium [36,37]. First, note that in the low-frequency region the $Z_{Re}(\omega)$ and $Z_{Im}(\omega)$ moduli decay as $O(\omega^{-\alpha})$, with a fractional decaying exponent of the order of $\alpha \approx 0.8$. In this way, the potential polarization of the ionic species cannot be characterized accurately by simple integer-order equivalent circuits. Following Westerlund and Ekstan [38], the ionic double-layer can be more accurately described by fractional-order capacitance than by integer-order capacitance. In this case, the equivalent circuit is composed by an active (medium) electrolyte resistance R_m in series with a parallel arrangement of a double-layer (or charge transfer) resistance R_{dl} and a constant-phase (CP) element representing the fractional-order capacitor (see Fig. 6). It should be commented that the proposed CPE-type behavior of the IES response is more related to particle size and interfacial ion mobility features, rather than to

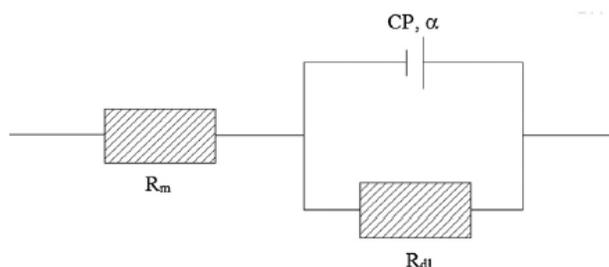


Fig. 6. Schematic diagram of the fractional-order Randles equivalent circuit.

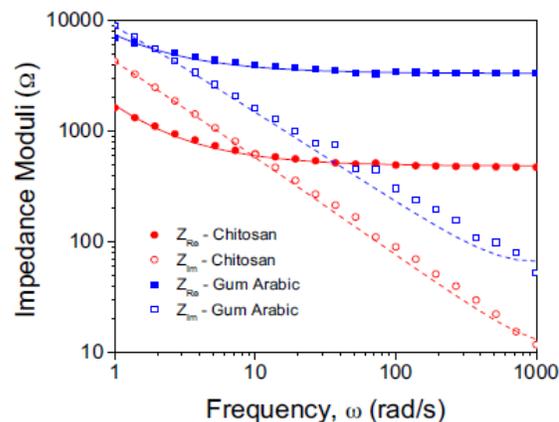


Fig. 7. Fractional-order Randles circuit fitting using the EIS experimental data in Fig. 5.

roughness of the electrode surface. The impedance of the equivalent fractional-order circuit is given by

$$Z(j\omega) = R_m + \frac{R_{dl}}{1 + (j\tau_{dl}\omega)^\alpha} \quad (1)$$

where τ_{dl} is a relaxation time-constant of the double-layer given by $\tau_{dl} = R_{dl}C_{dl}$. Here, C_{dl} is the capacitance of the double-layer. It is valuable to note that the fractional-order capacitor $(j\tau_{dl}\omega)^\alpha$ can be seen as an electrical device located between a pure capacitor ($\alpha = 1$) and a Warburg diffusion element ($\alpha = 0.5$).

Using the Euler's formula, one can show that the impedance moduli are given by

$$Z_{Re}(\omega) = R_m + \frac{R_{dl} \left(1 + \tau_{dl}^\alpha \omega^\alpha \cos\left(\frac{\alpha\pi}{2}\right)\right)}{\left(1 + \tau_{dl}^\alpha \omega^\alpha \cos\left(\frac{\alpha\pi}{2}\right)\right)^2 + \left(\tau_{dl}^\alpha \omega^\alpha \sin\left(\frac{\alpha\pi}{2}\right)\right)^2} \quad (2)$$

and

$$Z_{Im}(\omega) = \frac{R_{dl} \tau_{dl}^\alpha \omega^\alpha \sin\left(\frac{\alpha\pi}{2}\right)}{\left(1 + \tau_{dl}^\alpha \omega^\alpha \cos\left(\frac{\alpha\pi}{2}\right)\right)^2 + \left(\tau_{dl}^\alpha \omega^\alpha \sin\left(\frac{\alpha\pi}{2}\right)\right)^2} \quad (3)$$

It can be shown that the imaginary modulus decays as $O(\omega^{-\alpha})$ in the high-frequency region (i.e., for frequencies $\omega \gg \tau_{dl}^{-1}$). This behavior is in line with the pattern displayed by the gum Arabic and chitosan dispersions in Fig. 5a. Eqs. (2) and (3) were used to describe the experimental EIS data in Fig. 5. To this end, a tailored Fortran computer code was implemented to estimate the set of parameters $\{R_m, R_{dl}, \tau_{dl}, \alpha\}$ via the numerical solution of a least-squares error problem. Fig. 7 compares the adjusted functions with the experimental data, showing good agreement for both cases. The estimated parameters are exhibited in Table 1. As expected, the chitosan dispersion presented smaller resistance values than the gum Arabic dispersion. However, the relaxation time-constant for the chitosan dispersion was higher (about 70%) than that for the gum Arabic

Table 1

Parameters of the fractional Randles circuit for gum Arabic and chitosan dispersions.

Sample	pH	R_m (k Ω)	R_{dl} (k Ω)	τ_{dl} (s)	α	R^2
Chitosan	3.55	0.48 ± 0.02	44.01 ± 1.23	16.86 ± 1.22	0.89 ± 0.02	0.95
Gum Arabic	4.75	3.23 ± 0.15	64.02 ± 2.75	9.37 ± 0.52	0.83 ± 0.03	0.94

Values are means ± standard error, of three replicates.

dispersion. Since $\tau_{dl} = R_{dl}C_{dl}$, the smaller resistance and the higher time-constant imply that the double-layer of the chitosan dispersion is more capacitive than the respective double-layer of the gum Arabic dispersion. The fractional exponent was slightly higher for the chitosan dispersion than for the gum Arabic dispersion.

EIS test was also applied to the biopolymers complexation process, with impedance moduli exhibiting a pattern similar to that of the gum Arabic and chitosan dispersions. In this way, the theoretical impedance functions given by Eqs. (2) and (3) were used to fit the EIS experimental data. Fig. 8 shows the change of the equivalent circuit parameters $\{R_m, R_{dl}, \tau_{dl}, \alpha\}$ as a function of $R_{GA/Ch}$. The correlation coefficient R^2 was used as an indication of goodness of fit. $R^2 > 0.93$ in all cases. The following comments are in order:

- The electrolyte medium resistance R_m increased with the addition of gum Arabic. The increase was apparently linear up to $R_{GA/Ch}$ of 5:1, where an inflexion point was displayed. The dotted vertical line depicts the value at which the mixture achieved the isoelectric point (Fig. 2) and where the maximum biopolymer complex stability was obtained (Fig. 4). For higher $R_{GA/Ch}$, the electrolyte medium resistance also showed a sustained increase, although at a smaller rate.

- The double-layer resistance R_{dl} also increased with an apparent linear increase up to $R_{GA/Ch}$ of 5:1. In contrast to the electrolyte medium resistance, the double-layer resistance achieved a maximum value at the isoelectric point, then showing a slight decrease for $R_{GA/Ch}$ higher than 5:1.
- The relaxation time-constant τ_{dl} decreased with the addition of gum Arabic. After the isoelectric point (corresponding to $R_{GA/Ch}$ of about 5.5:1, the time-constant achieved a constant value of about 11.75 s.
- The fractional-order exponent α displayed a slight decrease with the addition of gum Arabic. It seems that this exponent achieved a minimum value at the isoelectric point conditions. The decrease showed by the fractional-order exponent indicates that the addition of gum Arabic led to a slight decrease of the capacitor components of the constant-phase element.
- It should be recognized that the Randles model is only an electrical analogy of the electrochemistry involved in dispersion systems. By using the Randles model for describing IES experimental data, the details of the electrochemical phenomena in the electrode vicinity are lost. For instance, it is hard to discriminate the effects of Stern and Gouy-Chapman layers. However, it should be emphasized that the use of the empirical Randles model can be justified since the purpose is to obtain some parameters for monitoring the formation of complex coacervates.

In all cases, the behavior of the equivalent circuit parameters changed their behavior near the isoelectric point where maximum complex coacervate stability and production were obtained. This means that the equivalent circuit parameters were sensitive to the formation gum Arabic–chitosan complexes. In general terms,

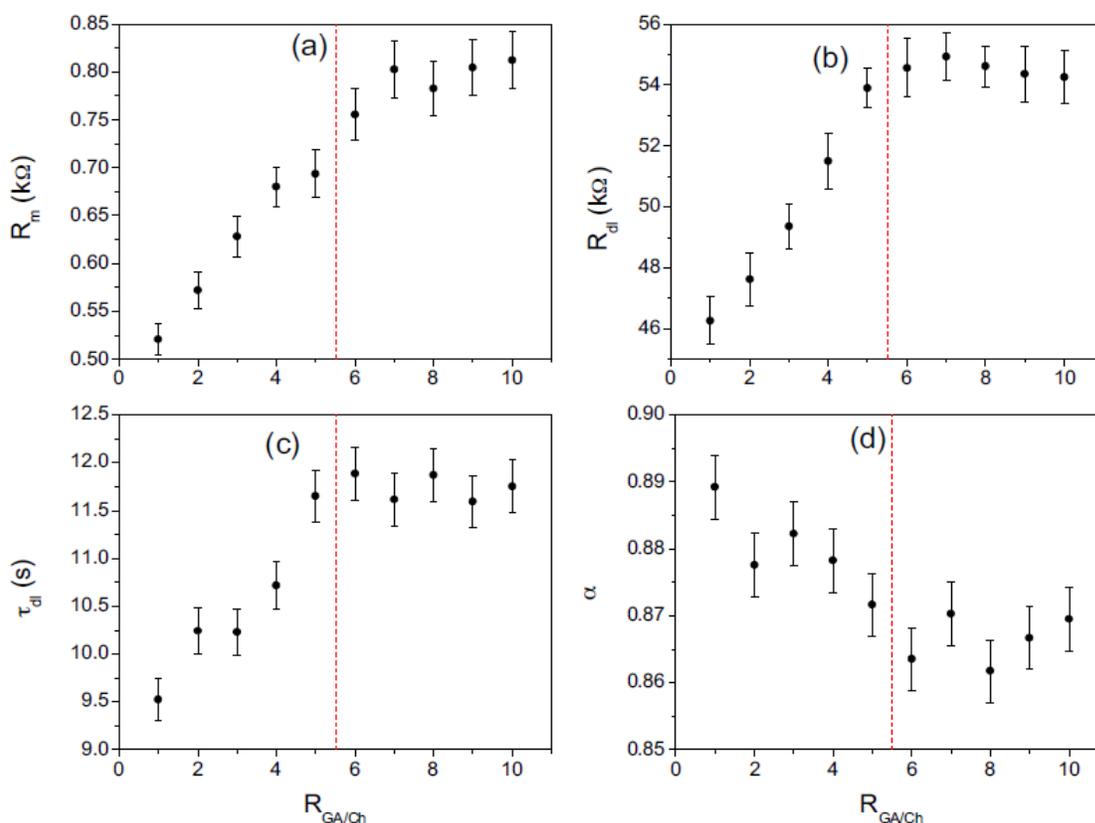


Fig. 8. Changes of the fractional-order Randles circuit parameters with the gum Arabic–chitosan mass ratio ($R_{GA/Ch}$). The dashed vertical line in red depicts the conditions at which the isoelectric point was attained. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the titration point at which the variation of the equivalent circuit parameters showed a break-point corresponds with the optimal conditions for obtaining the maximum complex coacervate yield and stability.

EIS measurements can be used for estimating the size of the structures dispersed in the medium. However, if a reference structure is not available for comparing, it is a hard task to relate the size of structures to the empirical Randles model. In this case, more fundamental models based on, e.g., Butler–Volmer modeling framework [39] might be used for this purpose. Some insights can be drawn from the results shown in Fig. 8. The rise of the resistance and the decrease of the fractional CP exponent suggest that the size of the complex structures increase with the GA/Ch ratio. The underlying idea is that increased resistance can be linked to larger structure size, while decreased fractional-order exponent α reflects more intricate structures. However, the analytical sedimentation results in Fig. 4b suggest that large complex structures are fragile as indicated by the sedimentation velocity, which decreased for high GA/Ch ratios. That is, complex structures for high GA/Ch ratios are easily fragmented by the action of shear deformations, limiting in this way the sedimentation velocity of the dispersed particles.

An interesting issue is how the break-point of the circuit parameters is related to the mechanism involved in the formation of stable complex coacervate. The departing point is the chitosan homogeneously dispersed in an acetic acid solution. Chitosan exhibits three types of functional sites that can interact with other molecules by electrical or hydrogen bonds; namely, an amino group and both primary and secondary hydroxyl groups at the C-2, C-3 and C-6 positions, respectively [40]. In addition, the acetyl group exhibits a certain degree of hydrophobicity [41]. The active polyelectrolyte was composed by a small amount of ions obtained from the decomposition of the acetic acid, as well as by the protonated amine groups of chitosan. In this way, the chitosan acted as a polycation that was able to transfer charges and polarize in the face of an alternating potential. The deprotonated carboxyl groups of the gum Arabic interacted with the protonated amine groups of the chitosan with electrostatic and chemical (via redox reactions), to form biopolymer complexes in the bulk dispersion. The result was an affective decrease of the active polyelectrolytes, achieving a minimum at the isoelectric point where the amine group moieties of the chitosan were balanced by the deprotonated carboxyl group moieties of the gum Arabic. From the electrical standpoint, the reduction of active electrolyte in the test dispersion was reflected as an increase of the electrical resistance and a decrease of the electrical capacitance. These changes were effectively detected by the EIS response of the biopolymer complexes in the dispersion.

The results obtained with the EIS approach were contrasted against DC conductivity measurements. Fig. 9 shows simultaneously the double-layer resistance from the Randles circuit and the DC conductivity as functions of the GA/Ch ratio. The DC conductivity decreased for small GA/Ch ratios, up to about 4:1. Afterwards, the conductivity tended to achieve a nearly constant value for higher GA/Ch ratios. The decrease of the system conductivity can be attributed to a decrease of polyelectrolytes available in the medium as the material is used for complexes formation. As further gum Arabic is incorporated, beyond the IEP of 5.5:1, the conductivity showed a slight rising induced by the increased availability of free ions from the gum Arabic. Relative to the results from IES measurements where the rate of change of the double-layer resistance decreased sharply at the isoelectric point, the results obtained with the DC conductivity measurements were not clearly conclusive. Although the conductivity exhibited a minimum value at about 4:1, the lack of clarity in the change of conductivity with respect to the gum Arabic/chitosan ratio can be explained from the relatively low sensitivity and accuracy in media displaying relatively

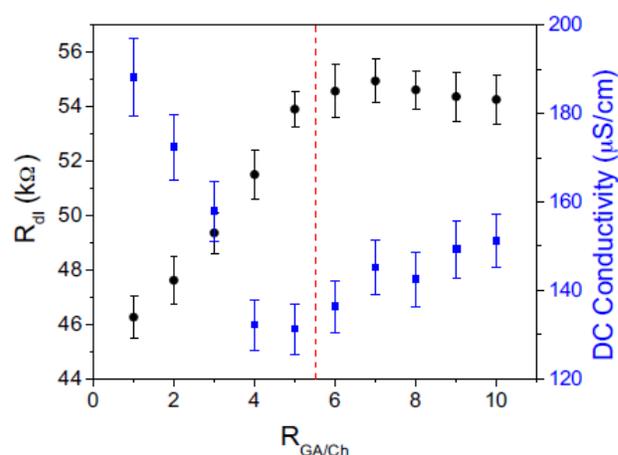


Fig. 9. DC conductivity compared with the double-layer resistance as function of the gum Arabic–chitosan ratio $R_{GA/Ch}$.

high conductivity [16]. The problem relies on saturation effect on the electrode surface, leading to distortions in the effective conductivity of charges in the medium. The use of IES measurements reduces the saturation effects since the polarizing voltage enables removal of adsorbates on the electrode surface.

3.6. Mechanistic implications of complex formation between gum Arabic and chitosan

Fig. 3 shows that the formation of gum Arabic/chitosan complex depends on the biopolymer ratio $R_{GA/Ch}$. Based on the results and discussion described above, a mechanism of the formation of complex coacervates can be outlined as follows. Protolytic balance mechanisms dominate the complex formation for small values of $R_{GA/Ch}$, up to about 2.5 where the stoichiometry plays an important role. The stoichiometric ratio reflects a balance between the protonated amine groups of chitosan and the deprotonated carboxyl groups of gum Arabic. It is possible that hydrogen bonds and possibly van der Waals interactions are involved in this phase, maintaining the cohesion of the complex microstructure [42]. The possible mechanisms of electronic interaction between chitosan and gum Arabic molecules might be caused by hydrogen bonding through functional groups such as hydroxyl, amino and carbonyl groups. Beyond the stoichiometric balance, further addition of gum Arabic increases the negative electrostatic repulsive forces, promoting the formation of a surrounding permeable membrane. At the isoelectric point corresponding to $R_{GA/Ch}$ values of about 5.5, the electrostatic forces become balanced, leading to the consolidation of the complex microstructure. This is in line with studies suggesting that intermolecular forces are more important than protolytic neutralization in the formation of stable floccules with chitosan [40,41,43]. For higher values of $R_{GA/Ch}$, the negative electrostatic forces induced by gum Arabic excess induce the surging of destabilization mechanisms, leading to fragile complex microstructures that can be broken by shear forces.

4. Conclusions

The formation of gum Arabic–chitosan complexes in aqueous phase was monitored by electrical impedance spectroscopy (EIS). It was observed that the parameters characterizing the EIS data changed as function of frequency and polysaccharide mass ratio. The change with the frequency reflected the attenuation of the polarization process as induced by an alternating exciting potential.

In contrast, the change with the mass ratio was due to variations of the active electrolytic species as consequence of the formation of biopolymer complexes. In order to detect sensible changes of the EIS data, a fractional-order Randles equivalent circuit was used to describe the experimental data. It was found that electrical resistance over the whole frequency range (from 1 to 1000 Hz) was sensitive to changes in molecular arrangements when forming complex coacervates. The resistance changes were detected as a break-point in the variations of the resistance parameters involved in the fractional-order Randles circuit.

The EIS approach was able to determine the point at which gum Arabic–chitosan complex coacervates with maximum yield and stability were formed. The method is relatively simple to implement and, together with ζ -potential measurements, becomes a practical alternative to monitor the evolution of biopolymers complexation in bulk solution leading to complex coacervates formation. The method requires some refinements, including tests with other systems (e.g., protein–protein, protein–polysaccharide, polysaccharide–polysaccharide) and the effects of the titration agent order (e.g., gum Arabic dispersion added to chitosan dispersion or viceversa).

Conflict of interest

None

Authors contribution

C. Roldan-Cruz (Ph.D. student) designed and performed the EIS experiments. J. Carmona-Ascencio (Ph.D. student) assisted with the experimental runs and developed the computer code for the estimation of the equivalent circuit parameters. E. J. Vernon-Carter proposed the use of EIS for monitoring complex coacervate formation. J. Alvarez-Ramirez organized results and discussion. All authors contributed to the writing of the manuscript.

Acknowledgements

The authors thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for partially financing this work through project 236500.

References

- [1] C. Schatz, J.M. Lucas, C. Viton, A. Domard, C. Pichot, D. Thierry, Formation and properties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers, *Langmuir* 20 (2004) 7766–7778.
- [2] P. Walstra, Studying food colloids: past, present and future, *R. Soc. Chem.* 284 (2003) 391–400.
- [3] R. Jiménez-Alvarado, C.I. Beristain, L. Medina-Torres, A. Román-Guerrero, E.J. Vernon-Carter, Ferrous bisglycinate content and release in $W_1/O/W_2$ multiple emulsions stabilized by protein–polysaccharide complexes, *Food Hydrocoll.* 23 (2009) 2425–2433.
- [4] L. Hernández-Rodríguez, C. Lobato-Calleros, D.J. Pimentel-González, E.J. Vernon-Carter, Lactobacillus plantarum protection by entrapment in whey protein isolate:κ-carrageenan complex coacervates, *Food Hydrocoll.* 36 (2014) 181–188.
- [5] C. Ramírez-Santiago, C. Lobato-Calleros, H. Espinosa-Andrews, E.J. Vernon-Carter, Viscoelastic properties and overall sensory acceptability of reduced-fat Petit-Suisse cheese made by replacing milk fat with complex coacervate, *Dairy Sci. Technol.* 92 (2012) 383–398.
- [6] C. Butstraen, F. Salaün, Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum Arabic and chitosan, *Carbohydr. Polym.* 99 (2014) 608–616.
- [7] Z. Dong, Y. Ma, K. Hayat, C. Jia, S. Xia, X. Zhang, Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation, *J. Food Eng.* 104 (2011) 455–460.
- [8] K.I. Shimokawa, K. Saegusa, Y. Wada, F. Ishii, Physicochemical properties and controlled drug release of microcapsules prepared by simple coacervation, *Colloid Surf. B* 104 (2013) 1–4.
- [9] B.M. Rauck, T.L. Novosat, M. Oudega, Y. Wang, Biocompatibility of a coacervate-based controlled release system for protein delivery to the injured spinal cord, *Acta Biomater.* 11 (2015) 204–211.
- [10] C. Schmitt, S.L. Turgeon, Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems, *Adv. Colloid Interface Sci.* 167 (2011) 63–70.
- [11] A.B. Kayitmazer, A.F. Koksak, E.K. Iyilik, Complex coacervation of hyaluronic acid and chitosan: effects of pH, ionic strength, charge density, chain length and the charge ratio, *Soft Matter* 11 (2015) 8605–8612.
- [12] C.Y.G. Lemetter, F.M. Meeuse, N.J. Zuidam, Control of the morphology and the size of complex coacervate microcapsules during scale-up, *AIChE J.* 55 (2009) 1487–1496.
- [13] H. Espinosa-Andrews, K.E. Enríquez-Ramírez, E. García-Márquez, C. Ramírez-Santiago, C. Lobato-Calleros, E.J. Vernon-Carter, Interrelationship between the zeta potential and viscoelastic properties in coacervates complexes, *Carbohydr. Polym.* 95 (2013) 161–166.
- [14] Q. Ru, Y. Wang, J. Lee, Y. Ding, Q. Huang, Turbidity and rheological properties of bovine serum albumin/pectin coacervates: effect of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio, *Carbohydr. Polym.* 88 (2012) 838–846.
- [15] D.V. Krogstad, S.H. Choi, N.A. Lynd, D.J. Audus, S.L. Perry, J.D. Gopez, C.J. Hawker, E.J. Kramer, M.V. Tirrell, Small angle neutron scattering study of complex coacervate micelles and hydrogels formed from ionic diblock and triblock copolymers, *J. Phys. Chem. B* 118 (2014) 13011–13018.
- [16] S. Ghasemi, M.T. Darestani, Z. Abdollahi, B.S. Hawket, V.G. Gomes, Electrical impedance spectroscopy for determining critical micelle concentration of ionic emulsifiers, *Colloid Surf. A* 441 (2014) 195–203.
- [17] J. Wu, Y. Ben, H.C. Chang, Particle detection by electrical impedance spectroscopy with asymmetric-polarization AC electroosmotic trapping, *Microfluid. Nanofluid.* 1 (2005) 161–167.
- [18] H.P. de Oliveira, E.G.L. Oliveira, C.P. de Melo, Aggregation of methyl orange probed by electrical impedance spectroscopy, *J. Colloid Int. Sci.* 303 (2006) 444–449.
- [19] H.P. de Oliveira, C.A.S. Andrade, C.P. de Melo, Electrical impedance spectroscopy investigation of surfactant–magnetite–polypyrrole particles, *J. Colloid Interface Sci.* 319 (2008) 441–449.
- [20] A. Galia, O. Scialdone, G. Begue, S. Piazza, G. Filardo, Utilization of impedance spectroscopy to investigate the self-assembly behavior of amphiphiles soluble in supercritical carbon dioxide: preliminary results, *J. Supercrit. Fluid* 40 (2007) 183–188.
- [21] H.P. de Oliveira, C.P. de Melo, Use of electrical impedance spectroscopy as a practical method of investigating the formation of aggregates in aqueous solutions of dyes and surfactants, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 6903–6908.
- [22] G. Scandurra, G. Tripodi, A. Verzera, Impedance spectroscopy for rapid determination of honey floral origin, *J. Food Eng.* 119 (2013) 738–743.
- [23] Z. Abdollahi, M.T. Darestani, S. Ghasemi, V.G. Gomes, Characterizing colloidal behavior of non-ionic emulsifiers in non-polar solvents using electrical impedance spectroscopy, *Colloid. Polym. Sci.* 292 (2014) 2695–2705.
- [24] Z. Hu, A. Antony, G. Leslie, P. Le-Clech, Real-time monitoring of scale formation in reverse osmosis using electrical impedance spectroscopy, *J. Membr. Sci.* 453 (2014) 320–327.
- [25] P.M. Claesson, B.W. Ninham, pH-dependent interactions between adsorbed chitosan layers, *Langmuir* 8 (1992) 1406–1412.
- [26] D. Renard, L. Lavenant-Gourgeon, M.C. Ralet, C. Sanchez, Acacia senegal gum: Continuum of molecular species differing by their protein to sugar ratio, molecular weight, and charges, *Biomacromolecules* 7 (2006) 2637–2649.
- [27] J.F. Duval, H.P. van Leeuwen, Electrokinetics of diffuse soft interfaces: 1. Limit of low Donnan potentials, *Langmuir* 20 (2004) 10324–10336.
- [28] J.F. Duval, Electrokinetics of diffuse soft interfaces 2. Analysis based on the nonlinear Poisson–Boltzmann equation, *Langmuir* 21 (2005) 3247–3258.
- [29] J.F. Duval, H. Ohshima, Electrophoresis of diffuse soft particles, *Langmuir* 22 (2006) 3533–3546.
- [30] H. Espinosa-Andrews, J.G. Báez-González, F. Cruz-Sosa, E.J. Vernon-Carter, Gum Arabic–chitosan complex coacervation, *Biomacromolecules* 8 (2007) 1313–1318.
- [31] J. Van der Gucht, E. Spruijt, M. Lemmers, M.A.C. Stuart, Polyelectrolyte complexes: bulk phases and colloidal systems, *J. Colloid Interface Sci.* 361 (2011) 407–422.
- [32] E. Kizilay, A.B. Kayitmazer, P.L. Dubin, Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids, *Adv. Colloid Interface Sci.* 67 (2011) 24–37.
- [33] T. Detloff, T. Sobisch, D. Lerche, Particle size distribution by space or time dependent extinction profiles obtained by analytical centrifugation, *Part. Part. Syst. Charact.* 23 (2006) 184–187.
- [34] H. Espinosa-Andrews, O. Sandoval-Castilla, H. Vázquez-Torres, E.J. Vernon-Carter, C. Lobato-Calleros, Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier transform infrared spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates, *Carbohydr. Polym.* 79 (2010) 541–546.
- [35] E. Barsoukov, J.R. Macdonald, *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment and Applications*, John Wiley & Sons, New York, 2005.
- [36] H.G. Coster, T.C. Chilcott, A.C. Coster, Impedance spectroscopy of interfaces: membranes and ultrastructures, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 40 (1996) 79–98.
- [37] S. Bannwarth, M. Darestani, H. Coster, M. Wessling, Characterization of hollow fiber membranes by impedance spectroscopy, *J. Membr. Sci.* 473 (2015) 318–326.
- [38] S. Westerlund, L. Ekstam, Capacitor theory, Dielect. Electrical Insul. *IEEE Trans.* 1 (1994) 826–839.
- [39] Y. Wang, E. Laborda, M.C. Henstridge, F. Martinez-Ortiz, A. Molina, R.G. Compton, The use of differential pulse voltammetries to discriminate between the Butler–Volmer and the simple Marcus–Hush models for

- heterogeneous electron transfer: the electro-reduction of europium(III) in aqueous solution, *J. Electroanal. Chem.* 668 (2012) 7–12.
- [40] E. Furusaki, Y. Ueno, N. Sakairi, N. Nishi, S. Tokura, Facile preparation and inclusion ability of a chitosan derivative bearing carboxymethyl- β -cyclodextrin, *Carbohydr. Polym.* 29 (1996) 29–34.
- [41] S.P. Strand, T. Nordengen, K. Østgaard, Efficiency of chitosans applied for flocculation of different bacteria, *Water Res.* 36 (2002) 4745–4752.
- [42] E.R. Leite, C. Ribeiro, *Cristallization and Growth of Colloidal Nanocrystals*, Springer, New York, 2012.
- [43] F. Gassara, C. Antzak, A.C. Matheyambath, S.J. Sarma, S.K. Brar, M. Verma, Chitin and chitosan as natural flocculants for beer clarification, *J. Food Eng.* 166 (2015) 80–85.



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfa

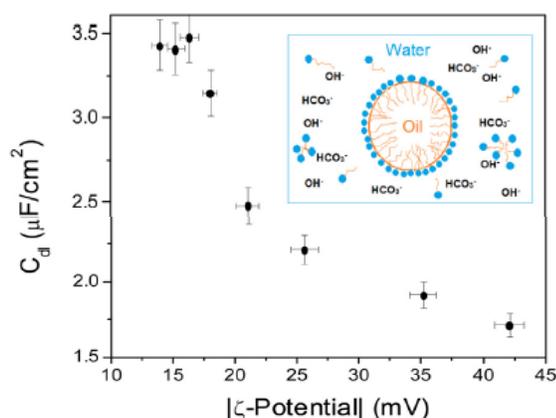
Assessing the stability of Tween 80-based O/W emulsions with cyclic voltammetry and electrical impedance spectroscopy

C. Roldan-Cruz^a, E.J. Vernon-Carter^b, J. Alvarez-Ramirez^{b,*}^a Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-534, Iztapalapa, D.F. 09340, Mexico^b Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-534, Iztapalapa, D.F. 09340, Mexico

HIGHLIGHTS

- Minimum surfactant amount for emulsion stability was estimated by voltammetry and EIS.
- Transfer of ionic charges was involved in the O/W interface stabilization.
- Minimum surfactant concentration was identified with saturation of electrical impedance.
- Effectiveness of the electrochemical technique provides it with great potential of use.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 July 2016

Received in revised form

20 September 2016

Accepted 22 September 2016

Available online 22 September 2016

Keywords:

O/W emulsions

Stability

Tween-80

zeta-Potential

Cyclic voltammetry

Electrical impedance spectroscopy

ABSTRACT

The stability of oil-in-water (O/W) emulsions made with the nonionic surfactant Tween-80 was explored using cyclic voltammetry and electrical impedance spectroscopy (EIS). Emulsions were prepared with a disperse phase volume fraction of 0.25 and Tween-80 concentrations ranging from 0.25 to 4% v/v with respect to the aqueous phase. As a preliminary step, the emulsions were characterized in terms of mean droplet diameter, creaming rate from analytical centrifugation and ζ -potential. The results showed that the mean droplet diameter and the creaming rate decreased as the concentration of Tween-80 was increased. In contrast, the ζ -potential showed a decreasing behavior probably caused by the displacement of ionic species from the oil/water interface. In a second step, cyclic voltammetry and EIS measurements were performed. The former indicated the increase of the system capacitance with the incorporation of surfactant molecules. A Randles equivalent circuit was used to fit EIS measurements, indicating that double-layer resistance decreased and the double-layer capacitance increased as the amount of Tween-80 increased up to about 2% v/v. For higher Tween-80 concentrations, the parameters achieved a nearly constant value, which was interpreted as the threshold point where the O/W emulsion droplets became saturated by surfactant molecules. Thus, it was concluded that cyclic voltammetry and EIS are suitable techniques for characterizing the stability of O/W emulsions made with nonionic surfactants, and for pinpointing optimal surfactant concentration for achieving full emulsion droplets surface coverage.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail addresses: jjar@xanum.uam.mx, hcnvas@gmail.com (J. Alvarez-Ramirez).

1. Introduction

Emulsions are widely used in pharmaceutical, food and cosmetic industries for delivery of bioactive agents such as antioxidants, vitamins, antimicrobials, parenteral nutrition, phytosterols and omega-3 fatty acids [1–4]. Emulsions built-up with food grade emulsifiers such as di- and triglycerides, caprylocaproyl polyoxylglycerides (Labrasol), polyethylene glycol (25)-cetostearyl ether (Cremophor) and polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (Tween-80) are susceptible to destabilization by environment factors, such as pH, temperature and ionic strength. Coalescence, aggregation, creaming and catastrophic inversion are the main mechanisms involved in emulsion instability. For instance, creaming is caused by differences in mass density between the dispersed and the continuous phase. On the other hand, coalescence occurs when two or more emulsion droplets become joined together forming larger droplets, due to the thinning and disruption of the liquid film between the droplets [5]. Some systematic approaches have been taken to evaluate the stability of emulsions. Interfacial shear rheology is a fundamental approach since the interfacial phenomenon has been linked to emulsion stability [6]. The underlying idea is that the interfacial flow behavior is controlled by the presence of compounds (e.g., surfactants, proteins, insoluble monolayers, lipids, macromolecules or particles) in the interfacial layer. The interface microstructure is formed by the adsorption of interfacial active molecules and attachment of particles or by spreading or layer formation of insoluble amphiphilic substances. Although the measurement of interfacial properties for predicting emulsion stability is increasing, the interpretation of the results is not always a direct and easy task. Stability of emulsions has been traditionally reported as the change of droplet size in time. In this regard, analytical centrifugation is considered as a reliable technique to gain insights regarding emulsion stability by effects of creaming, aggregation and coalescence [7,8]. The technique is based on light scattering measurements under accelerated centrifugation and the emulsion stability is quantified in terms of coalescence/creaming rates. On the other hand, methods borrowed from electrochemistry (e.g., cyclic voltammetry and electrical impedance spectroscopy (EIS)) have been also explored for characterizing emulsions [9,10]. Cyclic voltammetry has been used for the determination of critical micellar concentration (CMC), estimated as the surfactant concentration at which the anodic/cathodic current exhibits a sharp transition [11–13]. It has been shown that EIS measurements can provide valuable insights in the structure and stability of colloidal particles [14–16]. EIS has been proposed for CMC determination [17]. Here, the CMC was estimated as the concentration at which the parameters of a Randles' equivalent circuit exhibited a sharp transition. EIS has been also used for characterization the colloidal behavior of ionic emulsifiers in non-polar solvents [18]. The stability of water-in-oil (petroleum) emulsions was characterized by in situ EIS measurements via estimated parameters (resistance and conductivity) from an equivalent electrical circuit [10].

Tween-80 is a typical synthetic non-ionic surfactant with wide applications in food and polymer industries. The stabilization mechanism resides in the surfactant ability to reduce the interfacial tension by relatively short periods. Tween-80 is an amphiphilic molecule, meaning that when added to an oil/water mixture, the hydrophilic head accommodates into the aqueous phase and the hydrophobic tail into the oily phase. The result is a reduction of the interfacial tension, and hence of the tendency of oil/water interfaces to collapse. Emulsion stability is achieved when the surfactant molecules cover the entire oil/water interface, enhancing interfacial rheology, contributing in this way to hinder droplet coalescence and aggregation by the effects of steric repulsion. An interesting issue is to reliably determine the minimum amount of surfactant required for achieving maximum emulsion stability, as it impacts

the cost of emulsion manufacture, without necessarily improving stability. Thus the aims of this work were to: (1) manufacture O/W emulsions with constant dispersed volume fraction and different concentrations of Tween-80; (2) determine emulsion stability and optimal Tween-80 concentration leading to complete droplets surface coverage using cyclic voltammetry and EIS techniques; and (3) to contrast the emulsion stability results obtained by voltammetry and EIS with those obtained by analytical centrifugation and droplet size analysis.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Tween-80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, CAS number 9005-65-6, purity >99%, mol wt approx. 1310, CMC 0.012 mM, density 1.06 g mL⁻¹ at 25 °C) and mineral oil (CAS number 8042-47-5, density 0.84 g mL⁻¹ at 25 °C) were used as non-ionic surfactant and oil phase, respectively. Deionized water was used in all the experiments.

2.2. Preparation of emulsions

The required amount of Tween-80 was dissolved in deionized water using mechanical stirring at 3500 rpm for 2 min (Ultra-Turrax model T-25, IKA Works, Inc., Wilmington, NC, USA) for obtaining 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 and 4.0% v/v surfactant concentrations. Subsequently, mineral oil was incorporated dropwise unto the aqueous phase with mechanical stirring at 10,000 rpm for 5 min. All the emulsions had a disperse phase volume fraction of 0.25. The emulsions were tagged as E_x, where the sub-index *x* represents the emulsifier concentration. The E_x were stored at 4 °C until required for analysis, which occurred in all cases within 1 h of emulsion preparation, and in the case of droplet size analysis, also after 7 days of storage.

2.3. Microscopic observation

The E_x were observed with an optical microscope (Olympus BX45, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) coupled to an optical analyzer system (digital Olympus camera C3030, Olympus Imaging Americas Inc., Center Valley, PA, USA). Glass micro-slides (3 × 1 in) and were used. E_x samples were placed on glass micro-slides (3 × 1 in) and covered with care to reduce possible destruction of emulsion structures by shear stress with cover-slips (No. 11/2; VWR Scientific, Plainfield, NJ, USA), and the edges sealed using vacuum grease to minimize water evaporation. Light intensity was kept at minimum values to reduce sample heating. Selected micrographs taken at 100× were presented.

2.4. Droplet size measurement

The volume-weighted mean droplet diameter ($d_{4,3}$) of the E_x was estimated with a Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK) using deionized water (refractive index 1.333) as dispersant.

2.5. Analytical centrifugation

Physical stability to creaming of E_x was evaluated using an analytical centrifugal method (LUMISizer, L.U.M. GmbH, Berlin, Germany). The data produced was then used to calculate the creaming rate of emulsions as previously described [7,8]. Samples (0.4 mL) of E_x were subjected to centrifugation at 4000 rpm for 126 min at 20 °C. The LUMiSizer enables to simultaneously measure

the intensity of transmitted light as a function of time and position over the separation interface across the entire sample length. Rate and height of the creaming was obtained with the SEPVView equipment software. The creaming rate was correlated to the emulsion stability; namely, the higher the creaming rate, the lower the emulsion stability.

2.6. ζ -Potential

The ζ -potential of E_x was measured with a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), by determining the direction and velocity of the emulsion droplets as they moved in the direction of the applied electric field. The equipment software converted the electrophoretic mobility measurements into ζ -potential values using the Smoluchowsky mathematical model.

2.7. Cyclic voltammetry and electrical impedance spectroscopy (EIS)

E_x were loaded into a PARSTAT Potentiostat/Galvanostat (Princeton Applied Research, Oak Ridge, TN, USA) model 2273 cell (volume = 50 mL) equipped with a Faraday cage. The arrangement set-up consisted in a typical cell (volume = 50 mL) with three-electrodes: (1) a saturated sulfate reference electrode ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{SO}_4/\text{K}_2\text{SO}_4$), SSE, ($E = 0.645 \text{ V}/\text{SHE}$, XR200 Radiometer), (2) a platinum foil as counter-electrode, and (3) a platinum plate as working electrode. Prior to each experiment, the surface of the working electrode was polished using Buehler alumina powder (final grain size $\leq 0.05 \mu\text{m}$) to a mirror finish. The electrode was then rinsed with deionized water and placed in an ultrasonic bath for 5 min. The reaction cell was equipped with a temperature control system to maintain the system at 20°C . Voltammograms were obtained by applying a potential scan at 100 mV s^{-1} , from 1.0 to -1.0 V , in the anodic direction. EIS measurements were obtained for E_x under nominal open-circuit conditions (i.e., zero DC bias voltage) by scanning the exciting potential frequency from 1 to 1000 Hz.

For the sake of completeness, a brief description of EIS concepts will be given as follows [9]. Electrical impedance is normally performed using small excitation signals to obtain a pseudo-linear response. The excitation signal is carried out by the potential applied to the electrochemical cell as $E(t) = E_0 \sin(\omega t)$, where ω and E_0 are the excitation frequency and amplitude, respectively. It should be recalled that the relationship between radial frequency ω (expressed in rad/s) and frequency f (expressed in Hz) is given by $\omega = 2\pi f$. The response signal is given by the current in the form $I(t) = I_0 \sin(\omega t + \phi)$, where ϕ is the phase shift between the exciting potential and the response current signals. With the Euler's relationship $\exp(j\omega t) = \cos(\omega t) + j \sin(\omega t)$, one can express the impedance as a complex function. The exciting potential is given by $E(t) = E_0 \exp(j\omega t)$ and the current response as $I(t) = I_0 \exp(j\omega t - \phi)$. By using an Ohm's law in the complex domain, one can define the impedance as a dynamical version of the traditional resistance concept. That is, $Z(\omega) = E(t; \omega)/I(t; \omega)$. In this way, $Z(\omega) = Z_{\text{Re}}(\omega) + jZ_{\text{Im}}(\omega)$, where $Z_{\text{Re}}(\omega) = Z_0(\omega) \cos(\phi)$ and $Z_{\text{Im}}(\omega) = Z_0(\omega) \sin(\phi)$ are respectively the real and imaginary moduli, and $Z_0(\omega) = |Z(\omega)|$ is the impedance magnitude. The real and imaginary parts correspond to the loss (or resistance) and storage (or reactance) moduli. A purely reactive component does not dissipate energy. This means that the component alternatively absorbs energy at the boundary membrane system, a pure reactance will not dissipate any power. Finally, the magnitude of the impedance is related to the frequency-dependent conductance ($G(\omega)$) and capacitance ($C(\omega)$) as follows:

$$G(\omega) = |z|^{-1} \cos(\phi) \quad (1)$$

and

$$C(\omega) = (\omega|z|)^{-1} \sin(\phi) \quad (2)$$

respectively.

2.8. Statistical analysis

Results are presented as means \pm SE from the analysis of replicates ($n = 3$). Data were subjected to simple classification analysis of variance and to Tukey's means comparison analysis. Significance was established at $p \leq 0.05$. Data analysis was done using the Statgraphics Plus software (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc, Cambridge, MA, USA).

3. Results and discussion

Stabilization of emulsions via non-ionic surfactants is largely based on the ability of the emulsifier to alter the dynamic interfacial rheology. In general terms, when the emulsifier layer displays a greater the resistance to disruption, lower is the resulting droplets coalescence. Steric repulsion also plays an important role to slow down droplet flocculation [19]. In the following, the stability of the emulsion will be discussed in terms of changes in $d_{4,3}$ and creaming rate of droplets, and to compare these results with those obtained from voltammetry and EIS.

3.1. Emulsion morphology and mean droplet diameter

Fig. 1 presents illustrative optical microscopy images of $E_{0.25}$, E_1 and E_3 . Fig. 1a shows that low surfactant concentrations (0.25% v/v) did not lead to uniform droplet distribution. In fact, $E_{0.25}$ was characterized by exhibiting a wide distribution of droplet sizes, many of them even departing from spherical morphology. This reflects a deficit of surfactant molecules for covering the surface area of the droplets formed during homogenization. Fig. 1b shows that by increasing the concentration of Tween-80 from 0.25 to 1% v/v, a more uniform droplet size distribution and smaller $d_{4,3}$ was achieved, as higher number of Tween-80 molecules were available for covering the freshly sheared droplets surface. Nevertheless, droplet span was still relatively high, indicative that the amount of Tween-80 molecules was still not sufficient for achieving complete surface area coverage of the E_1 droplets. Further increase in the concentration of Tween-80 to 3% v/v, produced smaller, more uniformly distributed and tightly flocculated droplets arrangement in E_3 . It is apparent, that the number of surfactant molecules was in excess of those required for complete droplets interfacial area covering. Fig. 2 presents the mean droplet diameter as function of the surfactant concentration for the freshly prepared emulsions (0 days) and after 7 days of storage. The mean droplet diameter of the fresh emulsion exhibited an exponential decay with decaying rate of about $1.6 \pm 0.2 (\% \text{ v/v})^{-1}$. Basically, the droplet diameter changed only slightly for surfactant concentrations higher than about 2.0% v/v. For relatively high surfactant concentrations, the droplet diameter achieved an almost mean constant diameter of about $0.75 \mu\text{m}$. Further reduction of the droplet diameter by additional surfactant molecules was not possible because of the limited ability of non-ionic Tween-80 to stabilize the curvature of small drops. After 7 days, the mean droplet diameter of emulsions with low surfactant concentration (approx. $\leq 1.5\% \text{ v/v}$) exhibited an important increase of about 50%. This size increase was due to coalescence of the oil droplets, due to the insufficient amount of emulsifier adsorbed on the surface of emulsion droplets. In contrast, surfactant concentration of $\geq 2\% \text{ v/v}$ (approx. 0.014M) produced emulsions with almost unchanging droplet sizes during 7 days of storage time. This effect is indicative that above a

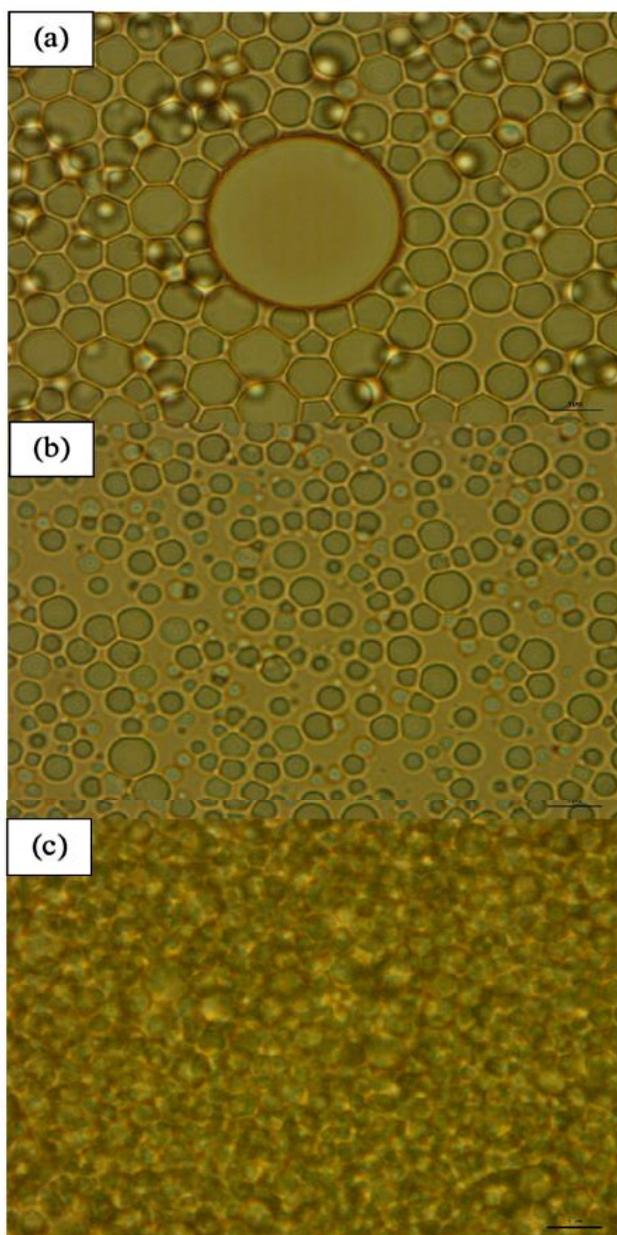


Fig. 1. Optical microscopy images of O/W emulsions stabilized with Tween-80 concentrations of: (a) 0.25, (b) 1.0 and (c) 3% v/v. The horizontal bar corresponds to the scale of 5 μm . It is noted that the higher the surfactant concentration, the smaller the volume-weighted mean droplet diameter.

minimum threshold surfactant concentration value, the number of surfactant molecules available sufficed for achieving a uniform covering of the droplets interface, and contributing to the enhance the resistance to deformation, while reducing the rate of droplet coalescence. A surfactant forms micelles in an aqueous solution when its concentration exceeds some critical level. Known as the critical micelle concentration (CMC) [19]. The CMC of Tween-80 is 0.012 mM, which is much lower than the critical concentration for achieving emulsion stability (approx. 0.014 M). This huge differ-

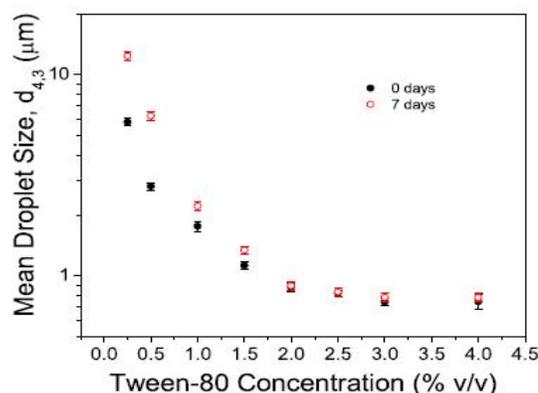


Fig. 2. Volume-weighted mean droplet diameter of the fresh (0 days) and aged (7 days) emulsions. Significant increase of the droplet diameter was exhibited by emulsions with low surfactant concentration.

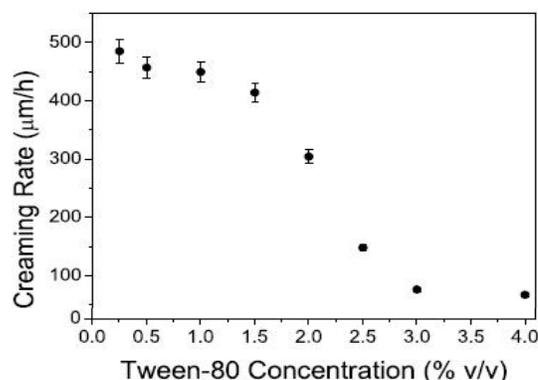


Fig. 3. Creaming rate of the O/W emulsions estimated from analytical centrifugation. A fast decay of the creaming rate onset was exhibited at Tween-80 concentration of about 2% v/v.

ence can be explained from the structure of micelles and emulsion droplets. Micelles are small spherical arrangements with diameter of the order of 10–50 nm. In contrast, the diameter of stable emulsion droplets is of the order of 1 μm (see Fig. 2). The ratio of emulsion droplet to micelle surfaces is in the range 400–1000. This ratio is in agreement with that found in this work for the case in which stable emulsions were obtained. That is, the coverage of the emulsion droplet surface requires about 400–1000 times more surfactant molecules than those required for achieving CMC.

3.2. Analytical centrifugation

E_x were subjected to analytical centrifugation to evaluate their stability against creaming. The results are shown in Fig. 3 as function of the surfactant concentration. The creaming rate was approx. 450 $\mu\text{m h}^{-1}$ for Tween-80 concentrations of up to 1.5% v/v. However, the creaming rate exhibited a sharp reduction to about 50 $\mu\text{m h}^{-1}$ for surfactant concentrations $\geq 3\%$ v/v. The above results indicated that the O/W emulsion was unstable for low surfactant concentrations, up to about 1.5% v/v. In contrast, stabilization was obtained for surfactant concentrations of about 2% v/v or higher. These results tend to suggest that when surfactant concentration was above a “critical” minimum for achieving complete droplets interface coverage, i.e. 2% v/v. Also, at this threshold concentra-

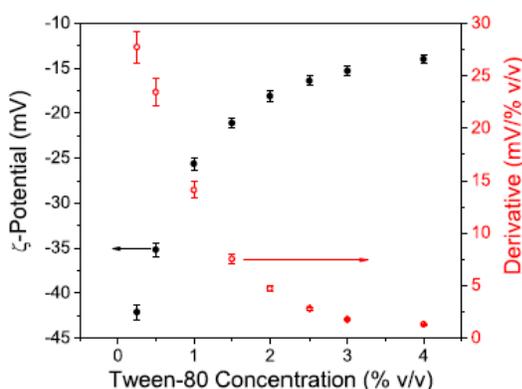


Fig. 4. ζ -Potential of the O/W emulsions as function Tween-80 concentration. It is noted that the ζ -potential decreased as more surfactant was added.

tion the time required by the Tween-80 molecules to move from the bulk phase to droplets surfaces was faster, and the droplet size tended to be smaller [19]. For concentrations above 2% v/v surfactant diffusion to the interface was faster and the adsorption efficiency higher, resulting in further decrease in $d_{4,3}$. Constant small droplet size occurred when Tween-80 concentration was 3% v/v or higher. Although the “actual” disperse phase volume fraction of all the E_x was 0.25, the “effective” disperse phase volume fraction was much greater for the emulsions having smaller $d_{4,3}$ (see Fig. 1). The smaller the droplets sizes, the more closely packed together they became, inducing a sharp increase in emulsion viscosity, hindering the flow past each other [19]. The result of this was a sharp decay of the creaming rate for Tween-80 concentrations of 2% v/v and higher concentrations.

3.3. ζ -Potential

Fig. 4 presents the variation of the ζ -potential of E_x as a function of Tween-80 concentration. The ζ -potential was negative and its absolute value decreased with the surfactant concentration. In fact, the ζ -potential was about -42 mV for $E_{0.25}$ and changed gradually to about -15 mV for high surfactant concentrations. Fig. 4 also presents the derivative of the ζ -potential with respect to the Tween-80 concentration, showing that the more important changes occurred for surfactant concentrations smaller than 2% v/v. For higher concentration values, the ζ -potential tended to a constant value as reflected by the derivative approaching a zero value.

The results in Fig. 4 showed a suppression of the surface charge, measured in terms of the ζ -potential, upon surfactant adsorption. The nature of the charges on the oil/water interface is not clear at all. It has been postulated that the interfacial charge can be attributed to the imbalance at the surface of ions produced by the water itself (namely, H^+ and OH^-). The imbalance is presumably induced by the preferential adsorption of OH^- ions on water interfaces [20,21]. Ions produced by dissolved carbon dioxide (HCO_3^- and CO_3^{2-}) might induce an additional effect. It has been theorized that increased adsorption of surfactant molecules can be expected to lead induce displacement of the ions from the interface [21]. This effect only occurs at relatively high interface coverage and results in a reduction of the interface charge and hence also of the magnitude of the ζ -potential. In this scenario, the results in Fig. 4 suggest that nearly complete interface coverage by surfactant molecules was achieved at concentrations of about 2% v/v of Tween-80. Excess surfactant molecules do not adsorb, tending to form of micelle structures in the bulk of the aqueous phase.

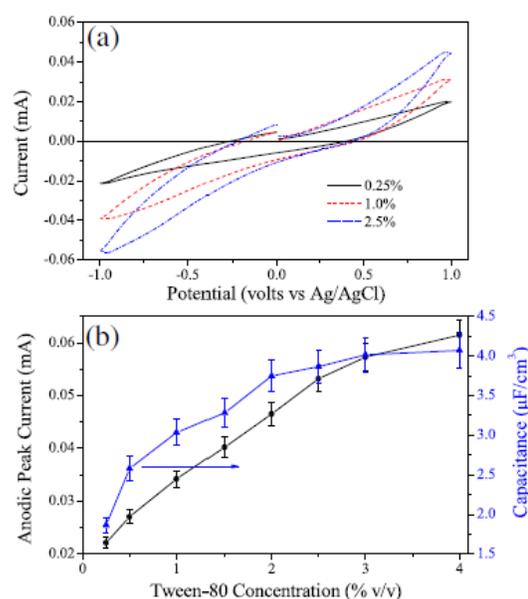


Fig. 5. (a) Illustrative voltammetry patterns of O/W emulsions made with three different concentrations of Tween-80. The absence of appreciable current peaks is noticeable. (b) Emulsion capacitance was estimated by integration of the potential-current pattern.

3.4. Cyclic voltammetry

ζ -Potential measurements suggested that adsorption of the nonionic surfactant might modify the ionic balance in the bulk of the aqueous phase. In turn, this effect can be reflected in the electrolytic properties of the emulsion as more ionic species are contained in the aqueous phase. Fig. 5a presents the cyclic voltammetry results for three different values of the surfactant concentration. Interestingly, the potential-current pattern did not exhibit appreciable oxidation/reduction peaks, suggesting that the pattern was related only to transfer of ionic charges from the bulk to the electrode surface. Besides, the anodic and cathodic peak currents (at $+1.0$ and -1.0 V) increased with the surfactant concentration. In terms of the postulates by Manev and Pugh [21], the increased current might be linked to displaced ionic species from the oil/water interface as more surfactant molecules were adsorbed. Fig. 5b presents the cathodic peak current as function of the surfactant concentration. The anodic current exhibited a similar pattern, as was illustrated by the patterns in Fig. 5a. The current exhibited a monotonous increasing behavior, with a tendency to achieve an asymptotic value of about 0.07 mA for high Tween-80 concentrations. On the other hand, Fig. 5b also presents the double-layer capacitance obtained by integration of the current-potential response as follows:

$$C_E = \frac{\int_{E_{\min}}^{E_{\max}} I(V) dV}{\nu(V_{\max} - V_{\min})} \quad (3)$$

where ν is the scanning rate, V_{\min} and V_{\max} are the minimum and maximum voltages, respectively. It is noted that the capacitance increased in line with the cathodic peak current. This feature in combination with the lack of oxidation/reduction peaks suggested that the system acted as a weak capacitor where the cyclic voltammetry response reflects just the charge transfer from the aqueous phase to the electrical double-layer. Besides, the capac-

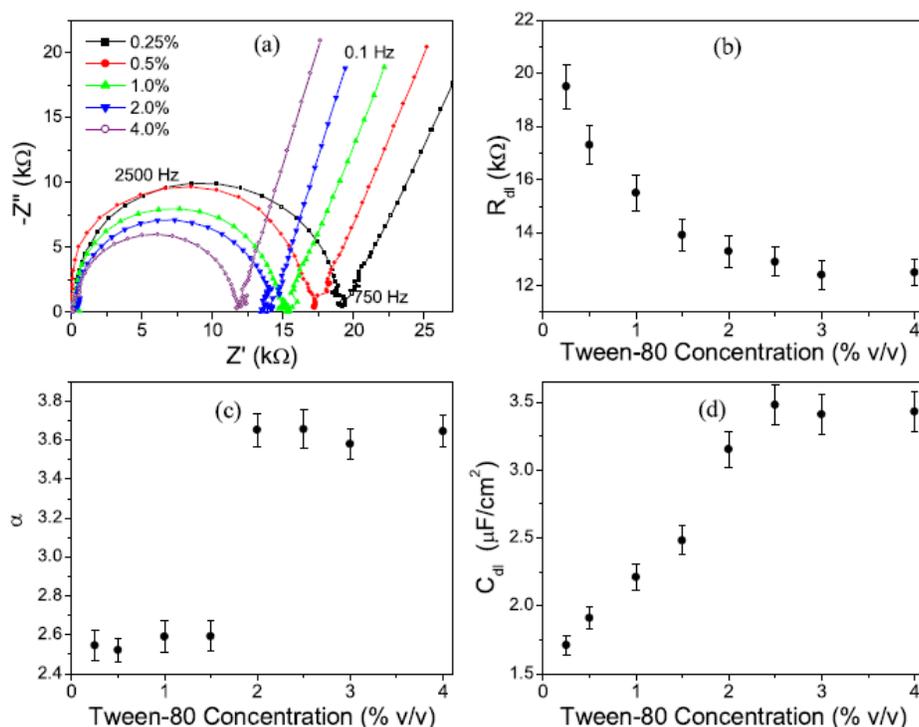


Fig. 6. (a) Nyquist plot of EIS measurements of O/W emulsions made with five different Tween-80 concentrations. A semi-circle was exhibited for the high-frequency region. (b)–(d) Estimated parameters (R_{dl} , α and C_{dl}) obtained by fitting the EIS measurements to a Randles equivalent circuit.

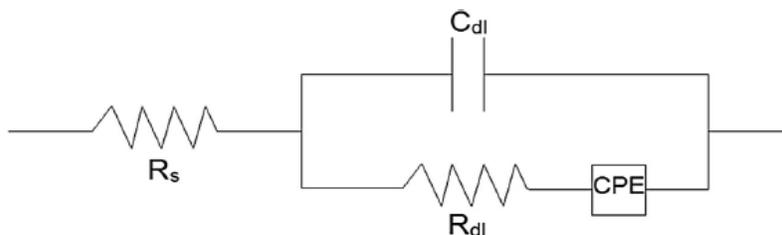


Fig. 7. Schematic diagram of the Randles equivalent circuit used to fit the EIS data.

itance achieved a maximum value for surfactant concentrations higher than about 2% v/v.

3.5. Electrical impedance spectroscopy (EIS)

Fig. 6a illustrates the behavior of the Nyquist diagram for five different values of the Tween-80 concentration. In the low-frequency region, a constant-phase behavior can be observed, with the constant-phase slope increasing with the surfactant concentration. For all cases, one semi-circle was displayed, indicating that there was a homogeneous distribution of time constants in the frequency range under scrutiny. The proposal of an equivalent electrical circuit for the EIS response of emulsions is shown in Fig. 6a. Specifically, the EIS response was described by the Randles circuit schematically described in Fig. 7. The Randles circuit consists of a resistance R_s in series with a parallel configuration of a resistance R_{dl} and a constant-phase element (CPE) given by

$$CPE(j\omega) = \frac{a}{(j\omega)^\alpha} \quad (4)$$

together with a capacitor C_{dl} . The meaning of a CPE is not clear at all. It is noted that the CPE corresponds to an ideal capacitor for $\alpha = 1$. It

has been suggested that CPE is related to inhomogeneous electrode surface or even anomalous diffusion of ionic species in a neighborhood of the electrode surface [22]. In fact, the CPE is commonly introduced to account for inhomogeneous distribution of charges on the electrode surface. The resistance R_s is related to the solution resistance, while the parallel capacitor (C_{dl}) + CPE + resistance (R_{dl}) is linked to the formation of an electrical double-layer about the electrode surface.

Nonlinear regression least-squares program was used to fit the experimental data to estimate the equivalent circuit parameters. The solution resistance R_s was negligible relative to the double-layer resistance, indicating that the dominant impedance mechanisms can be attributed to the accumulation of ionic charges in a neighborhood of the electrode surface. Fig. 6b–d presents the estimated electrical parameters as function of the surfactant concentration. The double-layer resistance R_{dl} decreased monotonously with the increasing amount of surfactant, indicating that the surfactant addition improved the conductance of the solution due maybe to the incorporation of OH^- displaced from the oil/water interface. On the other hand, the exponent of the CPE in Fig. 7c showed a sharp increase at about 2% v/v of surfactant concentration. The origin of the abrupt change of the CPE exponent

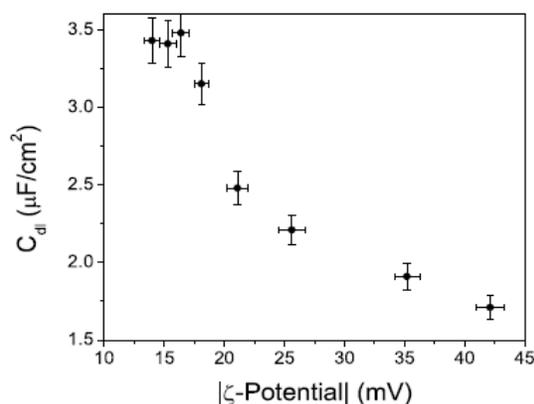


Fig. 8. Comparison between the measured ζ -potential and the estimated double-layer capacitance.

α is not clear for us, although it could be reflecting the jamming of ionic charges in the electrode neighborhood. The double-layer capacitance estimated from the EIS measurements is presented in Fig. 7d as function of the surfactant amount. The capacitance showed a sustained increasing for concentrations below 2% v/v. For higher concentrations, the capacitance exhibited a plateau at about $3.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Except the solution resistance, all the equivalent circuit parameters exhibited a transition at about 2% v/v of surfactant concentration. This suggests that 2% v/v is the minimum surfactant concentration required to achieve emulsion stability. The results in Table 1 show that the equivalent circuit parameters relative to the surfactant concentration showed a significant ($P < 0.05$) transition for a surfactant concentration of 2% v/v. The sharper transition was exhibited by the CPE exponent α , although both the double-layer resistance and capacitance also present a significant ($P < 0.05$) transition at about the same surfactant concentration.

Finally, Fig. 8 compares the ζ -potential measurements with the double-layer capacitance estimated from the equivalent circuit, showing an inverse relationship. This might be expected from the mechanism proposed by Manev and Pugh [21]. In fact, the addition of nonionic surfactant displaced ionic (mainly OH^-) species from the oil/water interfaces. In turn, the displaced ionic species improved the conductivity of the aqueous phase, which was reflected by reduced resistance and increased capacitance values.

3.6. Discussion

Traditionally used methods (e.g., mean droplet diameter and creaming rate) for monitoring the stability of O/W emulsions showed that using increasing concentrations of the nonionic surfactant Tween-80 tended to increase the emulsion stability. It is commonly argued that steric repulsion interactions retard emulsion droplets aggregation, and the interfacial membranes can deter droplet coalescence [19,23]. ζ -Potential measurements indicated that droplet charges decreased with the addition of surfactant molecules, suggesting that electrostatic repulsion was hardly involved in emulsion stabilization. However, the decrease of the ζ -potential poses interesting question on the role of ionic charges involved in the formation of O/W emulsions. The question has an important relevance as the magnitude of the ζ -potential showed a fast decrease for Tween-80 concentration higher than 2% v/v, and then achieved a nearly constant value. Interestingly, a Tween-80 concentration of about 2% v/v is widely used in practice for the formulation of O/W with oily fraction in the range 20–30% [24]. Cyclic voltammetry and EIS measurements showed fast transitions of the underlying parameters (e.g., resistance and capacitance) param-

eters at similar Tween-80 concentration values. In fact, the solution and double-layer capacitances increased monotonously with the Tween-80 concentration to achieve a nearly constant value for concentrations higher than 2% v/v. Similarly, the double-layer resistance showed a sustained decrease for surfactant concentration lower than 2% v/v. These results suggested that the Tween-80 concentration of about 2% v/v represented a threshold critical value for the stabilization of the E_x . By departing from the ideas by Manev and Pugh [21], decreased resistance and increased capacitances can be linked to the accumulation of displaced ionic species from the oil/water interface via the adsorption of surfactant molecules. The transition of the ζ -potential and the equivalent (Randles) circuit parameters to nearly constant values at about 2% v/v indicates that the further addition of surfactant molecules does not contribute to the covering of the interface. At this point, the oil/water interface is completely covered by the surfactant molecules, which is reflected by a reduction of displaced ionic species as detected by cyclic voltammetry and EIS measurements. In this way, both ζ -potential and electrochemical measurements can provide an estimate of the critical concentration of the nonionic surfactant at which the oil/water interface becomes saturated. The further addition of surfactant molecules does not lead to a significant improvement of the emulsion stability.

4. Conclusions

This work explored the use of methods from electrochemistry (cyclic voltammetry and electrical impedance spectroscopy) to characterize the stability of O/W emulsion using Tween-80 as emulsifying agent. The stabilization mechanism by nonionic surfactant was mainly of steric nature. However, results from cyclic voltammetry suggested that the transfer of ionic charges by physical displacement at the oil/water interface can be present in the interface stabilization. Ionic charges are eventually accumulated in the aqueous phase, whose electrolytic behavior can be also characterized by EIS measurements. Parameters (resistances and capacitance) obtained from the fitting of the EIS results to a fractional Randles equivalent circuit provided a quantification of the minimum surfactant concentration to achieve emulsion stability. The approach used in the present work has interesting practical potential given the effectiveness of electrochemical measurements even in situ conditions.

Conflict of interest

None.

Contribution by authors

C. Roldan-Cruz (Ph.D. student) designed and performed the EIS experiments. E. J. Vernon-Carter proposed the use of EIS for monitoring emulsion stability. J. Alvarez-Ramirez organized results and discussion. All authors contributed to the writing of the manuscript.

Acknowledgement

The authors thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for partially financing this work through project 236500.

References

- [1] A. Cavazos-Garduño, A.A. Ochoa Flores, J.C. Serrano-Niño, C.I. Beristain, H.S. García, Operating and compositional variables for preparation of betulinic acid nanoemulsions, *Rev. Mex. Ing. Quim.* 13 (2014) 689–703.

- [2] R. Zhang, Z. Zhang, H. Zhang, E.A. Decker, D.J. McClements, Influence of emulsifier type on gastrointestinal fate of oil-in-water emulsions containing anionic dietary fiber (pectin), *Food Hydrocoll.* 45 (2015) 175–185.
- [3] L. Cui, H.T. Cho, D.J. McClements, E.A. Decker, Y. Park, Effects of salts on oxidative stability of lipids in Tween-20 stabilized oil-in-water emulsions, *Food Chem.* 197 (2016) 1130–1135.
- [4] S. Tamnak, H. Mirhosseini, C.P. Tan, B.T. Amid, M. Kazemi, S. Hedayatnia, Encapsulation properties, release behavior and physicochemical characteristics of water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsion stabilized with pectin-pea protein isolate conjugate and Tween 80, *Food Hydrocoll.* 61 (2016) 599–608.
- [5] T. Tadros, Coalescence, in: T. Tadros (Ed.), *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 84.
- [6] J. Krägel, S.R. Derkatch, Interfacial shear rheology, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 15 (2010) 246–255.
- [7] T. Detloff, T. Sobisch, D. Lerche, Particle size distribution by space or time dependent extinction profiles obtained by analytical centrifugation, *Part. Part. Syst. Char.* 23 (2006) 184–187.
- [8] D. Lerche, T. Sobisch, Direct and accelerated characterization of formulation stability, *J. Dispersion Sci. Technol.* 32 (2011) 1799–1811.
- [9] E. Barsoukov, J.R. Macdonald, *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*, John Wiley & Sons, New York, 2005.
- [10] N. Perini, A.R. Prado, C.M.S. Sad, E.V.R. Castro, M.B.J.G. Freitas, Electrochemical impedance spectroscopy for in situ petroleum analysis and water-in-oil emulsion characterization, *Fuel* 91 (2012) 224–228.
- [11] A.B. Mandal, B.U. Nair, Cyclic voltammetric technique for the determination of the critical micelle concentration of surfactants, self-diffusion coefficient of micelles, and partition coefficient of an electrochemical probe, *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 9008–9013.
- [12] A.B. Mandal, B.U. Nair, D. Ramaswamy, Determination of the critical micelle concentration of surfactants and the partition coefficient of an electrochemical probe by using cyclic voltammetry, *Langmuir* 4 (1988) 736–739.
- [13] C. Ma, G. Li, Y. Xu, H. Wang, X. Ye, Determination of the first and second CMCs of surfactants by adsorptive voltammetry, *Colloids Surf. A* 143 (1998) 89–94.
- [14] H.P. de Oliveira, E.G.L. Oliveira, C.P. de Melo, Aggregation of methyl orange probed by electrical impedance spectroscopy, *J. Colloid Interface Sci.* 303 (2006) 444–449.
- [15] H.P. de Oliveira, C.A.S. Andrade, C.P. de Melo, Electrical impedance spectroscopy investigation of surfactant-magnetite-polypyrrole particles, *J. Colloid Interface Sci.* 319 (2008) 441–449.
- [16] H.P. de Oliveira, C.P. de Melo, Use of electrical impedance spectroscopy as a practical method of investigating the formation of aggregates in aqueous solutions of dyes and surfactants, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 6903–6908.
- [17] S. Ghasemi, M.T. Darestani, Z. Abdollahi, B.S. Hawkett, V.G. Gomes, Electrical impedance spectroscopy for determining critical micelle concentration of ionic emulsifiers, *Colloids Surf. A* 441 (2014) 195–203.
- [18] Z. Abdollahi, M.T. Darestani, S. Ghasemi, V.G. Gomes, Characterizing colloidal behavior of non-ionic emulsifiers in non-polar solvents using electrical impedance spectroscopy, *Colloid Polym. Sci.* 292 (2014) 2695–2705.
- [19] D.J. McClements, *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*, second ed., CRC Press, Boca Raton, 2005.
- [20] D. Exerowa, M. Zacharieva, R. Cohen, D. Platikanov, Dependence of the equilibrium thickness and double layer potential of foam films on the surfactant concentration, *Colloid Polym. Sci.* 257 (1979) 1089–1098.
- [21] E.D. Manev, R.J. Pugh, Diffuse layer electrostatic potential and stability of thin aqueous films containing a nonionic surfactant, *Langmuir* 7 (1991) 2253–2260.
- [22] S. Westerlund, L. Ekstam, Capacitor theory, *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.* 1 (1994) 826–839.
- [23] M.J. Rosen, J.T. Kunjappu, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, fourth ed., John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, 2012.
- [24] G. Lv, F. Wang, W. Cai, X. Zhang, Characterization of the addition of lipophilic Span 80 to the hydrophilic Tween 80-stabilized emulsions, *Colloids Surf. A* 447 (2014) 8–13.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 05210

Matrícula: 215180094

Monitoreo de la formación de complejos coacervados y emulsiones O/W con el uso de espectroscopía de impedancia eléctrica y voltametría cíclica.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:30 horas del día 11 del mes de enero del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ELICEO SOSA HERNANDEZ
DRA. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO
DRA. NANCY VELASCO ALVAREZ
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA
DE: CESAR ALBERTO BOLDAN CRUZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



CESAR ALBERTO BOLDAN CRUZ
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALVA FERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. MARIANA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. ELICEO SOSA HERNANDEZ

VOCAL

DRA. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO

VOCAL

DRA. NANCY VELASCO ALVAREZ

SECRETARIA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO