



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**

**POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA**

**PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, MICROESTRUCTURALES Y
DE DIGESTIBILIDAD DEL ALMIDÓN DE ACHIOTE (*Bixa
orellana* L.)**

TESIS

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

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

Presenta:

VIANNEY CORTÉS VIGURI

**Bajo la supervisión de: DRA. LANDY HERNÁNDEZ
RODRÍGUEZ y DRA. CONSUELO SILVIA OLIVIA LOBATO
CALLEROS**



Chapingo, Estado de México, febrero de 2022



APROBADA



**PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, MICROESTRUCTURALES Y
DE DIGESTIBILIDAD DEL ALMIDÓN DE ACHIOTE (*Bixa orellana*
L.)**

Tesis realizada por **VIANNEY CORTÉS VIGURI** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

DIRECTOR:


DRA. LANDY HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

CO-DIRECTOR:


DRA. CONSUELO SILVIA OLIVIA LOBATO CALLEROS

ASESOR:


DRA. BLANCA ELIZABETH HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

LECTOR EXTERNO: _____

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	ix
DEDICATORIAS	x
AGRADECIMIENTOS	xi
DATOS BIOGRÁFICOS	xii
RESUMEN GENERAL	xiii
GENERAL ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Objetivo general	2
1.2. Objetivos específicos	3
1.3. Hipótesis	4
1.4. Capítulos de tesis	4
1.5. Literatura citada	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA	7
2.1 Achiote (<i>Bixa orellana</i> L.)	7
2.2 Producción mundial y nacional de semillas de achiote	8
2.3 Usos y propiedades del achiote	8
2.4 Composición de las semillas de achiote	10
2.5 Extracción de pigmentos de semillas de achiote	12
2.6 Residuos vegetales de semillas de achiote	12
2.7 Almidón	14
2.7.1 Métodos de extracción y purificación	15

2.7.2	Características microestructurales	17
2.7.3	Propiedades funcionales	20
2.7.4	Propiedades térmicas	22
2.7.5	Propiedades reológicas	23
2.7.6	Digestibilidad	24
2.7.7	Aplicaciones	25
2.8	Literatura citada	27
3.	Achiote (<i>Bixa orellana</i> L.), una nueva fuente potencial de almidón: propiedades antioxidantes, microestructurales, funcionales y de digestibilidad	
3.1.	Resumen	34
3.2.	Abstract.....	35
3.3.	Introduction.....	36
3.4.	Material and methods	37
3.4.1.	Materials.....	37
3.4.2.	Starch extraction.....	38
3.4.3.	Proximal chemical composition	40
3.4.4.	ζ-potential	40
3.4.5.	Total phenolic content	40
3.4.6.	Antioxidant activity by ABTS ^{•+} assay	41
3.4.7.	Antioxidant activity by DPPH [•] assay	41
3.4.8.	Scanning electron microscopy (SEM).....	42
3.4.9.	Particle size distribution	42
3.4.10.	Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy	43
3.4.11.	X-ray diffraction (XRD)	43
3.4.12.	Gelatinized starch dispersions rheology	43

3.4.13.	GASD optical microscopy.....	44
3.4.14.	Swelling power and solubility index.....	44
3.4.15.	Water and oil absorption capacities.....	44
3.4.16.	<i>In vitro</i> digestibility	45
3.4.17.	Statistical analysis	45
3.5.	Results and discussion	46
3.5.1.	Yield and chemical composition	46
3.5.2.	ζ -potential	48
3.5.3.	Total phenolic content and antioxidant activity	49
3.5.4.	Morphology of starch granules	51
3.5.5.	Particle size distribution	53
3.5.6.	FTIR spectroscopy	54
3.5.7.	XRD analysis	56
3.5.8.	Rheological measurements	57
3.5.9.	Functional properties	62
3.5.10.	<i>In vitro</i> digestibility	64
3.6.	Conclusion	66
3.7.	Acknowledgments.....	67
3.8.	Conflict of interest	67
3.9.	Data availability.....	67
3.10.	Author contributions.....	67
3.11.	References	67
4.	CONCLUSIONES GENERALES.....	72
5.	APÉNDICE	74
5.1.	Artículo publicado	74

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Características morfológicas de almidones de diferentes fuentes botánicas.	20
Cuadro 2. Ejemplos de aplicación de almidones en productos alimenticios. ...	26
Table 3. Proximal chemical composition, yield, and ζ -potential of annatto starches (AS) variations.	46
Table 4 Total phenolic content and antioxidant activity of annatto starch (AS) variations.	50
Table 5 Pearson correlation coefficients between total phenolic content and antioxidant activity of the annatto starch variations.....	51
Table 6 Sauter mean diameter ($D_{3,2}$) and the granule diameters at 10% (d_{10}), 50% (d_{50}), and 90% (d_{90}) cumulative volumes, of annatto starch (AS) variations.	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. a) Frutos y b) semillas de achiote.	7
Figura 2. Estructura de a) cis-bixina y b) cis-norbixina.....	11
Figura 3. Esquema de los diferentes niveles estructurales del gránulo de almidón.	18
Fig. 4 The procedure employed to extract and purify annatto starch. AS _L (low purity); AS _{F0} : starch from defatted flour (medium purity); AS _{P0} : starch from deproteinized flour (medium purity); AS _{F0P0} : starch from defatted and deproteinized flour (high purity).....	39
Fig. 5 SEM micrographs and particle size distribution of annatto starch (AS) variations: (A) AS _L (low purity); (B) AS _{F0} : starch from defatted flour (medium purity); (C) AS _{P0} : starch from deproteinized flour (medium purity); (D) AS _{F0P0} : starch from defatted and deproteinized flour (high purity). Magnifications: (1) 250×, (2) 1000×, (3) 2000×	52
Fig. 6 (a) FTIR spectra and (b) XRD patterns of annatto starch (AS) variations. AS _L (low purity); AS _{F0} : starch from defatted flour (medium purity); AS _{P0} : starch from deproteinized flour (medium purity); AS _{F0P0} : starch from defatted and deproteinized flour (high purity).....	55
Fig. 7 Rheological properties of gelatinized AS dispersions (5% w/w) at 25°C: (a) Flow curves; (b) Storage (G') and (c) loss (G'') moduli depending on strain (%) obtained from oscillatory tests at 1 Hz. AS _L (low purity); AS _{F0} : starch from defatted flour (medium purity); AS _{P0} : starch from deproteinized flour (medium purity); AS _{F0P0} : starch from defatted and deproteinized flour (high purity).	59
Fig. 8. Optical micrographs (40×) of gelatinized annatto starch dispersions (5% w/w). (a) AS _{F0P0} : starch from defatted and deproteinized flour (high purity); (b) AS _L (low purity); (c) AS _{F0} : starch from defatted flour (medium purity); (d) AS _{P0} : starch from deproteinized flour (medium purity)	61

Fig.9. (a) Swelling power, (b) solubility index, and (c) water and oil absorption capacities (WAC and OAC) of annatto starch (AS) variations. Different letters on the same group mean significant differences ($p<0.05$). AS_L (low purity); AS_{F0}: starch from defatted flour (medium purity); AS_{P0}: starch from deproteinized flour (medium purity); AS_{F0P0}: starch from defatted and deproteinized flour (high purity) 63

Fig. 10 Annatto starch (AS) digestibility assay as a function of starch purity. Different letters on the same group mean significant differences ($p<0.05$). AS_L (low purity); AS_{F0}: starch from defatted flour (medium purity); AS_{P0}: starch from deproteinized flour (medium purity); AS_{F0P0}: starch from defatted and deproteinized flour (high purity). RDS: Rapidly digestible starch; SDS: Slowly digestible starch; RS: Resistant starch 65

ABREVIATURAS

ABTS	Sal de diamonio 2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AF	Harina de residuos de semillas de achiote
AS	Almidón de achiote
AS _L	Almidón de achiote de baja pureza
AS _{F0}	Almidón de achiote de harina desgrasada (pureza media)
AS _{P0}	Almidón de achiote de harina desproteinizada (pureza media)
AS _{F0P0}	Almidón de achiote de harina desgrasada y desproteinizada (alta pureza)
db	Base seca
D _{3,2}	Diámetro medio de Sauter
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
FTIR	Espectroscopía de Infrarrojo con transformada de Fourier
GAE	Equivalentes de ácido gálico
GASD	Dispersiones gelatinizadas de almidón de achiote
OAC	Capacidad de absorción de aceite
RDS	Almidón de digestión rápida
RS	Almidón resistente
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SDS	Almidón de digestión lenta
SI	Índice de solubilidad
SP	Capacidad de hinchamiento
TE	Equivalentes de Trolox
TPC	Contenido fenólico total
WAC	Capacidad de absorción de agua
XRD	Difracción de rayos X

DEDICATORIAS

*“...Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida.
Detrás de cada logro, hay un desafío.
Mientras estés viva, siéntete viva.
Si extrañas lo que hacías, vuelve a hacerlo.
No vivas de fotos amarillas...
Sigue, aunque todos esperen que abandones.
No dejes que se oxide el hierro que hay en ti.
Haz que, en vez de lástima, te tengan respeto.
Cuando por los años no puedas correr, trota.
Cuando no puedas trotar, camina.
Cuando no puedas caminar, usa el bastón.
¡Pero nunca te detengas!”*

Madre Teresa de Calcuta

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de desarrollarme académicamente en esta honorable institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada que hizo posible la realización de mis estudios de posgrado.

A mi directora de tesis, la Dra. Landy Hernández Rodríguez, por su calidad humana y apoyo. Gracias por confiar en mí, por guiarme y motivarme a lo largo de este trayecto.

A la Dra. Consuelo Silvia Olivia Lobato Calleros, a la Dra. Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez, por compartir sus conocimientos para el desarrollo de esta investigación. Gracias por guiarme durante este proceso.

Al Dr. Juan Carlos Cuevas Bernardino, por su apoyo y apertura para la realización de mi estancia de investigación doctoral.

Al Dr. José Álvarez Ramírez y al Dr. E. Jaime Vernon Carter, por sus valiosas aportaciones y apoyo durante el proceso de publicación del presente trabajo de investigación.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre: Vianney Cortés Viguri
Fecha de nacimiento: 23 de abril de 1987
Lugar de nacimiento: Tlalnepantla, Estado de México
CURP: COVV870423MMCRGN08
Profesión: Ingeniero bioquímico
Cédula profesional: 6889298

Desarrollo académico

Bachillerato: Centro de Bachillerato Tecnológico Industrial y de Servicios
No. 29. 2002-2005
Licenciatura: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto
Politécnico Nacional. 2005-2009.
Maestría: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto
Politécnico Nacional. 2011-2012.

RESUMEN GENERAL

Propiedades fisicoquímicas, microestructurales y de digestibilidad del almidón de achiote (*Bixa orellana* L.)¹

En este trabajo se estudiaron los efectos del grado de pureza del almidón de achiote (*Bixa orellana* L.) (AS) sobre sus propiedades fisicoquímicas, antioxidantes, microestructurales, funcionales y de digestibilidad. El AS fue sometido a tratamientos de purificación que incluyeron desgrasado para la eliminación de lípidos (AS_{F0}), tratamiento alcalino para la extracción de proteínas (AS_{P0}) y tratamiento combinado desgrasado/alcalino (AS_{F0P0}). Los almidones purificados mostraron valores de potencial ζ negativos (-18.30 a -24.10 mV), contenido fenólico total de 3.16 – 6.71 mg de GAE 100 g⁻¹ y actividad antioxidante de 0.52 – 1.14 μ g de TE g⁻¹ (ensayo ABTS^{•+}). Todos los almidones presentaron una morfología heterogénea con gránulos que exhibieron una variedad de formas ovaladas, esféricas, triangulares e irregulares con tendencia a aglomerarse. El diámetro medio de los aglomerados de gránulos (D_{3,2}) aumentó de 26.8 μ m a 31.1 μ m con los tratamientos de purificación. La espectroscopia FTIR mostró que moléculas de proteína estaban presentes a pesar de aplicar un tratamiento alcalino para eliminarlas. Los patrones de difracción de rayos X indicaron que la región cristalina del almidón no se modificó mediante el tratamiento de desproteínización. Las propiedades de flujo y viscoelásticas aumentaron cuando se eliminaron simultáneamente los lípidos y las proteínas. Las propiedades funcionales como capacidad de hinchamiento, índice de solubilidad y las capacidades de absorción de agua y absorción de aceite fueron 21.44 – 22.71 g g⁻¹, 21.77 – 40.43 %, 3.9 – 4.56 g g⁻¹ y 1.78 – 2.41 g g⁻¹, respectivamente. La digestibilidad *in vitro* del AS presentó una mayor fracción de almidón de digestión lenta (36.57 – 40.68 %) en comparación a la fracción de almidón de digestión rápida. El presente estudio sugiere que la remoción de proteínas mediante un tratamiento alcalino es un procedimiento de purificación adecuado para obtener AS con propiedades funcionales mejoradas.

Palabras clave: Extracción de almidón, propiedades funcionales, pureza del almidón, residuos de semillas de achiote, tratamiento alcalino.

GENERAL ABSTRACT

Physicochemical, microstructural, and digestibility properties of annatto starch²(*Bixa orellana* L.)

The aim of this work was to study the effects of the purity degree of annatto (*Bixa orellana* L.) starch (AS) on the physicochemical, antioxidant, microstructural, functional, and digestibility properties. The AS was subjected to purification treatments which included defatting for removing lipids (AS_{F0}), alkaline treatment for extracting protein (AS_{P0}), and combined defatting/alkaline treatment (AS_{F0P0}). The purified starches showed negative ζ -potential values (-18.30 to -24.10 mV), total phenolic content of 3.16 - 6.71 mg of GAE 100 g⁻¹, and antioxidant activity of 0.52 - 1.14 μ g of TE g⁻¹ (ABTS^{•+} assay). All AS starches presented a heterogeneous morphology with granules exhibiting an array of oval, spherical, triangular, and irregular shapes, which tended to agglomerate. Granule agglomerates mean diameter (D_{3,2}) increased from 26.8 μ m to 31.1 μ m with purification treatments. FTIR spectroscopy showed that protein molecules were present despite applying an alkaline treatment to remove them. The X-ray diffraction patterns pinpointed that the starch crystalline region was not modified by deproteinization treatment. Flow and viscoelastic properties increased when lipids and proteins were simultaneously removed. Functional properties as swelling power, solubility index, water absorption, and oil absorption capacities were 21.44 - 22.71 g g⁻¹, 21.77 - 40.43 %, 3.9 - 4.56 g g⁻¹, and 1.78 - 2.41 g g⁻¹, respectively. The *in vitro* digestibility of AS presented a higher fraction of slowly digested starch (36.57 - 40.68 %) compared to the rapidly digestible starch fraction. The present study suggests that protein removal by alkaline treatment is a suitable purification procedure to obtain AS with improved functional properties.

Key words: Starch extraction, functional properties, starch purity, annatto seed residues, alkaline treatment.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El achiote (*Bixa orellana* L.) es una planta nativa de América, probablemente de la cuenca del Amazonas en Brasil. Se cultiva ampliamente en todas las regiones tropicales, específicamente en Colombia, México, Ecuador y en los Andes peruanos. Es un arbusto perenne, de entre 3 a 5 metros de altura, su fruto es una cápsula roja, y cada una de las cápsulas puede contener entre 30 a 60 semillas (Raddatz-Mota *et al.*, 2017). Las semillas del achiote son consideradas la parte de la planta con importancia comercial, debido a que el pericarpio contiene los pigmentos que poseen el potencial para su aplicación industrial. Alrededor del 80% de estos pigmentos es el carotenoide conocido como bixina, el cual tiene la propiedad colorante y puede ser extraído con aceites vegetales o con químicos alcalinos (Vilar *et al.*, 2014). Otros componentes presentes en las semillas de achiote son las proteínas, carbohidratos como celulosa y sacarosa, aceites esenciales y otros carotenoides como norbixina, así como alfa y beta caroteno (Valério *et al.*, 2015). Las semillas del achiote se han empleado desde épocas prehispánicas como fuente de colorantes naturales, aunque su consumo se vio disminuido con el paso del tiempo por la introducción de colorantes artificiales. Actualmente, debido a las restricciones en el uso de colorantes sintéticos como tartrazina (E102), azorrubina (E122) y ponceau 4R (E124), se ha presentado un interés especial en fortalecer el cultivo de dicho arbusto y por consiguiente aprovechar todos los compuestos que pudieran ser de utilidad además de los pigmentos carotenoides (Pinzón-López *et al.*, 2008; Raddatz-Mota *et al.*, 2017).

La extracción de los pigmentos de las semillas de achiote genera una gran cantidad de subproductos (97 – 98 %), que se encuentran impregnados tanto de las sustancias empleadas para la extracción, como de pigmentos residuales.

En un estudio previo, Garcia-Silveira y Tapia-Blácido (2018) evidenciaron que es posible realizar el aislamiento de un material con un alto contenido de almidón (~60 %) a partir de residuos de semillas de achiote. Por lo anterior, es necesario desarrollar y aplicar un método que permita aislar y purificar el almidón, eliminando otros compuestos presentes como proteínas, lípidos y fibra.

En la literatura se han reportado diversos tratamientos que permiten aumentar la pureza del almidón aislado, como puede ser la adición de algunos disolventes como el etanol, metanol y éter de petróleo para la eliminación de lípidos (Chiou *et al.*, 2002; El Halal *et al.*, 2019). Para la remoción de proteínas se han empleado disoluciones a base de NaOH (Lim *et al.*, 1999), dodecil sulfato de sodio (SDS) (Blake *et al.*, 2015), dodecilbenceno sulfonato (DoBS), lauril sulfato de sodio (SLS) (Lim *et al.*, 1999) y enzimas proteolíticas (Chiou *et al.*, 2002).

De entre los métodos químicos, el uso de disoluciones acuosas de NaOH es el tratamiento más común. Sin embargo, las condiciones de operación pueden influir en algunas propiedades funcionales de los gránulos de almidón (Cardoso *et al.*, 2007; Debet & Gidley, 2006; Lu *et al.*, 2019). Los estudios realizados con almidones de diferentes cereales, como trigo, maíz, cebada y arroz, han mostrado un aumento en los valores de sinéresis y de capacidad de hinchamiento después de un proceso alcalino para la remoción de proteínas (Hu *et al.*, 2017; Wenhao Li *et al.*, 2016). Por lo anterior, es fundamental evaluar la modificación de las características de los gránulos de almidón en función de su grado de pureza. Ya que, dependiendo de sus características, los almidones se pueden utilizar en la industria alimentaria principalmente como aditivos, actuando como modificadores de textura, viscosidad, digestibilidad, entre otros. Por lo anterior, el presente trabajo de investigación se desarrolló con base en los siguientes objetivos:

1.1. Objetivo general

Evaluar la influencia de diferentes tratamientos de purificación sobre las propiedades fisicoquímicas (tamaño de partícula, comportamiento reológico),

antioxidantes, microestructurales (microscopía electrónica de barrido, FTIR, XRD), funcionales (hinchamiento, solubilidad, absorción de agua y aceite) y digestibilidad *in vitro* de almidón aislado a partir de residuos de semillas de achiote (*Bixa orellana* L.).

1.2. Objetivos específicos

- Aplicar distintos tratamientos de purificación a almidón aislado a partir de residuos de achiote.
- Determinar la composición química de las variantes de almidón obtenidas para verificar el grado de pureza alcanzado después de la aplicación de los tratamientos de purificación.
- Cuantificar los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de las variantes de almidón de achiote con el objeto de identificar la relación entre estos compuestos y los procesos de purificación.
- Identificar las características morfológicas del almidón de achiote mediante Microscopía Electrónica de Barrido y analizar la distribución del tamaño de partícula con el fin de evidenciar los cambios físicos ocasionados por los tratamientos de purificación aplicados.
- Analizar los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier y aquellos de difracción de rayos X para identificar cambios ocurridos en la microestructura del almidón de achiote como resultado de los tratamientos de purificación aplicados.
- Caracterizar las propiedades reológicas de dispersiones de las variantes de almidón a través de la determinación de su viscosidad aparente y comportamiento viscoelástico.
- Determinar la capacidad de hinchamiento, el índice de solubilidad y la capacidad de retención de agua y de aceite de las variantes de almidón, a fin de evidenciar una mejora en sus propiedades funcionales como resultado de su purificación.

- Determinar el grado de digestibilidad *in vitro* de los almidones purificados de achiote, a través de la cuantificación de las fracciones de almidón de digestión rápida, de digestión lenta y resistente.

1.3. Hipótesis

La aplicación de un tratamiento de desgrasado y un tratamiento alcalino para la remoción de proteínas solubles permitirá incrementar el grado de pureza del almidón aislado a partir de los residuos de semillas de achiote, lo cual mejorará sus propiedades funcionales y grado de digestibilidad.

1.4. Capítulos de tesis

El presente documento de tesis está conformado por los siguientes capítulos:

- a) Capítulo 1: Presenta una breve introducción al tema de investigación y se justifica el planteamiento y ejecución de este. Se presenta el objetivo general, así como los objetivos específicos que conducen a su cumplimiento e hipótesis a probar. Los capítulos que estructuran el documento de tesis son detallados en este apartado.
- b) Capítulo 2: Expone la revisión de literatura que sustenta el presente trabajo de investigación, comenzando con una breve explicación de las características de la fuente botánica a partir de la cual, se realizó la extracción de almidón: el achiote y sus semillas. Posteriormente, se introduce al tema central de interés que es el almidón, se explica su composición y estructura, procesos de extracción y purificación, además de sus características principales.
- c) Capítulo 3: Corresponde al artículo científico derivado de la investigación realizada. En este apartado, se especifican los tratamientos de purificación aplicados para remover lípidos y proteínas solubles contenidos en el almidón extraído a partir de residuos de semillas de achiote. Posteriormente, se presentan los resultados obtenidos en cada una de las pruebas realizadas para la caracterización de las variantes de almidón de

achiote purificado (almidones con pureza baja, media y alta) y evaluar el efecto de los tratamientos de purificación sobre sus propiedades fisicoquímicas, antioxidantes, microestructurales y funcionales. El artículo científico en mención fue publicado en el *Journal of Food Measurement and Characterization* (Cortés-Viguri et al., 2022). Por esta razón, la redacción del presente capítulo se realizó en el idioma inglés atendiendo el formato solicitado por la revista.

1.5. Literatura citada

- Blake, L. H., Jenner, C. F., Gidley, M. J., & Cozzolino, D. (2015). Effect of surfactant treatment on swelling behaviour of normal and waxy cereal starches. *Carbohydrate Polymers*, 125, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.049>
- Cardoso, M. B., Putaux, J.-L., Samios, D., & da Silveira, N. P. (2007). Influence of alkali concentration on the deproteinization and/or gelatinization of rice starch. *Carbohydrate Polymers*, 70(2), 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.03.014>
- Chiou, H., Martin, M., & Fitzgerald, M. (2002). Effect of Purification Methods on Rice Starch Structure. *Starch/Stärke*, 54, 415–420.
- Cortés-Viguri, V., Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Cuevas-Bernardino, J. C., Hernández-Rodríguez, B. E., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2022). Annatto (*Bixa orellana* L.), a potential novel starch source: antioxidant, microstructural, functional, and digestibility properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(1), 637–651. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01228-7>
- Debet, M. R., & Gidley, M. J. (2006). Three classes of starch granule swelling: Influence of surface proteins and lipids. *Carbohydrate Polymers*, 64(3), 452–465. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.12.011>
- El Halal, S. L. M., Kringel, D. H., Zavareze, E. da R., & Dias, A. R. G. (2019). Methods for Extracting Cereal Starches from Different Sources: A Review. *Starch/Stärke*, 71(11–12), 1900128. <https://doi.org/10.1002/star.201900128>
- Hu, P., Fan, X., Lin, L., Wang, J., Zhang, L., & Wei, C. (2017). Effects of surface proteins and lipids on molecular structure, thermal properties, and enzymatic hydrolysis of rice starch. *Food Science and Technology*, 38(1), 84–90. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.35016>
- Li, W., Wu, G., Luo, Q., Jiang, H., Zheng, J., Ouyang, S., & Zhang, G. (2016). Effects of removal of surface proteins on physicochemical and structural properties of A- and B-starch isolated from normal and waxy wheat. *Journal of Food Science and Technology*, 53(6), 2673–2685. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2239-3>
- Lim, S.-T., Lee, J.-H., Shin, D.-H., & Lim, H. S. (1999). Comparison of Protein

- Extraction Solutions for Rice Starch Isolation and Effects of Residual Protein Content on Starch Pasting Properties. *Starch/Stärke*, 120–125.
- Lu, Z.-H., Donner, E., & Liu, Q. (2019). The Effect of Various Extracting Agents on the Physicochemical and Nutritional Properties of Pea Starch. *Starch/Stärke*, 71(11–12), 1900123. <https://doi.org/10.1002/star.201900123>
- Pinzón-López, L. L., Avedaño-Arrazate, C. H., Mijangos-Cortés, J. O., Godoy-Hernández, G. del C., Cituk-Chan, D. E., Correa-Navarro, P. J., & Campos-Rojas, E. (2008). *Situación del Recurso Achiote en México (Bixa orellana L.)*. <https://doi.org/10.15713/ins.mmj.3>
- Raddatz-Mota, D., Pérez-Flores, L. J., Carrari, F., Mendoza-Espinoza, J. A., de León-Sánchez, F. D., Pinzón-López, L. L., Godoy-Hernández, G., & Rivera-Cabrera, F. (2017). Achiote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1729–1741. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2579-7>
- Valério, M. A., Ramos, M. I. L., Braga Neto, J. A., & Macedo, M. L. R. (2015). Annatto seed residue (*Bixa orellana* L.): nutritional quality. *Food Science and Technology (Campinas)*, 35(2), 326–330. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6539>
- Vilar, D. de A., Vilar, M. S. de A., Moura, T. F. A. de L. e, Raffin, F. N., Oliveira, M. R. de, Franco, C. F. de O., de Athayde-Filho, P. F., Diniz, M. de F. F. M., & Barbosa-Filho, J. M. (2014). Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa orellana* L.: A Review. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/857292>

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Achiote (*Bixa orellana* L.)

El achiote es un árbol pequeño o arbusto perenne perteneciente a la familia Bixaceae y al género *Bixa*. El achiote es originario de América, específicamente de la Cuenca del Amazonas en Brasil, sin embargo su cultivo se ha extendido a otras regiones tropicales en países como Perú, México, Ecuador, Indonesia, India, Kenia, África del Este y en algunos países asiáticos (Akshatha *et al.*, 2011; Vilar *et al.*, 2014). El árbol de achiote mide de 3 a 5 m de altura, aunque puede alcanzar los 10 m. Presenta flores blancas o rosadas según sea la variedad y sus frutos tienen forma de cápsulas ovoides globulares cubiertas de cerdas suaves (Figura 1a). Las cápsulas de achiote pueden contener entre 30 a 60 semillas en promedio, las cuales tienen forma piramidal o cónica y miden de 0.3 – 0.5 cm de largo y de 0.2 – 0.3 cm de diámetro (Figura 1b) (Raddatz-Mota *et al.*, 2017; Vilar *et al.*, 2014). Una de las principales características de las semillas es su recubrimiento por una fina capa de color naranja amarillenta a naranja rojiza (Ravindran *et al.*, 2012).

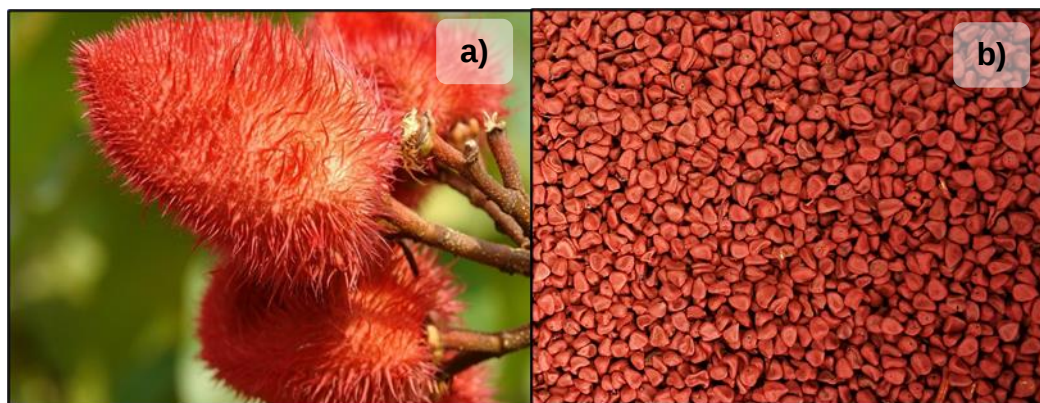


Figura 1. a) Frutos y b) semillas de achiote.

2.2 Producción mundial y nacional de semillas de achiote

La producción mundial anual de semillas de achiote alcanza aproximadamente 14500 toneladas en peso seco, de las cuales, el 60 % es producido en América Latina, el 27 % en África y el 12 % en Asia. A nivel mundial, Perú es el principal país productor, seguido por Kenia y a nivel Latinoamérica se incluyen países como Brasil y México (Avedaño-Arrazate *et al.*, 2012; Raddatz-Mota *et al.*, 2017; Ravindran *et al.*, 2012).

En México, el achiote se encuentra presente en 14 entidades federativas, destacando los estados de Yucatán, Oaxaca y Veracruz; aunque en algunos estados como Jalisco, Nayarit y Michoacán, no se explota este recurso y los ejemplares forman poblaciones aisladas (Avedaño-Arrazate *et al.*, 2012). Hasta el año 2019, el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) informó que en México se produjeron 740 toneladas de este recurso, abarcando una superficie sembrada de 664 hectáreas. La producción nacional de achiote se centra en los estados de Quintana Roo, Yucatán y Tabasco, con una producción de 347, 342.9 y 68.9 toneladas por año, respectivamente (SIAP, 2019).

2.3 Usos y propiedades del achiote

La planta de achiote ha sido empleada desde tiempos ancestrales para diversos usos. Actualmente, la parte de la planta con mayor importancia comercial son las semillas, debido a que su pericarpio contiene pigmentos de aplicación industrial. El carotenoide bixina constituye aproximadamente el 80 % de estos pigmentos, mientras que el 20 % restante está conformado por norbixina y otros carotenoides (Raddatz-Mota *et al.*, 2017; Vilar *et al.*, 2014). Desde la década de 1980, el comercio de extractos de achiote ha aumentado y se utiliza principalmente para dar color a productos lácteos como queso, mantequilla y margarina (Ravindran *et al.*, 2012). El “annatto” (extracto de las semillas de achiote) también es empleado como colorante en la industria de helados, cárnicos, salsas, jugos, cosméticos, pinturas, jabones, telas de algodón y sedas, así como en la industria farmacéutica (Devia & Saldarriaga, 2003; Vilar *et al.*, 2014).

Las semillas de achiote también se han empleado en menor medida como condimento. En el Sureste de México, las semillas de achiote son molidas y mezcladas con una serie de condimentos como orégano, comino, pimienta negra, ajo y chile. La pasta formada llamada “recado” se utiliza para marinar carne de puerco que se destina para la preparación del platillo típico “pibil” (Ravindran *et al.*, 2012). Dentro de la medicina tradicional se considera que la pulpa de la semilla posee propiedad laxante, expectorante, cardiotónica, antibiótica, antiinflamatoria y como cicatrizante de heridas (Vilar *et al.*, 2014).

Por otra parte, los tallos, raíces, corteza y hojas de la planta de achiote se emplean principalmente en la medicina tradicional. Los brotes tiernos de la planta se preparan y beben en una infusión, la cual se considera astringente y afrodisiaca; además de ser empleada en caso de afecciones como hepatitis, disentería y fiebre (Ravindran *et al.*, 2012). La raíz y la corteza se emplean como antipiréticos (Shilpi *et al.*, 2006). En Guatemala, las hojas son empleadas tradicionalmente para el tratamiento de enfermedades de transmisión sexual como la gonorrea. Tinturas de la raíz y de hojas de achiote han mostrado inhibir el crecimiento *in vitro* de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a la penicilina (Cáceres *et al.*, 1995). Extractos etanólicos y metanólicos de las hojas de achiote han evidenciado tener actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*) y Gram negativas (*Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*). Dicha actividad antibacteriana puede atribuirse a la presencia de fenoles y flavonoides que pueden alterar las membranas bacterianas. Estos estudios validan parcialmente el uso de hojas de achiote en la medicina tradicional para mejorar la higiene bucal (Fleischer *et al.*, 2003; Medina-Flores *et al.*, 2016).

Otros estudios realizados con extractos metanólicos de hojas de achiote se han centrado en evaluar sus efectos farmacológicos en pruebas *in vivo*. Al respecto, se ha identificado que los extractos disminuyeron el número total de deposiciones y heces húmedas en ratones sometidos a pruebas de diarrea inducida,

aumentaron el tiempo promedio de supervivencia en pruebas de actividad anticonvulsiva e inhibieron la frecuencia de constricciones en pruebas analgésicas (Shilpi *et al.*, 2006). La actividad antiespasmódica de hojas de achiote se evaluó en íleon aislado de conejillos de indias. El extracto acuoso probado disminuyó significativamente las contracciones del músculo liso inducidas por histamina (Mans *et al.*, 2004).

La actividad antioxidante de las hojas de achiote también ha sido evaluada mediante métodos como DPPH, FRAP (Poder antioxidante reductor férrico), TBARS (Prueba de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico), FIC (Ensayo de capacidad quelante de iones ferrosos) y Rancimat. En todas las pruebas, los extractos de hojas de achiote mostraron una actividad antioxidante significativa, por lo que se puede considerar a esta fuente vegetal como un conservador natural alternativo (Viuda-Martos *et al.*, 2012).

2.4 Composición de las semillas de achiote

Dependiendo del cultivo y de las condiciones climáticas de la región, la composición química y nutrimental de la semilla de achiote puede variar. La literatura indica que su contenido de humedad oscila entre 8 – 13 %, proteínas 10.3 – 14.2 %, cenizas 3.8 – 7.9 %, lípidos 4.4 – 6.3 %, fibra 4.9 – 18.5 % y carbohidratos 40 – 70 % (Coronado, 2014; Devia & Saldarriaga, 2003; Prabhakara Rao *et al.*, 2015; Taham *et al.*, 2015).

Las proteínas de la semilla de achiote están conformadas por cinco fracciones proteicas, las cuales son albúmina (49.07 %), globulinas de tipo 7S (24.78 %) y 11S (10.20 %), glutelina (15.20 %) y prolamina (0.75 %). El perfil de aminoácidos se caracteriza por la presencia de aminoácidos esenciales como histidina, treonina, metionina, fenilalanina, isoleucina, leucina y lisina, así como por aminoácidos no esenciales como el ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, serina, glicina, alanina y tirosina (Coronado, 2014).

La fracción lipídica está compuesta principalmente por acilglicéridos (98.12 %) y en menor medida por glicolípidos (1.52 %) y fosfolípidos (0.36 %), destacando dentro de la composición de ácidos grasos, la presencia de los ácidos palmítico, linoleico, oleico, linolénico y esteárico (Prabhakara Rao *et al.*, 2015). Dentro de la fracción lipídica de las semillas de achiote, también se ha identificado una concentración considerable de δ -tocotrienol (140 - 147 mg 100 g⁻¹ de semilla seca) y trazas de β -tocotrienol (Frega *et al.*, 1998). Hasta el momento, no se ha identificado otra fuente vegetal que presente una concentración comparable de δ -tocotrienoles, además de que el interés en este tipo de compuestos bioactivos se ha incrementado debido a la actividad anticancerígena que presentan (Moraes *et al.*, 2015). Estudios *in vitro* e *in vivo* evidenciaron una reducción en el número y tamaño de masas tumorales mamarias, así como un incremento en la apoptosis de células tumorales (Pierpaoli *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha identificado que ejercen un efecto osteoprotector y homeostático de la glucosa (Shen *et al.*, 2018).

El contenido de bixina también puede variar desde 1 hasta 6 % en la semilla (Vilar *et al.*, 2014). La bixina (Figura 2a) (C₂₅H₃₀O₄, metil hidrógeno 9'-cis-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato) es un carotenoide insoluble en agua, que puede estar presente como isómero geométrico de tipo 9-*cis* o en menor proporción como *trans*-bixina (más estable) y *cis*-norbixina (Figura 2b) (C₂₄H₂₈O₄, ácido 9'-cis-6,6'-diapocaroteno- 6,6'dioico) (Devia & Saldarriaga, 2003; Rahmalia *et al.*, 2015).

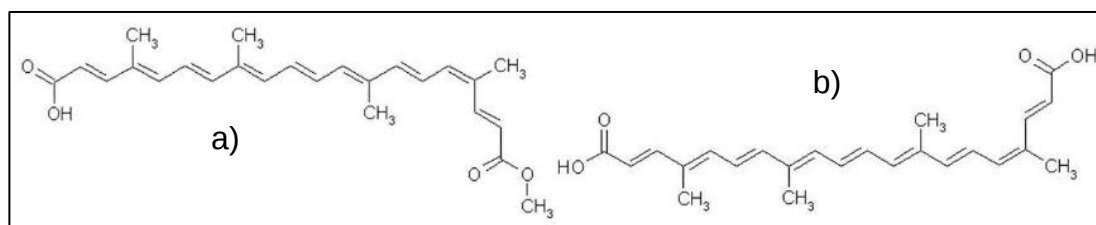


Figura 2. Estructura de a) *cis*-bixina y b) *cis*-norbixina. Fuente: Rahmalia *et al.* (2015)

2.5 Extracción de pigmentos de semillas de achiote

La extracción industrial de los pigmentos de las semillas de achiote se puede realizar con disoluciones alcalinas (NaOH, KOH), agua caliente, aceites vegetales (aceite de ricino, algodón, sésamo, soya) (Mehta *et al.*, 2015), acetato de etilo, entre otros disolventes orgánicos (ciclohexano, acetona) (Rahmalia *et al.*, 2015). En los últimos años, se han desarrollado tecnologías alternativas que permiten la extracción de bixina de una manera más eficiente y con ventajas ambientales, tal es el caso del empleo de CO₂ supercrítico combinado con disolventes orgánicos (etanol) (Taham *et al.*, 2015).

De los métodos antes mencionados, el empleo de disolución de hidróxido de potasio es muy común a escala de laboratorio, debido a que es más económico y al mismo tiempo se obtiene un buen rendimiento y calidad del colorante (Devia & Saldarriaga, 2003). El procedimiento de extracción consiste en remojar las semillas de achiote durante 12 horas en una disolución de KOH. Al terminar el remojo, se separa la solución coloreada y se mezclan nuevamente las semillas con solución alcalina con agitación constante. Posteriormente, se retira la solución coloreada y se lavan las semillas con solución de KOH. Finalmente, las soluciones coloreadas obtenidas se mezclan y se ajusta el pH con H₂SO₄ con el objetivo de que el colorante precipite. La solución ácida de color rojo intenso se filtra al vacío y la pasta obtenida es secada y molida (Devia & Saldarriaga, 2003). Dependiendo del método de extracción empleado, la proporción de bixina y norbixina variará en el extracto final.

2.6 Residuos vegetales de semillas de achiote

La extracción de los pigmentos de las semillas de achiote genera una gran cantidad de subproductos (97 – 98 %) que se encuentran impregnados tanto con las sustancias empleadas para su extracción, como de pigmentos residuales. Algunos investigadores han sugerido que este residuo puede ser empleado para alimentación animal o humana debido a su contenido de proteína, fibra, carbohidratos y bixina (Garcia Silveira & Tapia-Blácido, 2018).

Valério *et al.* (2015) reportaron que la composición proximal del residuo de semillas de achiote presenta un 6.75 % de humedad, 5.22 % de cenizas, 2.23 % de lípidos, 11.5 % de proteínas y 42.2 % de carbohidratos, con un contenido del 30.4 % de almidones y 28.48 % de fibra. Debido a su composición, se considera que este residuo vegetal es una fuente rica de carbohidratos y proteínas. Al analizar el perfil de aminoácidos presentes, los autores identificaron un alto contenido de fenilalanina + tirosina (100.2 mg g^{-1}), leucina (83.9 mg g^{-1}), lisina (76.7 mg g^{-1}) e isoleucina (59.3 mg g^{-1}). Adicionalmente, al alimentar roedores con el residuo de semillas de achiote, se identificó que no hubo toxicidad hepática y se redujo el nivel de creatinina en sangre. Silva *et al.* (2018) caracterizaron la biomasa generada a partir de semillas de achiote que fueron sometidas a un proceso integrado de extracción de tocotrienoles con fluido supercrítico y de extracción de bixina con solventes a baja presión. El subproducto vegetal generado a partir de este proceso se caracterizó por presentar un alto contenido de carbohidratos (~75 %), predominando la presencia de fibra y almidón.

Debido al interés de valorizar los residuos agroindustriales y tomando como referencia el alto contenido de carbohidratos que caracteriza a los residuos de semillas de achiote, se han reportado algunos trabajos de investigación enfocados en su aprovechamiento. Su objetivo principal es contribuir con la sustentabilidad de la industria del achiote dando un uso completo a las semillas. Alcázar-Alay *et al.* (2017) aplicaron un tratamiento de modificación hidrotermal en semillas de achiote semidesgrasadas, provocando una reacción de hidrólisis en los polímeros presentes (principalmente almidón). El cambio físico de los polímeros se evidenció mediante una disminución de la temperatura de formación de pastas, así como en su viscosidad máxima y final. La hidrólisis de los polímeros generó monómeros y oligómeros de azúcares, que podrían ser incorporados en la formulación de alimentos especiales.

Garcia Silveira y Tapia-Blácido (2018) aplicaron tres métodos de aislamiento para obtener almidón a partir de dichos residuos: remojo en solución alcalina (NaOH),

en solución ácida (ácido ascórbico) y neutra (agua). En general, obtuvieron materiales ricos en almidón (“materiales almidonosos”), alcanzando contenidos entre 64.6 – 68.7 % de almidón. Las características de los materiales almidonosos obtenidos se modificaron dependiendo del método de extracción aplicado, destacando que es necesario modificar los procesos seleccionados para la obtención de un almidón más puro con un menor contenido de proteína y fibra.

Posteriormente, Zabot *et al.* (2019) sometieron semillas de achiote a un proceso de extracción de aceite con fluido supercrítico combinado con una despigmentación con etanol asistida por ultrasonido. Los residuos vegetales generados se remojaron en disolución de metabisulfito de sodio (500 ppm) para la extracción del almidón presente. En este caso, se obtuvo un almidón aparentemente más puro y con cualidades similares a las de un almidón comercial.

2.7 Almidón

El almidón es el carbohidrato de reserva más abundante en las plantas y se encuentra presente en raíces, tubérculos, tallos, hojas, frutos y semillas. El almidón es empleado como fuente de energía en las plantas, principalmente para la germinación de semillas o en la brotación de tubérculos (Jobling, 2004; Srichuwong & Jane, 2007). Es un aditivo versátil y económico que presenta importantes propiedades como biodegradabilidad, biocompatibilidad y no tóxico, permitiendo su aplicación en la industria alimenticia, papelera, química, farmacéutica, biomédica y en la industria de polímeros (de Castro *et al.*, 2019; Waterschoot *et al.*, 2015). Los almidones más consumidos a nivel mundial son aquéllos obtenidos a partir de cereales como trigo, maíz y arroz, seguidos de los almidones de papa y yuca (El Halal *et al.*, 2019; Waterschoot *et al.*, 2015). En México, el almidón de maíz es un ingrediente importante en la industria cervecera y papelera. Su producción anual asciende entre US\$ 300 - 500 millones de

dólares y soporta alrededor de 2500 empleos directos y 7500 indirectos (IFSA, 2021).

El almidón es un polímero compuesto principalmente de dos tipos de cadenas de glucanos (Figura 3). La amilosa es una molécula lineal de unidades glucosa unidas a través de enlaces α -(1 $\rightarrow$ 4), y constituye aproximadamente del 20 – 30 % del almidón. La amilopectina es una molécula ramificada mucho más grande y es el principal componente del almidón, comprendiendo del 70 al 80 %. Su estructura está formada por cadenas cortas de glucano- α -(1 $\rightarrow$ 4) interconectados por enlaces α -(1 $\rightarrow$ 6) (Buléon *et al.*, 1998; Jobling, 2004). Los almidones que tienen un bajo contenido de amilosa son conocidos como “waxy”. Entre las especies botánicas que han reportado almidones waxy se encuentran el maíz, trigo, arroz, papa y yuca (Waterschoot *et al.*, 2015).

En una menor proporción, el almidón contiene otros constituyentes como proteínas, lípidos y minerales, cuya presencia será determinada por el origen botánico del almidón. El contenido de proteínas usualmente oscila entre 0.1 – 0.5 %, lípidos entre 0.1 – 1.4 % y cenizas 0.1 – 0.3 % (Waterschoot *et al.*, 2015). El fósforo es el mineral más importante presente en los almidones y se encuentra principalmente en forma de fosfolípidos. Los almidones que son aislados a partir de raíces y tubérculos presentan un alto contenido de monoésteres de fosfato (hasta 0.089 % en almidón de papa) (Buléon *et al.*, 1998).

2.7.1 Métodos de extracción y purificación

Existen varios métodos para realizar la extracción del almidón a partir de semillas, frutas, leguminosas, raíces y tubérculos. En general, los métodos de extracción consisten en separar al almidón de la matriz donde se encuentra contenido, eliminando otros componentes como proteína y fibra (Lindeboom *et al.*, 2004). Los almidones que son extraídos de la fuente botánica en su forma original se denominan “almidones nativos” (Santana & Meireles, 2014).

Los cereales son la principal fuente botánica empleada para la extracción de almidón. Los gránulos de almidón de los cereales se encuentran embebidos en una matriz de cuerpos proteicos, por lo cual su extracción estará determinada por factores como el grado de solubilidad de la proteína y las interacciones almidón-proteína (El Halal *et al.*, 2019). Por el contrario, la extracción del almidón de tubérculos como papa y yuca es más sencilla debido a su bajo contenido de proteínas y a que los gránulos no se encuentran atrapados en granos duros (Baldwin, 2001; Waterschoot *et al.*, 2015). En cualquier caso, los aspectos a considerar en el proceso de extracción incluyen evitar que los gránulos de almidón sufran daño amilolítico o mecánico, que la desproteínización sea efectiva y que la pérdida de gránulos de tamaño pequeño sea mínima (Lindeboom *et al.*, 2004).

Los métodos de extracción de almidón generalmente incluyen etapas de molienda y enjuague, por lo que pueden clasificarse en moliendas húmedas y secas. La molienda seca es ampliamente empleada en la extracción industrial de almidón a partir de leguminosas (Sun *et al.*, 2015), mientras que la molienda húmeda es empleada principalmente a nivel laboratorio (Oyeyinka & Oyeyinka, 2018). En las técnicas que consisten en enjuagues, las semillas o granos son lavados y sumergidos en agua o soluciones ácidas o alcalinas antes de molerlas para extraer el endospermo que contiene el almidón (Baldwin, 2001). De manera alternativa, las semillas pueden ser molidas en seco hasta obtener harinas previo a los enjuagues; sin embargo, se debe tener en cuenta que las condiciones de molienda en seco demasiado severas pueden inducir daños a los gránulos de almidón (Oyeyinka & Oyeyinka, 2018). Las disoluciones empleadas para enjuagar las semillas o harinas pueden ser agua desionizada, soluciones de hidróxido de sodio, bisulfito de sodio, dodecil sulfato de sodio o acetato de sodio para remover otros componentes como proteínas, lípidos, saponinas y fibras (El Halal *et al.*, 2019; Garcia Silveira & Tapia-Blácido, 2018; Li & Zhu, 2018). El tiempo de enjuague puede variar desde 5 minutos hasta 1 semana, sin embargo, no son recomendados periodos extensos debido a que pueden provocar

problemas microbiológicos, mientras que el cambio en el pH puede inducir daños a los gránulos de almidón (Li & Zhu, 2018).

Una vez que las semillas o harinas son enjuagadas y molidas, es necesario separar el almidón de la matriz proteica de almacenamiento mediante lavados con agua. Los restos celulares se eliminan por filtración o centrifugación (Baldwin, 2001). Al centrifugar, puede presentarse una capa oscura sobre la superficie del sedimento de almidón, la cual está compuesta en su mayoría por proteínas, así como por algunos polisacáridos no almidonosos y gránulos pequeños de almidón. A nivel laboratorio, esta capa usualmente es raspada como parte de los métodos de purificación del almidón, aunque conlleva a una considerable pérdida de gránulos pequeños (Lindeboom *et al.*, 2004).

En algunos casos, dependiendo de la fuente botánica, es necesario realizar procesos de purificación adicionales para eliminar proteínas y lípidos remanentes. Respecto a la remoción de proteínas, se han reportado métodos alternativos con soluciones alcalinas como NaOH (Lim *et al.*, 1999), surfactantes (dodecil sulfato de sodio, SDS) (Blake *et al.*, 2015) y enzimas proteolíticas (Chiou *et al.*, 2002). Los tratamientos enzimáticos son efectivos en la purificación del almidón pero tienen costos elevados, lo cual puede no ser adecuado para la preparación de grandes muestras (Li & Zhu, 2018). La remoción de lípidos se ha realizado mediante la aplicación de disolventes como etanol, metanol y éter de petróleo (Chiou *et al.*, 2002; El Halal *et al.*, 2019).

Debido a que los métodos empleados para aislar el almidón afectan sus propiedades finales, es necesario identificar la técnica más adecuada en términos de pureza, rendimiento y propiedades fisicoquímicas del almidón resultante (Garcia Silveira & Tapia-Blácido, 2018).

2.7.2 Características microestructurales

El almidón es biosintetizado por las plantas dentro de los amiloplastos y/o en los cloroplastos como gránulos semicristalinos, los cuales pueden presentar

diferentes morfologías y grados de cristalinidad (Buléon *et al.*, 1998; Lindeboom *et al.*, 2004). La síntesis del almidón comienza en el hilio, a partir del cual se deposita el almidón formando anillos concéntricos de crecimiento, alternando fracciones amorfas y cristalinas (Figura 3).

El carácter cristalino del almidón está dado en gran parte por las cadenas de amilopectina, las cuales forman dobles hélices que se ordenan en grupos o “clusters”. Las dobles hélices se encuentran presentes en las laminillas cristalinas, mientras que los puntos de ramificación se encuentran en las fracciones amorfas. Las cadenas de amilosa componen dichas laminillas amorfas y presentan un menor grado de ordenamiento que la amilopectina (Waterschoot *et al.*, 2015).

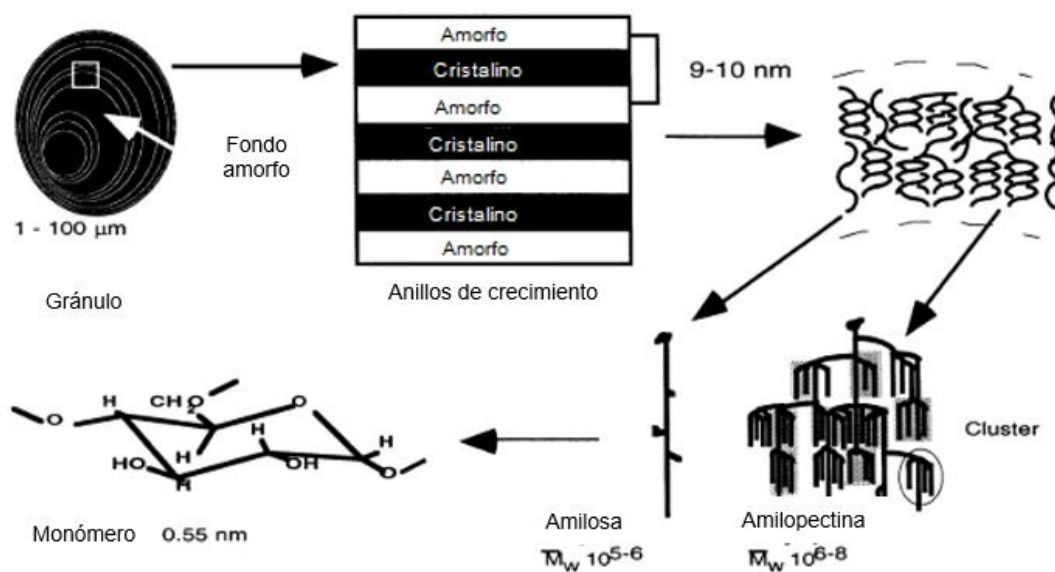


Figura 3. Esquema de los diferentes niveles estructurales del gránulo de almidón. Fuente: Buléon *et al.* (1998)

El ordenamiento de los polímeros, de forma radial centrada en el hilio y perpendicular a la superficie del gránulo, da origen a lo que se conoce como “patrón de birrefringencia”. Cuando los gránulos de almidón en su forma nativa

son expuestos a la luz polarizada, tienen la capacidad de refractarla, observándose una luz radial en forma de cruz sobre un fondo oscuro conocida como “cruz de malta” (Cornejo-Ramírez *et al.*, 2018). El grado de birrefringencia es proporcional a la estructura cristalina del gránulo de almidón, por lo que un patrón débil es un indicativo de la pérdida de cristalinidad (Alcázar-Alay & Meireles, 2015).

Los análisis de difracción de rayos X (XRD) y el modelamiento de estructuras cristalinas revelan que los gránulos de almidón presentan una estructura semicristalina. Las dos formas polimórficas principales son el tipo A y el tipo B, mientras que el tipo C es una combinación de ambos polimorfismos (Srichuwong & Jane, 2007). Los almidones de cereales generalmente presentan un patrón de difracción de tipo A, el cual es más denso que el tipo B característico de los almidones de tubérculos y raíces (Buléon *et al.*, 1998; Waterschoot *et al.*, 2015). El morfotipo A está relacionado con longitudes de cadena corta de amilopectina, mientras que el tipo B se relaciona con longitudes de cadena larga. El almidón aislado de leguminosas (como frijoles y chícharos) y algunos frutos usualmente presentan un patrón tipo C. Este morfotipo está compuesto por los tipos A y B, además de estar relacionado con longitudes de cadena intermedia (Alcázar-Alay & Meireles, 2015). Existe un cuarto morfotipo, conocido como tipo V, el cual está asociado con almidones gelatinizados o en complejos con lípidos, emulsionantes, butanol y yodo (Zobel, 1988).

Otra característica del almidón que depende de la fuente botánica de acuerdo con su origen es morfología y tamaño (Cuadro 1). Los gránulos de almidón pueden presentar tamaños que van desde 1 μm hasta más de 100 μm . El tamaño de los gránulos se puede expresar como el diámetro promedio o como la longitud promedio de ancho y largo.

Cuadro 1. Características morfológicas de almidones de diferentes fuentes botánicas.

Fuente botánica	Contenido de amilosa (%)	Tamaño promedio (μm)	Morfología	Referencia
Maíz normal	25 - 28	30	Poliédrica y redondeada	b
Maíz alto en amilosa	60 - 73	5 - 25	Irregular elongada	b
Trigo normal	25 - 29	20 - 35 (gránulos A)	Discos	b, c
Trigo normal	25 - 29	2 - 10 (gránulos B)	Esferas perfectas	b, c
Papa	18 - 21	10 - 110	Ovalada alargada	b, c
Chícharo	33 - 36	30	Ovalada	b
Arroz	20 - 25	3 - 8	Poligonal	a, c
Yuca	8 - 25	3 - 32	Redonda, truncada	a, c

Fuente: a) Alcázar-Alay & Meireles (2015), b) Buléon *et al.* (1998), c) Waterschoot *et al.* (2015).

Considerando un diámetro equivalente esférico promedio, los gránulos de almidón se pueden clasificar como muy pequeños (menores a 5 μm), pequeños (5 – 10 μm), medianos (10 – 25 μm) y grandes (tamaño superior a los 25 μm) (Lindeboom *et al.*, 2004). Los gránulos de almidón también se pueden clasificar como Tipo A cuando se trata de tamaños de gránulo grandes (>10 μm) y de Tipo B cuando son gránulos pequeños (<10 μm). Dentro de los almidones comerciales con tamaños pequeños se encuentran el arroz, la avena y el trigo. El almidón de papa es característico por presentar tamaños de gránulo muy grandes, en algunos casos alcanzando más de 100 μm (Buléon *et al.*, 1998).

2.7.3 Propiedades funcionales

Los gránulos de almidón son estructuras insolubles en agua que pasan a través de diferentes etapas cuando son calentados, exhibiendo dos características importantes: su capacidad de hinchamiento y su solubilidad (Cornejo-Ramírez *et al.*, 2018). La estructura semicristalina de los gránulos se rompe cuando éstos son calentados con exceso de agua. Las altas temperaturas provocan una mayor

vibración de las moléculas de los gránulos de almidón, provocando la ruptura de los enlaces intermoleculares y permitiendo que los grupos hidroxilo expuestos de las moléculas de amilosa y amilopectina formen enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua (de Castro *et al.*, 2019).

Este cambio en la estructura del almidón provoca que el gránulo se hinche e incremente su solubilidad y tamaño (Hoover, 2001). Al principio, los gránulos de almidón pueden incrementar su volumen hasta un 30 % de manera reversible. Posteriormente, las moléculas de agua continúan hidratando los fragmentos de amilosa, rompiendo los enlaces responsables de la cohesión del gránulo, lo que conlleva a un hinchamiento irreversible. En este punto, el gránulo ha incrementado su tamaño varias veces, así como la viscosidad de la pasta (Alcázar-Alay & Meireles, 2015). Este proceso es conocido como gelatinización del almidón.

La amilosa solubilizada en el agua es termodinámicamente inestable y a medida que la solución es enfriada comienza rápidamente a formar dobles hélices que se agregan. Se ha evidenciado una concentración crítica ≥ 1 % de amilosa para la formación de una red de gel tridimensional (Richardson *et al.*, 2000).

El grado de interacción entre los gránulos de almidón y las moléculas de agua se verá influenciado por la proporción de amilosa-amilopectina, y por sus características como peso molecular/distribución, grado de polimerización, longitud de cadena y conformación, entre otras (Hoover, 2001). Particularmente, la capacidad de hinchamiento y la solubilidad se ve restringida en almidones que presentan un mayor contenido de amilosa o cuando ésta se encuentra formando complejos con lípidos (Alcázar-Alay & Meireles, 2015). Se ha reportado que la presencia de grupos fosfato proporciona una carga negativa a los gránulos de almidón, causando repulsión entre cadenas adyacentes de amilopectina. Este efecto permite una rápida hidratación del gránulo de almidón y en consecuencia un mayor hinchamiento (Waterschoot *et al.*, 2015).

Otras propiedades funcionales de importancia son la capacidad de absorción de agua y de aceite. La capacidad de absorción de agua se puede entender como la habilidad del almidón para unirse con un contenido de agua limitado y se ha encontrado una correlación positiva con el contenido de amilosa (Bhat & Riar, 2016). Una alta capacidad de absorción de agua es un factor fundamental en la formación de la textura de los alimentos, como es en el caso de productos cárnicos triturados y masas horneadas (Bangar *et al.*, 2021). La capacidad de absorción de aceite determina la habilidad del almidón de unirse a lípidos físicamente debido a una acción capilar. Es una propiedad que se afecta por la presencia de proteínas debido a las cadenas laterales no polares de los aminoácidos que pueden formar interacciones hidrófobas con las cadenas de hidrocarburos de los lípidos (Jitngarmkusol *et al.*, 2008).

2.7.4 Propiedades térmicas

Cuando un sistema es calentado a cierta temperatura, la absorción o liberación de calor generalmente es debida a transiciones de fase (fusión o cristalización) o reacciones químicas (descomposición química) (Bangar *et al.*, 2021). Como se mencionó anteriormente, los gránulos de almidón se gelatinizan cuando son calentados con exceso de agua, este proceso transcurre en un intervalo de temperatura determinado donde se pueden identificar temperaturas de transición y entalpías de gelatinización (Hoover, 2001). Los almidones que tienen un alto grado de cristalinidad presentarán altas temperaturas de transición debido a la resistencia y estabilidad de su estructura (Alcázar-Alay & Meireles, 2015). La calorimetría diferencial de barrido (DSC) determina el cambio en la energía de un material y proporciona una medición cuantitativa de ese cambio asociado con las temperaturas de transición (inicio [T_o], punto medio [T_p], conclusión [T_c]), así como con las entalpías de fusión (ΔH) (Hoover *et al.*, 2010). Dentro del análisis de almidón mediante DSC, la aparición de un pico endotérmico refleja la fusión de los cristales de almidón, mientras que un segundo pico demuestra la disociación de los complejos de amilosa-lípido (Bangar *et al.*, 2021).

2.7.5 Propiedades reológicas

La reología estudia el flujo y la deformación de sustancias durante el procesamiento y la manipulación de los alimentos (Bangar *et al.*, 2021). Las propiedades reológicas de los almidones se estudian mediante el comportamiento de curvas de viscosidad determinadas por factores como el esfuerzo cortante aplicado, la concentración y temperatura (Alcázar-Alay & Meireles, 2015). Las propiedades reológicas de los almidones se pueden medir empleando un reómetro. Si los gránulos de almidón son sometidos a cizallamiento se desintegrarán fácilmente debido a que están hinchados y formarán una pasta. La estructura de la pasta está conformada por una fase continua y otra discontinua. La fase continua corresponde a las moléculas de amilosa y amilopectina que se encuentran solubilizadas, mientras que la fase discontinua está conformada por los gránulos de almidón remanentes (Xie *et al.*, 2012).

Específicamente para el análisis de las propiedades viscoelásticas, los datos obtenidos a través del módulo de almacenamiento (G') indicarán el comportamiento elástico, mientras que el módulo de pérdida (G'') hará referencia al comportamiento viscoso (Cornejo-Ramírez *et al.*, 2018). Las propiedades viscoelásticas estarán determinadas por el material lixiviado y por las interacciones moleculares presentes en la red tridimensional del gel de almidón (Alcázar-Alay & Meireles, 2015). Los lípidos, principalmente los fosfolípidos, tienen una gran influencia en la viscosidad de las pastas de almidón debido a que forman complejos con la amilosa y disminuyen la capacidad de hinchamiento del almidón, además de que este tipo de complejos requieren de temperaturas más elevadas para ser disociados (Berski *et al.*, 2011). De igual manera, las proteínas tienden a incrementar la viscosidad de pastas de almidón, favoreciendo la formación de un gel más estructurado (Ding *et al.*, 2021).

2.7.6 Digestibilidad

El almidón se clasifica de acuerdo con su tasa de digestión y la etapa en la cual se metaboliza. En este sentido, el almidón de rápida digestión (*rapidly digestible starch*, RDS) es la fracción que se hidroliza a monómeros de glucosa dentro de los primeros 20 minutos de su ingestión, mientras que el almidón de lenta digestión (*slowly digestible starch*, SDS) es degradado entre los 20 y 120 minutos de su ingesta. Por otra parte, también puede estar presente una fracción de almidón resistente (*resistant starch*, RS), la cual no es hidrolizada por las enzimas del intestino delgado y pasa hacia el intestino grueso (Englyst *et al.*, 1992).

La digestión de los gránulos de almidón es un proceso complejo e incluye diferentes fases: la difusión de la enzima digestiva hacia el sustrato; la unión de la enzima al almidón y el proceso de hidrólisis (Singh *et al.*, 2010). La hidrólisis de los almidones nativos puede variar dependiendo de una serie de factores atribuidos generalmente a su origen botánico, que determina el tamaño del gránulo, relación amilosa/amilopectina, cristalinidad del gránulo, asociación molecular entre los componentes del almidón, complejos de amilosa-lípidos, entre otros (Hoover, 2001). La presencia de poros y canales en el interior de los gránulos contribuyen en el debilitamiento de la estructura, permitiendo la entrada de reactivos y enzimas que inducen la hidrólisis del almidón (Cornejo-Ramírez *et al.*, 2018). Sin embargo, el grado de alteración de la estructura del gránulo durante el proceso de gelatinización determina la susceptibilidad del almidón a la degradación enzimática, así como a la formación de agregados durante la retrogradación (Bangar *et al.*, 2021).

La presencia de lípidos y proteínas puede afectar la tasa de digestión del almidón. Las fracciones proteicas de albúmina, globulinas y glutelinas contribuyen a unir los cuerpos proteicos que rodean los gránulos de almidón, actuando como una barrera contra la acción enzimática (Singh *et al.*, 2010). Los ácidos grasos pueden formar complejos con las moléculas de amilosa, dando como resultado almidones resistentes con una digestibilidad y solubilidad reducida, así como un

incremento en su temperatura de gelatinización (Singh *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2018). Se ha demostrado que la remoción de lípidos y proteínas, ya sea de manera independiente o simultánea, incrementa el grado de hidrólisis del almidón (Ye *et al.*, 2018).

La ingesta de alimentos ricos en SDS y RS ha demostrado que aporta diversos beneficios fisiológicos como la producción de ácidos grasos de cadena corta, control glucémico y aumento de producción fecal. Este último efecto es importante en la prevención del estreñimiento y de la aparición de hemorroides, favoreciendo un crecimiento bacteriano mejorado y disminuyendo la concentración de compuestos potencialmente tóxicos (Richardson *et al.*, 2000).

2.7.7 Aplicaciones

La funcionalidad del almidón está relacionada con sus características fisicoquímicas, influenciadas por la estructura molecular y origen botánico (de Castro *et al.*, 2019). Por ejemplo, un almidón con alto contenido de amilosa puede emplearse en la formulación de recubrimientos comestibles, mientras que un almidón waxy (alto contenido de amilopectina) tendrá aplicaciones diferentes debido a la producción de pastas viscosas formadas por calentamiento (Guerzoni *et al.*, 2011). En la industria alimentaria los almidones han sido empleados para proporcionar textura, como espesantes, proporcionar sólidos en suspensión, facilitar el procesamiento o para realizar funciones específicas (Cuadro 2) (de Castro *et al.*, 2019).

Los almidones nativos usualmente presentan algunas desventajas como alta retrogradación, sinéresis y baja resistencia al cizallamiento, lo que limita su aplicación industrial (Santana & Meireles, 2014). Por ello, la modificación química o física de los almidones amplía la gama de opciones para su aplicación. Por ejemplo, se ha reportado que el tratamiento físico de recocido o la modificación del almidón por entrecruzamiento, tienen como resultado la obtención de almidones con una menor solubilidad y capacidad de hinchamiento que los almidones nativos.

Cuadro 2. Ejemplos de aplicación de almidones en productos alimenticios.

Producto alimenticio	Propósito de la adición	Efecto en el producto	Referencia
Fideos de arroz	Desarrollo de fideos bajos en proteínas.	La calidad de cocción, los atributos sensoriales y la textura de los fideos se mejoraron.	Wang <i>et al.</i> , (2018)
Helado	Sustituto de grasa.	La dureza del helado mejoró con la adición de almidón y presentó características fisicoquímicas y sensoriales similares al helado alto en grasa.	Surendra Babu <i>et al.</i> , (2018)
Jalea de moras	Agente estabilizante y espesante.	Buena estabilidad (sin sinéresis) y textura. Favoreció la resistencia al calor de la mermelada al someterla a horneado.	Zhang <i>et al.</i> , (2016)
Jugo de anacardo	Formación de microcápsulas.	Obtención de microcápsulas con buena retención de compuestos fenólicos y ácido ascórbico, además de pérdida limitada de actividad antioxidante durante el almacenamiento.	Maia <i>et al.</i> , (2019)
Muffins	Sustituto de grasa.	Características de calidad del pan similares al tratamiento control.	Rodriguez-Sandoval <i>et al.</i> , (2017)
Nuggets de pollo	Ingrediente en la formulación de rebozado para productos fritos con grasa.	La adición de almidón de tapioca pregelatinizado redujo la absorción de aceite, aumentó el rendimiento de cocción y la absorción del rebozado.	Altunakar <i>et al.</i> , (2004)
Queso mozzarella rallado	Agente anti aglutinante.	Mejoró su estabilidad presentando menos grumos durante el almacenamiento. Además, mejoró las características sensoriales y fisicoquímicas.	Singh <i>et al.</i> , (2015)
Salchichas	Sustituto de grasa.	Aumentó la capacidad de retención de agua y la estabilidad de la emulsión en salchichas.	Luo & Xu, (2011)
Salsa blanca	Estabilizante en el proceso de congelación - descongelación.	Propiedades viscoelásticas si modificación después de congelar y descongelar.	Arocas <i>et al.</i> , (2009)
Yogurt	Sustituto de grasa.	Formación de sistemas gelificados de leche más estables.	Lobato-Calleros <i>et al.</i> , (2014)

En consecuencia, este tipo de almidones presentan una mayor estabilidad de la pasta, por lo cual son adecuados para aplicarlos en la elaboración de fideos y como sustitutos de grasa (Rodríguez-Sandoval et al., 2017; Wang et al., 2018).

Gracias a su capacidad de hinchamiento y gelatinización, los almidones pueden emplearse como agentes espesantes en la elaboración de salsas, sopas, coberturas y aderezos (Bangar et al., 2021; Rengsutthi & Charoenrein, 2011). Además, al mismo tiempo pueden fungir como estabilizantes previniendo cambios negativos del producto alimenticio como es la aparición de sinéresis (Arocas et al., 2009). Los almidones con alto contenido de amilosa presentan una mayor capacidad gelificante y pueden ser empleados en la elaboración de mermeladas, jaleas y gelatinas (Bangar et al., 2021). Asimismo, al formar películas crujientes son empleados en la formulación de alimentos rebozados como carne congelada, pescado, verduras y papas fritas (Richardson et al., 2000).

Los almidones también se pueden aplicar en la elaboración de películas y recubrimientos biodegradables. Los almidones tienen la ventaja de ser insumos de bajo costo, ecológicos, altamente biodisponibles y que, dependiendo de su origen, pueden aportar diferentes moléculas como los compuestos fenólicos (Bangar et al., 2021). Los almidones pueden presentar propiedades emulsificantes, resistencia a la digestión y buena formación de películas, favoreciendo su uso en la elaboración de biopelículas y encapsulados. Los sistemas estructurados con base en almidón pueden ser capaces de proteger y liberar una amplia gama de biomoléculas, permitiendo que puedan ser incorporadas en el desarrollo de productos alimenticios innovadores con propiedades nutricias y sensoriales mejoradas (Guo et al., 2021).

2.8 Literatura citada

Akshatha, V., Giridhar, P., & Ravishankar, G. A. (2011). Morphological diversity in *Bixa orellana* L. and variations in annatto pigment yield. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 86(4), 319–324. <https://doi.org/10.1080/14620316.2011.11512767>

- Alcázar-Alay, Sylvia C., Osorio-Tobón, J. F., Forster-Carneiro, T., Steel, C. J., & Meireles, M. A. A. (2017). Polymer modification from semi-defatted annatto seeds using hot pressurized water and supercritical CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids*, 129, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.12.011>
- Alcázar-Alay, S. C., & Meireles, M. A. A. (2015). Physicochemical properties, modifications, and applications of starches from different botanical sources. *Food Science and Technology*, 35(2), 215–236. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6749>
- Altunakar, B., Sahin, S., & Sumnu, G. (2004). Functionality of batters containing different starch types for deep-fat frying of chicken nuggets. *European Food Research and Technology*, 218(4), 318–322. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0854-5>
- Arocas, A., Sanz, T., & Fiszman, S. M. (2009). Influence of corn starch type in the rheological properties of a white sauce after heating and freezing. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 901–907. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.05.009>
- Avedaño-Arrazate, C. H., Pinzón-López, L. L., Mendoza-López, A., Campos-Rojas, E., Correa-Navarro, P. J., Godoy-Hernández, G., Mijangos-Cortés, J. O., & Rivera-Madrid, R. (2012). Rescate y conservación del achiote (*Bixa orellana* L.) en México. *Agro Productividad*, 5(4), 3–8.
- Baldwin, P. M. (2001). Starch granule-associated proteins and polypeptides: A review. In *Starch/Stärke* (Vol. 53, Issue 10, pp. 475–503). John Wiley & Sons, Ltd.
- Bangar, S. P., Kumar, M., Whiteside, W. S., Tomar, M., & Kennedy, J. F. (2021). Litchi (*Litchi chinensis*) seed starch: Structure, properties, and applications - A review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2(February), 100080.
- Berski, W., Ptaszek, A., Ptaszek, P., Ziobro, R., Kowalski, G., Grzesik, M., & Achremowicz, B. (2011). Pasting and rheological properties of oat starch and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 665–671. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.036>
- Bhat, F. M., & Riar, C. S. (2016). Effect of amylose, particle size & morphology on the functionality of starches of traditional rice cultivars. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 637–644. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.078>
- Blake, L. H., Jenner, C. F., Gidley, M. J., & Cozzolino, D. (2015). Effect of surfactant treatment on swelling behaviour of normal and waxy cereal starches. *Carbohydrate Polymers*, 125, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.049>
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., & Ball, S. (1998). Starch granules: Structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23(2), 85–112. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(98\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00040-3)
- Cáceres, A., Menéndez, H., Méndez, E., Cohobón, E., Samayoa, B. E., Jauregui, E., Peralta, E., & Carrillo, G. (1995). Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. *Journal of*

- Ethnopharmacology*, 48(2), 85–88. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01288-O](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01288-O)
- Chiou, H., Martin, M., & Fitzgerald, M. (2002). Effect of Purification Methods on Rice Starch Structure. *Starch/Stärke*, 54, 415–420.
- Cornejo-Ramírez, Y. I., Martínez-Cruz, O., Del Toro-Sánchez, C. L., Wong-Corral, F. J., Borboa-Flores, J., & Cinco-Moroyoqui, F. J. (2018). The structural characteristics of starches and their functional properties. *CYTA - Journal of Food*, 16(1), 1003–1017. <https://doi.org/10.1080/19476337.2018.1518343>
- Coronado, L. (2014). Obtención de péptidos bioactivos en *Bixa orellana* L. (axhiote). *Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.*
- de Castro, D. S., dos Santos Moreira, I., de Melo Silva, L. M., Lima, J. P., da Silva, W. P., Gomes, J. P., & de Figueirêdo, R. M. F. (2019). Isolation and characterization of starch from pitomba endocarp. *Food Research International*, 124(June), 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.032>
- Devia, J. E., & Saldarriaga, L. (2003). Planta piloto para obtener colorante de la semilla del achiote (*Bixa orellana*). *Revista Universidad EAFIT*, 39(131), 8–22.
- Ding, Y., Cheng, J., Lin, Q., Wang, Q., Wang, J., & Yu, G. (2021). Effects of endogenous proteins and lipids on structural, thermal, rheological, and pasting properties and digestibility of adlay seed (*Coix lacryma-jobi* L.) starch. *Food Hydrocolloids*, 111(August 2020), 106254. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106254>
- El Halal, S. L. M., Kringel, D. H., Zavareze, E. da R., & Dias, A. R. G. (2019). Methods for Extracting Cereal Starches from Different Sources: A Review. *Starch/Stärke*, 71(11–12), 1900128. <https://doi.org/10.1002/star.201900128>
- Englyst, H. N., Kingman, S. M., & Cummings, J. H. (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46, S33-50.
- Fleischer, T. C., Ameade, E. P. K., Mensah, M. L. K., & Sawyer, I. K. (2003). Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia*, 74(1–2), 136–138. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00289-7](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00289-7)
- Frega, N., Mozzon, M., & Bocci, F. (1998). Identification and estimation of tocotrienols in the annatto lipid fraction by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(12), 1723–1727. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0323-1>
- Garcia-Silveira, T. M., & Tapia-Blácido, D. R. (2018). Is isolating starch from the residue of annatto pigment extraction feasible? *Food Hydrocolloids*, 77, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.027>
- Guerzoni, M. E., Gianotti, A., & Vernocchi, P. (2011). Effect of Starch Addition to Fluid Dough During the Bread Making Process. In *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention* (pp. 375–384). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380886-8.10034-0>
- Guo, Y., Qiao, D., Zhao, S., Zhang, B., & Xie, F. (2021). Starch-based materials encapsulating food ingredients: Recent advances in fabrication methods and applications. *Carbohydrate Polymers*, 270(June), 118358.

- <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118358>
- Hoover, R. (2001). Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: A review. *Carbohydrate Polymers*, 45(3), 253–267. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00260-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00260-5)
- IFSA. (2021). *International Federation of Starch Association*. <https://internationalstarch.org/>
- Jitngarmkusol, S., Hongsuwankul, J., & Tananuwong, K. (2008). Chemical compositions, functional properties, and microstructure of defatted macadamia flours. *Food Chemistry*, 110(1), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.050>
- Jobling, S. (2004). Improving starch for food and industrial applications. In *Current Opinion in Plant Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2003.12.001>
- Li, G., & Zhu, F. (2018). Quinoa starch: Structure, properties, and applications. *Carbohydrate Polymers*, 181(September 2017), 851–861. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.067>
- Lim, S.-T., Lee, J.-H., Shin, D.-H., & Lim, H. S. (1999). Comparison of Protein Extraction Solutions for Rice Starch Isolation and Effects of Residual Protein Content on Starch Pasting Properties. *Starch/Stärke*, 120–125.
- Lindeboom, N., Chang, P. R., & Tyler, R. T. (2004). Analytical, Biochemical and Physicochemical Aspects of Starch Granule Size, with Emphasis on Small Granule Starches: A Review. *Starch/Stärke*, 56(34), 89–99. <https://doi.org/10.1002/star.200300218>
- Lobato-Calleros, C., Ramírez-Santiago, C., Vernon-Carter, E. J., & Alvarez-Ramirez, J. (2014). Impact of native and chemically modified starches addition as fat replacers in the viscoelasticity of reduced-fat stirred yogurt. *Journal of Food Engineering*, 131, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.01.019>
- Luo, Z., & Xu, Z. (2011). Characteristics and application of enzyme-modified carboxymethyl starch in sausages. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 1993–1998. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.07.016>
- Maia, P. D. D. S., dos Santos Baião, D., da Silva, V. P. F., de Araújo Calado, V. M., Queiroz, C., Pedrosa, C., Valente-Mesquita, V. L., & Pierucci, A. P. T. R. (2019). Highly Stable Microparticles of Cashew Apple (*Anacardium occidentale* L.) Juice with Maltodextrin and Chemically Modified Starch. *Food and Bioprocess Technology*, 12(12), 2107–2119. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02376-x>
- Mans, D., Toelsie, J., Jagernath, Z., Ramjiawan, K., van Brussel, A., Jhanjan, N., Orie, S., Muringen, M., Elliot, U., Jurgens, S., Macnack, R., Rigtters, F., Mohan, S., Chigharoe, V., Illes, S., & Bipat, R. (2004). Assessment of Eight Popularly Used Plant-Derived Preparations for Their Spasmolytic Potential Using the Isolated Guinea Pig Ileum. *Pharmaceutical Biology*, 42(6), 422–429. <https://doi.org/10.1080/13880200490886012>
- Medina-Flores, D., Ulloa-Urizar, G., Camere-Colarossi, R., Caballero-García, S., Mayta-Tovalino, F., & del Valle-Mendoza, J. (2016). Antibacterial activity of *Bixa orellana* L. (achiote) against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus*

- sanguinis. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(5), 400–403. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.03.005>
- Mehta, A. A., Behera, L. K., Tandel, M. B., Jadeja, D. B., & Vashi, B. G. (2015). Efficacy of different oils used for the extraction of annatto colour from the seeds of *Bixa orellana* L. *Journal of Applied and Natural Science*, 7(2), 828–831. <https://doi.org/10.31018/jans.v7i2.690>
- Moraes, M. N., Zabot, G. L., & Meireles, M. A. A. (2015). Extraction of tocotrienols from annatto seeds by a pseudo continuously operated SFE process integrated with low-pressure solvent extraction for bixin production. *Journal of Supercritical Fluids*, 96, 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.09.007>
- Oyeyinka, S. A., & Oyeyinka, A. T. (2018). A review on isolation, composition, physicochemical properties, and modification of Bambara groundnut starch. *Food Hydrocolloids*, 75, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.012>
- Pierpaoli, E., Viola, V., Barucca, A., Orlando, F., Galli, F., & Provinciali, M. (2013). Effect of annatto-tocotrienols supplementation on the development of mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Carcinogenesis*, 34(6), 1352–1360. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt064>
- Prabhakara Rao, P., Narsing Rao, G., Jyothirmayi, T., Satyanarayana, A., Karuna, M. S. L., & Prasad, R. B. N. (2015). Characterisation of Seed Lipids from *Bixa orellana* and *Trachyspermum copticum*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(10), 1483–1490. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2717-1>
- Raddatz-Mota, D., Pérez-Flores, L. J., Carrari, F., Mendoza-Espinoza, J. A., de León-Sánchez, F. D., Pinzón-López, L. L., Godoy-Hernández, G., & Rivera-Cabrera, F. (2017). Achiote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1729–1741. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2579-7>
- Rahmalia, W., Fabre, J.-F., & Mouloungui, Z. (2015). Effects of Cyclohexane/Acetone Ratio on Bixin Extraction Yield by Accelerated Solvent Extraction Method. *Procedia Chemistry*, 14, 455–464. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.061>
- Ravindran, P. N., Divakaran, M., & Pillai, G. S. (2012). Other herbs and spices: achiote to Szechuan pepper. In *Handbook of Herbs and Spices* (Second Edi, Vol. 2, pp. 534–556). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857095688.534>
- Rengsutthi, K., & Charoenrein, S. (2011). Physico-chemical properties of jackfruit seed starch (*Artocarpus heterophyllus*) and its application as a thickener and stabilizer in chilli sauce. *LWT - Food Science and Technology*, 44(5), 1309–1313. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.019>
- Richardson, P. H., Jeffcoat, R., & Shi, Y.-C. (2000). High-Amylose Starches: From Biosynthesis to Their Use as Food Ingredients. *MRS Bulletin*, 25(12), 20–24. <https://doi.org/10.1557/mrs2000.249>
- Rodriguez-Sandoval, E., Prasca-Sierra, I., & Hernandez, V. (2017). Effect of modified cassava starch as a fat replacer on the texture and quality characteristics of muffins. *Journal of Food Measurement and*

- Characterization*, 11(4), 1630–1639. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9543-0>
- Santana, Á. L., & Meireles, M. A. A. (2014). New Starches are the Trend for Industry Applications: A Review. *Food and Public Health*, 4(5), 229–241. <https://doi.org/10.5923/j.fph.20140405.04>
- Shen, C. L., Kaur, G., Wanders, D., Sharma, S., Tomison, M. D., Ramalingam, L., Chung, E., Moustaid-Moussa, N., Mo, H., & Dufour, J. M. (2018). Annatto-extracted tocotrienols improve glucose homeostasis and bone properties in high-fat diet-induced type 2 diabetic mice by decreasing the inflammatory response. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29063-9>
- Shilpi, J. A., Taufiq-Ur-Rahman, M., Uddin, S. J., Alam, M. S., Sadhu, S. K., & Seidel, V. (2006). Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(2), 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.05.008>
- SIAP. (2019). *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. Estadística de Producción Agrícola. <https://www.gob.mx/siap>
- Silva, E. K., Martelli-Tosi, M., Vardanega, R., Nogueira, G. C., Zabet, G. L., & Meireles, M. A. A. (2018). Technological characterization of biomass obtained from the turmeric and annatto processing by using green technologies. *Journal of Cleaner Production*, 189, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.04.101>
- Singh, J., Dartois, A., & Kaur, L. (2010). Starch digestibility in food matrix: a review. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 21, Issue 4, pp. 168–180). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.12.001>
- Singh, M. P., Kanawjia, S. K., Giri, A., & Khetra, Y. (2015). Effect of potato starch on quality characteristics of shredded Mozzarella cheese during storage. *Journal of Food Science and Technology*, 52(11), 7507–7512. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1807-2>
- Srichuwong, S., & Jane, J. -I. (2007). Physicochemical Properties of Starch Affected by Molecular Composition and Structures: A Review. *Food Science and Biotechnology*, 16(5), 663–674.
- Sun, Q., Chu, L., Xiong, L., & Si, F. (2015). Effects of different isolation methods on the physicochemical properties of pea starch and textural properties of vermicelli. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 327–334. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0980-4>
- Surendra Babu, A., Parimalavalli, R., & Jagan Mohan, R. (2018). Effect of modified starch from sweet potato as a fat replacer on the quality of reduced fat ice creams. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(4), 2426–2434. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9859-4>
- Taham, T., Cabral, F. A., & Barrozo, M. A. S. (2015). Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies. *Journal of Supercritical Fluids*, 100, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.02.006>
- Valério, M. A., Ramos, M. I. L., Braga Neto, J. A., & Macedo, M. L. R. (2015). Annatto seed residue (*Bixa orellana* L.): nutritional quality. *Food Science and*

- Technology (Campinas)*, 35(2), 326–330. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6539>
- Vilar, D. de A., Vilar, M. S. de A., Moura, T. F. A. de L. e, Raffin, F. N., Oliveira, M. R. de, Franco, C. F. de O., de Athayde-Filho, P. F., Diniz, M. de F. F. M., & Barbosa-Filho, J. M. (2014). Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa orellana* L.: A Review. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/857292>
- Viuda-Martos, M., Ciro-Gómez, G. L., Ruiz-Navajas, Y., Zapata-Montoya, J. E., Sendra, E., Pérez-Álvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2012). *In vitro* Antioxidant and Antibacterial Activities of Extracts from Annatto (*Bixa orellana* L.) Leaves and Seeds. *Journal of Food Safety*, 32(4), 399–406. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2012.00393.x>
- Wang, L., Zhang, C., Chen, Z., Wang, X., Wang, K., Li, Y., Wang, R., Luo, X., Li, Y., & Li, J. (2018). Effect of annealing on the physico-chemical properties of rice starch and the quality of rice noodles. *Journal of Cereal Science*, 84, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.10.004>
- Waterschoot, J., Gomand, S. V., Fierens, E., & Delcour, J. A. (2015). Production, structure, physicochemical and functional properties of maize, cassava, wheat, potato, and rice starches. *Starch/Stärke*, 67(1–2), 14–29. <https://doi.org/10.1002/star.201300238>
- Xie, F., Halley, P. J., & Avérous, L. (2012). Rheology to understand and optimize processibility, structures and properties of starch polymeric materials. In *Progress in Polymer Science (Oxford)* (Vol. 37, Issue 4, pp. 595–623). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.07.002>
- Ye, J., Hu, X., Luo, S., McClements, D. J., Liang, L., & Liu, C. (2018). Effect of endogenous proteins and lipids on starch digestibility in rice flour. *Food Research International*, 106, 404–409. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.008>
- Zabot, G. L., Silva, E. K., Emerick, L. B., Felisberto, M. H. F., Clerici, M. T. P. S., & Meireles, M. A. A. (2019). Physicochemical, morphological, thermal, and pasting properties of a novel native starch obtained from annatto seeds. *Food Hydrocolloids*, 89, 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.041>
- Zhang, L.-L., Ren, J.-N., Zhang, Y., Li, J.-J., Liu, Y.-L., Guo, Z.-Y., Yang, Z.-Y., Pan, S.-Y., & Fan, G. (2016). Effects of modified starches on the processing properties of heat-resistant blueberry jam. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 447–456. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.018>
- Zobel, H. F. (1988). Starch Crystal Transformations and Their Industrial Importance. *Starch/Stärke*, 40(1), 1–7. <https://doi.org/10.1002/star.19880400102>

3. Achiote (*Bixa orellana* L.), una nueva fuente potencial de almidón: propiedades antioxidantes, microestructurales, funcionales y de digestibilidad³

3.1. Resumen

La bixina y la norbixina se extraen de las semillas de achiote, y los residuos de estas últimas se pueden utilizar como una fuente potencial de almidón de achiote (AA), contribuyendo a la economía circular de las comunidades regionales donde el recurso es cultivado/procesado. Para determinar la idoneidad del AA como ingrediente alimentario, se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas, antioxidantes, microestructurales y funcionales después de ser purificado mediante: Remojo en solución de metabisulfito de sodio (baja pureza), desgrasado para remoción de lípidos (pureza media), tratamiento alcalino para extracción de proteínas (pureza media) y tratamiento de desgrasado/alcalino combinados (alta pureza). El grado de pureza del AA afectó todos los parámetros evaluados. Los valores de potencial ζ oscilaron entre -18.30 a -24.10 mV y los de la actividad antioxidante entre 0.52-1.14 $\mu\text{g TE/g}$ (ensayo ABTS⁺). El AA presentó una morfología heterogénea con gránulos que tendieron a aglomerarse, y el diámetro medio de Sauter varió de 26.8 a 31.1 μm . La espectroscopia FTIR mostró que moléculas de proteína estuvieron presentes a pesar del tratamiento alcalino. Los patrones de rayos X indicaron que la región cristalina del almidón no fue modificada por el tratamiento de desproteinización. La viscosidad aparente y las propiedades viscoelásticas de las dispersiones de almidón gelatinizado aumentaron cuando se eliminaron simultáneamente los lípidos y las proteínas. El poder de hinchamiento (21.44-22.71 g/g), el índice de solubilidad (21.77-40.43%), la absorción de agua (3.9-4.56 g/g) y la absorción de aceite (1.78-2.41 g/g) aumentaron con el grado de purificación. El ensayo de digestibilidad *in vitro* mostró que el AA presentó una mayor fracción de almidón de digestión lenta (36.57-40.68%) que las fracciones de almidón resistente y de rápida digestión. Este trabajo demuestra que el AA posee adecuadas propiedades funcionales que abren la posibilidad de su uso en la industria alimentaria.

Palabras clave: Almidón de achiote, digestibilidad, propiedades funcionales, tratamientos de purificación.

ANNATTO (*Bixa orellana* L.), A POTENTIAL NOVEL STARCH SOURCE: ANTIOXIDANT, MICROSTRUCTURAL, FUNCTIONAL, AND DIGESTIBILITY PROPERTIES⁴

3.2. Abstract

Bixin and norbixin are extracted from annatto seeds, and the residual seed waste can be used as a potential source of annatto starch (AS), contributing to the circular economy of the regional communities where the resource is grown/processed. To assess AS suitability as a food ingredient, its physicochemical, antioxidant, microstructural, and functional properties were evaluated after being purified by: Soaking in sodium metabisulfite solution (low purity), defatting for removing lipids (medium purity), alkaline treatment for extracting protein (medium purity), and combined defatting/alkaline (high purity) treatments. AS degree of purity affected all the evaluated parameters. The ζ -potential values ranged between -18.30 to -24.10 mV and those of the antioxidant activity between 0.52-1.14 $\mu\text{g TE/g}$ (ABTS^{•+} assay). AS presented a heterogeneous morphology with granules tending to agglomerate, and the mean Sauter diameter varied from 26.8 to 31.1 μm . FTIR spectroscopy showed that protein molecules were present despite the alkaline treatment. X-ray patterns pinpointed that the starch crystalline region was not modified by the deproteinization treatment. The apparent viscosity and viscoelastic properties of gelatinized starch dispersions increased when lipids and proteins were simultaneously removed. The swelling power (21.44-22.71 g/g), solubility index (21.77-40.43%), water absorption (3.9-4.56 g/g), and oil absorption (1.78-2.41 g/g) increased with the purification degree. The *in vitro* digestibility assay showed that AS presented a higher fraction of slowly digestible starch (36.57-40.68%) than rapidly digestible and resistant starch fractions. This work demonstrates that AS has suitable functional properties that open the possibility for its use in the food industry.

Keywords: Annatto starch, digestibility, functional properties, purification treatments.

3.3. Introduction

Annatto (*Bixa orellana* L.) is a native plant from America, whose economic and commercial importance lies in extracting natural pigments (bixin and norbixin) from its seeds. These pigments are widely employed as a condiment in traditional Mexican cuisine. They are also used in industrial applications for coloring processed foods (mainly dairy products), oils, paints, cosmetics, and textile fibers [1]. Also, several studies have pinpointed that annatto seeds are sources of tocotrienols and phenolic compounds with beneficial biological properties. Extracts obtained from annatto leaves and seeds have shown antibacterial, antifungal, antioxidant, antidiarrheal, anticonvulsant, and analgesic capabilities [2–4].

Regardless of the pigment extraction process used in annatto seeds, by-products accounting for around 97 to 98% (dry weight) of the seeds are generated [5,6]. The extracted seed wastes contain 40–75% (w/w) of carbohydrates, of which approximately 19 to 30% (w/w) is starch [5,6]. Starch with various purity degrees can be obtained from the annatto residues depending on the extraction and depigmentation method employed [7,8]. It is known that the presence of proteins, lipids, and other carbohydrates modify the thermal, rheological, pasting, and digestibility properties of different starch sources. For example, lipid and protein removal in rice and adlay seed starches caused a decrease in thermal stability but increased digestibility, relative crystallinity, and peak viscosity [9,10].

In general, protein content is removed from the starch granule to enhance its functional properties. Several methods have been proposed for protein depletion, like enzymatic and chemical treatments. In the latter case, the use of aqueous NaOH solutions is most common. Alkali concentration, soaking time, and temperature can change the structure and functionality of the starch granules [11,12]. Studies conducted with potato, sago, and corn starches have shown an increase in swelling power, solubility, and syneresis values after being treated under different NaOH concentrations for protein depletion [13–14]. In this context,

the importance of investigating the starch changes related to the presence or absence of native lipids and proteins is evident. The broad utility of starches in the food industry depends on their ability to modify the viscoelastic, culinary, and sensory properties of processed foods [15,16].

Some studies have shown that starches obtained from non-conventional sources have antioxidant activity, distinguishing them from conventional starches [7,17,18]. It has been shown that annatto seeds have a high content of antioxidant compounds [1]. Therefore, it is of interest to identify whether the starch obtained from the seeds preserves phenolic compounds with antioxidant activity. Several works have focused on the morphological, thermal, and pasting properties of annatto starch [7,8], but none on its functional properties (e.g., swelling power, solubility, and absorption capacity) and *in vitro* digestibility.

This study aimed to evaluate the physicochemical (particle size, rheology), phenolic content and antioxidant activity, microstructural (scanning electron microscopy, FTIR, XRD), functional properties (swelling, solubility, water, and oil absorption), and the *in vitro* digestibility of annatto starch, as influenced by different purification methods. It is hoped that this study may promote the use of annatto starch for specific applications in the food industry.

3.4. Material and methods

3.4.1. Materials

Annatto seeds (*Bixa orellana* L.) were acquired in September 2018 at a local market in San Sebastian Yaxche, Peto, Yucatan, Mexico (GPS coordinates of 19°58'53" N and 88°55'28" W, elevation above sea level of 42 m). The seeds were stored in airtight plastic bags at 5 °C until required for their use. Gallic acid (G7384), 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS, A1888), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox, 238813), 2,20-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, D9132), pancreatin from porcine pancreas (P1750), amyloglucosidase (A7095, EC 3.2.1.3), invertase (I4504, EC

3.2.1.26), and glucose oxidase-peroxidase reagent (GAGO20) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other chemical reagents were of analytical grade, and distilled water was used.

3.4.2. Starch extraction

Annatto seeds (100 g) were twice depigmented with 300 mL of 2% (w/v) KOH for 12 h and 45 min, respectively, with constant stirring. The colored solutions were separated in each case [19]. The vegetal residue was dried at 50 °C for 24 h using a forced ventilation oven (HCF-S2-D, Riossa Digital, Mexico City, Mexico), milled with a commercial blender, sieved (20-mesh) until obtaining a fine flour.

The annatto flour (AF) was subjected to four procedures to obtain different starch purities (Fig. 4): A low purity starch (AS_L) was obtained by soaking AF (100 g) with a 0.5% (w/v) sodium metabisulfite solution ($Na_2S_2O_5$) (1:10, w/v ratio) [8]. The obtained starch was dried (45 °C for 20 h), ground (pestle and mortar), and passed through an 80-mesh sieve.

Two medium purity starches were extracted by a defatting (AS_{F0}) and by alkaline treatment to remove soluble proteins (AS_{P0}). For AS_{F0} , the AF was defatted in a Soxhlet apparatus with petroleum ether for 5 h previous to the starch extraction [10]. For AS_{P0} , 50 g of AS_L was soaked in 100 mM NaOH solution at 30 °C (1:10, w/v ratio) with magnetic stirring for 4 h and resting for 44 h. The sediment was washed five times with distilled water, and the pH was adjusted to 7.0 [20]. The resulting starch was washed three times with 96% ethanol, dried and milled at the conditions mentioned before.

A high purity starch (AS_{F0P0}) was obtained by AF defatting followed by starch extraction and subsequent alkaline deproteinization with NaOH solution. The extraction yield was calculated as the amount of obtained starch from 100 g of AF (dry basis) in each treatment [7].

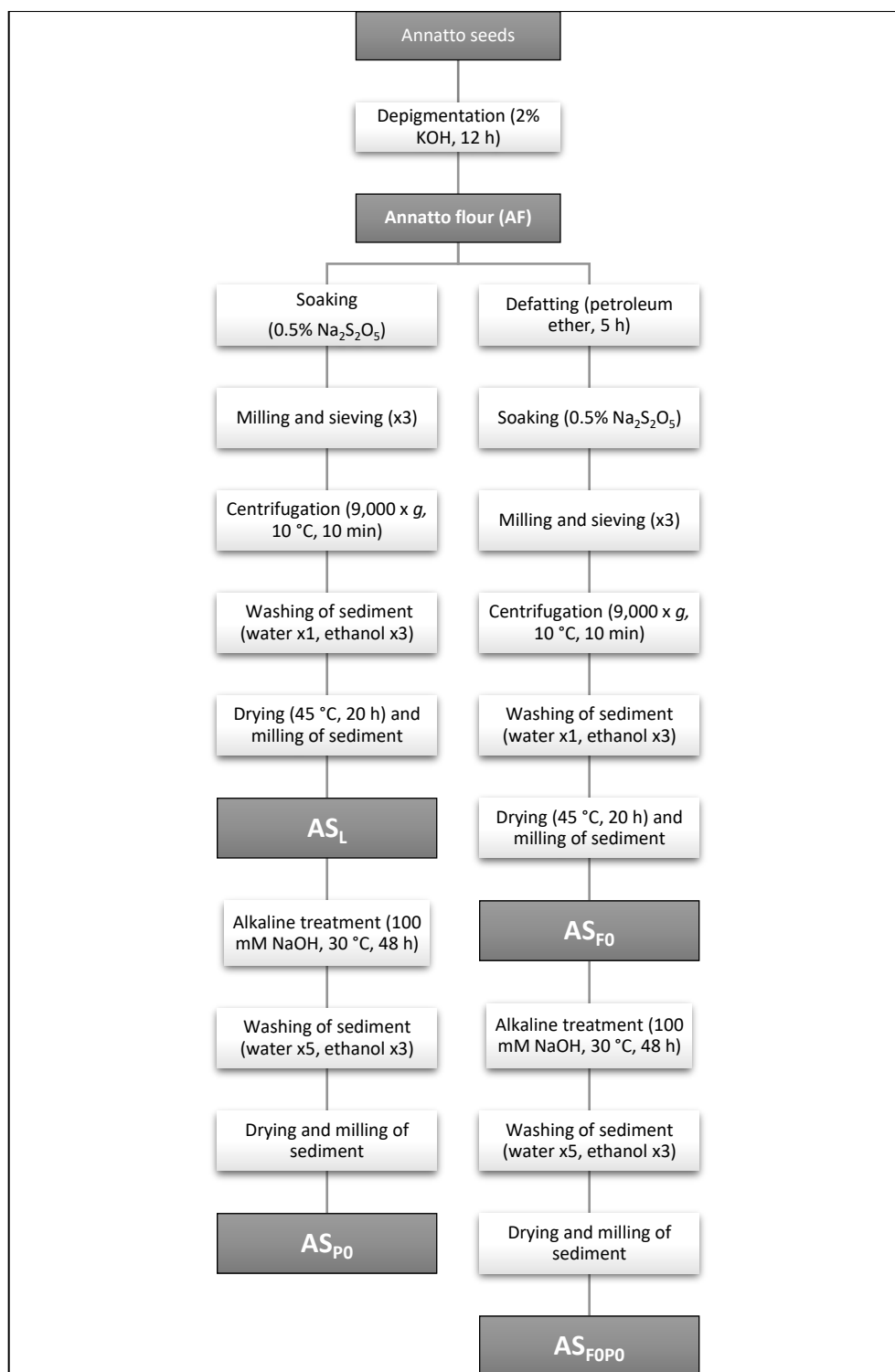


Fig. 4 The procedure employed to extract and purify annatto starch. AS_L (low purity); AS_{F0}: starch from defatted flour (medium purity); AS_{P0}: starch from deproteinized flour (medium purity); AS_{F0P0}: starch from defatted and deproteinized flour (high purity).

3.4.3. Proximal chemical composition

The moisture, protein, ash, lipid, and crude fiber contents in the annatto starches (AS) were determined by the AACC methods 44-15.02, 46-13, 08-17.01, 30-25.01, and 32-10.01, respectively [21]. Total carbohydrates were calculated by difference. The results of chemical composition were expressed on a dry basis (db).

The apparent amylose content was estimated by the dual-wavelength iodine binding technique [22]. AS sample (100 mg, db) was mixed with 1 mL of ethanol and 10 mL of NaOH (1 N) into a 100 mL volumetric flask. The suspension was stirred for 1 h, and after the volume was adjusted with distilled water. Then, 2 mL of the dilution were transferred to another 100 mL volumetric flask. Distilled water (50 mL) and phenolphthalein (2 drops) were added and neutralized with HCl solution (0.1 N). Iodine solution (2 mL, 2% (w/v)) was added, the volume was adjusted again, and let to rest for 30 min to develop color. The absorbance was recorded at 510 and 620 nm with a spectrophotometer (HP 8453, Hewlett Packard, NY, USA). The amylopectin content was estimated as (100 - amylose percentage) [23].

3.4.4. ζ -potential

The ζ -potential of AS was determined using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd, Worcestershire, UK) at room temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). Starch suspensions (0.1%, w/v) were prepared in deionized water at pH 7.0 before analysis [24].

3.4.5. Total phenolic content

Total phenolic content was measured using the Folin-Ciocalteu method (Hashemi & Jafarpour, 2021a; Milani et al., 2020). Briefly, 200 mg of AS were mixed with 2 mL of methanol for 3 h in the absence of light at room temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) (Garcia Silveira & Tapia-Blácido, 2018; Jouki, Khazaei, Rashidi-Alavijeh, et al.,

2021). The mixture was centrifuged at $2740 \times g$ for 10 min at 10°C and an aliquot of 250 μL was mixed in a test tube with 1250 μL of deionized water and 200 μL of Folin-Ciocalteu reagent. The mixture was allowed to stand for 3 min. After, 300 μL of Na_2CO_3 (15%, w/v) were added and the mixture was incubated for 30 min at room temperature ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) in the dark (Gómez-Maldonado et al., 2020). The absorbance was measured with a spectrophotometer (HP 8453, Hewlett Packard, NY, USA) at 760 nm, and the total phenolic content was expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per 100 g of starch (db).

3.4.6. Antioxidant activity by ABTS^{•+} assay

The ABTS^{•+} assay was employed to determine the antioxidant activity (Garcia Silveira & Tapia-Blácido, 2018). Previously, the ABTS^{•+} radical was prepared from the reaction of 5 mL of 7 mM ABTS with 88 μL of potassium persulfate solution (140 mM). The solution was stored for 16 h at room temperature ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) in the absence of light. After, ethyl alcohol was added to 1 mL of the solution until an absorbance value of 0.70 ± 0.05 at 734 nm was reached. AS samples (200 mg) were mixed with 2 mL of methanol for 3 h in the absence of light at room temperature ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) (Garcia Silveira & Tapia-Blácido, 2018). The mixture was centrifuged at $2740 \times g$ for 10 min at 10°C . An aliquot of 30 μL of the methanolic extract was mixed with 3 μL of ABTS^{•+} radical, and after 6 min, the absorbance was taken at 734 nm using a spectrophotometer. The antioxidant activity was expressed as μg of Trolox equivalents (TE)/g of starch (db) employing a Trolox standard curve.

3.4.7. Antioxidant activity by DPPH[•] assay

For the DPPH[•] assay (Hashemi & Jafarpour, 2020b; Maniglia & Tapia-Blácido, 2016), 200 mg of AS powder and 2 mL of methanol were mixed for 3 h in the absence of light at room temperature ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) (Garcia Silveira & Tapia-Blácido, 2018). The mixture was centrifuged at $2740 \times g$ for 10 min at 10°C . The supernatant (500 μL) was mixed with 2 mL of methanolic DPPH[•] solution (0.06

mmol/L) and incubated for 30 min at room temperature in the dark. The absorbance of the remaining DPPH[•] was measured on a spectrophotometer at 517 nm (Hashemi & Jafarpour, 2020a, 2021b). The antioxidant activity was expressed as µg of Trolox equivalents (TE)/g of starch employing a Trolox standard curve.

3.4.8. Scanning electron microscopy (SEM)

The morphology of the AS variations was observed by SEM. A sample of each AS powder was placed directly on the surface of aluminum stubs with carbon adhesive tape and coated with gold for 5 min at 1.5 KV, 5-6 mA in a JFC 1100 vacuum sputter coater (JEOL, Tokyo, Japan). Micrographs were obtained using a scanning electron microscope (JSM-6360, JEOL, Tokyo, Japan) under an accelerating voltage of 13 kV. Magnifications at 250, 1000, and 2000× were used (Jouki, Khazaei, Rezaei, et al., 2021).

3.4.9. Particle size distribution

The particle size distribution and Sauter mean diameter ($D_{3,2}$) of the samples were determined on a Mastersizer 3000 laser diffraction particle size analyzer (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK), equipped with a Hydro 2000 module. The samples were analyzed by a wet method, by suspending starch in distilled water, and using refractive indexes of 1.52 and 1.33, respectively (Yang et al., 2019). The polydispersity index (span) and $D_{3,2}$ values were calculated using Equations 1 and 2.

$$D_{3,2} = \sum_{i=1}^k n_i \cdot D_i^3 / \sum_{i=1}^k n_i \cdot D_i^2 \quad (1)$$

$$span = (d_{90} - d_{10}) / d_{50} \quad (2)$$

where D_i is the mean diameter of the starch granules; n_i is the number of starch granules; and d_{10} , d_{50} , and d_{90} are the diameters at 10, 50, and 90% of cumulative volume, respectively.

3.4.10. Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy

The spectra of the samples were obtained on an infrared spectrometer (Cary 630, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with an attenuated total reflectance accessory. Dried samples (~0.01 g) were placed in contact with the crystal diamond universal sampling accessory. Measurements were obtained over the range of 4000-400 cm^{-1} at a resolution of 2 cm^{-1} . Thirty-two scans per sample were integrated to obtain the mean values of the spectrum (Sukhija et al., 2016).

3.4.11. X-ray diffraction (XRD)

X-ray diffraction patterns of the samples were performed with a diffractometer (Ultima IV X-ray, Rigaku, Tokyo, Japan) (Londoño-Restrepo et al., 2014). Samples were carried out with filter radiation of Cu-K α ($\lambda=1.542 \text{ \AA}$), current of 30 mA, a voltage of 40 kV. The samples were analyzed over a 2θ scan region from 4 to 50° with a step interval of 0.02° (0.5°/min). The relative crystallinity of the samples was calculated using the Jade PRO software (version 7.2, Livermore, CA, USA).

3.4.12. Gelatinized starch dispersions rheology

AS dispersions (5% w/w) were heated at 90 °C with magnetic stirring for 20 min and left to cool down to 25 °C for 15 min for obtaining gelatinized AS dispersions (GASD) (Zapata-Luna et al., 2021). About 3.8 mL of GASD sample was loaded into the parallel plate geometry (PP50-2, serrated top plate to avoid sample slippage, 50 mm diameter) of a Physica MCR 300 rheometer (Physica Messtechnik GmbH, Stuttgart, Germany). A gap of 0.5 mm between plates was used as some AS granules exhibited sizes of up to about 130 μm (see Results sub-section - “Particle size distribution”), and for allowing for granules swelling upon gelatinization. Samples were allowed to relax for 5 min after loading for structure recovery. Flow curves were determined by varying the shear rate from

0.01 to 1000 s⁻¹. The obtained data were described using the following Herschel-Bulkley model:

$$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n \quad (3)$$

Where τ is shear stress (Pa), τ_0 is the yield stress (Pa), K is consistency coefficient (Pa s ^{n}), $\dot{\gamma}$ is the shear rate (s⁻¹), and n is the flow behavior index (dimensionless). The viscoelastic properties were determined under oscillatory shear conditions. Initially, the frequency sweeps were carried out in the range 0.01-10 Hz at 0.1% strain for determining the linear viscoelastic region (LVR) of the GASD. Then strain sweeps were carried out in the range from 0.01 to 100% in the LVR range (1 Hz). The storage (G') and loss (G'') moduli were obtained with the US200/32 V2.50 software. All the experiments were carried out at 25 °C, and temperature maintenance was achieved with the Physica TEK 150PA Peltier system.

3.4.13. GASD optical microscopy

GASD were stained with iodine solution (0.1 N) and were observed using an optical microscope (Olympus BX45, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan). Micrographs were captured with a digital camera (Olympus C3030, Olympus America Inc., Center Valley, PA, USA). Representative optical micrographs at 40× are presented for illustration purposes.

3.4.14. Swelling power and solubility index

The swelling power (SP) and solubility index (SI) values were determined at 60, 70, 80, and 90 °C, in accordance with Wu et al. (Wu et al., 2019).

3.4.15. Water and oil absorption capacities

The water absorption (WAC) and oil absorption (OAC) capacities were determined according to Souza de Castro et al. (de Castro et al., 2019). The WAC and OAC values were expressed as g of water or oil absorbed per g of starch.

3.4.16. *In vitro* digestibility

The *in vitro* digestion of the raw AS starch purified variations was carried out according to the method of Englyst et al. with slight modifications (Englyst et al., 1992). Firstly, an enzyme solution was prepared by suspending 1.5 g of pancreatin in 10 mL of 0.02 M sodium acetate buffer (pH 5.5) by magnetic stirring for 30 min. The suspension was centrifuged at $1500 \times g$ for 10 min, and the supernatant (8 mL) was mixed with 0.4 mL of amyloglucosidase (≥ 260 U/mL) and 5 mg of invertase (Polesi et al., 2018). Dried AS starches (250 mg) were suspended in 20 mL of 0.02 M sodium acetate buffer at pH 5.5. After that, the samples (temperature = 37°C) were mixed with 5 mL of enzyme solution at 1 min intervals between each sample. Aliquots (0.5 mL) were taken at 20 and 120 min after starting hydrolysis and mixed with 4 mL of absolute ethanol. Then, samples were centrifuged at $3000 \times g$ for 5 min, and the glucose content was quantified by glucose oxidase-peroxidase reagent. Starch fractions were classified according to their hydrolysis rate like rapidly digestible starch (RDS), slowly digestible starch (SDS), and resistant starch (RS) using the following equations:

$$RDS (\%) = G_{20} \times 0.9 \quad (4)$$

$$SDS (\%) = (G_{120} - G_{20}) \times 0.9 \quad (5)$$

$$RS (\%) = TS - (RDS + SDS) \quad (6)$$

where TS is the total starch, while G_{20} and G_{120} are the glucose released at 20 and 120 min, respectively.

3.4.17. Statistical analysis

All measurements were done by triplicate, and data were presented as the means $\pm$ standard deviation. Data were processed using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's means comparison analysis with a significance level of $p < 0.05$. Pearson's correlation coefficients were calculated to identify trends

between total phenolic content and antioxidant activity. Data analysis was carried out using the SPSS software (version 26.0.0.0, Chicago, IL, USA).

3.5. Results and discussion

3.5.1. Yield and chemical composition

Table 3 presents the results of the proximal chemical composition of the AS variations. AS_{F0P0} presented the highest carbohydrate content (85.15±0.04%), which could be attributed to the reduction of lipids and proteins (Garcia Silveira & Tapia-Blácido, 2018). However, this sample presented the lowest extraction yield (16.15±1.62%).

Table 3. Proximal chemical composition, yield, and ζ -potential of annatto starches (AS) variations.

	Annatto starch			
	AS _L	AS _{F0}	AS _{P0}	AS _{F0P0}
Moisture* (%)	8.63 ± 0.01 ^c	9.83 ± 0.16 ^b	11.45 ± 0.13 ^a	11.26 ± 0.01 ^a
Ash (%)	2.49 ± 0.01 ^a	2.35 ± 0.03 ^a	2.55 ± 0.08 ^a	2.08 ± 0.05 ^b
Lipid (%)	1.02 ± 0.04 ^a	0.28 ± 0.04 ^b	1.01 ± 0.01 ^a	0.15 ± 0.06 ^b
Protein (%)	7.51 ± 0.07 ^a	7.52 ± 0.36 ^a	5.81 ± 0.01 ^b	4.36 ± 0.03 ^c
Fiber (%)	7.09 ± 0.67 ^b	6.49 ± 0.74 ^b	9.21 ± 0.19 ^a	8.25 ± 0.04 ^{ab}
Carbohydrates (%)	81.9 ± 0.63 ^{bc}	83.37 ± 0.37 ^b	81.43 ± 0.11 ^c	85.15 ± 0.04 ^a
Apparent amylose (%)	20.76 ± 0.66 ^c	28.56 ± 0.89 ^a	25.16 ± 0.86 ^b	18.94 ± 1.04 ^d
Amylopectin (%)	79.24 ± 0.67 ^b	71.44 ± 0.89 ^d	74.84 ± 0.86 ^c	81.06 ± 1.04 ^a
Yield (%)	22.55 ± 1.68 ^a	20.05 ± 0.52 ^{ab}	17.46 ± 0.96 ^{bc}	16.15 ± 1.62 ^d
ζ -potential	-23.80 ± 0.99 ^a	-20.30 ± 0.42 ^b	-18.30 ± 0.01 ^b	-24.10 ± 0.85 ^a

Data are means ± standard deviations. Different letters in the same row indicate a significant difference between treatments ($p < 0.05$). AS_L (low purity); AS_{F0}: starch from defatted flour (medium purity); AS_{P0}: starch from deproteinized flour (medium purity); AS_{F0P0}: starch from defatted and deproteinized flour (high purity)

The lipid content was significantly diminished by defatting treatment in AS_{F0} and AS_{F0P0} starches. The lipid content of all AS was lower (0.15-1.02%) than that reported (3.4-6.9%) by García-Silveira et al. (Garcia Silveira & Tapia-Blácido, 2018). Starch lipids can be classified as internal and external, but their removal efficiency may be related to the solvent used and plant source (Debet & Gidley, 2006; Morrison, 1988). In general, petroleum ether (non-polar solvent) is usually used to extract free lipids and other non-polar compounds from cereals flour (Bahrami et al., 2014; Morrison, 1988).

Similarly, AS_{P0} and AS_{F0P0} starches presented lower protein content than AS_L and AS_{F0}. Protein contents of 14.7-17.4% have been reported for annatto starches extracted by water, acid, and alkaline methods (Garcia Silveira & Tapia-Blácido, 2018). Decreased protein content in alkali-treated starches has been associated with the solubilization of inner and surface starch granule proteins (Cardoso et al., 2007; S. Wang et al., 2014).

Besides, the amylose and amylopectin contents were modified by the applied purification treatments. The low percentage of amylose in AS_L could be due to an underestimation caused by the high lipid content, while the amylose content of defatted AS_{F0} was significantly higher than for non-defatted AS_L, and AS_{P0}, may be due to a breakdown of the amylose-lipid complexes (Morrison, 1988). In contrast, protein removal decreased the amylose content, especially in AS_{F0P0}, probably by an amylose leaching caused by the alkaline solution (S. Wang & Copeland, 2012). In general, starches can be classified as low (or waxy) (8 - 22%), intermediate (23 - 27%), or high amylose content (28 - 32%). Considering this type of classification, AS variations are of intermediate amylose content. Within this category, other starches from various plant sources have been reported, such as some varieties of wheat, potato, corn, and rice (Bhat & Riar, 2016; J. Y. Li & Yeh, 2001; Martínez & Cuevas, 1989).

3.5.2. ζ -potential

The ζ -potential values of the AS variations are shown in Table 3. This parameter is helpful to study the electric interactions of components in foods. The ζ -potential reflects the potential between the liquid layer immediately next to the surface (firmly bound to the particle) and the continuous phase (Cano-Sarmiento et al., 2018).

All the AS variations were negatively charged, with values ranging from -18.30 to -24.10 mV. Similar values of ζ -potential have been reported for taro starch granules (-20.3 ± 0.3 mV), melloco seed starch (about -24 mV), and lbes bean starch (-26.26 ± 2.30 mV) (Hoyos-Leyva et al., 2018; Pacheco et al., 2019; Zapata-Luna et al., 2021). In emulsions, it is reported that a ζ -potential between -11 to -20 mV is not enough to prevent particle agglomerations induced by Van der Waals forces. Values greater than -30 mV are needed to produce suitable electrostatic repulsions and thus ensure the stability of the dispersed particles (Feng et al., 2020; Hoyos-Leyva et al., 2018).

In general, it is assumed that the negative ζ -potential value of starch is due to the carboxyl groups present on their surface, and the presence of lipids and proteins could modify the ζ -potential value (Marsh & Waight, 1982). The removal of lipids from AS caused a significant decrease in ζ -potential. The lipid composition of annatto seeds is made up of palmitic, linoleic, and oleic acids (Prabhakara Rao et al., 2015). These fatty acids are hydrophobic molecules that can contribute with negative carboxyl groups ($-\text{COO}^-$) to annatto starch granules in their free form (Marsh & Waight, 1982). The lipid removal could cause a reduction in the negative charges, inducing a significant diminution in the ζ -potential value of AS_{F0} (Table 3). On the other hand, annatto seed residues are characterized by the presence of aromatic, non-polar and basic amino acids as phenylalanine + tyrosine, leucine, and lysine, respectively (Valério et al., 2015). Lysine has an amine group ($-\text{NH}_3^+$) in its side chain with a positive charge at pH 7.0 that could influence the ζ -potential of annatto starch. The deproteinization of AS_{F0P0} could have induced an increase

in the net negative charge of starch due to a reduction of the positive charges. Wongsagonsup et al. (Wongsagonsup et al., 2005) reported that the ζ -potential of rice flour changed depending on the pH and the protein content, although the exchange rate was variable. Under acidic conditions (pH 2), the ζ -potential became more positive at higher protein contents, while in an alkaline medium (pH 12), ζ -values were more negative with increasing protein percentage. On the other hand, at pH 7, there was a non-significant difference in ζ -potential. Some other factors, such as phosphate groups and amylose content, have been reported to modify the ζ -potential of starches (Utrilla-Coello et al., 2014; Wongsagonsup et al., 2005). Bixin and norbixin carotenoids could influence the ζ -potential of annatto starches, and this is a topic worth investigating in the future.

3.5.3. Total phenolic content and antioxidant activity

Table 4 presents the total phenolic content (TPC) and antioxidant activity of the AS variations by ABTS^{•+} and DPPH[•] assays. The TPC varied from 6.70 ± 0.23 mg of GAE/100 g for AS_L (lowest purity) to 3.16 ± 0.44 mg of GAE/100 g for AS_{F0P0} (highest purity). Unpurified isolated starches from annatto seed residues have been reported to have phenolic compounds contents of 1306 - 1454 mg of GAE/100 g, which may be due to their higher protein and fiber content (Garcia Silveira & Tapia-Blácido, 2018). Other starches isolated from unconventional sources present quite variable TPC, including 8.2 ± 0.1 mg of GAE/100 g for babassu starch and 6062.6 ± 14 mg of GAE/100 g for pitomba endocarp starch (de Castro et al., 2019; Maniglia & Tapia-Blácido, 2016). Hypolaetin (pentahydroxyflavone) is the main phenolic compound reported in annatto seeds, followed by the caffeoyl acid derivative (Chisté et al., 2011). Generally, phenolic acids and flavonoids are present as soluble conjugates (glycosides) and insoluble forms covalently linked to components such as structural proteins (Acosta-Estrada et al., 2014). Also, phenolic compounds interact with starch through non-covalent bonds, such as hydrogen bonds, hydrophilic interactions, and ionic and electrostatic interactions (F. Zhu, 2015). Statistical analysis showed that TPC in annatto starches decreased when soluble proteins were removed. This decrease

could be due to the alkaline deproteinization treatment since the ester bonds that bind phenolic compounds with proteins and carbohydrates are broken (Acosta-Estrada et al., 2014).

Table 4 Total phenolic content and antioxidant activity of annatto starch (AS) variations.

	Total phenolic content (mg of GAE/100 g of starch)	ABTS ^{•+} assay (μ g of TE/g of starch)	DPPH [•] assay (μ g of TE/g of starch)
AS _L	6.70 $\pm$ 0.23 ^a	1.14 $\pm$ 0.13 ^a	0.47 $\pm$ 0.03 ^a
AS _{F0}	6.71 $\pm$ 0.63 ^a	1.07 $\pm$ 0.08 ^a	0.36 $\pm$ 0.01 ^b
AS _{P0}	5.54 $\pm$ 0.22 ^b	0.52 $\pm$ 0.09 ^b	0.35 $\pm$ 0.02 ^b
AS _{F0P0}	3.16 $\pm$ 0.44 ^c	0.62 $\pm$ 0.04 ^b	0.09 $\pm$ 0.01 ^c

Data are means $\pm$ standard deviations. Different letters in the same column indicate a significant difference between treatments ($p < 0.05$). AS_L (low purity); AS_{F0}: starch from defatted flour (medium purity); AS_{P0}: starch from deproteinized flour (medium purity); AS_{F0P0}: starch from defatted and deproteinized flour (high purity)

The antioxidant activity also decreased significantly in AS subjected to alkaline treatment to remove proteins. In the antioxidant activity assay by the ABTS^{•+} radical, AS_L and AS_{F0} starches presented the highest radical scavenging activity (Table 4). These results were lower than those reported for unpurified annatto starchy materials (1.9-3.6 mg of TE/g of the sample), which also had a high content of phenolic compounds and carotenoids (Garcia Silveira & Tapia-Blácido, 2018). Again, the process of removing soluble proteins led to a significantly decreased scavenging activity in AS_{P0} and AS_{F0P0} starches.

The antioxidant activity assay by DPPH[•] radical also showed a significant decrease in antioxidant activity of the AS variations, with values ranging from 0.47 $\pm$ 0.03 to 0.09 $\pm$ 0.01 μ g of TE/g of starch. Therefore, AS_L was the treatment that presented the highest donor capacity of hydrogen atoms or electrons to reduce the DPPH[•] radical (Viuda-Martos et al., 2012). In the present study, there is a positive correlation between the content of phenolic compounds and the

antioxidant activity by ABTS^{••} ($r=0.667$, $p<0.01$) and DPPH[•] ($r=0.898$, $p<0.01$) assays (Table 5), suggesting that the antioxidant activity of AS variations was influenced by the content of total phenolic compounds, which agrees with the literature (Abdul Aziz et al., 2012; Gómez-Maldonado et al., 2020).

Table 5 Pearson correlation coefficients between total phenolic content and antioxidant activity of the annatto starch variations.

Parameter	CFT	ABTS
ABTS	0.667**	
DPPH	0.898**	0.546*

TPC: total phenolic content; ABTS: Antioxidant activity by ABTS^{••} assay; DPPH: Antioxidant activity by DPPH[•] assay. * $p\leq0.05$; ** $p\leq0.01$.

3.5.4. Morphology of starch granules

SEM micrographs of the AS variations are shown in Fig. 5. In all cases, the granules presented a heterogeneous morphology characterized by an array of oval (predominant), spherical, triangular, and irregular shapes. These morphologies agree with those reported previously for annatto starch granules (Garcia Silveira & Tapia-Blácido, 2018; E. K. Silva et al., 2018; Zabot et al., 2019). The AS_L granules surface was mostly smooth, with rounded edges, without pores, cracks, or holes (Fig. 5.A). However, the purified variations tended to show increasingly irregular shapes, defects (pores, cracks, and holes), and debris vestiges (Fig. 5. B, C, D).

In particular, the surging of these irregularities was intensified in the deproteinization treatment (AA_{P0}; Fig. 5.C) and the combined defatting-deproteinization treatment (AA_{F0P0}; Fig. 5.D3). The irregular shapes increase could be due to granule coalescence into single structures, as has been reported by alkaline treatment of pea (Cardoso et al., 2007) and wheat (S. Wang et al., 2014) starches that induced a partial gelatinization and adhesion of starch

granules. Debris formation can be attributed to AS granules disintegration due to purification treatment (Punia et al., 2020).

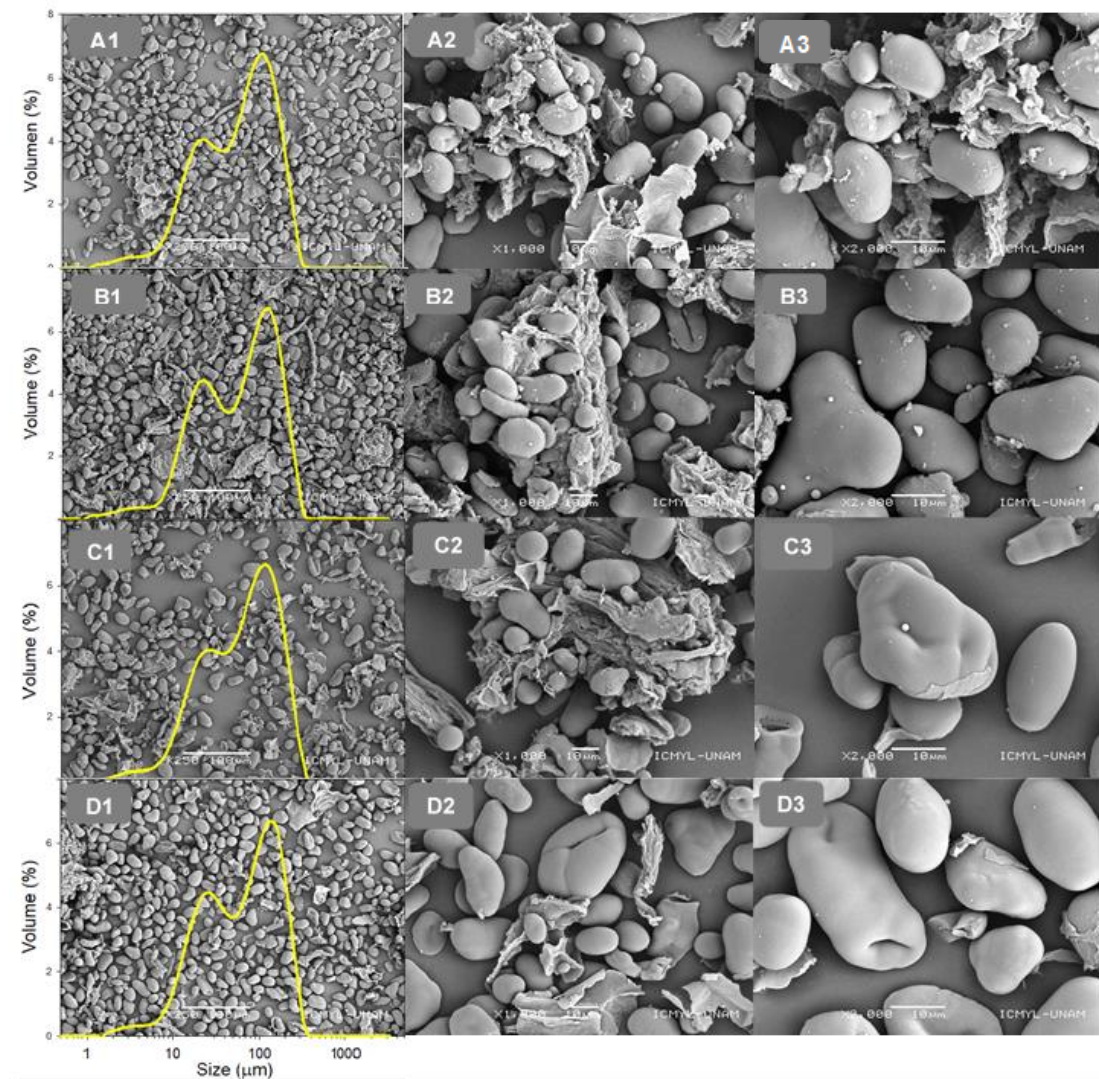


Fig. 5 SEM micrographs and particle size distribution of annatto starch (AS) variations: (A) AS_L (low purity); (B) AS_{F0} : starch from defatted flour (medium purity); (C) AS_{P0} : starch from deproteinized flour (medium purity); (D) AS_{F0P0} : starch from defatted and deproteinized flour (high purity). Magnifications: (1) 250 $\times$, (2) 1000 $\times$, (3) 2000 $\times$

In all treatments, non-starchy materials were present, such as membrane debris, elongated woody-looking forms, irregular spongy bodies, and parenchyma

remains. The starch granules could adhere to these impurities and form agglomerates that changed slightly in abundance according to the AS purity degree. AS_L presented the highest agglomerates, while the number of agglomerates decreased in AS_{F0} , AS_{P0} , and AS_{F0P0} . Therefore, the defatting and protein elimination processes could have eliminated part of the remaining lipids and proteins that favored the agglomeration of the starch granules to non-starchy materials.

3.5.5. Particle size distribution

Table 6 shows that $D_{3,2}$ increased when soluble proteins were removed from the AS. A similar trend was found for wheat starch treated with 0.25% NaOH, which showed a significant increase in the average granule, attributed to a partial gelatinization of the starch granules (S. Wang et al., 2014).

The AS variations showed a bimodal particle size distribution pattern with a central peak between 118.8-134.9 μm and a smaller peak between 22.6-25.7 μm (Fig. 5). Zabet et al. (Zabet et al., 2019) reported a bimodal particle size distribution pattern for AS with the central peak near 10 μm and a smaller peak near 100 μm , while García-Silveira et al. (García-Silveira & Tapia-Blácido, 2018) reported a polymodal distribution in AS extracted with an alkaline process. The disagreements in the distribution pattern reported by these authors and by us could be due to the intensity of the treatments used in each case. In our case, the purification treatments, while being capable of depleting the lipid/protein content, did not cause extensive disintegration of the AS granules. Starch granules modification by the alkaline deproteinization was such that it promoted the granules coalescence, leading to increased particle sizes. These results are backed up by the cumulative volumes d_{10} , d_{50} , and d_{90} and the rather high span (2.57-2.77) values (Table 6), which tended to increase significantly in the following relative order: $AS_L < AS_{F0} < AS_{P0} < AS_{F0P0}$.

Table 6 Sauter mean diameter ($D_{3,2}$) and the granule diameters at 10% (d_{10}), 50% (d_{50}), and 90% (d_{90}) cumulative volumes, of annatto starch (AS) variations.

	d_{10} (μm)	d_{50} (μm)	d_{90} (μm)	$D_{3,2}$ (μm)	Span
AS _L	13.07 $\pm$ 0.18 ^c	63.33 $\pm$ 1.31 ^{ab}	178.07 $\pm$ 1.83 ^d	26.80 $\pm$ 0.48 ^b	2.57 $\pm$ 0.17 ^b
AS _{F0}	13.20 $\pm$ 0.39 ^c	63.05 $\pm$ 4.87 ^b	183.23 $\pm$ 3.90 ^c	26.35 $\pm$ 1.18 ^b	2.71 $\pm$ 0.16 ^{ab}
AS _{P0}	14.30 $\pm$ 0.17 ^b	65.73 $\pm$ 1.38 ^{ab}	190.70 $\pm$ 6.75 ^b	30.43 $\pm$ 0.31 ^a	2.69 $\pm$ 0.15 ^{ab}
AS _{F0P0}	14.57 $\pm$ 0.14 ^a	66.21 $\pm$ 1.99 ^a	197.93 $\pm$ 5.92 ^a	31.09 $\pm$ 0.38 ^a	2.77 $\pm$ 0.16 ^a

Data are means $\pm$ standard deviations. Different letters in the same column indicate a significant difference between treatments ($p < 0.05$). AS_L (low purity); AS_{F0}: starch from defatted flour (medium purity); AS_{P0}: starch from deproteinized flour (medium purity); AS_{F0P0}: starch from defatted and deproteinized flour (high purity).

3.5.6. FTIR spectroscopy

FTIR spectra (Fig. 6a) revealed the short-range order of the AS variations. The absorption peaks showed a similar structure to those from non-conventional native starches, such as inhambu and cassava starches (Monroy et al., 2018; G. M. de S. Silva et al., 2020). Regardless of the degree of purification of the AS, the four studied samples had remarkably similar IR spectra and intensity. All FTIR spectra exhibited a broader peak at 3273 cm^{-1} , which can be associated with the O-H bond stretching of amylose and amylopectin chains (Pelissari et al., 2012). The peak near 2100 cm^{-1} can be attributed to free water content, suggesting that water molecules play a structural role in the starch (Dankar et al., 2018). A band at 1635 cm^{-1} can be assigned to amide-I stretching vibrations, and the doublet peak at 1412-1334 cm^{-1} can be attributed to the inflection of N-H bonds and the stretching of C-N bonds (W. Li et al., 2006; Pelissari et al., 2012). Therefore, these peaks corroborate the presence of protein molecules, even in the AS variations that underwent deproteinization treatment.

Other signals were present at 2925 cm^{-1} and 1412 cm^{-1} , which could be attributed due to the asymmetrical stretching and angular deformation of the C-H bond of the glucose ring (Dankar et al., 2018).

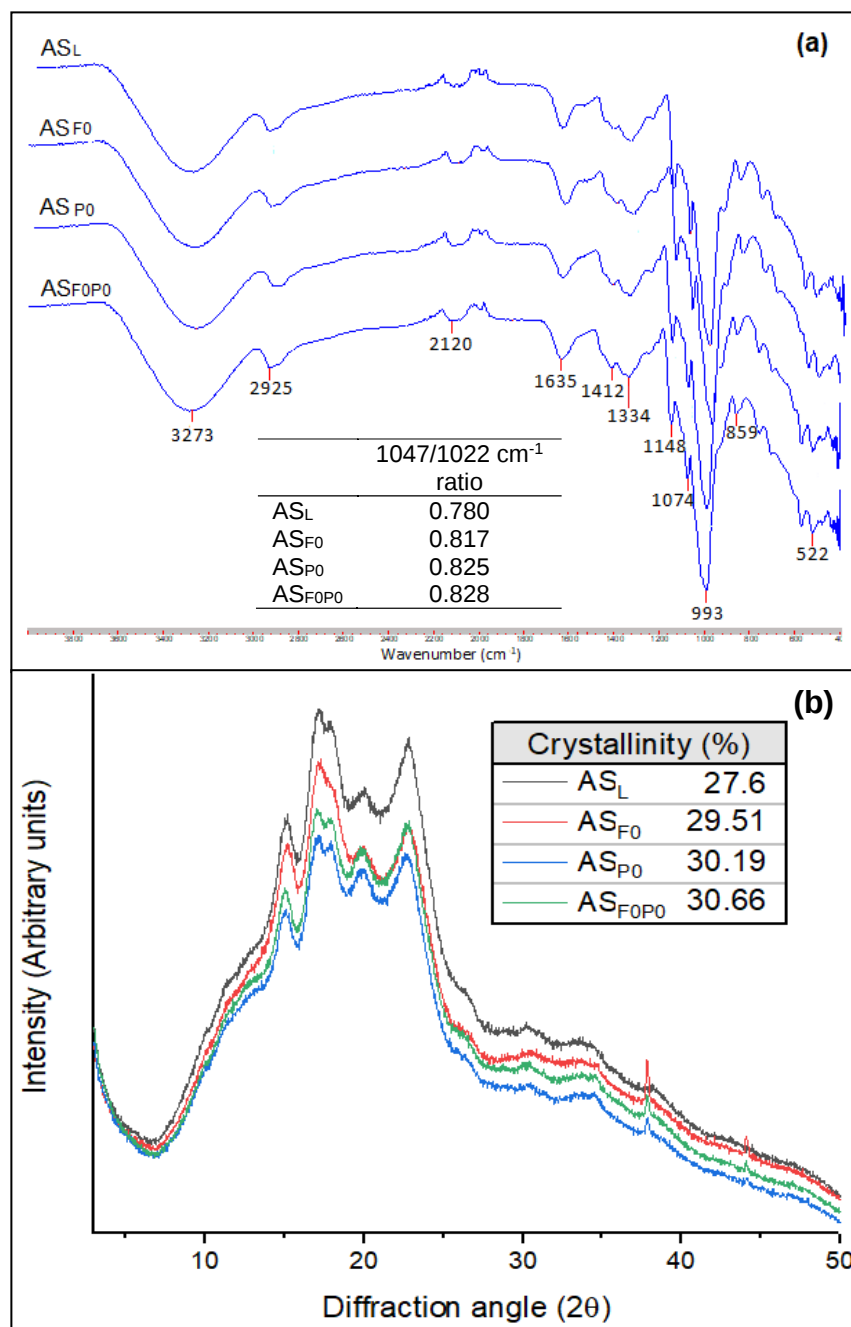


Fig. 6 (a) FTIR spectra and (b) XRD patterns of annatto starch (AS) variations. AS_L (low purity); AS_{F0}: starch from defatted flour (medium purity); AS_{P0}: starch from deproteinized flour (medium purity); AS_{F0P0}: starch from defatted and deproteinized flour (high purity).

The fingerprint region stood out two peaks at 1148 cm⁻¹ and 1074 cm⁻¹ corresponding to the C-C and C-O-H flections of the glycosidic bond of starch,

while the intense peak at 993 cm^{-1} corresponds to the crystalline region of the starch (Lu et al., 2019; Pelissari et al., 2012; S. Wang et al., 2014). The remarkable similarity in peaks and signal intensity between the treatments suggests that lipid and protein removal did not modify the chemical structure of AS.

The $1047/1022\text{ cm}^{-1}$ intensity ratio was used to estimate the ratio of amorphous to crystalline domains (Fig. 6a) (Zapata-Luna et al., 2021). The bands at 1047 cm^{-1} and 1022 cm^{-1} are associated with crystalline and amorphous fractions (Lu et al., 2019). The $1047/1022\text{ cm}^{-1}$ intensity ratio of the AS increased when the soluble proteins were removed, suggesting a slight increase in the proportion of the ordered forms.

3.5.7. XRD analysis

The semicrystalline structure of starch granules presents a characteristic diffraction pattern that allows its identification. Starches can be classified as A-type (generally present in cereals), B-type (from tubers), C-type (from some seeds and leguminous), and V-type (starches in complex with other agents like fatty acids and emulsifiers) (Srichuwong & Jane, 2007).

The AS diffractograms (Fig. 6b) presented high-intensity peaks at approximately 15.1 , 17 - 18 , 19.9 , and $22.7^\circ 2\theta$. This pattern corresponds to the typical A-type crystalline structure (Cheetham & Tao, 1998) and agrees with the diffraction pattern reported by Zabot et al. (Zabot et al., 2019) for annatto starch. The A-type starches are characterized by a compact structure presenting a central double helix inside the unit cell of double helices (Cheetham & Tao, 1998; Srichuwong & Jane, 2007).

Garcia-Silveira et al. (Garcia Silveira & Tapia-Blácido, 2018) reported a C-type (presenting both A- and B-type signals) for annatto starch. Nevertheless, the peak associated with B-type polymorphism ($6^\circ 2\theta$) was absent in this work. The defatting and alkaline deproteinization did not modify the diffraction patterns of

AS, while the morphology and amylose contents were different. Wang and Copeland (S. Wang & Copeland, 2012) reported amylose leaching in pea starches after soaking in 0.1 M NaOH solution. They attributed a modification of the internal structure that was physically observed as a depression in the center of the starch granule. In the same way, the alkaline deproteinization altered the structure of the granules. When starch granules undergo amylose leaching, the internal structure is modified, and a physical depression can be observed in the AS_{F0P0} granules (Fig. 5-D3). Also, the AS samples showed a slight increase in their semicrystalline percentage (Fig. 6b) when the native proteins were eliminated. This increase was consistent with the increase in the intensity ratio of 1047/1022 cm⁻¹ obtained in the FTIR analysis, indicating a more orderly structure.

3.5.8. Rheological measurements

All the gelatinized AS dispersion variations presented a non-Newtonian behavior, characterized by shear-thinning under the applied shear rate (Fig. 7a). A shear-thinning behavior is associated with an alignment of the biopolymer molecules with the field of shear changing its original conformation; also, biopolymer-biopolymer interactions are disrupted, reducing the force between the stream layers (Ding et al., 2021; Lobato-Calleros et al., 2014). The steady flow profiles were well described ($R^2 > 0.98$) by the Herschel-Bulkley model.

All the GASD required of the application of shear stress that exceeded the yield stress (τ_0) of the gelatinized dispersions for flow to commence, which was from higher to lower: AS_{F0P0} (5.51 ± 1.23 Pa) > AS_L (4.08 ± 0.92 Pa) > AS_{F0} (3.25 ± 1.43 Pa) > AS_{P0} (0.92 ± 0.36 Pa). τ_0 may be considered as a threshold critical value for the gelatinized dispersions to begin to deform. The same order was presented by K values varying as follows: AS_{F0P0} (13.71 ± 0.99) > AS_L (9.83 ± 1.20) > AS_{F0} (6.70 ± 0.67) > AS_{P0} (5.74 ± 0.24). The flow index varied from higher to lower values as follows: AS_{P0} (0.45 ± 0.01) > AS_{F0} (0.42 ± 0.02) > AS_{F0P0} (0.39 ± 0.01) > AS_L (0.36 ± 0.02).

The decrease in K values showed a lower resistance of AS gels to flow, while lower n values refer to a more pronounced pseudoplastic behavior ($n < 1$). The apparent viscosity (η) exhibited by the GASD as a function of $\dot{\gamma}$, was calculated with the following expression: $\eta = \tau_0 + K\dot{\gamma}^{n-1}$. The apparent viscosity at any shear rate value was higher for AS_{F0P0} followed by $AS_L > AS_{F0} > AS_{P0}$ variations. The differences in η could be associated with the purity degree of the GASD variations. When starch granules are gelatinized in water excess, they reach their maximum swelling degree and begin to break down, releasing amylose and amylopectin molecules.

However, structural granular residues, called "ghosts", also remain, which can also be associated with endogenous proteins and lipids (Debet & Gidley, 2007; Z. Li & Wei, 2020). Therefore, the content of proteins and lipids greatly influences the rheological behavior of gelatinized starches. The present results suggest that lipids and proteins provided rigidity to the gelatinized starch, increasing the viscosity of the AS_L matrix. Defatting and deproteinization induced a reduction in the flow resistance of AS_{F0} and AS_{P0} , which may be due to a breakdown of the protein-starch and lipid-starch bonds, resulting in a more fragile structure (Ding et al., 2021).

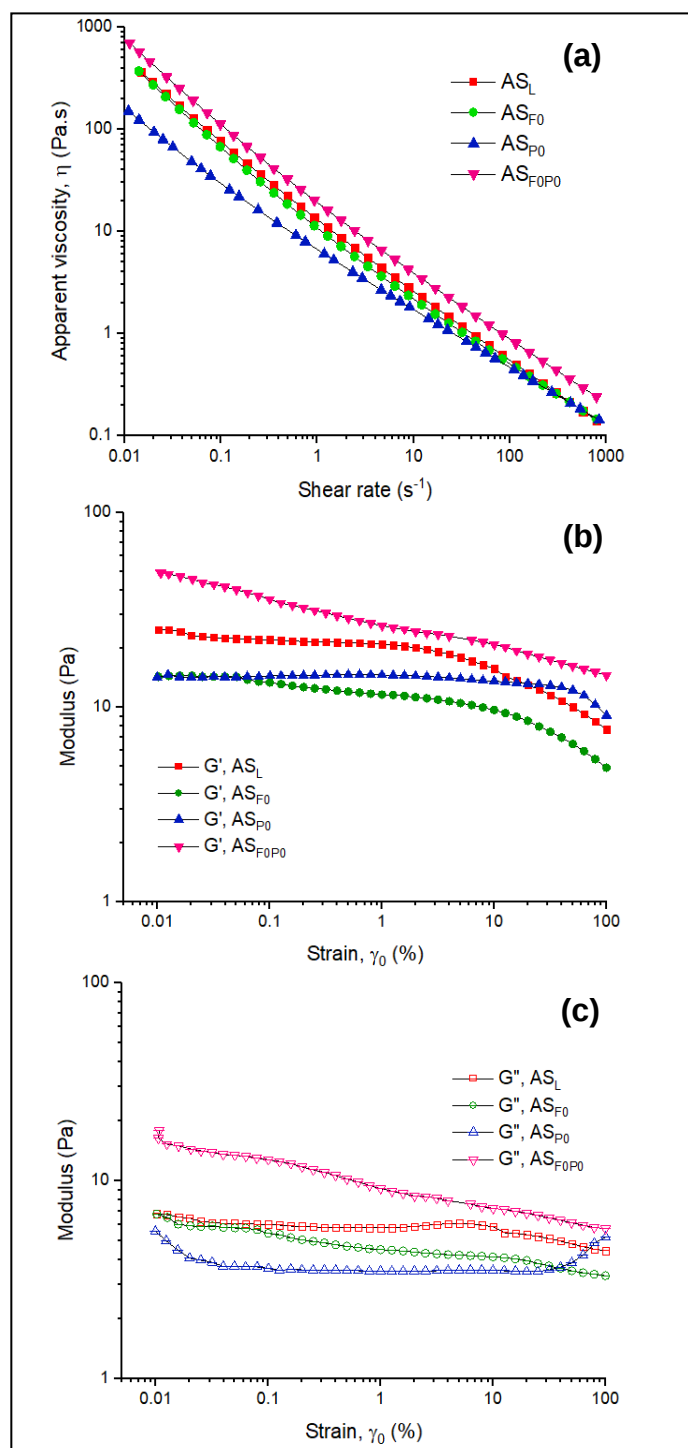


Fig. 7 Rheological properties of gelatinized AS dispersions (5% w/w) at 25°C: (a) Flow curves; (b) Storage (G') and (c) loss (G'') moduli depending on strain (%) obtained from oscillatory tests at 1 Hz. AS_L (low purity); AS_{F0} : starch from defatted flour (medium purity); AS_{P0} : starch from deproteinized flour (medium purity); AS_{F0P0} : starch from defatted and deproteinized flour (high purity).

However, the viscosity of the gel increased when starch was purified by combining defatting with deproteinization (AS_{F0P0}). This behavior can be explained by light microscopy observations (Fig. 8). The micrographs showed whole and more defined gelatinized granules in starch gels with higher lipid and protein content (AS_L , AS_{F0} , and AS_{P0}), in addition to presenting a more widely spaced distribution. In AS_{F0P0} , the optical micrographs showed the presence of broken, irregular, and leached starch granules, forming a more compact and homogeneous gel structure. This observation is consistent with the SEM micrographs (Fig. 5), where increasing granule damage was associated with intense starch purification.

Regarding the viscoelastic properties of GASD, Fig. 7b shows the storage modulus (G'), and Fig. 3c shows the loss modulus (G'') as a function of the strain. For all the GASD variations, G' was higher than G'' , indicating a predominant solid-like behavior. A similar behavior was observed for bean starch gels at a 5% (w/w) (Zapata-Luna et al., 2021). At percentages of strain less than 10%, both the G' and G'' moduli remained practically constant, indicating a nearly Newtonian behavior. In the linear viscoelastic zone (0.1% of strain), the G' value of AS_{F0P0} gel (35.87 Pa) was higher than for the AS_L , AS_{P0} , and AS_{F0} gels (22.07, 14.49, and 13.15 Pa, respectively) (Fig. 7b). The solid-like behavior of AS_{F0P0} gel was ~ 1.62 , ~ 2.47 , and ~ 2.72 times higher than AS_L , AS_{P0} , and AS_{F0} gels, respectively. This trend was similar at 10% of strain, where AS_{F0P0} (21.01 Pa) presented a higher value in G' than AS_L , AS_{P0} , and AS_{F0} gels (15.79, 13.62, and 9.68 Pa, respectively). At 100% strain, the G' values followed the order of AS_{F0P0} (14.60 Pa) > AS_{P0} (9.06 Pa) > AS_L (7.69 Pa) > AS_{F0} (4.89 Pa).

The drop in the G' modulus corresponds to a breakdown of the three-dimensional gel structure with an alignment of the polymeric chains in the direction of the flow field (Alvarez-Ramirez et al., 2019). When comparing the response of each of the treatments to the oscillatory stress test, it is observed that endogenous lipids and proteins play a role in the strength of the starch hydrogel.

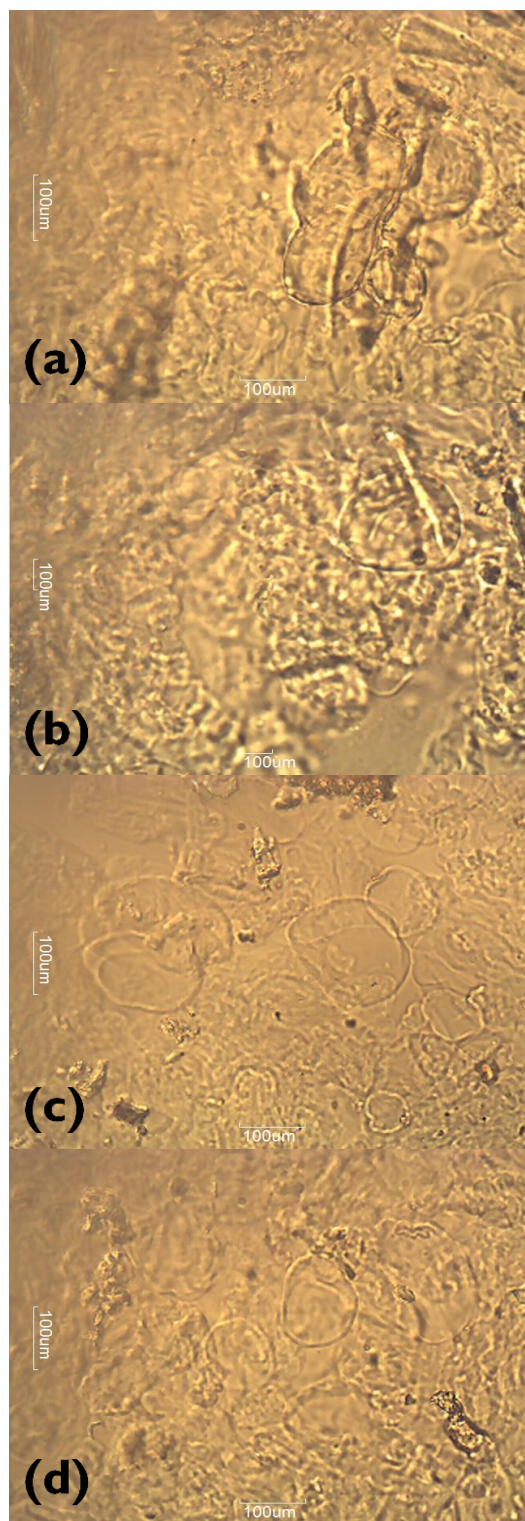


Fig. 8. Optical micrographs (40×) of gelatinized annatto starch dispersions (5% w/w). (a) AS_{F0P0} : starch from defatted and deproteinized flour (high purity); (b) AS_L (low purity); (c) AS_{F0} : starch from defatted flour (medium purity); (d) AS_{P0} : starch from deproteinized flour (medium purity)

At low strain percentages, AS_L presented higher values in modulus G' than AS_{F0} and AS_{P0}, corroborating that the presence of proteins increased the storage modulus of gelatinized starch (Han et al., 2002). Still, AS_{F0P0} presented higher G' values than the other treatments, according to the steady shear results (Fig. 7a). These results support the proposal that both lipids and proteins provide some structural rigidity to the gel, mainly at low percentages of strain (<10%). At the same time, starch purification (defatting plus deproteinization) increases the granule fragility leading to a release of polymeric compounds during gelatinization and therefore enhancing the solid-like behavior of the AS gel.

3.5.9. Functional properties

The swelling power (SP) and solubility index (SI) values provide information about the degree of interaction between the chains present in the crystalline and amorphous regions of the starch granule (S. Singh et al., 2010). Fig.9a shows that the SP depended on the purity degree of AS. Other authors have reported an enhanced SP in rice flours submitted to a protein removal (Ye et al., 2018). As expected, AS submitted to deproteinization treatment presented a higher SP due to ionization of the hydroxyl groups that negatively charge the starch molecules (Karim et al., 2008).

The change in the charges induces a repulsion inside the structure, increasing the water filtration and augmenting the swelling volume (Karim et al., 2008). The maximum SP was presented at 90 °C in the different AS (21.44-22.71 g water/g starch). Our studied starches presented similar SP to that reported for some Indian wheat varieties (20.2-24.9 g/g) (S. Singh et al., 2010). When starch granules are heated in water, water molecules associate with amylose and amylopectin fractions by hydrogen bonds developed within the hydroxyl groups (Karim et al., 2008). Therefore, to a higher degree of water association, starch swelling was increased.

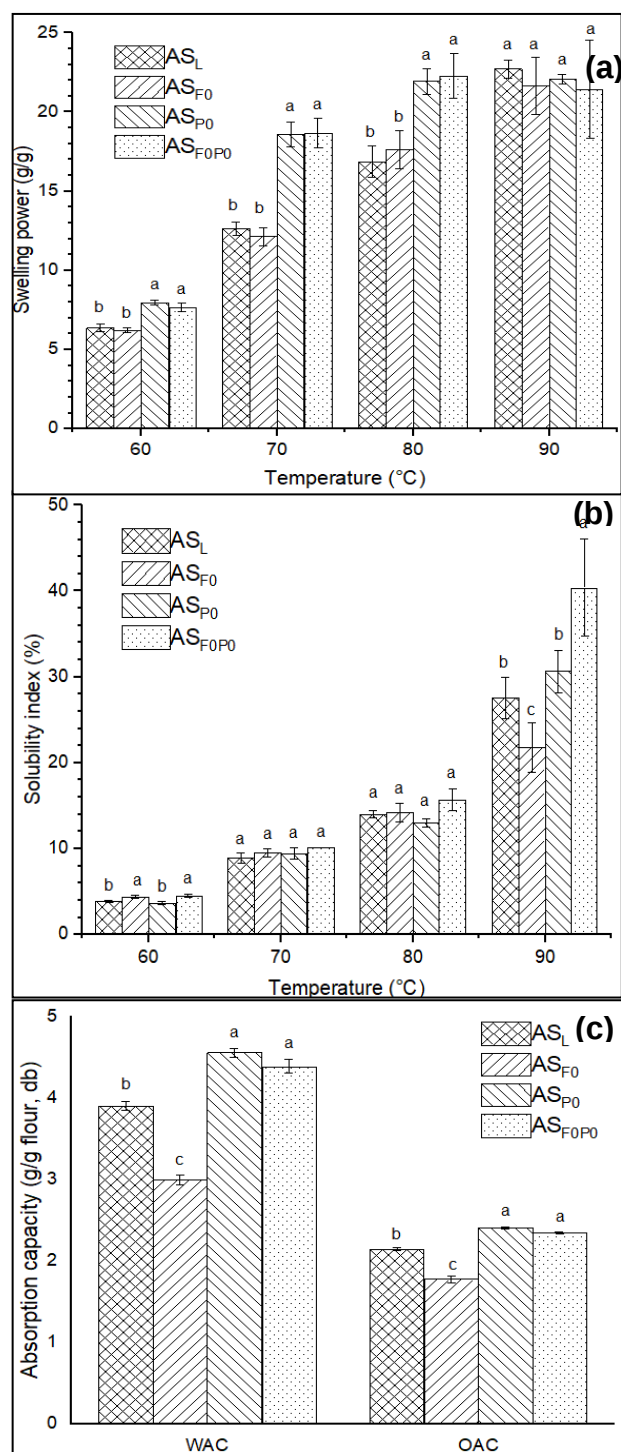


Fig.9. (a) Swelling power, (b) solubility index, and (c) water and oil absorption capacities (WAC and OAC) of annatto starch (AS) variations. Different letters on the same group mean significant differences ($p < 0.05$). AS_L (low purity); AS_{F0}: starch from defatted flour (medium purity); AS_{P0}: starch from deproteinized flour (medium purity); AS_{F0P0}: starch from defatted and deproteinized flour (high purity).

As in the SP, the SI increased throughout the entire temperature range independently of the purity degree, from 3.67% to 40.43% (Fig.9b). It has been reported that wheat and maize starches have solubilities of 20% and 18%, respectively, at 95°C (Takahashi & Seib, 1988). At the beginning of the heating, the granule structure begins to lose, and the amylose fraction starts to leach and dissolve in the aqueous medium with the rise of temperature (Z. Li & Wei, 2020). The main difference in the SI was observed at 90 °C, where AS_{F0P0} reached the highest solubility (Fig.9b). When the surface proteins of the starch granules are present, the swelling and the solubility are restricted; however, by increasing the starch purity, these functional properties are enhanced due to an augmented exposure of the granule to water molecules (Debet & Gidley, 2006). On the other hand, the amylose chains restrict the swelling; therefore, the amylose leaching from the amorphous fraction favored the SP and SI (Karim et al., 2008).

The water absorption (WAC) ranged between 3.9-4.6 g water/g starch and the oil absorption (OAC) between 1.8-2.4 g oil/g starch (Fig.9c). Our results are similar to the WAC reported for defatted macadamia flours (4.71-6.72 g water/g flour, db) and superior to the OAC of corn and rice starches (0.80-1.1 g oil/g starch, db) (Ali et al., 2016; Jitngarmkusol et al., 2008). The hydrophilic tendency of the starch strongly depends on the open spaces for water penetration and the available water binding sites in the starch granule (Debet & Gidley, 2006). In our study, AS_{P0} and AS_{F0P0} presented the greatest WAC and OAC values, which could be associated with their fiber content (Table 3). It is reported that fiber content increases the hydration properties due to the hydroxyl group interaction between fiber and water molecules through hydrogen bonds (Abdul Aziz et al., 2012). According to the high values of WAC and OAC, AS could be used as an additive in food products that require high retention of oil or water (de Castro et al., 2019).

3.5.10. *In vitro* digestibility

The *in vitro* digestibility of the raw AS variations is shown in Fig. 10. All samples presented a higher fraction of slowly digestible starch (SDS) than rapidly

digestible starch (RDS) and resistant starch (RS). RDS and SDS percentages were similar to the content reported in high amylose rice starch (20.8% of RDS and 40.7% of SDS) (Sui et al., 2017).

The SDS percentage increased significantly with respect to the RDS and RS fractions when AS was defatted (AS_{F0}), deproteinized (AS_{P0}), or defatted/deproteinized (AS_{F0P0}), but these increases were non-significantly different. The RDS starch fraction also increased significantly as the AS starch was defatted, deproteinized or defatted/deproteinized, and exhibited significant differences between treatments, as follows in increasing order: $AS_L < AS_{F0} < AS_{P0} < AS_{F0P0}$. Our results are in agreement with studies of the *in vitro* digestion of rice starch subjected to defatting and deproteinization (Ye et al., 2018).

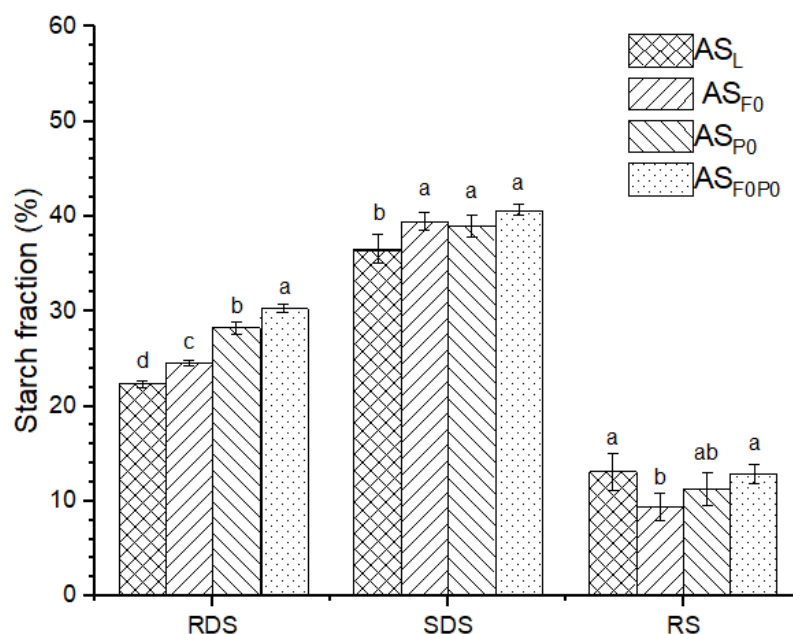


Fig. 10 Annatto starch (AS) digestibility assay as a function of starch purity. Different letters on the same group mean significant differences ($p < 0.05$). AS_L (low purity); AS_{F0} : starch from defatted flour (medium purity); AS_{P0} : starch from deproteinized flour (medium purity); AS_{F0P0} : starch from defatted and deproteinized flour (high purity). RDS: Rapidly digestible starch; SDS: Slowly digestible starch; RS: Resistant starch

These results can be attributed to the enzyme access to restricted substrate sites as lipid and protein removal, which allowed an easier migration of pancreatic α -amylase into the starch granule. Thus, the susceptibility to hydrolysis by digestive enzymes of amylose and amylopectin increased (Sui et al., 2017). Previous reports of alkali-treated pea starch showed an increased *in vitro* enzymatic breakdown when protein content was diminished (S. Wang & Copeland, 2012).

As mentioned before, the chemical composition, SEM, and XRD results suggest that the deproteinization treatment can cause an amylose leaching of the AS granules. Consequently, the amylose chains breaking, and the augmented amylopectin fraction could facilitate the enzymatic attack. The short branched chains of amylopectin are weak points in the crystalline structure, resulting in augmented hydrolysis susceptibility, increasing RDS percentage (Ding et al., 2021; Lin et al., 2016). Resistant starch contents remained relatively unchanged for treatments including deproteinization (AS_{P0} and AS_{F0P0}) but decreased significantly for AS_{F0} concerning to RS content of AS_L .

3.6. Conclusion

Annatto flour was obtained from depigmented annatto seeds, and was purified via soaking in sodium metabisulfite solution, defatting, deproteinization and combined defatting/deproteinization. The removal of protein decreased phenolic compounds and antioxidant activity of AS, while the depletion of lipids and proteins did not change the basic chemical structure of AS. However, the functional properties (swelling power, solubility index, water, and oil absorption), and the flow and oscillatory viscoelastic properties of gelatinized starch dispersions were significantly higher as the AS purity degree was increased. Independently of the purification degree of AS, the slowly digestible starch fraction predominated over that of the readily digestible starch and resistant starch fractions. Overall, the results showed that annatto seeds are viable sources of starch with marked antioxidant capacity, while exhibiting acceptable gel rheological properties. These results pinpoint the feasibility of using annatto

starch as an alternative starch source in food applications requiring high water and oil retention capabilities, and where relative low starch digestibility is desired. Also, AS can be incorporated in the preparation of bread to improve antioxidant properties and textural characteristics.

3.7. Acknowledgments

This work was supported by the Universidad Autónoma Chapingo [projects 19026-ECI-62, 20225-C-62]; and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) [Ph.D. scholarship 384708].

3.8. Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

3.9. Data availability

All raw data are available from the corresponding author upon reasonable request.

3.10. Author contributions

V. Cortés-Viguri: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft, Visualization; **L. Hernández-Rodríguez:** Project administration, Funding acquisition, Supervision, Writing - Review & Editing; **C. Lobato-Calleros:** Resources, Funding acquisition, Writing - Review & Editing; **Juan C. Cuevas-Bernardino:** Writing - Review & Editing; **J. Alvarez-Ramirez:** Supervision, Writing - Review & Editing; **E. Jaime Vernon-Carter:** Writing - Review & Editing; **Blanca Elizabeth Hernández-Rodríguez:** Writing - Review & Editing.

3.11. References

1. D. Raddatz-Mota, L.J. Pérez-Flores, F. Carrari, J.A. Mendoza-Espinoza, F.D. de León-Sánchez, L. L. Pinzón-López, G. Godoy-Hernández, F. Rivera-Cabrera, J. Food Sci. Technol. **54**(6), 1729 (2017).

2. H. Ahsan, A. Ahad, J. Iqbal, W.A. Siddiqui, *Nutr. Metab.* **11**(1), 52 (2014).
3. M. Viuda-Martos, G.L. Ciro-Gómez, Y. Ruiz-Navajas, J.E. Zapata-Montoya, E. Sendra, J.A. Pérez-Álvarez, J. Fernández-López, *J. Food Saf.* **32**(4), 399-406 (2012).
4. J.A. Shilpi, M. Taufiq-Ur-Rahman, S.J. Uddin, M.S. Alam, S.K. Sadhu, V. Seidel, *J. Ethnopharmacol.* **108**(2), 264-271 (2006).
5. M.A. Valério, M.I.L. Ramos, J.A. Braga Neto, M.L.R. Macedo, *Food Sci. Technol.* **35**(2), 326-330 (2015).
6. E.K. Silva, M. Martelli-Tosi, R. Vardanega, G.C. Nogueira, G.L. Zabot, M.A.A. Meireles, *J. Clean. Prod.* **189**, 231-239 (2018).
7. T.M. Garcia Silveira, D.R. Tapia-Blácido, *Food Hydrocoll.* **77**, 117-125 (2018).
8. G.L. Zabot, E.K. Silva, L.B. Emerick, M.H.F. Felisberto, M.T.P.S. Clerici, M.A.A. Meireles, *Food Hydrocoll.* **89**, 321-329 (2019).
9. J. Ye, X. Hu, S. Luo, D. J. McClements, L. Liang, C. Liu, *Food Res. Int.* **106**, 404-409 (2018).
10. Y. Ding, J. Cheng, Q. Lin, Q. Wang, J. Wang, G. Yu, *Food Hydrocoll.* **111**, 106254 (2021).
11. M.B. Cardoso, J.-L. Putaux, D. Samios, N.P. da Silveira, *Carbohydr. Polym.* **70**(2), 160-165 (2007).
12. Z.H. Lu, E. Donner, Q. Liu, *Starch - Stärke* **71**(11-12), 1900123 (2019).
13. A.A. Karim, M.Z. Nadiha, F.K. Chen, Y.P. Phuah, Y.M. Chui, A. Fazilah, *Food Hydrocoll.* **22**(6), 1044-1053 (2008).
14. M.Z.N. Nadiha, A. Fazilah, R. Bhat, A.A. Karim, *Food Chem.* **121**(4), 1053-1059 (2010).
15. C. Lobato-Calleros, C. Ramírez-Santiago, E. J. Vernon-Carter, J. Alvarez-Ramirez, *J. Food Eng.* **131**, 110-115 (2014).
16. L. Wang, C. Zhang, Z. Chen, X. Wang, K. Wang, Y. Li, R. Wang, X. Luo, Y. Li, J. Li, *J. Cereal Sci.* **84**, 125-131 (2018).
17. D.S. de Castro, I. dos Santos Moreira, L.M. de Melo Silva, J.P. Lima, W.P. da Silva, J.P. Gomes, R.M.F. de Figueirêdo, *Food Res. Int.* **124**, 181-187 (2019).
18. R.C.T. Barbi, G.L. Teixeira, P.S. Hornung, S. Ávila, R. Hoffmann-Ribani, *Food Hydrocoll.* **77**, 646-658 (2018).
19. J.E. Devia, L. Saldarriaga, *Rev. Univ. EAFIT* **39**(131), 8-22 (2003).
20. K. Israkarn, N.N. Nakornpanom, P. Hongsprabhas, *Carbohydr. Polym.* **105**, 34-40 (2014).

21. AACC, Approved Methods of Analysis, 10th Ed (Cereals & Grains Association, St. Paul, MN, U.S.A, 2000).
22. T. Zhu, D.S. Jackson, R.L. Wehling, B. Geera, Cereal Chem. J. **85**(1), 51-58 (2008).
23. R.L. Zapata-Luna, T. Ayora-Talavera, N. Pacheco, E. García-Márquez, H. Espinosa-Andrews, Á. Ku-González, J. Ruiz-Ruiz, J.C. Cuevas-Bernardino, J. Food Meas. Charact. **15**(2), 1410-1421 (2021).
24. J. Hoyos-Leyva, L.A. Bello-Pérez, E. Agama-Acevedo, J. Alvarez-Ramirez, Int. J. Biol. Macromol. **120**, 237-244 (2018).
25. A. Milani, M. Jouki, M. Rabbani, Food Sci. Nutr. **8**, 3768-3776 (2020)
26. S.M.B. Hashemi, D. Jafarpour, J. Food Sci. **86**, 513-522 (2021)
27. M. Jouki, N. Khazaei, S. Rashidi-Alavijeh, S. Ahmadi, Food Hydrocoll. **120**, 106895 (2021).
28. D. Gómez-Maldonado, C. Lobato-Calleros, E. Aguirre-Mandujano, S.G. Leyva-Mir, L. Robles-Yerena, E.J. Vernon-Carter, LWT **126**, 109337 (2020).
29. B.C. Maniglia, D.R. Tapia-Blácido, Food Hydrocoll. **55**, 47 (2016).
30. S.M.B. Hashemi, D. Jafarpour, Food Sci. Nutr. **8**(7), 3128-3137 (2020).
31. S.M.B. Hashemi, D. Jafarpour, J. Food Meas. Charact. **15**(3), 2516-2523 (2021).
32. S.M.B. Hashemi, D. Jafarpour, J. Food Process. Preserv. **44**(9), 1-12 (2020).
33. M. Jouki, N. Khazaei, F. Rezaei, R. Taghavian-Saeid, Int. Dairy J. **122**, 105133 (2021).
34. Q.Y. Yang, X.X. Lu, Y.Z. Chen, Z.G. Luo, Z.G. Xiao, Ultrason. Sonochem. **51**, 350-358 (2019).
35. S. Sukhija, S. Singh, C.S. Riar, Food Hydrocoll. **55**, 56-64 (2016).
36. S.M. Londoño-Restrepo, N. Rincón-Londoño, M. Contreras-Padilla, A.A. Acosta-Osorio, L.A. Bello-Pérez, J.C. Lucas-Aguirre, V.D. Quintero, P. Pineda-Gómez, A. del Real-López, M.E. Rodríguez-García, Int. J. Biol. Macromol. **65**, 222-228 (2014).
37. T.Y. Wu, C.R. Chang, T.J. Chang, Y.J. Chang, Y. Liew, C.F. Chau, Food Chem. **283**, 46-51 (2019).
38. H.N. Englyst, S.M. Kingman, J.H. Cummings, Eur. J. Clin. Nutr. **46** (Suppl 2), S33-S50 (1992).
39. L.F. Polesi, S.B.S. Sarmiento, S.G. Canniatti-Brazaca, Rice Sci. **25**(1), 42-51 (2018).
40. W.R. Morrison, J. Cereal Sci. **8**(1), 1-15 (1988).

41. M.R. Debet, M.J. Gidley, Carbohydr. Polym. **64**(3), 452-465 (2006).
42. N. Bahrami, L. Yonekura, R. Linforth, M. Carvalho da Silva, S. Hill, S. Penson, G. Chope, I.D. Fisk, J. Sci. Food Agric. **94**(3), 415-423 (2014).
43. S. Wang, H. Luo, J. Zhang, Y. Zhang, Z. He, S. Wang, J. Agric. Food Chem. **62**(16), 3636-3643 (2014).
44. S. Wang, L. Copeland, Food Chem. **135**(3), 1635-1642 (2012).
45. J.Y. Li, A.I. Yeh, J. Food Eng. **50**(3), 141-148 (2001).
46. C. Martínez, F. Cuevas, Evaluación de La Calidad Culinaria y Molinera Del Arroz. Guía de Estudio., Tercera ed (Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, 1989).
47. F.M. Bhat, C.S. Riar, Int. J. Biol. Macromol. **92**, 637-644 (2016).
48. C. Cano-Sarmiento, D.I. Téllez-Medina, R. Viveros-Contreras, M. Cornejo-Mazón, C.Y. Figueroa-Hernández, E. García-Armenta, L. Alamilla-Beltrán, H.S. García, G.F. Gutiérrez-López, Food Eng. Rev. **10**(3), 113-138 (2018).
49. M.T. Pacheco, F.J. Moreno, R. Moreno, M. Villamiel, O. Hernandez-Hernandez, Food Chem. **301**, 125268 (2019).
50. Y. Feng, S.R. Kilker, Y. Lee, in Charact. Nanoencapsulated Food Ingredients, edited by S. M. Jafari (Academic Press, 2020), pp. 213–241.
51. R.A. Marsh, S.G. Waight, Starch - Stärke **34**(5), 149-152 (1982).
52. P.P. Rao, G.N. Rao, T. Jyothirmayi, A. Satyanarayana, M.S.L. Karuna, R.B.N. Prasad, J. Am. Oil Chem. Soc. **92**(10), 1483-1490 (2015).
53. R. Wongsagonsup, S. Shobsngob, B. Oonkhanond, S. Varavinit, Starch - Stärke **57**(1), 25-31 (2005).
54. R.G. Utrilla-Coello, M.E. Rodríguez-Huezo, H. Carrillo-Navas, C. Hernández-Jaimes, E.J. Vernon-Carter, J. Alvarez-Ramirez, Carbohydr. Polym. **101**(1), 154-162 (2014).
55. R.C. Chisté, A.Z. Mercadante, A. Gomes, E. Fernandes, J.L.F. da Costa Lima, N. Bragagnolo, Food Chem. **127**(2), 419-426 (2011).
56. B.A. Acosta-Estrada, J.A. Gutiérrez-Urbe, S.O. Serna-Saldívar, Food Chem. **152**, 46-55 (2014).
57. F. Zhu, Trends Food Sci. Technol. **43**(1), 1-17 (2015).
58. N.A. Abdul Aziz, L.M. Wong, R. Bhat, L. H. Cheng, J. Sci. Food Agric. **92**(3), 557-563 (2012).
59. S. Punia, S. B. Dhull, P. Kunner, S. Rohilla, Int. J. Biol. Macromol. **157**, 584-590 (2020).
60. Y. Monroy, S. Rivero, M.A. García, Ultrason. Sonochem. **42**, 795-804 (2018).

61. G.M. de S. Silva, C.M. Veloso, L.S. Santos, B.A. de Melo Neto, R. da C.I. Fontan, R.C.F. Bonomo, J. Food Sci. Technol. **57**(5), 1830-1839 (2020).
62. F.M. Pelissari, M.M. Andrade-Mahecha, P.J. do A. Sobral, F.C. Menegalli, Starch - Stärke **64**(5), 382-391 (2012).
63. I. Dankar, A. Haddarah, F.E.L. Omar, M. Pujolà, F. Sepulcre, Food Chem. **260**, 7-12 (2018).
64. W. Li, B.J. Dobraszczyk, A. Dias, A.M. Gil, Cereal Chem. J. **83**(4), 407-410 (2006).
65. S. Srichuwong, J.-I. Jane, Food Sci. Biotechnol. **16**(5), 663-674 (2007).
66. N.W.H. Cheetham, L. Tao, Carbohydr. Polym. **36**(4), 277-284 (1998).
67. M.R. Debet, M.J. Gidley, J. Agric. Food Chem. **55**(12), 4752-4760 (2007).
68. Z. Li, C. Wei, Int. J. Biol. Macromol. **163**, 2084-2096 (2020).
69. J. Alvarez-Ramirez, R. Escarela-Perez, E.J. Vernon-Carter, H. Carrillo-Navas, J. Cereal Sci. **88**, 31-37 (2019).
70. X.Z. Han, O.H. Campanella, H. Guan, P.L. Keeling, B.R. Hamaker, Carbohydr. Polym. **49**(3), 323-330 (2002).
71. S. Singh, N. Singh, N. Isono, and T. Noda, J. Agric. Food Chem. **58**, 1180 (2010).
72. S. Takahashi, P.A. Seib, Cereal Chem **65**(6), 474-483 (1988).
73. S. Jitngarmkusol, J. Hongsuwankul, K. Tananuwig, Food Chem. **110**(1), 23-30 (2008).
74. A. Ali, T. A. Wani, I.A. Wani, F.A. Masoodi, J. Saudi Soc. Agric. Sci. **15**(1), 75-82 (2016).
75. Z. Sui, T. Yao, X. Ye, J. Bao, X. Kong, Y. Wu, Starch - Stärke **69**(7-8), 1600164 (2017).
76. L. Lin, C. Cai, R.G. Gilbert, E. Li, J. Wang, C. Wei, Food Hydrocoll. **52**, 359-368 (2016).

4. CONCLUSIONES GENERALES

Los residuos de semillas de achiote son una fuente importante de carbohidratos, entre los cuales destaca el almidón. El proceso de extracción de almidón aplicado, basado en remojo con disolución de metabisulfito de sodio, permitió obtener materiales con contenidos de almidón entre 81.9 y 85.15% p/p. Los tratamientos de purificación (desgrasado y desproteinización) lograron disminuir el contenido de impurezas, tales como lípidos y proteínas solubles. El incremento en el grado de pureza del almidón de achiote tuvo un impacto significativo en sus propiedades fisicoquímicas y microestructurales.

Los almidones aislados presentaron un contenido de amilosa intermedio (18.94 – 28.56 %) y un potencial ζ negativo a pH neutro. Se encontró una correlación positiva entre el contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante de los almidones, disminuyendo esta última con la intensidad de los tratamientos de purificación.

En general, los gránulos del almidón de achiote presentaron una morfología heterogénea donde predominaron los gránulos ovalados. Una característica particular fue la presencia de aglomerados conformados por gránulos de almidón y restos vegetales fibrosos. Estos aglomerados disminuyeron en cantidad y tamaño al purificar el almidón de achiote. La remoción de lípidos y proteínas solubles no cambió la estructura química básica del almidón de achiote. Sin embargo, sus propiedades de flujo, funcionales y de digestibilidad se modificaron significativamente. El almidón de achiote de mayor pureza formó geles con una mayor viscosidad aparente.

La capacidad de hinchamiento, el índice de solubilidad, la capacidad de absorción de agua y de aceite mejoraron al reducir el contenido de lípidos y proteínas de los almidones. Independientemente del grado de purificación, la fracción de almidón de digestión lenta (36.57 – 40.68 %) predominó sobre las fracciones de almidón de digestión rápida (22.33 – 30.31 %) y de almidón resistente (9.43 – 13.10 %).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que los residuos de semillas de achiote son aptos para la obtención de un almidón no convencional. Las características del almidón de achiote indican que puede ser incorporado en formulaciones de alimentos que requieran una alta capacidad de retención de agua y aceite, así como para mejorar sus características texturales y antioxidantes.

5. APÉNDICE

5.1. Artículo publicado

Journal of Food Measurement and Characterization (2022) 16:637–651
<https://doi.org/10.1007/s11694-021-01228-7>

ORIGINAL PAPER



Annatto (*Bixa orellana* L.), a potential novel starch source: antioxidant, microstructural, functional, and digestibility properties

Vianney Cortés-Viguri¹ · Landy Hernández-Rodríguez²  · Consuelo Lobato-Calleros² · Juan C. Cuevas-Bernardino³ · Blanca Elizabeth Hernández-Rodríguez² · Jose Alvarez-Ramirez⁴ · E. Jaime Vernon-Carter⁴

Received: 9 September 2021 / Accepted: 8 October 2021 / Published online: 24 November 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

Bixin and norbixin are extracted from annatto seeds, and the residual seed waste can be used as a potential source of annatto starch (AS), contributing to the circular economy of the regional communities where the resource is grown/processed. To assess AS suitability as a food ingredient, its physicochemical, antioxidant, microstructural, and functional properties were evaluated after being purified by: Soaking in sodium metabisulfite solution (low purity), defatting for removing lipids (medium purity), alkaline treatment for extracting protein (medium purity), and combined defatting/alkaline (high purity) treatments. AS degree of purity affected all the evaluated parameters. The ζ -potential values ranged between -18.30 and -24.10 mV and those of the antioxidant activity between 0.52 and 1.14 $\mu\text{g TE/g}$ (ABTS^{•+} assay). AS presented a heterogeneous morphology with granules tending to agglomerate, and the mean Sauter diameter varied from 26.8 to 31.1 μm . FTIR spectroscopy showed that protein molecules were present despite the alkaline treatment. X-ray patterns pinpointed that the starch crystalline region was not modified by the deproteinization treatment. The apparent viscosity and viscoelastic properties of gelatinized starch dispersions increased when lipids and proteins were simultaneously removed. The swelling power (21.44 – 22.71 g/g), solubility index (21.77 – 40.43%), water absorption (3.9 – 4.56 g/g), and oil absorption (1.78 – 2.41 g/g) increased with the purification degree. The in vitro digestibility assay showed that AS presented a higher fraction of slowly digestible starch (36.57 – 40.68%) than rapidly digestible and resistant starch fractions. This work demonstrates that AS has suitable functional properties that open the possibility for its use in the food industry.

Keywords

 Annatto starch · Digestibility · Functional properties · Purification treatments