



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

**EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y MICROENCAPSULACIÓN DE
BETALAÍNAS DE FRUTOS DE *Stenocereus pruinosus* PARA USO EN
ALIMENTOS**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA**

PRESENTA:

LILIA VARGAS CAMPOS



**DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES**



Diciembre de 2015

Chapingo, Estado de México

**EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y MICROENCAPSULACIÓN DE
BETALAÍNAS DE FRUTOS DE *Stenocereus pruinosus* PARA USO EN
ALIMENTOS**

Tesis realizada por **Lilia Vargas Campos** bajo la dirección del Comité Asesor
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener
el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA**

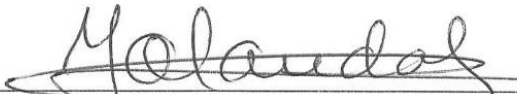
DIRECTOR:


DR. SALVADOR VALLE GUADARRAMA

ASESOR:


DRA. CONSUELO S.O. LOBATO CALLEROS

ASESOR:


DRA. YOLANDA SALINAS MORENO

ASESOR:


DR. FERNANDO MARTÍNEZ BUSTOS

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, al Departamento de Ingeniería Agroindustrial y al Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Querétaro.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología y a la Dirección General de Investigación y Posgrado por el financiamiento y apoyo durante esta investigación.

A mi comité asesor: Dr. Salvador Valle Guadarrama, Dr. Fernando Martínez Bustos, Dra. Yolanda Salinas Moreno y Dra. Consuelo S.O. Lobato Calleros por el apoyo y confianza en esta investigación.

A mis maestros: Dra. Ma. Carmen Ybarra Moncada, Dr. Arturo Hernández Montes, Dr. Eleazar Aguirre Mandujano, Rosario García Mateos y María Teresa Beryl Colinas León por compartir sus conocimientos.

A Sra. Esperanza Salinas, Dra. Amira Daniela Calvo, M.C Verónica Flores, M.I.Q. David Tochihuitl, M.T José Juan Veles, Q en A. Martín Adelaido, M en C. Reina Araceli Mauricio, Ing. Eleazar Urbina, Ing. Carlos Alberto Ávila, Ing. Adair Jiménez, Mauricio Arellano, María del Pilar Meraz y Guadalupe Rodríguez por su apoyo en esta investigación.

DEDICATORIA

A Dios

Por permitirme concluir esta etapa profesional.

A mis padres

Rafa Campos González† y Orlando Vargas Mendoza.

Con cariño a mi hermano

A mí querido hermano Cesar Vargas Campos por su apoyo, amor, confianza y por ser esa persona especial de inspiración para superar pruebas difíciles.

A mi abuelito

Vicente Campos Alonso por su cariño y cuidados en momentos difíciles.

A mis tíos y primos

En especial a mi tía Ma. Isabel Vargas Mendoza, tíos Pablo Vargas Mendoza y Carlos Vargas Mendoza por preocuparse de mi bienestar e impulsarme a salir adelante. A mi tía Adelfa Tufiño Martínez por su cariño y apoyo. A mis primos Carlos Ismael Ponce Vargas, Nancy Campos Quintero y Héctor Campos Quintero.

DATOS BIOGRÁFICOS

Lilia Vargas Campos nació el 19 de noviembre de 1986 en Puebla, México. En 2009, obtuvo el título de Ingeniero Bioquímica en el Instituto Tecnológico Superior de Atlixco con el tema de tesis “Formulación y evaluación de estabilidad de un shampoo con extracto de jitomate (*Lycopersicum esculentum*, var. *saladette*)”. Posteriormente se desempeñó como docente de nivel medio superior en la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP).

En 2013 inició sus estudios de posgrado en la Universidad Autónoma Chapingo en el Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria.

Participó en el 3^{er} Congreso Internacional de Investigación en Ciencias Básicas, III Congreso Internacional & XVII Congreso Nacional de Ciencias Agronómicas y en el International Conference on Food Chemistry & Technology “Exploring the recent trends, innovation, & emerging technologies for food research and development”.

**EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y MICROENCAPSULACIÓN DE
BETALAÍNAS DE FRUTOS DE *Stenocereus pruinosus* PARA USO EN
ALIMENTOS**

**EXTRACTION, PURIFICATION AND MICROENCAPSULATION OF
BETALAINS OF *Stenocereus pruinosus* FRUIT FOR USE IN FOOD**

Lilia Vargas-Campos¹; Salvador Valle-Guadarrama²

RESUMEN

Los frutos de *Stenocereus pruinosus* representan una fuente de betalaínas. Sin embargo, estos pigmentos son susceptibles a temperatura, azúcares, pH, a_w , luz y oxígeno. El objetivo de esta investigación fue extraer y purificar betalaínas por el método de Extracción Acuosa en Dos Fases (ATPE) y aplicar la encapsulación. Los azúcares se disminuyeron de 347.6 mg g⁻¹ a 65.25 mg g⁻¹. Se obtuvo alta eficiencia de encapsulación de betalaínas con almidón succinatado con una concentración de betacianinas de 0.5528 mgBC g⁻¹ de cápsulas y betaxantinas de 0.5319 mgBX g⁻¹ de cápsulas comparado con almidón fosfatado y almidón N-Lok con una concentración de betacianinas de 0.5384 y 0.3456 mgBC g⁻¹ de cápsulas respectivamente y el contenido de betaxantinas de 0.5384 y 0.4030 mg BX g⁻¹ de cápsulas respectivamente. La degradación de betalaínas microencapsuladas fue lenta para el almidón succinatado. Las microcápsulas de betalaínas fueron apropiadas para la aplicación en yogurt.

Palabras clave: betalaínas, yogurt, microcápsulas, estabilidad.

ABSTRACT

The fruits of *Stenocereus pruinosus* represent a source of betalains. However, these pigments are susceptible to temperature, sugars, pH, a_w , light and oxygen. The objective of this research was to extract and purify by the method Aqueous Two Phase Extraction (ATPE) betalains and apply encapsulation. Sugars decreased from 347.6 mg g⁻¹ to 65.25 mg g⁻¹. High encapsulation efficiency betalains with succinylated starch was obtained with a concentration of betacyanins from 0.5528 mgBC g⁻¹ capsule and betaxanthins of 0.5319 mgBX g⁻¹ capsules compared with phosphorylated starch and N-Lok starch with a concentration of betacyanins from 0.5384 and 0.3456 mgBC g⁻¹ capsules respectively and betaxanthins content of 0.5384 and 0.4030 mgBX g⁻¹ capsules respectively. Betalains microencapsulated degradation was slow for succinylated starch. Betalains microcapsules were suitable for application in yoghurt

Keywords: betalains, yogurt, microcapsules, stability.

1 Tesista

2 Director

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA	IV
DATOS BIOGRÁFICOS.....	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VI
ÍNDICE DE CUADROS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	4
3. OBJETIVOS.....	6
3.1.1. Objetivos particulares.....	6
4. MARCO TEÓRICO	7
4.1 La pitaya (<i>Stenocereus pruinosus</i>)	7
4.2. Distribución de las betalaínas en la naturaleza	9
4.2.1 Biosíntesis de las betalaínas	9
4.3. Factores que afectan la estabilidad de las betalaínas	10
4.3.1 Estructura y composición	11
4.3.2. Temperatura.....	11
4.3.3. pH.....	12
4.3.4. Actividad de agua (a_w).....	12
4.3.5. Oxígeno.....	12
4.3.6. Luz.....	13
4.3.7. Metales.....	13
4.4. Rutas de degradación de las betalaínas.....	14
4.5. Clasificación de colorantes alimentarios.....	15
4.6. Extracción de betalaínas	16

4.7. Sistemas de extracción acuosa en dos fases (ATPE)	17
4.8. Microencapsulación	18
4.8.1. Secado por aspersion.....	20
4.8.2. Descripción del proceso de secado por aspersion	21
4.8.3. Condiciones de operación del secado por aspersion	23
4.8.4. Materiales de pared	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1. Materiales	34
5.2. Metodología	35
5.2.1. Extracción de betalaínas por el método ATPE	35
5.2.2. Preparación del extracto de pitaya	35
5.2.3. Cuantificación de betalaínas por el método de espectrofotometría..	36
5.2.4. Cuantificación de betalaínas en las microcápsulas	36
5.2.5. Preparación del diagrama de extracción acuoso en dos fases	37
5.2.6. Preparación de la muestra de betalaínas para eliminación de azúcares por el método de ATPE.....	38
5.2.7. Cuantificación de azúcares	39
5.2.8. Cuantificación de mucílago	41
5.2.9. Contenido de sólidos solubles totales	42
5.2.10. Estudio de estabilidad acelerado de betalaínas con y sin azúcares durante almacenamiento	42
5.2.11. Encapsulación de betalaínas.....	43
5.2.12. Caracterización fisicoquímica de los almidones modificados	46
5.2.13. Preparación de microcápsulas	52
5.2.14. Caracterización de microcápsulas.....	53
5.2.15. Evaluación de la estabilidad de las betalaínas encapsuladas	56
5.3. Análisis de datos.....	56
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
6.1. Extracto crudo de betalaínas	58
6.2. Sistema de extracción acuosa en dos fases para eliminación de azúcares	58
6.3. Efecto de la presencia de azúcares en el extracto de betalaínas.....	60

6.4. Evaluación de la estabilidad de betalaínas en el extracto de frutos de pitaya	62
6.5. Caracterización de los almidones modificados como material de pared para encapsulamiento de betalaínas	64
6.6. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	65
6.7. Viscosidad de los almidones	67
6.8. Grado de sustitución (GS)	68
6.9. Índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA)	69
6.10. Difracción de rayos X (XRD).....	70
6.11. Microscopía electrónica de barrido de los almidones modificados y almidón nativo	73
6.12. Caracterización de las microcápsulas	75
6.13. Morfología de las microcápsulas	75
6.14. Estudio de estabilidad de las microcápsulas de betalaínas	77
6.15. Estudio de estabilidad de yogurt adicionado con microcápsulas de betalaínas	82
7. CONCLUSIONES	85
8. BIBLIOGRAFÍA	88

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tipos de modificación del almidón y técnicas de preparación.....	27
Cuadro 2. Montaje del ensayo para determinación de azúcares totales por el método de Antrona.	39
Cuadro 3. Estudio de estabilidad de betalaínas con y sin azúcares.	43
Cuadro 4. Formulación de yogurt natural estandarizado a 3 % de grasa.	56
Cuadro 5. Caracterización del extracto de pitaya con azúcares y sin azúcares.	61
Cuadro 6. Índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA).....	69
Cuadro 7. Caracterización de las microcápsulas de betalaínas obtenidas con tres diferentes materiales de pared.....	75
Cuadro 8. Estabilidad del color en yogurt adicionado con extracto de pitaya liofilizado.	83
Cuadro 9. Yogurt adicionado con microcápsulas de betalaínas.	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frutos de pitaya (<i>Stenocereus</i> spp.) (García–Cruz <i>et al.</i> , 2016).....	7
Figura 2. Estructura general del ácido betalámico (a), betacianinas (b) y betaxantinas (c). Betanina: $R_1 = R_2 = H$. R_3 = grupo amino o aminoácido (Strack <i>et al.</i> , 2003).....	10
Figura 3. Grupos funcionales propensos a la degradación en betacianinas. Los sitios propensos por descarboxilación se muestran en cuadros azules, para deshidrogenación en rosa y para la desglicosilación en círculos verdes (Adaptado con modificaciones de Stintzing y Carle 2007).	15
Figura 4. Esquema de un secador por aspersion (Martínez, 2007).	21
Figura 5. Estructura común de una microcápsula (Kandansamy y Somasundaram 2012).....	24
Figura 6. Estructura y composición del almidón (Sweedman <i>et al.</i> , 2013).....	28
Figura 7. Almidón modificado con tripolifosfato de sodio (Martínez <i>et al.</i> , 2007).	32
Figura 8. Estructura de almidón modificado por anhídrido n–octenil succínico (Sweedman <i>et al.</i> , 2013).	32
Figura 9. Diseño genérico del extrusor utilizado en la fase experimental.	46
Figura 10. Fotografía del equipo utilizado en la obtención de microcápsulas de betalaínas.	53
Figura 11. Diagrama ATPE con mezclas PEG–SA a). Formación del sistema acuoso en dos fases (ATPE) para la separación de azúcares del extracto de betalaínas b). La flecha señala la interface del sistema de ATPE.	59
Figura 12. Separación de betalaínas por el método ATPE (a) y eliminación de PEG con cloroformo (b).	60
Figura 13. Extracto de betalaínas liofilizado con azúcares (a); sin azúcares (b).	61

Figura 14. Estabilidad de betalaínas afectada por la temperatura y la presencia de azúcares. BC: betacianinas; BX: betaxantinas; SAz: sin azúcares; CAz: con azúcares. Letras mayúsculas iguales entre paréntesis indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre cinéticas de betacianinas. Letras minúsculas iguales entre paréntesis indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre cinéticas de betaxantinas. Las leyendas ns y * indican cambio no significativo ($P > 0.05$) y cambio significativo ($P \leq 0.05$) al interior de una cinética particular.	63
Figura 15. Izquierda: apariencia de muestras sometidas a condiciones degradantes (izquierda) con temperatura de 60 °C y pH menor a 3.5. Derecha: apariencia de muestras sometidas a condiciones de 4 °C y pH de 5.5.	64
Figura 16. Muestra de almidón modificado por extrusión reactiva succinatado (a); fosfatado (b).	65
Figura 17. Espectro infrarrojo del almidón succinatado y almidón nativo de papa (control).	66
Figura 18. Espectro IR del almidón fosfatado y almidón nativo de papa (control).	67
Figura 19. Perfil de viscosidad de almidón succinatado y fosfatado con respecto al almidón nativo de papa (control).	68
Figura 20. Patrones de difracción de rayos X de almidón nativo de papa (a) almidón succinatado (b) y fosfatado (c).	72
Figura 21. Micrografías de los gránulos de almidón nativo de papa con magnificaciones de 250 y 2500X (a ₁ , a ₂), almidón succinatado (b ₁ , b ₂), fosfatado (c ₁ , c ₂) y N – lok (d ₁ , d ₂).	74
Figura 22. Micrografías de microcápsulas de betalaínas preparadas con almidón succinatado a); almidón fosfatado b); N – Lok c) con magnificación de 2500X. 77	
Figura 23. Estabilidad del contenido de betacianinas (BC) y betaxantinas (BX) totales encapsuladas con diferentes materiales de pared con almidón succinatado (S), fosfatado (F) y N–Lok (NL) a 40 °C. Letras mayúsculas entre paréntesis indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para cinéticas de betacianinas y betaxantinas. Las leyendas ns y * indican cambio no significativo ($P > 0.05$) y cambio significativo ($P \leq 0.05$) para cada cinética.	78
Figura 24. Estabilidad del contenido de betacianinas (BC) y betaxantinas (BX) superficiales encapsuladas con diferentes materiales de pared con almidón succinatado (S), fosfatado (F) y N–Lok (NL) a 40 °C. Letras mayúsculas entre	

paréntesis indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para cinéticas de betacianinas y betaxantinas. Las leyendas ns y * indican cambio no significativo ($P > 0.05$) y cambio significativo ($P \leq 0.05$) para cada cinética..... 80

Figura 25. Microcápsulas de betalaínas al inicio y final del estudio de estabilidad preparadas con almidón succinatado (a₁, a₂) almidón fosfatado (b₁, b₂) y almidón N–Lok (c₁, c₂)..... 81

Figura 26. Muestras de yogurt con microcápsulas de betalaínas preparadas con almidón succinatado a) Fosfatado b) N–Lok c) y yogurt adicionado con extracto liofilizado de pitaya d). Fuente: Elaboración propia..... 83

1. INTRODUCCIÓN

El color es uno de los atributos más importantes en los alimentos y es considerado un indicador de calidad que determina con frecuencia la aceptación de un producto. Está estrechamente relacionado con las expectativas del consumidor y la adición de colorantes a los alimentos es una manera de satisfacer esas expectativas. Los colorantes se añaden a los alimentos por una o más de las siguientes razones: 1) sustituir el color perdido durante el procesamiento, 2) mejorar el color ya presente, 3) minimizar variaciones entre lotes y 4) colorear de otra manera los alimentos incoloros. El desarrollo de alimentos con una apariencia atractiva es un objetivo importante para la industria alimentaria; los productores de alimentos están recurriendo cada vez más a los colorantes alimentarios naturales, debido que los colorantes artificiales han demostrado que causan problemas de salud después de su consumo (Aberoumand, 2011) y han recibido mucha atención de los medios en los últimos años, debido a una posible y controversial asociación con el desarrollo de desórdenes de déficit de atención e hiperactividad en niños susceptibles (Cardoso–Ugarte *et al.*, 2014). Los colorantes naturales tienen algunas desventajas sobre los colorantes artificiales. Entre ellas destacan, que son más caros y exhiben baja estabilidad sobre el procesamiento y condiciones de almacenamiento.

Sin embargo, muestran aparente falta de toxicidad y son amigables con el medio ambiente. Por lo tanto, varios investigadores se han interesado en desarrollar formas de mejorar la capacidad de extracción y estabilidad de colorantes naturales (Delgado–Vargas *et al.*, 2002).

Los colorantes naturales comprenden clorofilas, carotenoides, flavonoides, antocianinas, quinonas y betalaínas. Todos ellos están presentes en una gran diversidad de productos y se han estudiado desde hace varios años, con excepción de las betalaínas, las cuales recientemente han despertado interés en la industria alimentaria, ya que se han evaluado los beneficios que aportan a la salud y únicamente se localizan en diez familias del orden Caryophyllales (Stintzing y Carle 2007), entre ellos la pitaya (*Stenocereus* spp.) tiene alto contenido de betalaínas que podrían ser aprovechados como pigmentos naturales en la industria de alimentos (Chuck–Hernández *et al.*, 2016). Sin embargo la estabilidad de las betalaínas está fuertemente influenciada por azúcares, luz, oxígeno, actividad de agua, pH y temperatura (Chethana *et al.*, 2007). En particular, la presencia de azúcares puede ser un factor no deseado en el uso de las betalaínas como pigmento, ya que en el proceso de colorear un alimento se puede tener la problemática de alterar sus propiedades sensoriales, además de que pueden ser un elemento que favorezca procesos de fermentación. En adición, las condiciones de procesamiento de diversos alimentos y su manejo durante el almacenamiento puede ser una limitante para el uso de las betalaínas como pigmento. En este contexto, la tecnología de encapsulado puede constituir una herramienta para proteger y mejorar la estabilidad de las betalaínas. Por ello, el presente trabajo se realizó con el

objetivo general de extraer betalaínas de frutos de pitaya (*Stenocereus pruinosus*), evaluar su estabilidad ante la presencia de azúcares y aplicar una tecnología de encapsulado para favorecer su uso como pigmento natural de alimentos estudiado en un yogurt.

2. JUSTIFICACIÓN

Los frutos de pitaya (*Stenocereus* spp.) tienen buena aceptación en el mercado de frutos frescos, por su pulpa aromática, jugosa y con pequeñas semillas en su interior, con un promedio de 9.9 % de azúcares totales (50 % glucosa, seguido de fructosa y sacarosa) (Chuck–Hernández *et al.*, 2016). Sin embargo, su consumo se limita a las áreas de producción regional, debido a que son altamente perecederos y su comportamiento postcosecha no ha sido suficientemente estudiado (García–Cruz *et al.*, 2016). Por otra parte, se han reportado contenidos de betalaínas en los frutos de pitaya que podrían ser aprovechados como pigmentos naturales en la industria de alimentos, debido a los beneficios que aportan a la salud y su seguridad como colorantes naturales (Chuck–Hernández *et al.*, 2016). En los últimos 20 años se ha incrementado la tendencia hacia la sustitución de colorantes sintéticos por pigmentos naturales. El mercado actual de colorantes alimentarios se estima en 1.7 billones de pesos en el que los colorantes naturales comprenden 0.65 billones. Se espera que el mercado global de colorantes naturales crezca un 10 % en los próximos 5 años. Debido a esta situación, el mercado de los colorantes artificiales está decayendo (Kandansamy y Somasundaram, 2012).

Los productores de alimentos están recurriendo cada vez más al uso de colorantes alimentarios naturales, debido que los colorantes artificiales han demostrado que causan problemas de salud después de su consumo (Aberoumand, 2011), por lo que han recibido mucha atención de los medios en los últimos años, debido a una asociación con el desarrollo de déficit de atención e hiperactividad en niños susceptibles (Cardoso–Ugarte *et al.*, 2014).

Los colorantes naturales tienen algunas desventajas con respecto a los artificiales. Entre ellas está que son más caros y su estabilidad está influenciada por azúcares, luz, oxígeno, actividad de agua, pH y temperatura (Delgado–Vargas *et al.*, 2002), siendo la temperatura el factor más importante en la degradación de betalaínas durante el procesamiento de alimentos y condiciones de almacenamiento.

La estabilidad es un aspecto importante a considerar en el uso de estos pigmentos como colorantes en los alimentos. La estabilidad de betalaínas podría mejorarse utilizando tecnologías de encapsulación, tales como secado por aspersión, que aseguren su biodisponibilidad y uso en la industria de alimentos (Desai y Park, 2005) como aditivos en gelatinas, postres, alimentos horneados, entre otros, (Aparnathi y Borkhatriya, 1999).

En este contexto, en el presente trabajo se planteó extraer betalaínas de frutos de pitaya (*S. pruiosus*) libres de azúcares y almacenarlas en condiciones óptimas que incluyen ausencia de oxígeno y luz, pH de 5.5, temperatura de 4 °C y el uso de una tecnología de encapsulado como medio de protección, con la que adicionalmente se planteó disminuir el contenido de agua y de esta manera mejorar la estabilidad de las betalaínas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Extraer betalaínas de frutos de pitaya (*Stenocereus pruinosus*), evaluar su estabilidad ante la presencia de azúcares y aplicar una tecnología de encapsulado para favorecer su uso como pigmento natural de alimentos.

3.1.1. Objetivos particulares

- Obtener un extracto de betalaínas a partir de frutos de pitaya por medio de maceración etanol-agua.
- Construir un sistema de extracción acuoso en dos fases polímero/sal para la eliminación de azúcares y mucílago del extracto de betalaínas.
- Evaluar la estabilidad de betalaínas con presencia y ausencia de azúcares.
- Diseñar dos materiales de pared mediante la modificación química de almidón nativo de papa con tripolifosfato de sodio (TPS) y anhídrido n-octenil succínico (n-OSA) mediante extrusión reactiva.
- Estudiar la estabilidad de microcápsulas de betalaínas obtenidas con almidones modificados a 40 °C durante 39 días.
- Evaluar la estabilidad de las microcápsulas de betalaínas en un sistema alimentario durante 39 días a 4 °C.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 La pitaya (*Stenocereus pruinosus*)

La pitaya (*Stenocereus pruinosus*) es localmente llamada pitaya de mayo, tiene forma elipsoide y el color de su pulpa es blanca, amarilla, púrpura, naranja y comúnmente se encuentra más la roja, con presencia de semillas pequeñas de color negro (García–Cruz *et al.*, 2016) (Figura 1).



Figura 1. Frutos de pitaya (*Stenocereus* spp.) (García–Cruz *et al.*, 2016).

La pitaya es producida por un cactus columnar nativo de México que puede alcanzar 8 m de altura, con ramificaciones verdes, presencia de cinco a ocho costillas y ápice blanquecino.

Sus flores miden 7–10 cm de longitud; los tépalos exteriores son de color verde y rígido de color marrón, mientras que los tépalos interiores son de color blanco y carnosos. Las flores tienen antesis nocturna y son polinizadas por murciélagos. La especie se distribuye principalmente en zonas semiáridas de los estados de Oaxaca, Puebla, Chiapas, Guerrero, Tamaulipas, Veracruz y San Luis Potosí. En estas regiones, las cactáceas columnares se han utilizado como alimento, materiales de construcción, forraje, cercas vivientes y combustible (Parra *et al.*, 2008). Actualmente el conocimiento que se tiene acerca de los frutos de pitaya se limita a las características morfológicas y estudios sobre la variación genética. Sin embargo, el color de la pulpa sugiere altos contenidos de betalaínas (García–Cruz *et al.*, 2013). Los colorantes rojos naturales son muy apreciados por la industria alimentaria y las betalaínas pertenecen a esta categoría. Hay pocas fuentes de betalaínas en la naturaleza. Entre ellas está la remolacha roja, cuyas betalaínas son empleadas como aditivo colorante y son aceptadas por las regulaciones de varios países para su adición en los alimentos. En comparación con la remolacha, las betalaínas de cactus muestran olor y sabor fresco, libre del sabor a tierra producido por la geosmina y pirazina 2-metoxi-3-sec-butilo de remolacha; por esta razón los frutos de cactus pueden ser utilizados como colorantes en los alimentos, sin el impacto negativo de sabor de colorantes derivados de extractos de remolacha (Saénz *et al.*, 2009).

4.2. Distribución de las betalaínas en la naturaleza

Las betalaínas se pueden encontrar en raíces, flores y frutas; las pocas fuentes de betalaínas comestibles disponibles son la remolacha roja y amarilla (*Beta vulgaris* L. spp. *vulgaris*), acelgas de color morado (*Beta vulgaris* L. ssp. *Cicla*), granos u hojas de amaranto (*Amaranthus* sp.) y frutas de cactus (Cai *et al.*, 1998; Stintzing *et al.*, 2002b.; Kugler *et al.*, 2004; Vaillant *et al.*, 2005). El principal cultivo de betalaínas explotado comercialmente es el de la remolacha (*Beta vulgaris*) que contiene dos grandes pigmentos solubles: betanina (rojo) y vulgaxantina I (amarillo) (Azeredo, 2009).

4.2.1 Biosíntesis de las betalaínas

Las betalaínas son pigmentos que contienen nitrógeno y son solubles en agua; se sintetizan a partir del aminoácido tirosina en dos grupos estructurales: betacianinas que exhiben color rojo–violeta y betaxantinas de tonalidad amarillo – naranja. El ácido betalámico es el cromóforo común de todos los pigmentos de betalaínas. La naturaleza de la adición del ácido betalámico residual determina la clasificación del pigmento (Figura 2) como betacianina o betaxantina (Strack *et al.*, 2003).

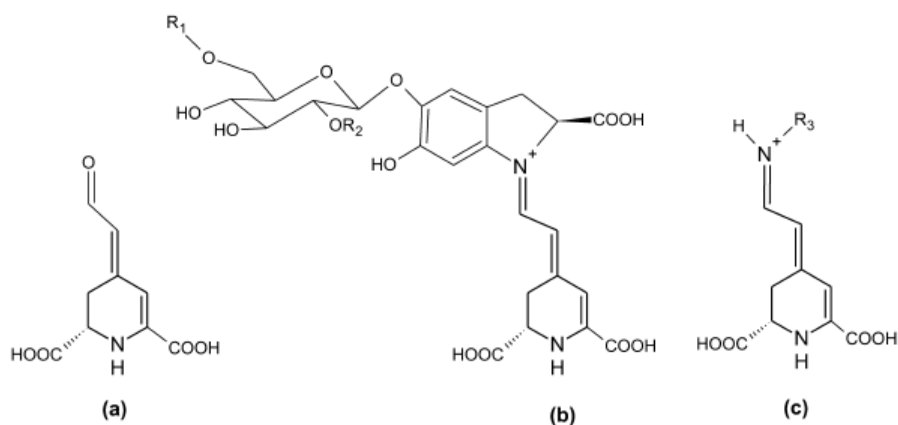


Figura 2. Estructura general del ácido betalámico (a), betacianinas (b) y betaxantinas (c). Betanina: R₁ = R₂ = H. R₃ = grupo amino o aminoácido (Strack *et al.*, 2003).

La conversión del ácido betalámico a betaxantina se produce por la condensación de ácido betalámico con uno de los compuestos amino, mientras que la condensación con cyclo – Dopa [cyclo –3– (3,4 – dihidroxifenilalanina)] da como resultado la formación de betacianinas (Neelwarne, 2012).

Una de las principales características de las betalainas es que absorben fuertemente la luz y de esta manera pueden ser identificadas por espectrofotometría. Las betacianinas absorben a 540 nm y las betaxantinas a 480 nm (Azeredo, 2009).

4.3. Factores que afectan la estabilidad de las betalainas

La degradación de las betalainas puede ocurrir por varios factores intrínsecos y extrínsecos que afectan la estabilidad y necesitan ser considerados para

asegurar la retención óptima del pigmento y color en alimentos que usen estos compuestos para pigmentación (Herbach *et al.*, 2006b).

4.3.1 Estructura y composición

En cuanto a aspectos estructurales, se ha informado que las betacianinas son más estables que las betaxantinas, tanto a temperatura ambiente como a temperaturas elevadas (Sapers y Hornstein, 1979). En comparación con la estabilidad de diferentes betacianinas, las estructuras glucosiladas son más estables que las agliconas, probablemente debido a mayor actividad de oxidación–reducción (von Elbe y Attoe, 1985). Las remolachas rojas tienen varias enzimas endógenas tales como β –glucosidasa, polifenoloxidasas y peroxidasas, que si no se inactivan adecuadamente por escaldado, pueden degradar las betalaínas y, por ende, el color (Escribano *et al.*, 2002).

4.3.2. Temperatura

La temperatura puede ser considerada como el factor que más influye en la degradación de las betalaínas durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos y sigue una cinética de reacción de primer orden, dependiente del pH (Castellar *et al.*, 2003). Al calentar soluciones de betanina se produce una reducción gradual del color rojo característico de este pigmento con la aparición de pardeamiento (Von Elbe *et al.*, 1974).

4.3.3. pH

Las betalaínas son relativamente estables en un rango de pH de 3 a 7 (Stintzing *et al.*, 2005), lo que permite su aplicación en alimentos con baja acidez. El pH óptimo para la máxima estabilidad de la betanina es 5–6. Las condiciones alcalinas causan hidrólisis del enlace almidina, mientras que la acidificación induce a la recondensación de ácido betalámico con el grupo amino de la adición residual (Schwartz y Von Elbe, 1983).

4.3.4. Actividad de agua (a_w)

La estabilidad de las betalaínas se ve afectada exponencialmente por la actividad de agua (a_w), que es un factor que determina la susceptibilidad de las betalaínas en la actividad hidrolítica, provocando la escisión del enlace almidina. Un producto con contenido de humedad de menos del 5 % es efectivo para prevenir la degradación de pigmentos de betalaínas, es decir, los pigmentos almacenados por debajo de una a_w de 0.64 son adecuados para alargar la estabilidad de los pigmentos rojos (Serris y Biliaderis, 2001).

4.3.5. Oxígeno

Las betalaínas reaccionan con el oxígeno molecular causando oscurecimiento del producto y pérdida del pigmento. La estabilidad de la betanina disminuye

linealmente con el aumento en la concentración de oxígeno (Czapski, 1990), siguiendo una cinética de primer orden en presencia de oxígeno, pero en ausencia de oxígeno su comportamiento se desvía de este modelo. Se ha recomendado que para aumentar la estabilidad del pigmento es necesario colocar las muestras en atmósferas con bajas concentraciones de oxígeno, incorporando antioxidantes (Han *et al.*, 1998) o utilizando atmósferas con nitrógeno (Drunkler *et al.*, 2006).

4.3.6. Luz

Existe una relación inversa entre la estabilidad de las betalaínas de betabel y la exposición a la luz. La degradación de betalaínas sigue una cinética de primer orden en presencia de oxígeno, ya que los efectos de la exposición a la luz son insignificantes bajo condiciones anaerobias (Attoe y von Elbe, 1981). Otros autores han observado que la adición de 0.1 % de ácido isoascórbico y 1 % de ácido ascórbico a jugo de betarraga y pitaya ha inhibido la degradación inducida por la luz durante el almacenamiento de betacianinas (Bilyk *et al.*, 1982; Herbach *et al.*, 2006a).

4.3.7. Metales

Algunos cationes metálicos tales como hierro, cobre, estaño y aluminio aceleran la degradación de la betanina. Puede ocurrir la formación de complejos metal–pigmento seguido esto por cambios batocrómicos e hipocrómicos. Resultados de

Czapski (1990) indican que el jugo de remolacha es menos susceptible a los efectos negativos de los iones metálicos en comparación con soluciones de betanina pura, debido probablemente a la presencia de agentes metal-complejos en el jugo. Los agentes quelantes, tales como ácido cítrico y EDTA se han reportado con capacidad para estabilizar la betanina contra la degradación catalizada por los metales (Herbach *et al.*, 2006a).

4.4. Rutas de degradación de las betalaínas

Los primeros informes sobre estabilidad de betalaínas sugieren que éstas pueden sufrir degradación a través de hidrólisis para formar ácido betalámico y ciclo – DOPA 5–O–glucósido (von Elbe *et al.*, 1974). La exposición de betanina a alta temperatura causa isomerización y descarboxilación, lo que resulta en la formación de estereoisómeros C–15 isobetanina y 15–descarboxibetanina, respectivamente. Recientes investigaciones en betabel han demostrado que la deshidrogenación resultante de betacianinas en C14/C15 corresponde a componentes–neo, provocando un cambio de color rojo a un tono amarillento. La descarboxilación en C17 y/o C2 y deshidrogenación en C14/15 son los más importantes en la desestabilización del pigmento (Herbach *et al.*, 2006b). En betacianinas, el C19, C20 y el grupo ácido carboxílico unido a C2 son los sitios más propensos a descarboxilación, mientras que la deshidrogenación ocurre entre los enlaces entre C2, C3, C14 y C15 (Figura 3). Otro factor que favorece de forma importante la estabilidad de las betalaínas es la concentración de la propia molécula de pigmento (Mobhammer *et al.*, 2005).

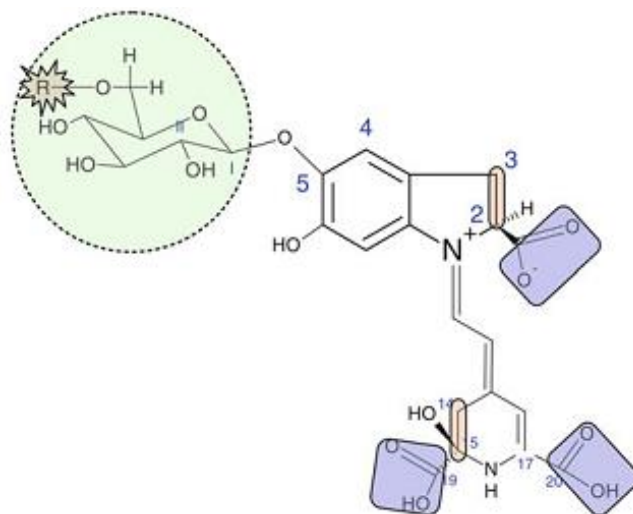


Figura 3. Grupos funcionales propensos a la degradación en betacianinas. Los sitios propensos por descarboxilación se muestran en cuadros azules, para deshidrogenación en rosa y para la desglicosilación en círculos verdes (Adaptado con modificaciones de Stintzing y Carle 2007).

4.5. Clasificación de colorantes alimentarios

Los colorantes alimentarios se pueden dividir en cuatro categorías: 1) colorantes naturales, 2) colorantes idénticos a los naturales, 3) colorantes artificiales y 4) colorantes inorgánicos. Los colorantes naturales son pigmentos sintetizados por organismos vivos. Estos se clasifican en: clorofilas, carotenoides, flavonoides, quinoides, cumarinas, indigoides, curcuminoides y betalaínas. Los colorantes idénticos a los naturales son pigmentos que se encuentran en la naturaleza, por ejemplo, caroteno, cantaxantina y riboflavina. Los colorantes sintéticos son colores artificiales que no se encuentran en la naturaleza, y son a menudo

colorantes azoicos. Los colorantes inorgánicos son aquéllos que en su composición química no contienen carbono, por ejemplo; dióxido de titanio, oro y plata (Aberoumand, 2011).

4.6. Extracción de betalaínas

Los materiales que contienen betalaínas generalmente se maceran. Los pigmentos pueden ser extraídos con agua, sin embargo, el uso de metanol o etanol (20–50 %) se requieren para completar la extracción (Delgado–Vargas *et al.*, 2002). Todos los pigmentos de betalaínas son solubles en agua, una propiedad explotada para extraer el pigmento. A escala de laboratorio la betanina puede obtenerse de forma cristalina, mediante el empleo de intercambio iónico, absorción y/o cromatografía de filtración en gel. Desafortunadamente estos métodos dan bajos rendimientos y por lo tanto son de muy poco o ningún valor comercial. Los azúcares libres presentes en extracto de betalaínas pueden provocar fermentación y caramelización durante el procesamiento de alimentos a altas temperaturas. Por lo tanto, la eliminación de estos azúcares es deseable, a fin de facilitar la aplicación de betalaínas en el procesamiento de alimentos. La extracción acuosa en dos fases (ATPE por sus siglas en inglés) ha sido reconocida como una técnica superior y versátil para la separación de biomoléculas (Chetana *et al.*, 2007).

4.7. Sistemas de extracción acuosa en dos fases (ATPE)

Generalmente el procesamiento de biomoléculas comprende cuatro etapas: extracción, aislamiento purificación y recuperación. La etapa de purificación es la etapa que representa más del 70 % del costo total de proceso. Los métodos convencionales de purificación de biomoléculas implican varios pasos de operaciones unitarias y por lo tanto, son generalmente costosos.

La extracción acuosa en dos fases (ATPE o ATPS) es un método alternativo para la separación de biomoléculas que reduce el número de pasos y por lo tanto reduce el costo general. ATPE es un método de extracción líquido-líquido que emplea dos fases acuosas y tiene aplicación en el campo de la biotecnología para la separación y purificación de materiales biológicos como proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, virus, antibióticos y organelos celulares.

En general hay dos tipos principales de ATPE y consisten en interacciones polímero/polímero y polímero/sal. Cuando se superan ciertas concentraciones de equilibrio o limitantes, se forman dos fases inmiscibles.

Las concentraciones limitantes dependen del tipo de componentes formadores de fase, del pH, de la fuerza iónica y de la temperatura de la solución. El polietilenglicol (PEG) se usa como una de las fases de formación de polímeros en sistemas ATPE porque está disponible a bajo costo. Debido al alto costo y alta viscosidad del sistema polímero/polímero, se prefieren los sistemas bifásicos polímero/sal. Por otra parte, el sistema polímero/sal tiene mayores diferencias en densidad, mayor selectividad, menor viscosidad y menor costo (Raja *et al.*, 2011). Las principales ventajas de los sistemas de ATPE son alta capacidad,

biocompatibilidad con el medio ambiente, baja tensión interfacial de fases, altos rendimientos, poco tiempo de proceso y bajo consumo de energía. Asimismo, tiene potencial para lograr la capacidad deseada y la concentración del producto en un solo paso (Chethana, Nayak, y Raghavarao, 2004; Chethana y Raghavarao, 2003).

4.8. Microencapsulación

La microencapsulación (ME) es una técnica mediante la cual compuestos activos sólidos, líquidos y gases (antioxidantes, sabores, bactericidas, etc.) se introducen en una matriz o sistema pared de naturaleza polimérica con el fin de protegerlos del medio ambiente, de su interacción con otros componentes del alimento o bien para controlar su liberación (Champagne y Fustier 2007).

La microencapsulación es considerada como uno de los métodos más usados para preservar compuestos de origen natural. El principal objetivo del proceso de encapsulación es crear una barrera entre el material núcleo y el medio ambiente (Desai y Park 2005).

El término microencapsulación se ha interpretado ampliamente para incluir a las microcápsulas, microesferas, nanocápsulas y sustancias activas atrapadas o embebidas. La técnica se utiliza ampliamente en la industria química, farmacéutica y alimentaria como un método para conservar materiales sensibles que pueden ser degradados por agentes ambientales. Algunos productos encapsulados son aceites, grasas, compuestos aromáticos, oleorresinas, vitaminas, colorantes, enzimas y microorganismos (Madene *et al.*, 2006).

Las microcápsulas (reservorio o matriz) tienen un tamaño entre 0.2 y 5000 μm . En contraste las macrocápsulas son más grandes que 5000 μm . Cápsulas más pequeñas que 0.2 μm son referidas a términos de nanocápsulas. Un gran número de términos se utilizan para describir el contenido interior de la microcápsula que incluyen el núcleo, material de núcleo, ingrediente, sustrato y agente activo. El material de revestimiento se denomina también portador o material de pared. La matriz o agente encapsulante puede ser seleccionada de una amplia variedad de polímeros naturales, dependiendo del agente activo a recubrir y las características deseadas en las microcápsulas finales (Ré, 1998).

Existen diferentes métodos para realizar el proceso de microencapsulación y, en general, se pueden clasificar en tres grupos:

- a. Procesos físicos, que incluyen secado por aspersión, extrusión, recubrimiento por lecho fluidizado y separación por suspensión rotacional.
- b. Procesos físico-químicos, basados en coacervación simple o compleja, liposomas y gelificación iónica.
- c. Procesos químicos, caracterizados por Inclusión molecular, polimerización interfacial y cocrystalización.

A pesar del gran número de opciones disponibles para la microencapsulación de sabores y colores, el secado por aspersión es la técnica más empleada por la industria alimentaria por ser un método eficiente y de bajo costo (Pituala *et al.*, 2010).

4.8.1. Secado por aspersión

El secado por aspersión es la técnica más utilizada para la encapsulación de ingredientes alimentarios. Es la transformación de un fluido (solución, dispersión o pasta) a partículas sólidas en un proceso continuo que implica la combinación de varias etapas: atomización, mezcla de pulverización y del aire, evaporación y separación del producto.

La selección del atomizador es una de las opciones más importantes, ya que tiene un efecto significativo sobre la distribución del tamaño de las partículas secas. Un equipo de secado por aspersión se compone básicamente de un sistema de alimentación del líquido, dispositivo de atomización con una boquilla, cámara de secado y un sistema colector del producto seco (Figura 4).

Las características del atomizador más importantes desde el punto de vista de la calidad del producto son la uniformidad de tamaño de gota, control de la distribución de gota grande y la homogeneidad de la pulverización. La forma de los atomizadores más comunes son atomizadores de presión, atomizadores centrífugos (ruedas) y neumáticos (dos fluidos) (Ré, 1998).

Al momento de que las partículas atomizadas entran en contacto con el aire de secado se produce instantáneamente la evaporación del disolvente (normalmente agua). La alta tasa de evaporación conduce a la formación de costra en la superficie de la partícula. A pesar de las altas temperaturas utilizadas en el proceso, la evaporación del solvente produce frigorías centrípetas que enfrían el sólido y lo protegen del choque térmico, el corto tiempo de exposición y la absorción de calor durante la evaporación del disolvente reducen la

probabilidad de daño por calor al material del núcleo. Finalmente las partículas secas se separan del aire usando un ciclón (Kandansamy y Somasundaram, 2012).

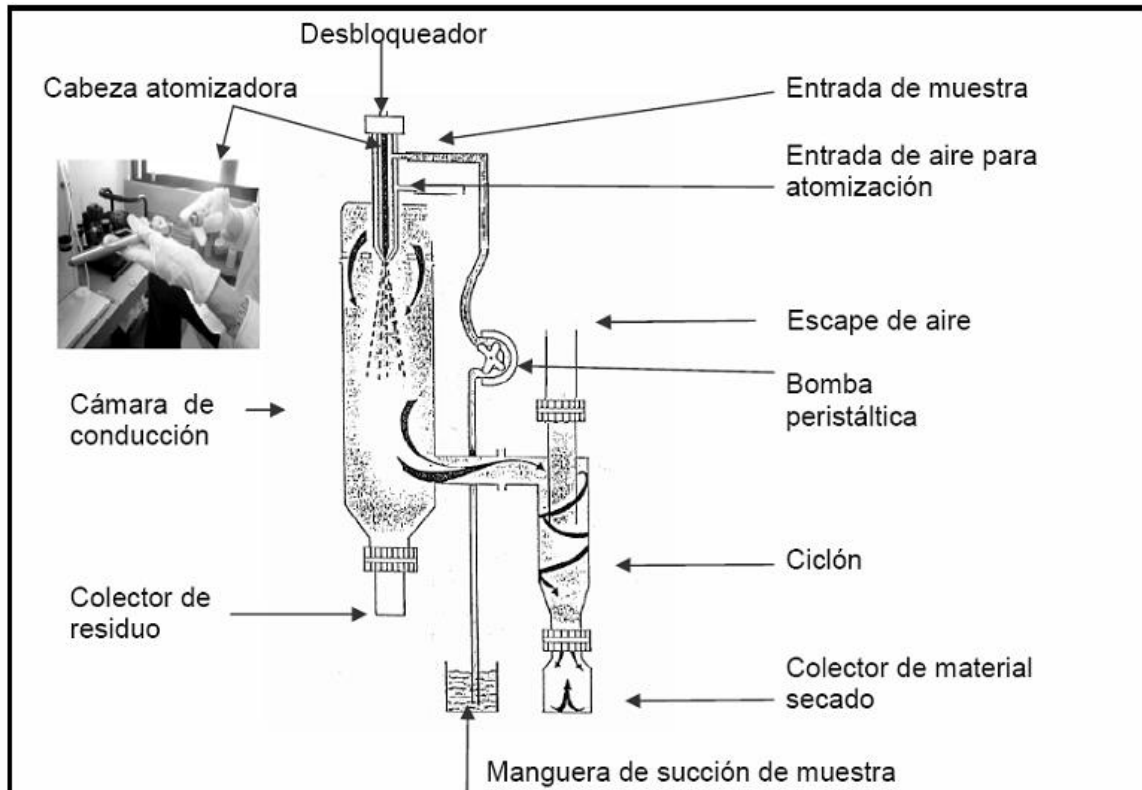


Figura 4. Esquema de un secador por aspersión (Martínez, 2007).

4.8.2. Descripción del proceso de secado por aspersión

El secado por aspersión es una operación unitaria por la que un producto líquido es atomizado en una corriente de aire caliente para obtener instantáneamente un polvo. El gas comúnmente usado es aire y raramente se utiliza gas inerte como nitrógeno. El líquido alimentado inicialmente al secador puede ser una solución, emulsión o suspensión. El secador produce, dependiendo del material

alimentado al inicio y condiciones de operación, un polvo muy fino (10–50 μm) o partículas de gran tamaño (2–3 mm).

El secado por aspersión es utilizado en la industria alimentaria para disminuir el contenido y actividad de agua para asegurar estabilidad microbiológica del producto, evitar el riesgo de degradación química y/o biológica, reducir el almacenamiento, costos de transporte y finalmente obtener un producto con propiedades específicas por ejemplo, solubilidad instantánea.

La microencapsulación involucra cuatro etapas: preparación, homogenización, atomización y deshidratación. Para fines de encapsulación se utilizan polisacáridos (almidones, maltodextrinas, jarabe de maíz y gomas), proteínas y lípidos (ceras) que son hidratados para ser usados como material de pared. El material de núcleo se homogeneiza con el material pared; la mezcla se alimenta al secador por aspersión atomizado con una boquilla. A continuación el agua se evapora por contacto con el aire caliente.

Las cápsulas secas son colectadas en un separador usando un ciclón. La elección del atomizador utilizado depende de la viscosidad del material de alimentación. Durante la operación de contracorriente, el líquido y el aire caliente son asperjados en la misma dirección con un rango de temperatura de entrada y salida de 140–220 °C y 50 – 80 °C, respectivamente, que limitan la degradación térmica (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

4.8.3. Condiciones de operación del secado por aspersión

El factor más importante que optimiza las condiciones de secado por aspersión incluyen velocidad de alimentación del flujo, temperatura de entrada y salida, temperatura de alimentación (Liu *et al.*, 2004). La rápida evaporación de la humedad en un corto espacio de tiempo asegura la temperatura del material del núcleo por debajo de los 40 °C. En comparación con el secado por congelación, el costo del método de secado por aspersión es hasta 50 veces más barato. La principal limitante del secado por aspersión es el número limitado de materiales de pared disponibles y que deben ser solubles en agua (Desai y Park, 2005).

4.8.4. Materiales de pared

La elección del material de pared para la microencapsulación por secado por aspersión es muy importante para la eficiencia de microencapsulación y estabilidad de las microcápsulas. Los criterios para seleccionar un material de pared en el secado por aspersión son: alto grado de solubilidad, viscosidad limitada de la solución a 35–45 % de sólidos, buenas propiedades emulsionantes, buenas propiedades de secado, carácter higroscópico, sabor suave, no debe ser reactivo y tener bajo costo (Reineccius, 2006).

Cada micropartícula es una pequeña esfera con pared uniforme alrededor. La más simple de las microcápsulas consiste de un núcleo rodeado por una pared con espesor uniforme o no uniforme. El material de pared puede ser utilizado

como capa simple o múltiple (Kandansamy y Somasundaram, 2012) como se muestra en la Figura 5.

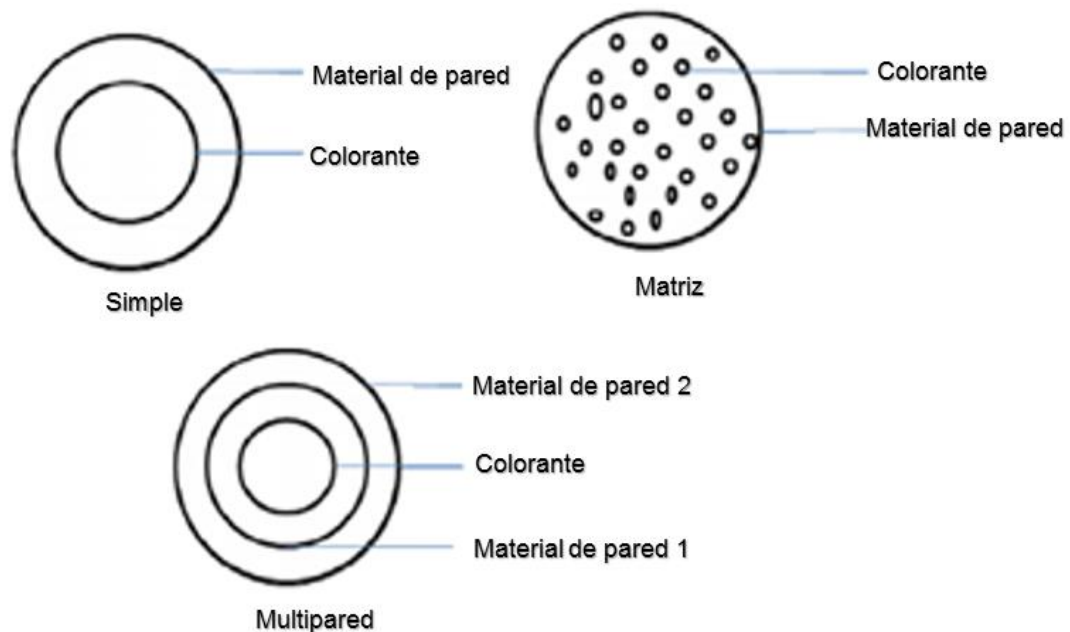


Figura 5. Estructura común de una microcápsula (Kandansamy y Somasundaram 2012).

Los diferentes tipos de agentes de encapsulación que se han empleado en el secado por aspersión incluyen polisacáridos (almidones, maltodextrinas, jarabes de maíz y goma arábica); lípidos (ácido esteárico, mono y diglicéridos) y proteínas (gelatina, caseína, suero de leche, soja y trigo) (Saénz *et al.*, 2009). El agente de encapsulación más conocido para aplicaciones en alimentos en el proceso de secado por aspersión es la goma arábica.

Sin embargo, debido a que esta goma crece de manera natural en el Medio Oriente su costo, disponibilidad y calidad son imprevisibles, por lo que se ha

buscado el desarrollo de nuevas alternativas de materiales encapsulantes utilizados en el secado por aspersión que remplace a esta goma y proporcione una vida de anaquel estable y que sea de bajo costo. Los productos que se han sugerido para tal uso son los almidones (Murúa–Pagola *et al.*, 2009). Dentro de los almidones más importantes destacan el almidón de papa (*Solanum tuberosum*), maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticumaestivum*) y arroz (*Oryza sativa*), (Yañez *et al.*, 2002; Fuchs *et al.*, 2006; Lokuwan, 2007).

Generalidades del almidón. El almidón es la principal fuente dietética de carbohidratos; es el polisacárido de almacenamiento más abundante en las plantas y se produce en forma de gránulos en el cloroplasto de las hojas verdes y amiloplasto de semillas, legumbres y tubérculos (Ochubiojo y Rodríguez, 2012). Entre los polímeros de carbohidratos, el almidón actualmente está recibiendo mucha atención, debido a su utilidad en diferentes productos alimenticios. El almidón contribuye en gran medida a las propiedades texturales de muchos alimentos y es ampliamente utilizado en alimentos y aplicaciones industriales como espesante, estabilizador coloidal, agente gelificante, agente de carga y agente de retención de agua.

Las propiedades físico–químicas, características funcionales y la singularidad del almidón en varios productos alimenticios varían de acuerdo con su origen biológico. Los almidones de diferentes fuentes vegetales, como trigo, maíz, arroz y papa han recibido mucha atención en relación con su estructura y propiedades físico–químicas. El almidón nativo es buen estabilizador de textura y regulador en sistemas alimentarios, pero las limitaciones como baja resistencia al corte,

resistencia térmica, descomposición térmica y alta tendencia a la retrogradación, limitan su uso en algunas aplicaciones industriales (Singh *et al.*, 2007), por lo tanto deben ser modificados químicamente y/o físicamente para mejorar sus atributos y/o minimizar sus defectos (Chiu y Solarek, 2009).

La modificación del almidón se logra generalmente a través de procesos de derivatización tales como eterificación, esterificación, entrecruzamiento y modificación dual; descomposición por hidrólisis ácida o enzimática y oxidación del almidón o tratamiento físico del almidón utilizando calor o humedad, etc.

La modificación química implica la introducción de grupos funcionales en la molécula de almidón, dando como resultado la alteración notable de las propiedades físico-químicas. Dicha modificación al gránulo de almidón nativo altera profundamente su gelatinización, adherencia y comportamiento de retrogradación (Cuadro 1). En términos moleculares, el gránulo de almidón es una estructura altamente organizada. Cuando los gránulos se observan bajo la luz polarizada de un microscopio, aparece una cruz típica de birrefringencia, como dos bandas interceptándose (denominada cruz de malta), la cual indica que existe un alto grado de orden molecular dentro del gránulo.

El agua es un componente integral de la estructura del gránulo y participa en el proceso de hidratación que toma lugar durante la gelatinización y en el subsecuente hinchamiento y disolución del gránulo (Liu, 2005).

Los gránulos de almidón cuando se extraen y se secan tienen apariencia de un polvo blanco y son insolubles en agua fría.

Cuadro 1. Tipos de modificación del almidón y técnicas de preparación

Modificación	Tipos	Preparación
Física	Tratamiento con calor/humedad	Tratamiento por calor y humedad: calentamiento del almidón a una temperatura superior a su punto de gelatinización con insuficiente humedad para causar la gelatinización. Precocido: calentamiento de una suspensión de almidón granular a temperatura por debajo de su punto de gelatinización durante periodos prolongados de tiempo.
	Pregelatinización	Pregeles/instantáneos: preparados en agua fría utilizados en el procesamiento de secado en tambor/aceite en aerosol/extrusión basados en solventes.
Conversión	Hidrólisis ácida parcial	Tratamiento con ácido orto-fosfórico, clorhídrico o sulfúrico.
	Hidrólisis enzimática parcial	Tratamiento en solución acuosa a temperatura por debajo del punto de gelatinización con una o más enzimas amilolíticas de grado alimenticio.
	Tratamiento álcali	Tratamiento con hidróxido de sodio o hidróxido de potasio.
	Blanqueo/oxidación	Tratamiento con ácido peracético, peróxido de hidrógeno, hipoclorito de sodio, clorito de sodio, dióxido de azufre, permanganato de potasio, persulfato de amonio.
Derivatización	Piroconversión (dextrinización)	Pirodextinas: preparadas por acidificado del almidón seco tostado.
	Esterificación	Almidón hidropropil: esterificación con óxido de propileno.
	Esterificación	Almidón acetilado: esterificación con anhídrido acético o acetato de vinilo. Acetilado adipado de dialmidón: esterificación con anhídrido octenilsuccinico. Almidón octenil succinatado de sodio: esterificación con anhídrido octenilsuccinico.
	Entrecruzamiento	Monoalmidón fosfatado: esterificación con ácido orto – fosfórico, orto fosfato de sodio o potasio o tripolifosfato de sodio. Dialmidón de fosfato: combinación de tratamientos para monoalmidón fosfato y dialmidón fosfato.
	Modificación dual	Dialmidón fosfato acetilado: Esterificación por trimetafosfato de sodio u oxiclورو de sodio combinado con esterificación con anhídrido acético o acetato vinilo. Dialmidón hidropropil fosfato: Esterificación con trimetafosfato de sodio u oxiclورو de fósforo combinado con esterificación por óxido de propileno.

Fuente: Singh *et al.*, 2007.

En forma general presentan una composición química con bajos contenidos de proteína, cenizas, lípidos y el resto, lo forma el almidón; estos constituyentes en muchas ocasiones juegan un papel importante en las propiedades funcionales del almidón (Agustiniano, 2004). Alrededor del 70% de la masa del gránulo de almidón se considera amorfa y aproximadamente 30% como cristalino. Las regiones amorfas contienen principalmente amilosa con una parte considerable de amilopectina. La región cristalina se compone fundamentalmente de amilopectina (Sajilata *et al.*, 2006).

Estructura del almidón. El almidón es químicamente un homopolímero de glucosa, formado por amilosa, con enlaces lineales α -D (1,4), y por amilopectina, con enlaces ramificados α -D (1,6) (Figura 6). El almidón es la molécula de almacenamiento de energía de las plantas y está ampliamente disponible como un recurso para la industria, denominado seguro para consumo humano (Sweedman *et al.*, 2013).

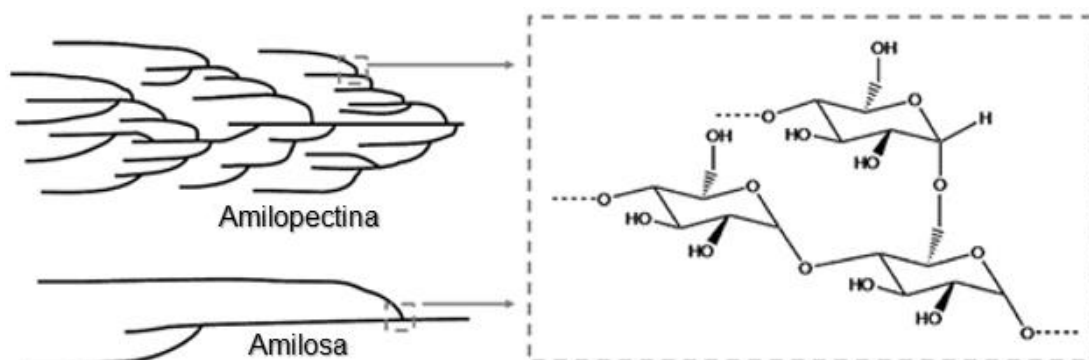


Figura 6. Estructura y composición del almidón (Sweedman *et al.*, 2013).

Amilosa. La amilosa es lineal o ligeramente ramificada, tiene un grado de polimerización de hasta 6000. Las cadenas pueden formarse fácilmente solas o con doble hélice. Tiene peso molecular moderado del orden de $\sim 10^6$, el tamaño de su estructura depende del origen botánico y de los métodos de extracción (Tester *et al.*, 2004).

La abundancia de grupos hidroxilo a lo largo de las moléculas de amilosa imparte propiedades hidrofílicas al polímero, dándole mayor afinidad por el agua.

Debido a su naturaleza lineal, su movilidad y la presencia de numerosos grupos hidroxilo a lo largo de las cadenas del polímero, las moléculas de amilosa tienden a orientarse de forma paralela y acercarse lo suficiente como para permitir la formación de enlaces de hidrógeno entre cadenas adyacentes. Como resultado, la afinidad de los polímeros por el agua se reduce y la solución que forman se vuelve opaca (Liu, 2005).

Amilopectina. La amilopectina tiene peso molecular de aproximadamente dos órdenes de magnitud superior a la amilosa, es muy ramificada y tiene un alto grado de polimerización, por lo que es una de las moléculas más grandes de la naturaleza. Tiene longitudes típicas de cadena de 20 a 25 unidades de glucosa entre los puntos de ramificación (Ochubiojo y Rodríguez, 2012). El gran tamaño de la molécula reduce su movilidad en solución y elimina la posibilidad de formación de enlaces hidrógeno entre cadenas adyacentes.

Dependiendo de la fuente, la amilopectina es el principal componente en la mayoría de los almidones (70–80 %) y puede alcanzar niveles de 98–99 % en los almidones tipo cerosos. El almidón presenta numerosas propiedades funcionales

que dan lugar a diversas aplicaciones en alimentos y otras ramas industriales. El almidón es utilizado como agente espesante, de cobertura, gelificante, adhesivo y agente encapsulante. La gelatinización, retrogradación y formación de pasta son los tres fenómenos más importantes que definen la funcionalidad del almidón en sus diferentes aplicaciones.

Modificación de almidón por extrusión reactiva. Las modificaciones químicas del almidón se llevan a cabo tradicionalmente en solución acuosa, donde la microestructura del gránulo del almidón impone el control difusional (porosidad de su membrana y la canalización a su interior) sobre los ingredientes reactivos, retrasando así la conversión de los componentes interiores. La reacción puede tardar hasta 24 h para llegar a la conversión completa y se lleva a cabo a temperaturas relativamente bajas (~35–50 °C), para evitar la gelatinización del almidón. La modificación del almidón ha surgido como una alternativa interesante, tradicionalmente conducida por extrusión reactiva. La reacción es relativamente rápida llevándose a cabo a elevadas temperaturas (130–150 °C), evitando el costo elevado de recuperación y eliminación de solvente. El método se basa en la gelatinización para proporcionar la exposición rápida al interior de los polisacáridos dentro del almidón, ayudados por el daño mecánico a los gránulos (Wang *et al.*, 2012).

Por otra parte, es conveniente una hidrólisis adicional al almidón para propósitos de microencapsulación. Durante la extrusión el almidón se calienta, transporta y comprime por un tornillo único o de doble husillo que es presionado hacia una boquilla a alta temperatura donde sufre cambios moleculares. Las condiciones

de extrusión pueden convertir al almidón de un material granular y semicristalino a un material plástico altamente viscoso (Brümmer *et al.*, 2002). Esta conversión es acompañada por la disrupción de la estructura cristalina de los polímeros de almidón y su reducción a moléculas más pequeñas (Vasanthan *et al.*, 2001).

Almidón modificado por fosfatación. Los almidones fosfatados están diseñados para superar las deficiencias mostradas por los almidones nativos. La modificación puede llevarse a cabo a través de la esterificación de los grupos hidroxilos con agentes fosforilantes, tales como el tripolifosfato de sodio (TPS), meta fosfato de sodio y oxiclورو de fósforo (Kim *et al.*, 1999; Sitohy *et al.*, 2000). De acuerdo a la FDA el fósforo residual para uso alimentario está regulado en base al agente fosfatante empleado. Para el almidón modificado por TPS el límite en el grado de sustitución (GS) está establecido en 0.04. La Figura 7 muestra la representación de un almidón fosfatado con TPS. El reactivo TPS es un anhídrido parcial del ácido ortofosfórico y es utilizado para formar ortofosfatos de almidón monoéster con un GS de 0.02. Puede usarse a temperaturas moderadas (100 °C a 120 °C) en la fosfatación del almidón.

El almidón fosfatado por esterificación ha sido preparado para alcanzar niveles de fosfatación mayores del 2 % por la vía de los métodos convencionales. Sin embargo, la fosfatación mediante el método de extrusión reactiva, normalmente producen almidones fosfatados a un nivel mucho menor de fósforo que van del 0.1 al 0.4 % (Kim *et al.*, 1999).

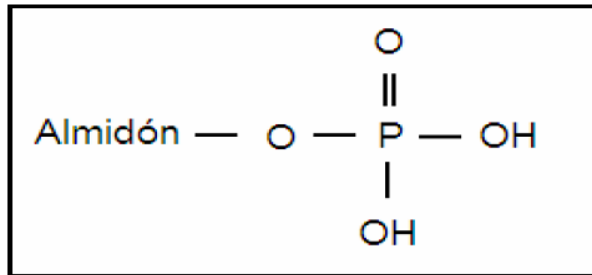


Figura 7. Almidón modificado con tripolifosfato de sodio (Martínez *et al.*, 2007).

Almidón modificado por succinatación. Los almidones OSA se obtienen de la reacción de esterificación entre los grupos hidroxilo del almidón y octenil anhídrido succínico. Un parámetro comúnmente utilizado en este sentido es el grado de sustitución (GS), que es el número promedio de octenil succinato (OS) derivado por unidad de glucosa. La vía de síntesis más ampliamente descrita es una reacción en medio acuosa bajo condiciones alcalinas suaves con el almidón en su forma granular. Las condiciones ligeramente básicas ayudan a reducir los enlaces de hidrógeno entre las cadenas de almidón, que en consecuencia favorece la difusión de las moléculas de OSA dentro de los gránulos de almidón hinchados (Sweedman *et al.*, 2007) (Figura 8).

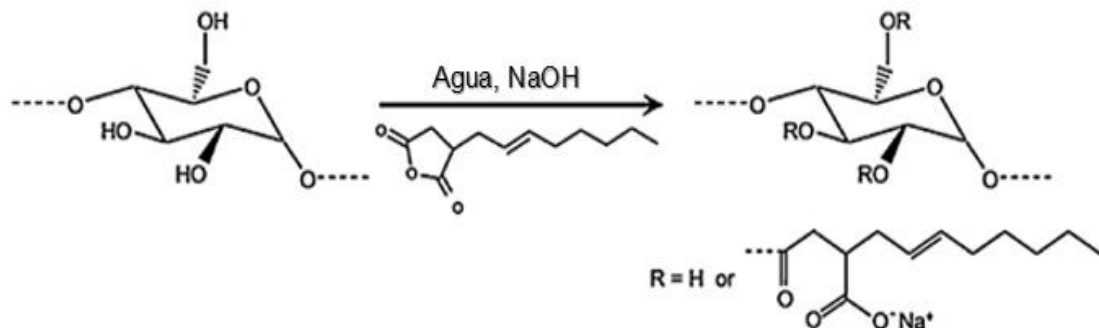


Figura 8. Estructura de almidón modificado por anhídrido n–octenil succínico (Sweedman *et al.*, 2013).

La FDA establece un nivel de anhídrido n-octenil succínico (OSA) como agente modificante de almidón para su uso en alimentos del 3 % ($\sim$ GS= 0.02). El grado de sustitución (GS) es el número promedio de grupos hidroxilo sustituidos por unidad de glucosa (Zhu *et al.*, 2011). La sustitución puede ocurrir en las posiciones 2, 3, y 6 de los carbonos de la unidad de glucosa. El anhídrido más utilizado para esta modificación es el anhídrido n-octenil succínico (OSA) (Martínez, 2007).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

Se utilizaron frutos de pitaya de mayo (*Stenocereus pruinosus*) como fuente de betalaínas, los cuales fueron obtenidos de una plantación localizada en el municipio de Huaquechula, Puebla, México.

Los frutos fueron almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en bolsas de polietileno de forma individual hasta su análisis posterior. Para la extracción de betalaínas se utilizó etanol al 96 % de pureza.

Para el sistema acuoso en dos fases (ATPE) se utilizó polietilenglicol 4000 (PEG 4000) adquirido de Bioultra (Sigma, México) y sulfato de amonio granular (SA) obtenido de ACS (J. Bayer, México) para eliminar biomoléculas de interés del extracto de pitaya (azúcares y mucílago). La fase polimérica (PEG) presente en las betalaínas fue retirada con cloroformo (Química Meyer, México).

Se usó almidón nativo de papa (Corn Products, México) y se modificó químicamente con tripolifosfato de sodio (TPS) (fosfatación) y anhídrido n-octenil succínico (succinatación) de grado reactivo marca Sigma-Aldrich S.A de C.V., México, para ser utilizado como material de pared en la microencapsulación de betalaínas. El material pared testigo fue almidón comercial succinatado (N-Lok Heamz-405) adquirido de National Starch and Chemical Co. (USA).

5.2. Metodología

5.2.1. Extracción de betalaínas por el método ATPE

Se preparó un extracto de pitaya y se procedió a su purificación para obtener betalaínas libres de azúcares, encapsularlas y aplicarlas a un sistema modelo de yogurt de acuerdo a la siguiente metodología.

5.2.2. Preparación del extracto de pitaya

La extracción de betalaínas se obtuvo a partir de frutos de pitaya (15 kg), los cuales se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se descongelaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para proceder a la extracción. Se eliminó el mesocarpio de la pulpa manualmente. La pulpa obtenida se molió con una batidora de mano (Braun, México) para facilitar la extracción de betalaínas, mantener integra las semillas del fruto y así evitar la extracción de aceites. La pulpa obtenida se maceró con una solución etanol-agua 1:1 en proporción 1:2 de pulpa de pitaya-solución etanólica durante 15 h. Posteriormente se realizó un primer filtrado con un tamiz de $250\text{ }\mu\text{m}$ para separar los sólidos de mayor tamaño. Después se hizo un segundo filtrado con tela pellón aplicando vacío tres veces hasta la clarificación de la pulpa. El extracto etanólico obtenido se concentró en un rotavapor (Heidolph, Alemania) a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $112,896\text{ g}$ por 60 min en lotes de 500 mL. El extracto obtenido por lotes se homogeneizó en una parrilla de agitación magnética y posteriormente se almacenó en viales ámbar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis posterior.

5.2.3. Cuantificación de betalaínas por el método de espectrofotometría

La cuantificación de betalaínas se llevó a cabo de acuerdo a la metodología de Stintzing *et al.*, (2005). Los extractos acuosos de los pigmentos se diluyeron con una solución buffer (0.1 M de ácido cítrico y 0.2 M de disodiofosfato 29/71 v/v). El contenido de betacianinas (BC) y betaxantinas (BX) se calculó de acuerdo a la ecuación (1):

$$\text{BC o BX [mg L}^{-1}\text{]} = \frac{(A)(FD)(PM)(1000)}{(\epsilon)(l)} \quad (1)$$

donde A es el valor de absorción; FD es el factor de dilución y l es la longitud del trayecto de la celda (1 cm).

Para la cuantificación de betaxantinas y betacianinas se usaron los pesos moleculares (PM) y coeficientes de extinción molar (ϵ) de betanina (PM = 550 g mol⁻¹, ϵ = 60 000 L mol⁻¹ cm⁻¹; λ = 538 nm) y de indicaxantina (PM = 308 g mol⁻¹; ϵ = 48 000 L mol⁻¹, cm⁻¹; λ = 480 nm) como compuestos de referencia. Todas las mediciones se realizaron por triplicado usando un espectrofotómetro UV–VIS (Cintra, Japón).

5.2.4. Cuantificación de betalaínas en las microcápsulas

Las betalaínas totales y superficiales en las microcápsulas se cuantificaron de acuerdo Stintzing *et al.*, (2005).

5.2.4.1. Cuantificación de betalaínas totales. Para liberar las betalaínas de las microcápsulas se usó la metodología reportada por Otálora *et al.*, (2015) con algunas modificaciones. Se pesaron 100 mg de microcápsulas y se dispersaron en 5 mL de agua destilada. Esta suspensión se agitó usando un vortex durante 1 min a temperatura ambiente (25 °C) y luego un ultrasonificador por 20 min dos veces. La muestra se centrifugo durante 20 min a 112,896 g. Se recuperó el sobrenadante y al precipitado se le hizo un lavado con 5 mL de agua destilada siguiendo la misma metodología inicial, excepto la ultrasonificación. Los dos sobrenadantes obtenidos se reunieron y homogenizaron en un vortex durante un min.

5.2.4.2. Cuantificación de betalaínas superficiales. Se trataron 100 mg de microcápsulas con 2 mL de una mezcla de etanol y metanol (1:1). Estas dispersiones se agitaron en un vortex a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 min, se centrifugaron a 112,896 g por 20 min. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se filtró usando acrodiscos whatman de 0.45 µm.

5.2.5. Preparación del diagrama de extracción acuoso en dos fases

Se construyó un diagrama de extracción acuosa en dos fases (ATPE) por triplicado mediante el método del punto de turbidez (Li *et al.*, 2005) con soluciones de PEG 4000 y sulfato de amonio [SA; (NH₄)₂SO₄] al 20 % p/p, respectivamente, para identificar mezclas PEG–SA de una fase y mezclas de dos fases inmiscibles y así conocer la concentración exacta de PEG y SA para eliminar biomoléculas

de interés del extracto de betalaínas. Se colocó 1 g de PEG 4000 en solución al 20 % (p/p) en un tubo de ensayo. Posteriormente se añadió gota a gota la solución de SA al 20 % hasta alcanzar turbidez, esto como parámetro para la formación de un sistema acuoso en dos fases, después de permitir reposo durante 10 min.

Se registró el peso del sistema con las gotas de solución de SA añadidas y enseguida se añadió agua gota a gota para obtener un sistema de una sola fase transparente, se registró la cantidad de agua agregada al sistema, y nuevamente se añadió sulfato de amonio para formar el sistema acuoso en dos fases, repitiendo el mismo procedimiento sucesivamente hasta originar una sola fase en el sistema. Los datos se sometieron a rutinas de regresión lineal y se verificó la formación de dos fases inmiscibles.

5.2.6. Preparación de la muestra de betalaínas para eliminación de azúcares por el método de ATPE

Se prepararon soluciones con PEG-4000 y sulfato de amonio en concentración de 9.0 y 10 %, respectivamente, utilizando extracto de pitaya con 26.3 °Brix de sólidos solubles totales como medio de disolución. El contenido fue mezclado vigorosamente con un agitador magnético y posteriormente se permitió reposo durante 8 h a 4 °C para favorecer la formación del sistema de dos fases y la acumulación de betalaínas en la fracción polimérica superior (PEG) y la de azúcares en la fracción salina inferior (SA). Las fases se separaron por decantación, donde la fase polimérica superior fue la de interés, debido a que en

ella se encontraba la mayor concentración de betalaínas. Para la separación de PEG y betalaínas se usó cloroformo (Chetana *et al.*, 2007) en proporción 1:1.

5.2.7. Cuantificación de azúcares

Para confirmar la separación de azúcares del extracto de pitaya fue necesario cuantificar los azúcares totales, el cual se hizo por el método de Antrona (Osborne y Voogt, 1986), utilizando un espectrofotómetro UV/Vis (Cintra, Japón) a una longitud de onda de 630 nm. Esta prueba estima los carbohidratos soluble totales, reaccionando con éstos y produciendo un color azul. La reacción ocurre con mono, di y polisacáridos, dextras, dextranas, almidones, gomas y glucósidos. El ensayo se realizó como se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Montaje del ensayo para determinación de azúcares totales por el método de Antrona.

Tubo	1	2	3	4	5	6
Extracto (mL)	0	0	0	0	0	1
Agua destilada (mL)	1	0.9	0.7	0.5	0.3	0
Patrón de glucosa (300 µg/mL)	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0
Reactivo de antrona (mL)	10	10	10	10	10	10

Fuente: Elaboración propia.

Se mezcló cada una de las muestras y se mantuvieron en baño maría por 10 min, tras lo cual, se dejaron enfriar y fueron sometidas a lectura de absorbancia a 630

nm. Se obtuvo una curva de calibración con los datos de concentración de los tubos del 1 al 5 referidos en el Cuadro 2. Una vez obtenidos los valores de la curva de calibración se interpolaron las lecturas de los tubos problema y se determinó la concentración de azúcares totales.

5.2.7.1. Preparación del reactivo de antrona. Se adicionaron 660 mL de ácido sulfúrico concentrado a 340 mL de agua, realizando esta operación dentro de un recipiente con hielo, debido a que se produce una reacción exotérmica. Posteriormente se agregaron 10 g de tiourea y 0.5 g de reactivo antrona, agitando constantemente hasta la disolución de los reactivos.

5.2.7.2. Preparación de extractos con azúcares. Se pesaron 20 g de extracto liofilizado de betalainas con presencia y ausencia de azúcares. A cada una de las muestras se agregó 50 mL de alcohol al 70 % y se dejó a ebullición en baño maría durante 15 min. Se filtraron los extractos y se aforaron a 100 mL con alcohol al 70 %. Se tomaron 10 mL de las muestras y se centrifugaron a 112,896 g durante 15 min.

5.2.7.3. Aclaramiento de los extractos. Los extractos obtenidos anteriormente, además de contener azúcares, también tienen otras sustancias, generalmente aminoácidos, que pueden reaccionar durante el desarrollo del método. Para evitar esto se usan agentes clarificantes como crema de albumina, soluciones de nitrato o acetato de plomo. En este caso se utilizó la solución de Carrez (Pearson, 1976) preparada con las siguientes soluciones:

Solución A. Se agregó 21.9 g de acetato de zinc cristalizado más 3 mL de ácido acético glacial y se aforó a 100 mL.

Solución B. Se agregó 10.6 g de ferrocianuro potásico cristalizado y se aforó a 100 mL.

La solución a clarificar se mezcló con 5 mL del reactivo A. Posteriormente se añadieron 5 mL del reactivo B y se homogeneizó. Se filtró la muestra y se midió el volumen antes y después.

5.2.8. Cuantificación de mucílago

La extracción y cuantificación de mucílago se realizó de acuerdo a (Armenta y Peña-Valdivia, 2009). Se agregaron 5 mL de agua destilada a 0.5 g de muestra liofilizada y se calentaron a 92 °C en baño maría durante 15 min. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 112,896 g durante 30 min a 25 °C.

El sobrenadante se reunió con el obtenido de una segunda extracción con 2.5 mL de agua caliente. Por cada parte de extracto precipitado se adicionaron cuatro partes de etanol acidificado con HCl al 0.1 % y pH de 4.8. Las muestras se dejaron reposar durante 24 h en refrigeración a 8 °C, se centrifugaron a 112,896 g por 15 min a 25 °C, y se eliminó el sobrenadante.

Para eliminar los residuos de etanol las muestras se deshidrataron durante 6.5 h en un horno de convección (Riossa, México) a 85 °C $\pm$ 2 °C hasta peso constante y el residuo se cuantificó como porcentaje de mucílago por gramo de materia seca (P), con la Ecuación (2):

$$P = \frac{M1 - Mo}{M} \times 100 \quad (2)$$

donde, P es porcentaje de mucílago por gramo de materia seca; Mo es peso en gramos del tubo vacío; M1 es peso en gramos del tubo con liofilizado; M es peso de la muestra de jugo liofilizado de las pitayas.

5.2.9. Contenido de sólidos solubles totales

El contenido de sólidos solubles totales del extracto de pitaya se determinó usando un refractómetro de mano digital Modelo: PAL-1 (Atago Co, Japón) a 25 °C, calibrado con agua destilada. El contenido de sólidos solubles totales fue expresado como °Brix.

5.2.10. Estudio de estabilidad acelerado de betalaínas con y sin azúcares durante almacenamiento

Las muestras liofilizadas de betalaínas con azúcares (CAz) y sin azúcares (SAz) se sometieron a un estudio de estabilidad en las condiciones degradantes y óptimas, respectivamente, mostradas en el Cuadro 3. Las muestras liofilizadas se transfirieron a un vial de vidrio transparente 16x150 mm y las pruebas se hicieron por triplicado. El estudio se realizó por 12 h. Para cuantificar las betalaínas en las muestras, los tubos fueron retirados cada 2 h.

Cuadro 3. Estudio de estabilidad de betalaínas con y sin azúcares.

Factores ambientales				
Condiciones	Muestra	Temperatura (°C)	pH	Con luz y sin luz
Degradantes	CAz	60	4.0	Con luz
	SAz	60	4.0	Con luz
Óptimas	CAz	4	5.5	Sin luz
	SAz	4	5.5	Sin luz

Caz: muestra de betalaínas con azúcares; Saz: muestra de betalaínas sin azúcares. Fuente: Elaboración propia.

5.2.11. Encapsulación de betalaínas

Para la encapsulación de betalaínas se propuso generar materiales de pared a partir de almidón nativo de papa. Este se modificó químicamente por extrusión reactiva con TPS y n-OSA de acuerdo a la siguiente metodología:

5.2.11.1. Modificación química de almidón nativo de papa. Se modificó químicamente por extrusión reactiva con TPS y n-OSA de acuerdo a la metodología de Murúa-Pagola *et al.*, (2009).

5.2.11.2. Hidrólisis ácida. Como etapa previa a la modificación química del almidón nativo de papa con TPS y n-OSA, se llevó a cabo una hidrólisis ácida con el objetivo de hacer más eficiente el grado de sustitución de los almidones y así aumentar su solubilidad. Los almidones fueron hidrolizados de acuerdo a lo reportado por Zambrano y Camargo (2001) con algunas modificaciones. Se preparó una suspensión de almidón al 40 % de sólidos con una solución que

contenía ácido clorhídrico (HCl) en una concentración de 3.4 % con respecto a los sólidos de almidón.

La hidrólisis se llevó a cabo a una temperatura de 50 ± 2 °C en un baño maría, manteniéndose en agitación constante durante 4 h. Posteriormente se ajustó el pH a 5.0 con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 10 %; la suspensión se centrifugó a 112,896 g durante 10 minutos en una centrifuga (Herle Z513 K, Germany). El sedimento se recuperó y lavó dos veces con agua destilada para eliminar residuos de ácido.

La pasta de almidón se secó en un horno marca Felisa (Feligneo, México), a temperatura de 40 ± 5 °C por 15 h. Posteriormente, el almidón se molió en un molino (Pulvex 200, México) y se tamizó con una malla de 250 μ m. La muestra de almidón hidrolizado se almacenó en bolsas de polietileno a 4 °C durante 12 h hasta su modificación posterior por extrusión reactiva.

5.2.11.3. Fosfatación. El almidón se modificó con TPS (fosfatación) de acuerdo a la metodología de Múrua–Pagola *et al.* (2009). Se preparó una solución con 4 g TPS/100 g de almidón base seca y se roció sobre el polvo de almidón hidrolizado. La muestra se almacenó a 4 °C en una bolsa de polietileno durante 12 h. Antes del proceso de extrusión el almidón se ajustó a pH 5.0–5.2 y contenido de humedad de 20 %.

5.2.11.4. Succinatación. La modificación con n–OSA (succinatación) se realizó de acuerdo al método propuesto por Múrua–Pagola *et al.* (2009) con algunas modificaciones. Se preparó una solución al 1 % de n–OSA con respecto al almidón en base seca. Se utilizó la mitad de agua requerida para ajustar la

humedad al 20 % y se adicionó la solución gota a gota a la muestra de almidón. Posteriormente la muestra se homogenizó en un tamiz de 250 μm y se almacenó a 4 °C en una bolsa de polietileno durante 12 h. A continuación se ajustó el pH a 8.0 asperjando una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1.25 N con el agua restante y se homogenizó en tamiz de 250 μm .

5.2.11.5. Extrusión reactiva. Para procesar las muestras de almidón modificadas químicamente con TPS y n-OSA en el extrusor fue necesario acondicionarlas al 20 % de humedad mediante un balance de materia. El proceso de extrusión se realizó bajo las mismas condiciones para las dos muestras utilizando un extrusor de tornillo simple diseñado y fabricado por el Cinvestav-IPN, México con un diámetro de barril interno de 20 mm.

La temperatura de barril fue de 70 °C para la zona de alimentación, 140 °C para la zona de transición y 170 °C para la zona de alta presión. La velocidad de tornillo fue de 80 rpm, velocidad de alimentación 35 g/min (15 rpm), la relación de compresión de tornillo fue de 2:1 y el diámetro del dado (cabezal) fue de 4.0 mm en la salida. El diseño genérico de un extrusor se presenta en la Figura 9. Las muestras extrudidas se secaron en un horno de convección forzada a 45 °C durante 8 h, posteriormente se molieron utilizando un molino Pulvex (modelo 200, México) tipo muelas y se cribaron en un tamiz de 250 μm .

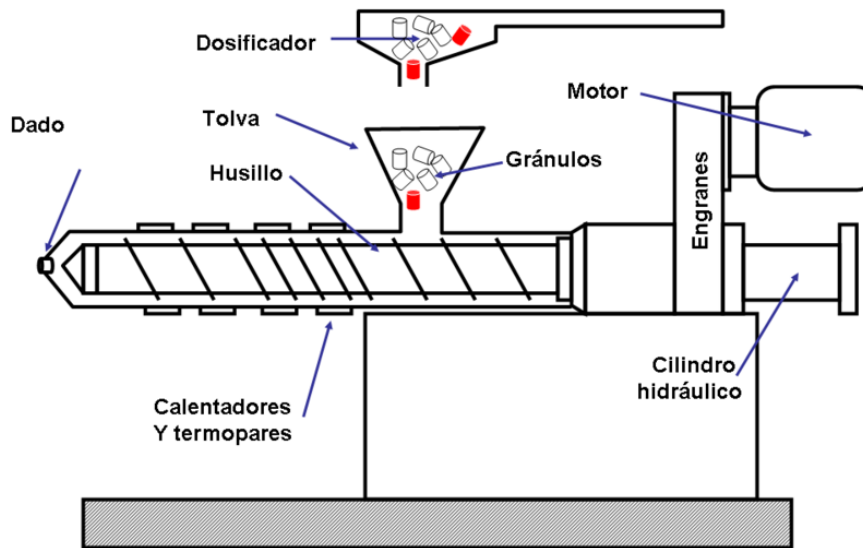


Figura 9. Diseño genérico del extrusor utilizado en la fase experimental.

5.2.12. Caracterización fisicoquímica de los almidones modificados

El almidón modificado por extrusión reactiva con TPS y n-OSA se caracterizó fisicoquímicamente de acuerdo a la siguiente metodología:

5.2.12.1. Grado de sustitución (GS) de fósforo. El contenido de fósforo se determinó de acuerdo al método descrito por Chang y Lii (1992) con algunas modificaciones. La determinación del grado de sustitución se basa en la reacción de Misson's, en la cual el fósforo presente como ortofosfato, reacciona con un reactivo de vanadato-molibdato en condiciones ácidas, dando lugar a un complejo estable naranja-amarillo de vanado-molibdo-fosfórico (H_3PO_4 , VO_3 , $11MoO_3$, nH_2O) (Kirk *et al.*, 1996). El reactivo vanadato-molibdato se preparó mezclando una solución de molibdato de amonio al 5 % (p/v) y una solución de vanadato de amonio al 0.25 % (p/v) en relación 1:1.

Se reportó el valor promedio de tres repeticiones de cada muestra de almidón modificado con TPS y almidón nativo de papa (control). Para determinar el contenido de fósforo, los fosfatos solubles fueron removidos lavando dos veces cada una de las muestras de almidón con una mezcla etanol-agua (50:50 p/p). Posteriormente las muestras se secaron la muestra en una estufa de circulación forzada a 45 °C durante 15 h y se molieron. Se pesó 1 g de muestra en base seca, la cual quemó en un mechero y fue calcinada en una mufla a 500 °C por 1.5 h. Las cenizas obtenidas se calentaron a ebullición con 8 mL de HCl por 1 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Cada muestra obtenida se filtró en papel whatman no 4 en un matraz volumétrico aforado de 100 mL al cual se le adicionaron 25 ml de reactivo vanadato-molibdato y se aforo con agua. La solución obtenida se agitó vigorosamente en una parrilla de agitación y se dejó reposar por 10 min antes de medir absorbancia a 470 nm en un espectrofotómetro UV/Vis (Cintra, Japón). La concentración de fósforo se calculó con una curva de calibración preparada a partir de muestras con cantidades conocidas de fósforo mediante la Ecuación (3):

$$\text{Contenido de fósforo (mg/100 g)} = (C \times V \times D \times 100)/M \quad (3)$$

donde, C es contenido de fósforo leído en la curva de calibración (mg), V es volumen de aforo, D es factor de dilución si es necesario y M es cantidad de muestra en g. Una vez determinado el contenido de fósforo, se calculó el grado de sustitución de fósforo con la Ecuación (4), donde P es % de fósforo en el almidón fosfatado (base seca):

$$GS = \frac{162P}{(3100 - 124P)} \quad (4)$$

5.2.12.2. Grado de sustitución de succinato. Se determinó de acuerdo a lo reportado por Jeon *et al.*, (1999). Se disolvió 0.1 g de muestra en 10 mL de Dimetil Sulfóxido (DMSO) por calentamiento a 70 °C durante 10 min. Después de que la solución se enfrió, se adicionaron cinco gotas de indicador fenolftaleína. La solución se tituló con una solución estándar de 0.05 M de NaOH hasta obtener un color rosa pálido. El grado de sustitución se calculó de acuerdo a Song *et al.* (2006) mediante la Ecuación (5):

$$GS = \frac{0.162 V_{NaOH} \frac{M_{sol}}{P_{mues}}}{1 - [0.210 V_{NaOH} \frac{M_{sol}}{P_{mues}}]} \quad (5)$$

donde, V es volumen de titulación de la solución de NaOH (mL), P es peso seco de la muestra (g) y M es molaridad de la solución de NaOH.

5.2.12.3. Índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA). Ambos índices se determinaron a las muestras de almidón modificado por TPS y n-OSA tomando como control al almidón nativo de papa de acuerdo al método descrito por Anderson *et al.*, (1969). Se realizaron tres repeticiones para cada análisis y los valores se reportaron como promedio. Se pesaron 2.5 g de muestra en un tubo de centrifuga de 50 mL y se adicionaron 30 mL de agua destilada. Los tubos se agitaron constantemente por 30 min a 30 °C. Las muestras se centrifugaron a 112,896 g (Riossa, México) por 10 min. Se registró el peso del residuo sólido y el sobrenadante se evaporó en un crisol de aluminio en una

estufa a temperatura de 90 ° C. El peso del residuo en el crisol se registró como residuo de evaporación. Los índices de absorción de agua (IAA) y de solubilidad en agua (ISA) se calcularon de acuerdo a las ecuaciones (6) y (7), donde Rcent fue la masa del residuo de centrifugación, Revap la masa del residuo de evaporación y M la masa en base seca de la muestra.

$$IAA = \frac{R_{cent}}{M - Revap} \quad (6)$$

$$ISA = \frac{Revap}{M} \times 100 \quad (7)$$

5.2.12.4. Cristalinidad. La cristalinidad de los almidones modificados por TPS y n-OSA fueron estudiadas por el método de difracción de rayos X descrito por Martínez (1997), considerando al almidón nativo de papa como control en este estudio. Las muestras se empacaron en un portamuestras de vidrio con una profundidad de 0.5 mm y se colocaron en un difractómetro de Rayos X RIGAKU (Dmax2100, Francia). Los difractogramas fueron obtenidos con un barrido de ángulo de Bragg de 5°-30° sobre una escala de 2θ, con intervalos de 0.02, operando a 30 KV y 16 mA, con una radiación de $\text{CoK}\alpha$ y una longitud de onda de 1.5406 Å. La cristalinidad relativa de las muestras se calculó de acuerdo al método Hermen con el software Fityk 9.8 (Carrier, 1964) El área de fracción cristalina fue calculada con la ecuación (8), donde CR es cristalinidad relativa (%), RCE es región cristalina del producto extrudido y RCH se refiere a la región cristalina del producto sin procesar (Control).

$$CR(\%) = \frac{(RCEx * 100)}{RCH} \quad (8)$$

5.2.12.5. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT–IR). El cambio en la estructura química de los almidones modificados por TPS y n–OSA, y almidón nativo de papa (control) fueron analizados cualitativamente usando un espectrofotómetro FT–IR con microscopio acoplado AutoIMAGE. (Spectrum GX de Perkin Elmer, U.S.A), usando la técnica de reflectancia difusa. Se molieron finamente 4 mg de cada muestra de almidón con 96 mg de KBr en un mortero. Los espectros se registraron en un intervalo de número de onda entre 400 y 4000 cm^{-1} . El KBr se secó a 105 °C por 12 horas antes del análisis para evitar interferencias de humedad (Hui *et al.*, 2009).

5.2.12.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM). La morfología externa de los gránulos de almidón modificados con TPS y n–OSA se evaluaron cualitativamente de acuerdo al método descrito por Gunning *et al.*, (1999) con algunas modificaciones usando almidón nativo de papa como control de este estudio. Las muestras de almidón se colocaron en un semicírculo de cinta doble cara adhesiva, fijada inicialmente a un portamuestras de aluminio. El exceso de muestra se eliminó con aire comprimido.

Las muestras se recubrieron con polvo de grafito en una cámara (Denton Vacuum Desk V) en condiciones de vacío, con la finalidad de inducir electrones a la muestra y permitir la visualización con alta resolución de las imágenes. Posteriormente estas muestras se transfirieron a una microsonda (Jeol JXA–

8530F, Japón) en condiciones de vacío bajo de 0.7 mBar, voltaje de aceleración de 15.0–20.0 KV y 50 μ A de corriente en el detector GSE (Gaseus Secondary Electron). Las muestras se observaron con diferentes magnificaciones (500, 1000, 1500 y 2500 X).

5.2.12.7. Perfil de viscosidad. La viscosidad de los almidones modificados y almidón nativo (control) fue evaluada utilizando un equipo Rapid Visco Analyzer modelo RVA–3D (Newport Scientific, Australia). Las mediciones se realizaron de acuerdo a lo reportado por Murúa *et al.* (2009). Se colocaron 2.5 g (base seca) de muestra cribada por una malla con abertura de 250 μ m, adicionando la cantidad de agua destilada necesaria para alcanzar un peso total de 28 g de suspensión en un recipiente de aluminio. La muestra se colocó en el viscosímetro, el cual produce una agitación rápida durante 10 s, para luego estabilizarse a velocidad constante de 75 rpm. La temperatura inicial de 50 °C es mantenida durante un minuto y posteriormente fue elevada a 92 °C, a una velocidad de calentamiento de 5.6 °C/min.

Una vez alcanzada la temperatura indicada, ésta se mantuvo constante durante 5 min y luego se aplicó enfriamiento a la misma velocidad utilizada en el calentamiento, hasta alcanzar una temperatura de 50 °C. La temperatura final se mantuvo constante durante dos minutos y el tiempo total de la prueba fue de 23 min con agitación constante durante todo el análisis.

5.2.13. Preparación de microcápsulas

Se prepararon dispersiones de betalaínas con los materiales de pared obtenidos por extrusión reactiva con TPS y n-OSA usando N-Lok como control. Este procedimiento se realizó de acuerdo a la siguiente metodología:

5.2.13.1 Procesamiento de microcápsulas. Las betalaínas obtenidas se mezclaron por separado con almidón fosfatado, succinatado y N-Lok (control) en una solución al 10 % de sólidos. Aunque en los procesos industriales de secado por aspersión, se recomiendan dispersiones con alta concentración de sólidos (>30 %) para reducir los costos y aumentar la eficiencia de secado (Filoková *et al.*, 2006), en este estudio se trabajó con dispersiones con baja concentración de sólidos totales a fin de evitar la obstrucción de la boquilla neumática del equipo de secado.

Los almidones se hidrolizaron previamente en agua destilada durante 12 h de acuerdo a lo propuesto por Saénz *et al.*, (2009). Para disolver el almidón se agitó vigorosamente agua destilada a 45 °C y el almidón se adicionó lentamente. Durante el tiempo de hidratación las dispersiones se almacenaron a 4 °C y se refinaron en un tamiz de 250 µm para asegurar la ausencia de grumos. Las betalaínas se adicionaron y homogeneizaron en la dispersión antes del secado por aspersión. Las dispersiones se alimentaron a un secador Lab Plant (Spray Dryer SD-Basic, UK).

Las condiciones de secado fueron: temperatura de aire de entrada 140 °C, temperatura de salida 80±5 °C, flujo de alimentación 210 mL/h, presión de aire

del compresor 4 bar y diámetro interno de la boquilla 0.5 mm (Figura 10). Las microcápsulas obtenidas se colectaron y pesaron en una balanza analítica para obtener el rendimiento de microencapsulación. Posteriormente se almacenaron en frascos de vidrio ámbar a -4°C y se reemplazó el oxígeno por nitrógeno hasta su posterior análisis.



Figura 10. Fotografía del equipo utilizado en la obtención de microcápsulas de betalaínas.

5.2.14. Caracterización de microcápsulas

Las microcápsulas obtenidas se caracterizaron de acuerdo a la siguiente metodología:

5.2.14.1. Contenido de humedad y actividad de agua (a_w). El contenido de humedad de las microcápsulas se evaluó en forma gravimétrica en una estufa a 45 °C por 24 h (peso constante). Las mediciones de actividad de agua (a_w) se obtuvieron con un medidor de actividad de agua Aqualab (CX-2 de la Decagón Devices Inc, USA). Las muestras se analizaron por triplicado.

5.2.14.2. Color. Se determinó el color de las microcápsulas con un espectrofotómetro–colorímetro (HunterLab–MiniScan ® XE Plus, USA) para obtener parámetros CIELAB (L^* , a^* , b^*). La medición se llevó a 10° con fuente iluminante de D65. El equipo fue calibrado usando un azulejo blanco y negro como estándar proporcionado por el fabricante. Los parámetros Chroma (C_{ab}^*) y hue (h_{ab}) fueron calculados con las Ecuaciones (9) y (10) (Meléndez-Martínez *et al.*, 2003).

$$C^{*ab} = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad (9)$$

$$H_{ab} = \arctan(b^*/a^*) \quad (10)$$

La distancia Euclidiana entre dos puntos en el espacio tridimensional definido por L^* , a^* y b^* son parámetros para calcular la diferencia de color (ΔE^*_{ab}) mediante la ecuación (11) (Cejudo-Bastante *et al.*, 2014).

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (11)$$

5.2.14.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM). La morfología de las microcápsulas obtenidas con almidón comercial modificado N-Lok (control) y los almidones modificados por extrusión reactiva con TPS y n-OSA fueron analizadas mediante microscopía electrónica de barrido en una microsonda (Jeol JXA-8530F, Japón), con las mismas especificaciones y condiciones a las que fueron sometidas las muestras de almidón.

El tamaño de partícula de las microcápsulas se obtuvo con las micrografías obtenidas en el microscopio electrónico de barrido usando el software *Image J* versión 1.49.

5.2.14.4. Rendimiento de microencapsulación. El rendimiento de microencapsulación se calculó con el peso recuperado de las microcápsulas obtenidas por la técnica de secado por aspersión. El rendimiento fue determinado usando la Ecuación (12) donde YE es el rendimiento ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$), W_2 es el peso (g) del producto colectado y W_1 es el peso (g) de los sólidos totales de la dispersión alimentada (Xue *et al.*, 2008).

$$\%YE = \left(\frac{W_2}{W_1} \right) * 100 \quad (12)$$

5.2.14.5. Eficiencia de microencapsulación (EE) se calculó como la relación de la cantidad real de betalaínas a la cantidad teórica. El porcentaje de EE fue determinado con la Ecuación (13):

$$\%EE = \left(\frac{\text{Cantidad real de BC}}{\text{Cantidad teorica de BC}} \right) * 100 \quad (13)$$

5.2.15. Evaluación de la estabilidad de las betalaínas encapsuladas

Para evaluar el comportamiento de las betalaínas en un sistema alimentario se preparó yogurt natural en condiciones asépticas. El cultivo láctico se homogeneizó por separado con leche líquida. Se mezclaron los ingredientes del Cuadro 4 con la leche líquida, excepto las microcápsulas. Posteriormente la mezcla se pasteurizó durante 30 minutos a 80 °C y se enfrió rápidamente a 45 °C para adicionar los cultivos homogenizados. El yogurt se almacenó a 4 °C con pH final promedio de 4.6 durante 12 h. Posteriormente las microcápsulas de betalaínas obtenidas con los diferentes materiales de pared se liberaron en el yogurt. Cada una de las muestras se almacenó en condiciones de refrigeración (4 °C).

Cuadro 4. Formulación de yogurt natural estandarizado a 3 % de grasa.

Ingrediente	Cantidad (%)
Leche semidescremada	90.22
Leche en polvo	0.45
Azúcar	9.04
Cultivo lácteo	0.01
Microcápsulas de betalaínas	1

Fuente: Elaboración propia

5.3. Análisis de datos

En el experimento se utilizó un diseño completamente al azar el cual tuvo como modelo lineal $y_{ij} = \mu + \tau_i + e_{ij}$ dónde, y_{ij} es la respuesta (variable de interés o

variable respuesta), μ es la media general del experimento, τ_i es el efecto del tratamiento y e_{ij} es el error aleatorio asociado a la respuesta y_{ij} (Kuehl, 2001).

Los datos obtenidos de la caracterización del extracto de betalaínas, caracterización de las microcápsulas obtenidas, estabilidad de las microcápsulas a 40 °C durante 39 días y la aplicación de estas microcápsulas al yogurt se expresaron como la media de la desviación estándar.

Los datos de estabilidad de las betalaínas con y sin azúcar se analizaron conforme a un arreglo factorial 2^2 alojado en un diseño completamente al azar.

Las determinaciones se hicieron por triplicado ($n = 3$) y en este sentido se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y un análisis de correlación con el paquete estadístico SAS® (Statistical Analysis System, versión 9.0). Se utilizó la prueba Tukey para identificar la significancia de los contrastes entre tratamientos con $p < 0.05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Extracto crudo de betalaínas

A partir de 15 kg de frutos de pitaya se obtuvieron 12 kg de pulpa con concentración de sólidos solubles totales de 14.8 °Brix. A partir de este material se obtuvo un extracto filtrado y concentrado con 26.3 °Brix, cuya masa total fue de 2.5 kg, lo que implica un rendimiento con respecto a la masa inicial de frutos de 16.7 %. Este extracto se sometió a evaluación de betalaínas, de donde se derivó una concentración de 0.768 mg L⁻¹.

6.2. Sistema de extracción acuosa en dos fases para eliminación de azúcares

Para la eliminación de azúcares se usó un sistema de extracción acuosa en dos fases (ATPE) basado en polietilenglicol 4000 (PEG-4000) y sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄]. Se identificó un conjunto de condiciones cuya mezcla de reactivos produjo la separación en dos fases inmiscibles. La Figura 11 muestra este conjunto de datos y el ajuste a una línea recta que se hizo mediante una rutina de regresión.

Se verificó que hacia la derecha de la línea de ajuste la mezcla de PEG-4000 con sulfato de amonio produjo un sistema de dos fases (Figura 11) en tanto que hacia la izquierda se formaba un sistema de una fase, lo cual coincidió con lo descrito en general para un sistema de ATPE (Raja *et al.*, 2011).

De manera particular, para conducir la separación de azúcares del extracto de betalaínas se usó una mezcla con PEG-4000 y sulfato de amonio en concentración de 9.0 y 10 %, respectivamente, utilizando extracto de pitaya con 26.3 °Brix de sólidos solubles totales como medio de disolución y, tras la aplicación de reposo, se consiguió la separación de fases donde la superior mostró una tonalidad roja oscuro, dando evidencia de una mayor acumulación de betalaínas, en tanto que la inferior tuvo tonalidad rojiza pálida (Figura 12).

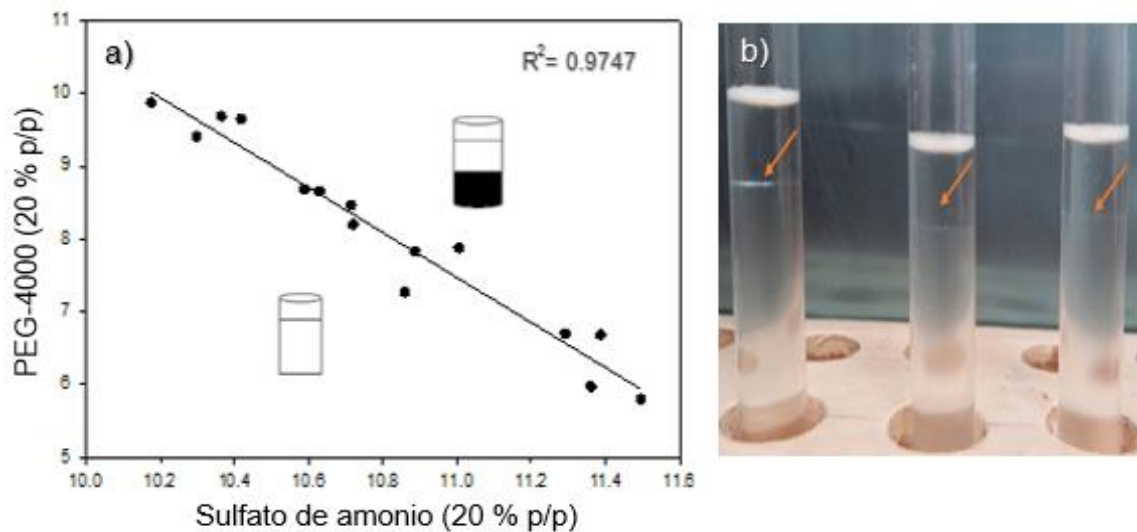


Figura 11. Diagrama ATPE con mezclas PEG-SA a). Formación del sistema acuoso en dos fases (ATPE) para la separación de azúcares del extracto de betalaínas b). La flecha señala la interface del sistema de ATPE.

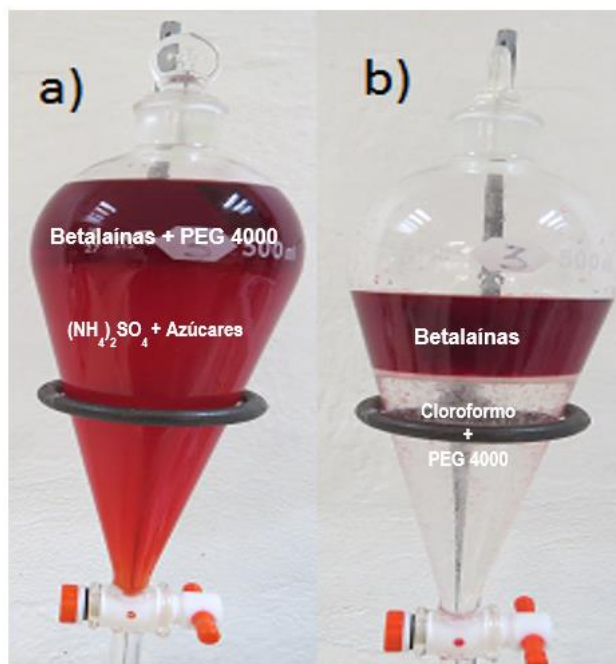


Figura 12. Separación de betalaínas por el método ATPE (a) y eliminación de PEG con cloroformo (b).

6.3. Efecto de la presencia de azúcares en el extracto de betalaínas

Los extractos de betalaínas con y sin azúcares fueron liofilizados. En el caso del material que aún contenía azúcares fue difícil eliminar el agua en su totalidad, debido a la presencia de azúcares, los cuales contribuyeron a la formación de una masa con consistencia adhesiva y chiclosa que contrastó en estructura física con el material carente de azúcares (Figura 13). El sistema de ATPE permitió una reducción significativa del 81.23 % en el contenido de azúcares en el extracto de betalaínas (Cuadro 5), lo cual puede considerarse una eficiencia alta del procedimiento usado, pues se aplicó una sola etapa de separación, pudiendo, de

acuerdo con Chetana *et al.* (2007) incrementarse a través del uso de dos o más etapas de ATPE.

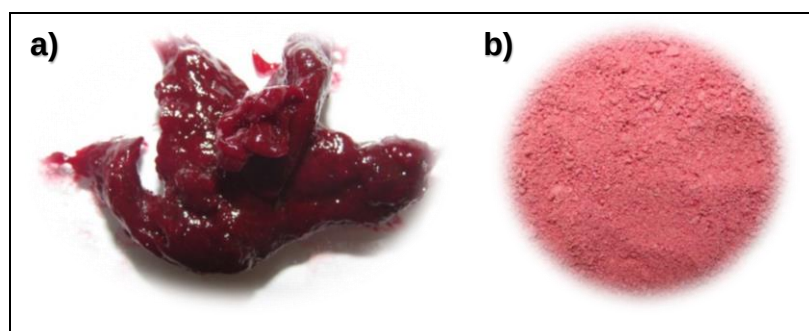


Figura 13. Extracto de betalainas liofilizado con azúcares (a); sin azúcares (b).

En forma congruente, el extracto de betalainas experimentó una reducción de 16.35 % en el contenido de sólidos solubles totales. Adicionalmente, fue notoria la utilidad del procedimiento de ATPE para reducir el contenido de mucílago del extracto de betalainas, pues la goma experimentó una disminución de 54.74 % (Cuadro 5).

Cuadro 5. Caracterización del extracto de pitaya con azúcares y sin azúcares.

Parámetros	Muestras	
	Extracto de pitaya antes de ATPE	Extracto de pitaya después de ATPE
SST (%) del extracto concentrado de pitaya	26.3	22.0
Azúcares totales (mg glucosa/g de extracto)	349.37 ^a ±28.51	65.23 ^b ±3.05
Mucílago (%)	1.37 ^a ±0.15	0.62 ^b ±0.02
pH	5.35 ^a ±0.005	5.39 ^a ±0.01

Este hecho es significativo, ya que el método de ATPE tiene dos modalidades de implementación, una basada en la mezcla de un polímero y una sal, que fue la usada en el presente trabajo, en tanto que la otra incluye el uso de dos polímeros, los cuales en ciertas concentraciones forman también dos fases inmiscibles (Raja *et al.*, 2011). En tal sentido, el método de ATPE podría usarse como base para la extracción de mucílago de otras fuentes vegetales como nopal.

6.4. Evaluación de la estabilidad de betalaínas en el extracto de frutos de pitaya

Se evaluó la estabilidad de betalaínas de manera diferenciada entre betacianinas (BC) y betaxantinas (BX). En ambos casos, la velocidad de degradación presentó una cinética lineal, es decir, de primer orden. La estabilidad fue afectada por la temperatura. En la condición de 4 °C no hubo modificación de la concentración de betacianinas y betaxantinas durante las rutinas realizadas con duración de 12 h. Sin embargo, la aplicación de una condición de 60 °C causó una reducción rápida en la concentración de BC y BX, pero tal degradación ocurrió a mayor velocidad en las muestras con contenido reducido de azúcares (Figura 14), de tal forma que estas últimas mostraron pérdida casi total de la tonalidad (Figura 15), lo cual no fue observado en los materiales manejados a temperatura baja.

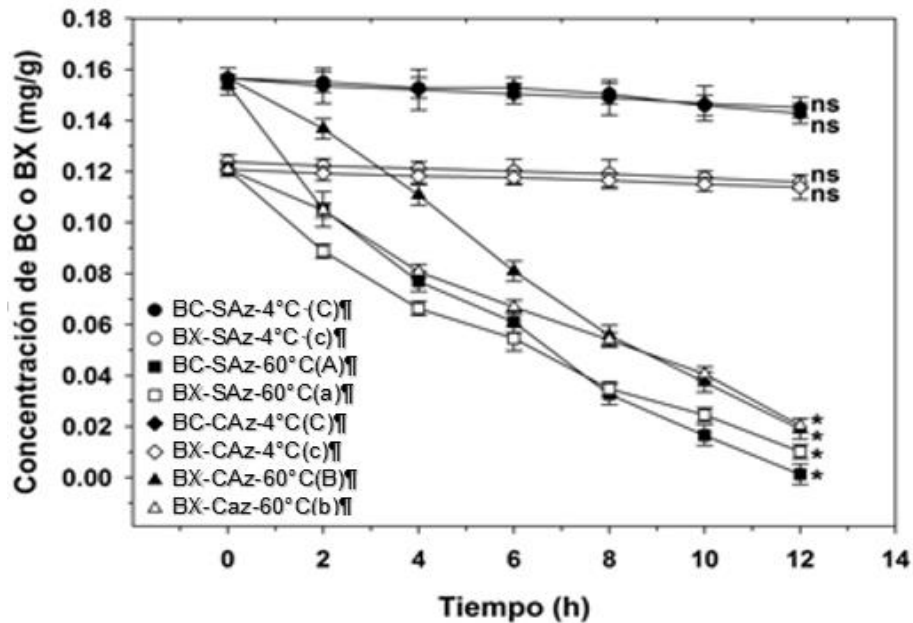


Figura 14. Estabilidad de betalaínas afectada por la temperatura y la presencia de azúcares. BC: betacianinas; BX: betaxantinas; SAz: sin azúcares; CAz: con azúcares. Letras mayúsculas iguales entre paréntesis indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre cinéticas de betacianinas. Letras minúsculas iguales entre paréntesis indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre cinéticas de betaxantinas. Las leyendas ns y * indican cambio no significativo ($P > 0.05$) y cambio significativo ($P \leq 0.05$) al interior de una cinética particular.

Estos hechos son importantes en virtud de que muchos procesos de manejo de alimentos que usan colorantes como ingredientes, se desarrollan a temperaturas altas, y los resultados aquí encontrados sugieren que las betalaínas no podrían usarse en tales condiciones deteriorantes. En el mismo sentido, el uso de pigmentos como las betalaínas deberán usarse sin la presencia de otro tipo de compuestos como los azúcares y, aunque éstos confieren estabilidad, su remoción deberá ocurrir con objeto de favorecer su uso en la industria de los

alimentos. En tal sentido, es necesario explorar alternativas que favorezcan la protección de las betalaínas cuando sean usadas en alimentos con distintos tipos de procesamiento y en esa línea de pensamiento resulta necesaria la exploración de la estrategia de encapsulado de los extractos de betalaínas.

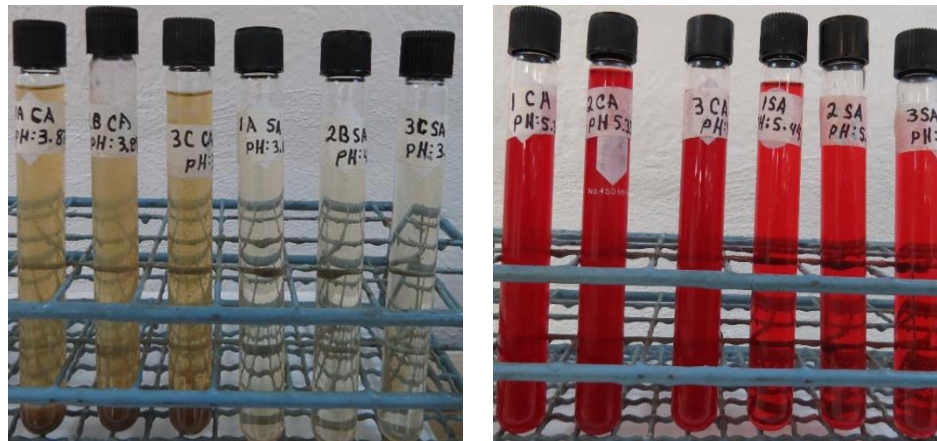


Figura 15. Izquierda: apariencia de muestras sometidas a condiciones degradantes (izquierda) con temperatura de 60 °C y pH menor a 3.5. Derecha: apariencia de muestras sometidas a condiciones de 4 °C y pH de 5.5.

6.5. Caracterización de los almidones modificados como material de pared para encapsulamiento de betalaínas

En la Figura 16 se muestra la apariencia de los almidones modificados por succinatación y fosfatación extrudidos para ser utilizados como materiales de pared en la microencapsulación de betalaínas. Chang y Lii (1992) reportaron que una temperatura elevada de extrusión conduce a una mayor presión de vapor que favorece la expansión inicial y puede conducir a una disminución en la

viscosidad del almidón plastificado y consecuentemente incrementar la tendencia de los extrudidos a colapsar.

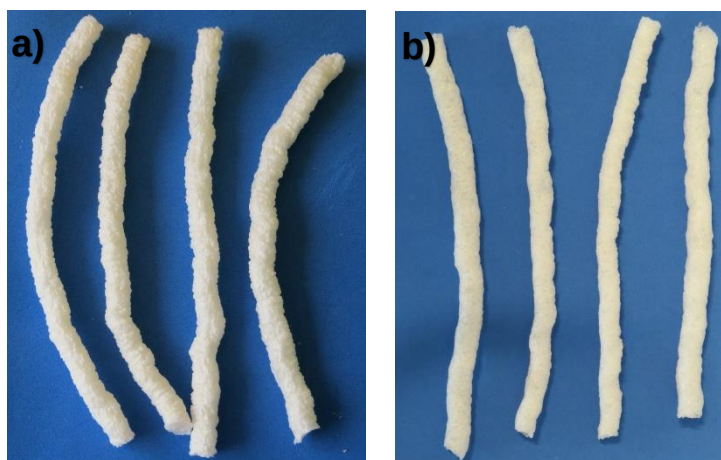


Figura 16. Muestra de almidón modificado por extrusión reactiva succinatado (a); fosfatado (b).

6.6. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

El análisis FT-IR proporciona información sobre los enlaces químicos y la estructura molecular de los materiales. La modificación química del almidón por esterificación conduce a la sustitución de los grupos hidroxilo en las moléculas de almidón por grupos carbonilo de OSA y grupo fosfato proveniente de TPS. La introducción de grupos carbonilo se pudo confirmar por espectroscopía FT-IR (Marcazzan *et al.*, 1999).

Se encuentran establecidas dos áreas importantes en el espectro de IR, la región de los grupos funcionales entre 3600 y 1200 cm^{-1} y la región de las huellas dactilares entre 1200 y 600 cm^{-1} (Skoog *et al.*, 2001). Los espectros de IR mostraron que el almidón nativo de papa y almidón OSA tienen perfiles similares

(Figura 17). Se observaron varias bandas de absorción a 1150 1021 y 933 cm^{-1} atribuidas al enlace de elongación C–O.

Otro pico característico se originó a 1639 cm^{-1} debido probablemente a la presencia de agua en el gránulo de almidón. La banda a 2930 cm^{-1} es característica del estiramiento de vibración de C–H. La banda de absorción muy amplia generada a 3390 cm^{-1} es el resultado de la vibración de grupos hidroxilo (O–H). Al comparar el espectro del almidón nativo de papa con el almidón succinatado muestra un nuevo pico a 1727 cm^{-1} que sugiere la formación de enlaces éster de grupos carbonilo. En sistemas alcalinos, el almidón modificado por OSA, se sintetiza en forma de n–octenil succinato de sodio por lo que una banda de absorción aparece a 1570 cm^{-1} la cual se atribuye a la vibración asimétrica de carboxilato RCOO^- (Hui *et al.*, 2009).

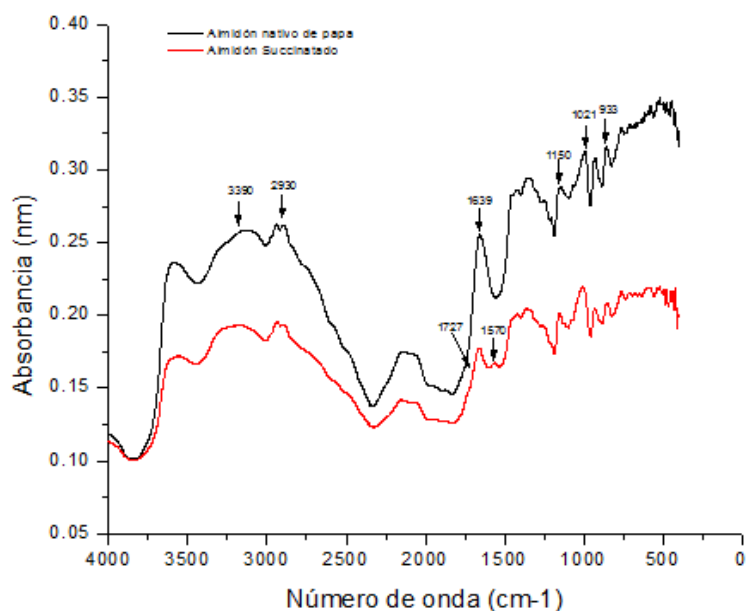


Figura 17. Espectro infrarrojo del almidón succinatado y almidón nativo de papa (control).

Sin embargo, el almidón fosfatado no mostró diferencia con respecto al almidón nativo de papa usado como control en el espectro IR, probablemente debido a una fuerte dependencia de la vibración de elongación del grupo $(PO_2)^{-2}$ con la hidratación de la muestra (Figura 18).

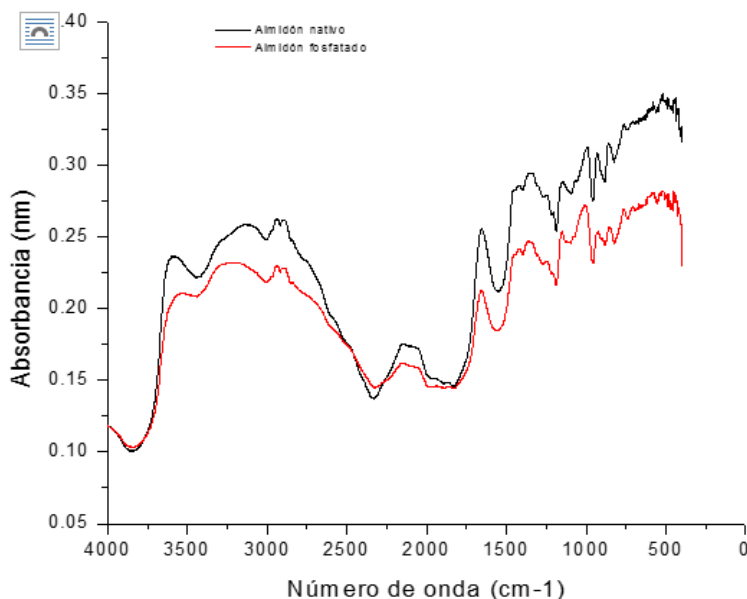


Figura 18. Espectro IR del almidón fosfatado y almidón nativo de papa (control).

6.7. Viscosidad de los almidones

En la Figura 19 se muestran los perfiles de viscosidad de los almidones modificados químicamente por extrusión reactiva utilizando almidón nativo como control en este estudio. Debido a la hidrólisis ácida y condiciones de extrusión, ninguno de los almidones desarrollo viscosidad. Por lo general, la extrusión de almidones modificados exhibe menores perfiles de viscosidad comparados con los almidones que han sido modificados por métodos convencionales. Esto se puede atribuir a la desintegración de la estructura del almidón por las condiciones durante la extrusión (alto cizallamiento, presión y temperatura) (Chang y Lii,

1992). De acuerdo a Murúa–Pagola (2009) los almidones fosfatados y succinatados que se hidrolizaron antes de ser extrudidos no desarrollaron viscosidad. Una de las condiciones de los materiales de pared que se utilizan en el secado por aspersión debe desarrollar limitada viscosidad en la solución, por lo que los materiales usados en este estudio cumplen con esta especificación.

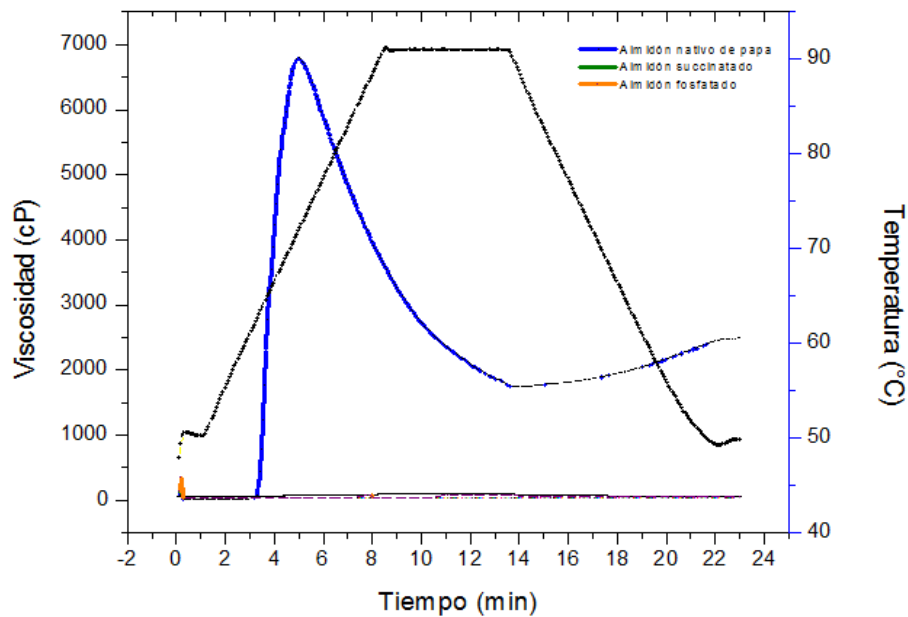


Figura 19. Perfil de viscosidad de almidón succinatado y fosfatado con respecto al almidón nativo de papa (control).

6.8. Grado de sustitución (GS)

El contenido de fósforo en almidón nativo de papa usado como control fue de 0.60 % y GS de 0.032 al ser modificado con TPS por extrusión reactiva los valores aumentaron a 0.85 % contenido de fosforo y GS de 0.038, valores similares fueron reportados por Murúa–Pagola *et al.*, (2009). El grado de sustitución de almidones succinatados fue de 0.021, valores similares fueron reportados por

Xiaoyan *et al* (2015) para almidones de arroz modificados con GS de 0.0287 en solución acuosa. Yaoqui *et al.*, (2015) obtuvo un GS de 0.014 para almidones modificados en condiciones de extrusión.

6.9. Índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA)

El proceso de hidrólisis ácida y las severas condiciones de extrusión causaron la dextrinización de los almidones modificados con valores de ISA superiores al 50 % (Cuadro 6), lo cual fue muy favorable tomando en cuenta las especificaciones de alta solubilidad que deben tener los materiales de pared utilizados en el secado por aspersión. El almidón comercial N–Lok se utilizó en este estudio como control y se obtuvieron valores muy altos de solubilidad de 89.74 % reflejado en altos rendimientos de encapsulación. Los almidones fosfatados y succinatados no mostraron diferencias significativas en los valores de ISA e IAA.

Cuadro 6. Índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA).

Muestra	ISA (%)	IAA
Almidón succinatado	53.45±0.83 ^a	2.45±0.09 ^a
Almidón fosfatado	54.25±1.31 ^a	2.31±0.14 ^a
Almidón N–Lok	89.74±0.87 ^b	4.14±0.08 ^b

Los resultados son el promedio de 3 mediciones. Medias en las columnas con la misma letra no son significativamente diferentes (P<0.05).

6.10. Difracción de rayos X (XRD)

La técnica de difracción de rayos X (XRD) aporta información para analizar el grado de cristalinidad de las muestras. La cristalinidad del almidón se basa en la formación de dobles hélices en las cadenas de amilopectina y es influenciada por el contenido de amilopectina, longitud media de cadena de amilopectina, orientación de las hélices dobles (dentro de los cristalitos) y tamaño de cristalito (Lan *et al.*, 2008).

Los difractogramas de almidón fosfatado, succinatado y nativo (control) se observan en la Figura 20. Los difractogramas muestran picos característicos del almidón nativo de papa con un valor de cristalinidad relativa (CR) de 8.61 % y estos se desvanecieron en las muestras modificadas químicamente por extrusión reactiva.

Zobel (1988) afirmó que la pérdida de resolución en el pico (ensanchamiento y reducción de la altitud) refleja la pérdida de cristalinidad y un incremento amorfo en la estructura. La disminución de la cristalinidad es causada por el grado de fragmentación de los gránulos de almidón y es ocasionada por el daño mecánico de la molienda, hidrólisis ácida y condiciones de extrusión. O'Brien *et al.*, (2009) determinaron el efecto de la introducción de grupos fosfato en estructuras de almidón de maíz ceroso y papa, encontrando durante su análisis que las muestras no exhibieron picos de difracción después de la extrusión.

(Hui *et al.*, 2009) indicaron que los almidones nativos de papa y almidones OSA mostraron patrones típicos de difracción de tipo B. Este resultado sugirió que la esterificación no cambió el patrón cristalino de OSA en un sistema de suspensión

acuoso alcalino. Sin embargo recientes investigaciones han sugerido la producción de nanopartículas de almidón con tratamientos físicos (alta presión homogenización, extrusión y tratamiento con ultrasonido) para generar nanopartículas de almidón en cortos periodos de tiempo y con mayores rendimientos (Hee-Young *et al.*, 2015).

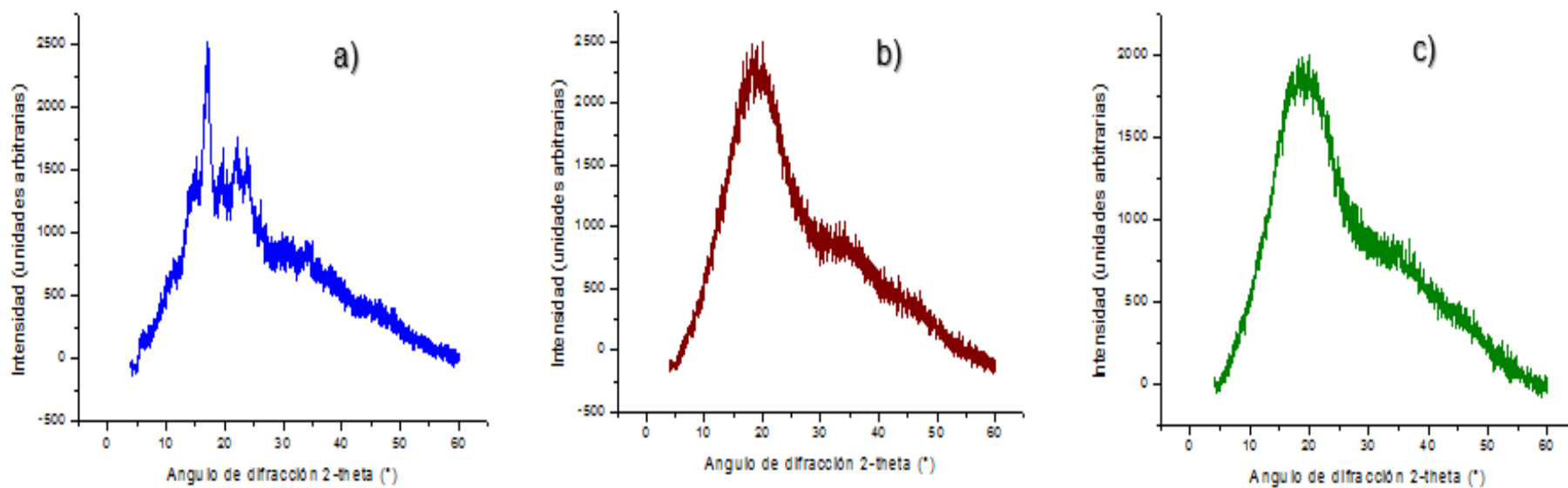


Figura 20. Patrones de difracción de rayos X de almidón nativo de papa (a) almidón succinatado (b) y fosfatado (c).

6.11. Microscopía electrónica de barrido de los almidones modificados y almidón nativo

Las micrografías de los gránulos de almidón nativo de papa y los almidones modificados se muestran en la Figura 21 con magnificaciones de 250 y 2500 X. Los gránulos de almidón presentan forma ovalada características del almidón de papa con pequeñas fisuras formadas posiblemente por fracturación durante el recubrimiento anterior al análisis SEM. Después de la modificación los gránulos de almidones succinatados y fosfatados perdieron su integridad con formas irregulares y empaquetadas. Estos cambios drásticos en la morfología del almidón indican que el gránulo de almidón fue completamente destruido. La micrografía del almidón N-Lok presenta una morfología esférica con concavidades debido posiblemente al tipo de modificación.

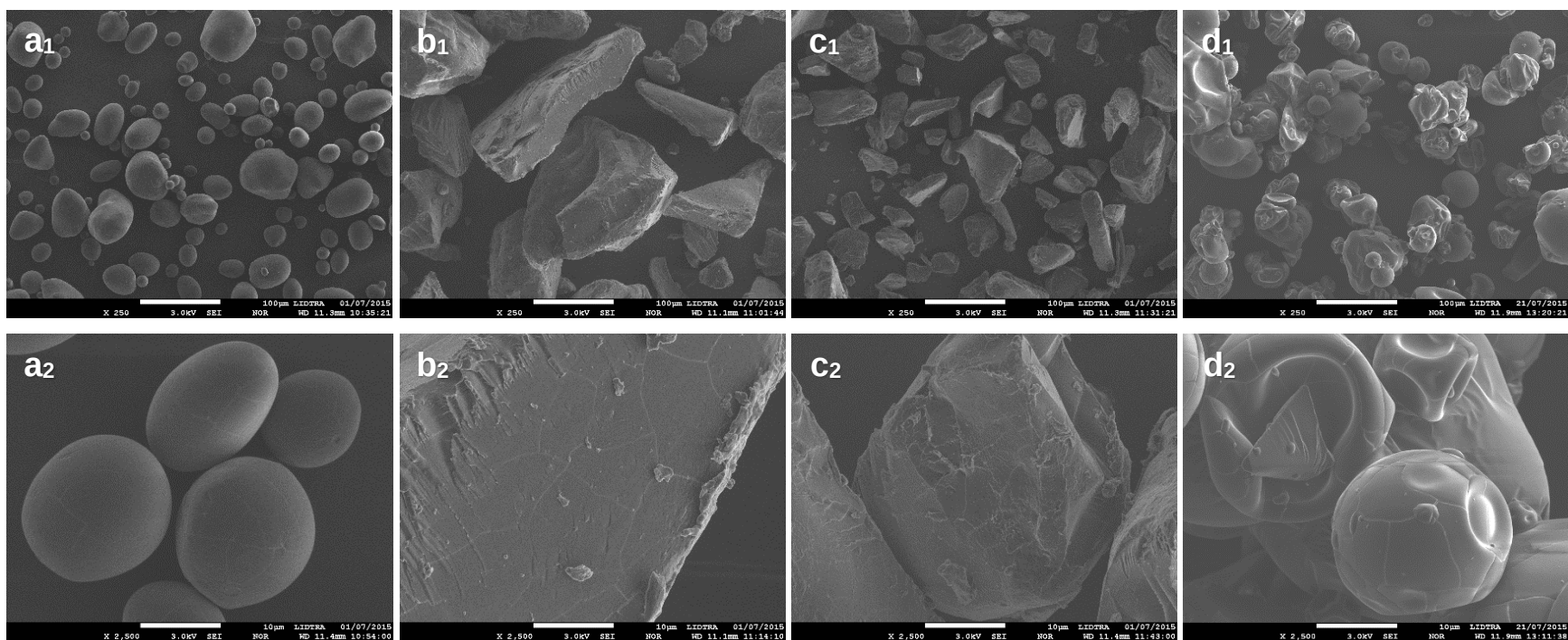


Figura 21. Micrografías de los gránulos de almidón nativo de papa con magnificaciones de 250 y 2500X (a₁, a₂), almidón succinatado (b₁, b₂), fosfatado (c₁, c₂) y N – lok (d₁, d₂).

6.12. Caracterización de las microcápsulas

En las microcápsulas obtenidas se evaluó el rendimiento de encapsulación, eficiencia de encapsulación, actividad de agua (a_w), contenido de humedad y parámetros de color (Cuadro 7).

Cuadro 7. Caracterización de las microcápsulas de betalaínas obtenidas con tres diferentes materiales de pared.

Parámetros	MUESTRAS		
	S	F	NL
EY (%)	34.77 ^a	30.25 ^b	60.58 ^c
EE (%)	97.56 ^a	96.69 ^b	93.98 ^c
a_w a 25 °C	0.31 ^a	0.29 ^b	0.24 ^c
Contenido de humedad (%)	4.20 ^a	4.21 ^a	4.3 ^a
Parámetros de color			
L*	63.59	60.68	67.00
a*	25.99	28.34	22.96
b*	3.69	4.64	3.38
Cab*	26.25	28.71	23.21
hab*	0.14	0.16	0.15

Todos los datos son la media de las mediciones ($n = 3$). Letras diferentes en la misma fila indican una diferencia estadística ($p < 0.05$). S: almidón succinatado; F: almidón fosfatado; NL: almidón control N–Lok.

6.13. Morfología de las microcápsulas

Las microcápsulas presentaron en su mayoría formas esféricas con superficie colapsada o indentaciones (Figura 22). La formación de estas indentaciones en

la superficie de microcápsulas obtenidas por secado por aspersión es usualmente atribuida a la contracción de las partículas debido a la drástica pérdida de agua, seguida del enfriamiento (Krishnaiah *et al.*, 2012) que puede ocurrir a bajas o altas temperaturas de entrada.

Cuando la temperatura de entrada es baja hay menos difusión de agua y las partículas tienen más tiempo para reducir su tamaño. A altas temperaturas de entrada, la rápida evaporación y alta presión también producen la contracción (Robert *et al.*, 2010). De acuerdo a Ferrari *et al* (2013) partículas con superficies rugosas probablemente contribuyen al aumento en valores de humedad y baja retención de pigmentos.

Las partículas presentaron morfologías heterogéneas con diámetros promedio para almidón succinatado, fosfatado y N-Lok de 6.93 μm , 6.61 μm y 4.66 μm respectivamente. Una de las grandes ventajas que se observaron con el uso de almidones modificados químicamente por agentes de fosfatación y succinación es que mostraron estructuras rígidas sin la aparente ruptura o fisura de las microcápsulas de betalaínas. En efecto esto es importante debido a que los daños en la superficie de la partícula podrían reducir la protección y retención del material núcleo.

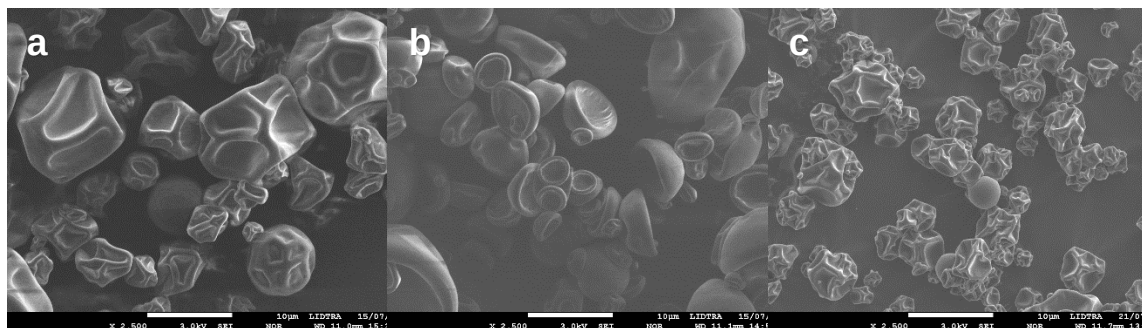


Figura 22. Micrografías de microcápsulas de betalaínas preparadas con almidón succinatado a); almidón fosfatado b); N – Lok c) con magnificación de 2500X.

6.14. Estudio de estabilidad de las microcápsulas de betalaínas

La Figura 23 muestra la cinética de betacianinas (BC) y betaxantinas (BX) totales. La degradación de betacianinas en las microcápsulas S y F fue estadísticamente diferente a NL ($p \leq 0.005$). Cabe señalar que el almidón N-Lok se usó como control en este estudio debido a su uso comercial. Con este almidón se obtuvieron altos rendimientos de encapsulación. Sin embargo, su estabilidad y eficiencia de encapsulación fueron bajos a 40 °C comparado con los almidones S y F. La concentración de betacianinas para los almidones S, F y NL fué de 0.5528 mg BC g⁻¹ de cápsulas, 0.5384 mg BC g⁻¹ de cápsulas y 0.3456 mg BC g⁻¹ y el contenido de betaxantinas fue de 0.5319 mg BX g⁻¹ de cápsulas, 0.5384 mg BX g⁻¹ de cápsulas y 0.4030 mg BX g⁻¹ de cápsulas respectivamente. Estos valores son superiores a los reportados por Saénz *et al.*, (2009) para betacianinas encapsuladas con maltodextrina e Inulina obtenidas de *Opuntia ficus-indica* con extracto etanólico y pulpa.

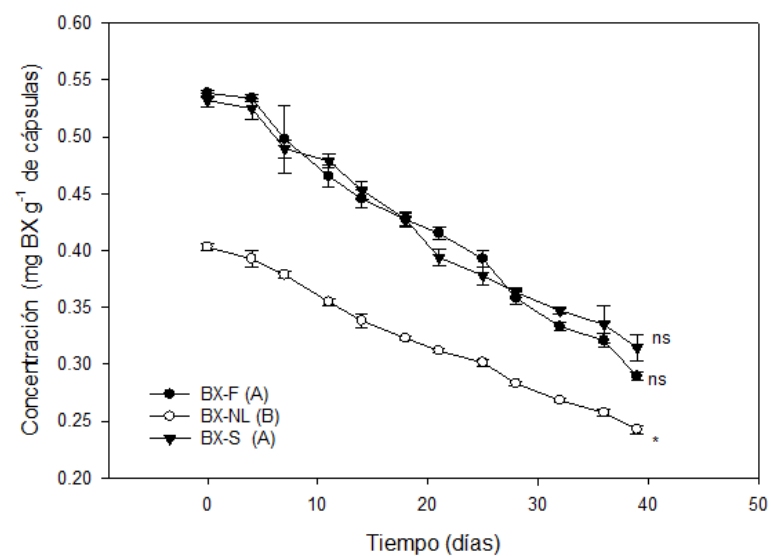
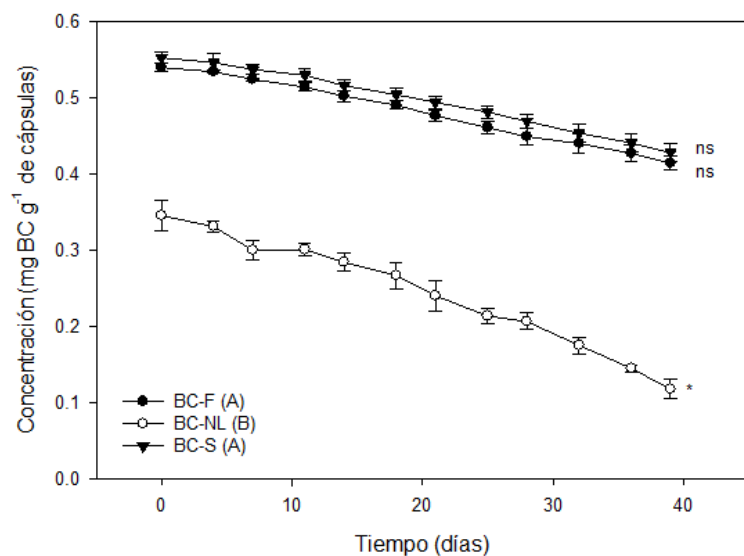


Figura 23. Estabilidad del contenido de betacianinas (BC) y betaxantinas (BX) totales encapsuladas con diferentes materiales de pared con almidón succinatado (S), fosfatado (F) y N-Lok (NL) a 40 °C. Letras mayúsculas entre paréntesis indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para cinéticas de betacianinas y betaxantinas. Las leyendas ns y * indican cambio no significativo ($P > 0.05$) y cambio significativo ($P \leq 0.05$) para cada cinética.

El contenido de betacianinas superficiales en las microcápsulas S, F y NL fue de 0.0138 mg BC g⁻¹, 0.0185 mg BC g⁻¹ y 0.0239 mg BC g⁻¹ y la cantidad de betaxantinas superficiales fue de 0.0127 mg BX g⁻¹, 0.0172 mg BX g⁻¹ y 0.0212 mg BX g⁻¹ respectivamente. La Figura 24 muestra la cinética de estos valores para betacianinas y betaxantinas en las microcápsulas. La mejor eficiencia de encapsulación se obtuvo con almidones succinatados, seguido de los fosfatados y N-Lok. Sin embargo, en todos los casos, la velocidad de degradación presentó una cinética lineal, es decir, de primer orden con la pérdida total de los pigmentos en el día siete. En contraste, las microcápsulas obtenidas con N-Lok presentaron mayor contenido de betaxantinas y menor cantidad de betacianinas. Esto hecho concuerda con los datos obtenidos por Janiszewska, (2014) para betalaínas obtenidas de betabel encapsuladas con goma arábica.

En la Figura 25 se observa un cambio de color al inicio y final del estudio de estabilidad de las microcápsulas a 40 °C. El cambio de color que se obtuvo con los materiales de pared de almidón S, F y NL fue de 17.44, 16.76 y 20.69 respectivamente.

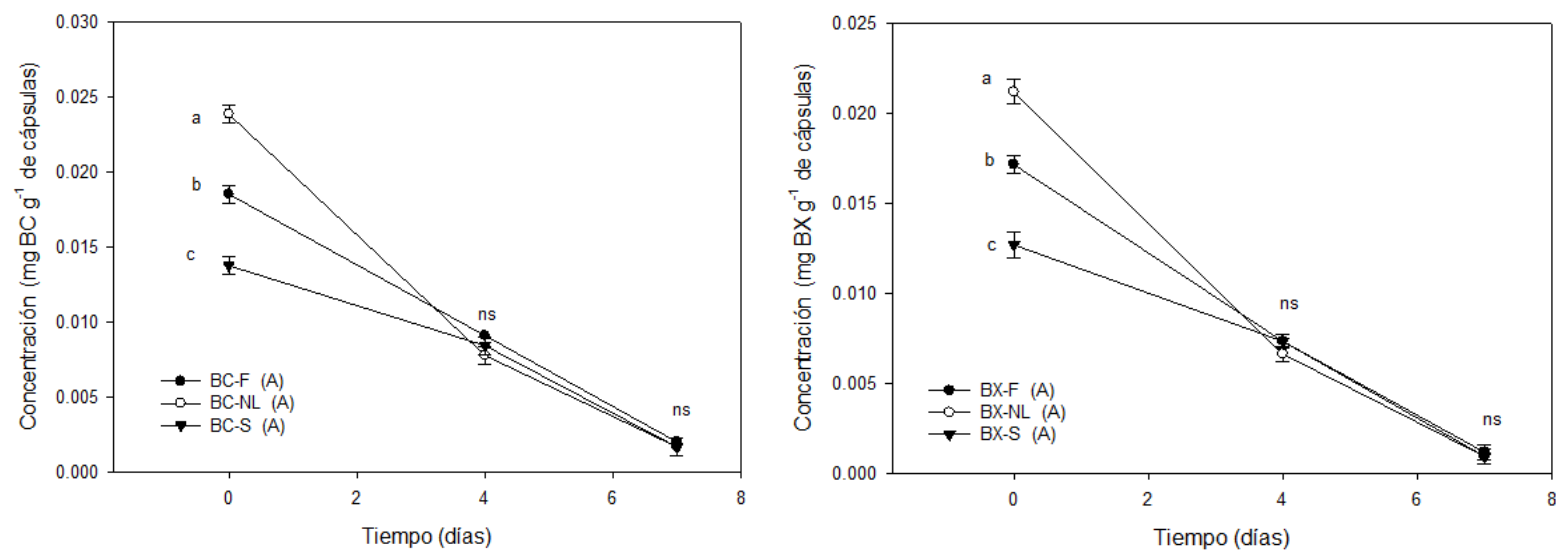


Figura 24. Estabilidad del contenido de betacianinas (BC) y betaxantinas (BX) superficiales encapsuladas con diferentes materiales de pared con almidón succinatado (S), fosfatado (F) y N-Lok (NL) a 40 °C. Letras mayúsculas entre paréntesis indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para cinéticas de betacianinas y betaxantinas. Las leyendas ns y * indican cambio no significativo ($P > 0.05$) y cambio significativo ($P \leq 0.05$) para cada cinética.

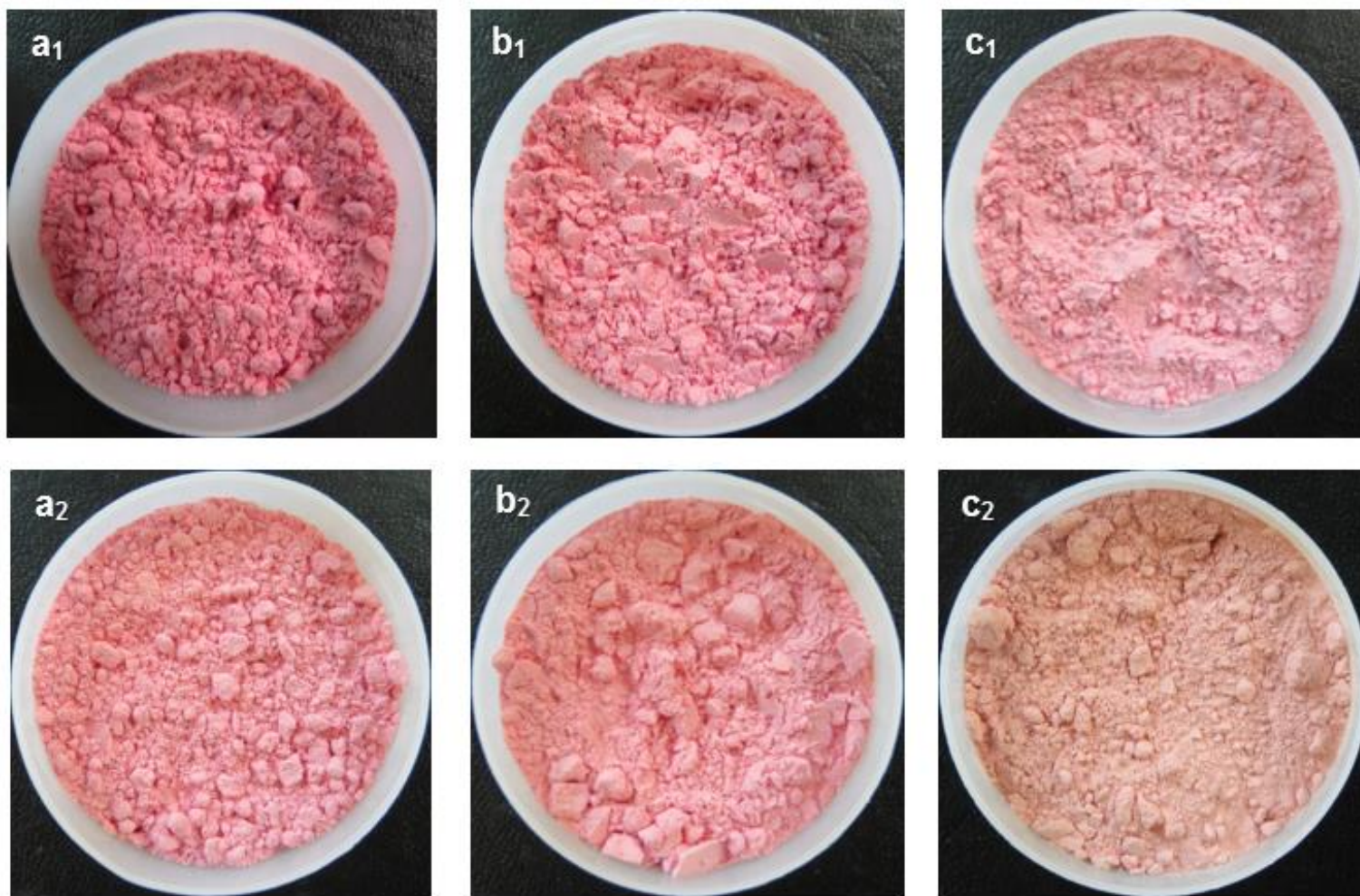


Figura 25. Microcápsulas de betalaínas al inicio y final del estudio de estabilidad preparadas con almidón succinatado (a₁, a₂) almidón fosfatado (b₁, b₂) y almidón N-Lok (c₁, c₂).

6.15. Estudio de estabilidad de yogurt adicionado con microcápsulas de betalaínas

En este estudio se evaluó la estabilidad de un yogurt con betalaínas encapsuladas (Cuadro 8) y extracto liofilizado de pitaya como control (Cuadro 9) almacenados a 4 °C durante 39 días. El yogurt tuvo un pH promedio de 4.6 ± 0.2 para las dos muestras de yogurt evaluadas y no hubo cambio durante su almacenamiento. Los parámetros de color L^* , a^* , b^* para el yogurt con microcápsulas de almidón succinatado fue de $L^* = 67.86$, $a^* = 21.27$ y $b^* = 3.17$; para almidón fosfatado fue $L^* = 70.43$, $a^* = 18.84$ y $b^* = 3.40$ y para el almidón control N-Lok se obtuvieron valores de $L^* = 71.09$, $a^* = 18.33$ y $b^* = 3.61$.

Para el yogurt con extracto liofilizado de pitaya los parámetros de color fueron $L^* = 84.06$, $a^* = 5.96$ y $b^* = 6.69$. Los cambios de color durante el almacenamiento se reportaron como ΔE (Figura 26). El yogurt adicionado con extracto de pitaya tuvo un ΔE de 10.33 con un cambio de h° inicial de 48.30 y final de 67.31.

Las muestras de yogurt que contenían microcápsulas con los materiales de pared estudiados S, F y NL exhibieron cambios ΔE de 24.12, 16.04 y 18.80 respectivamente. El valor h° inicial para estas microcápsulas fue de 8.48, 10.22 y 11.13 y final fue de 12.38, 15.32, 17.04 respectivamente.

Obón *et al.*, (2009) estudiaron la aplicación de un colorante obtenido de frutos de *Opuntia stricta* a un yogurt en el que obtuvieron valores muy similares en L^* y C^* . Sin embargo obtuvieron parámetros de color $+a$ y $-b$ obteniendo valores h° diferente al de este estudio con tonos púrpura cercano a los 360° . En este estudio se obtuvieron valores $+a$ y $+b$ por lo tanto el tono en el yogurt fue color rosa.

Cuadro 8. Estabilidad del color en yogurt adicionado con extracto de pitaya liofilizado.

Tiempo (días)	Parámetros de color		
	L*	C*	h°
0	84.06	8.96	48.30
4	84.60	8.85	50.07
7	84.31	9.03	54.72
11	83.68	9.80	56.09
14	83.87	9.97	59.40
18	84.09	9.98	62.20
21	83.15	9.87	63.32
25	83.39	9.86	63.88
28	83.52	9.83	64.52
32	83.54	9.83	65.30
36	83.37	9.72	66.56
39	83.51	9.70	67.31

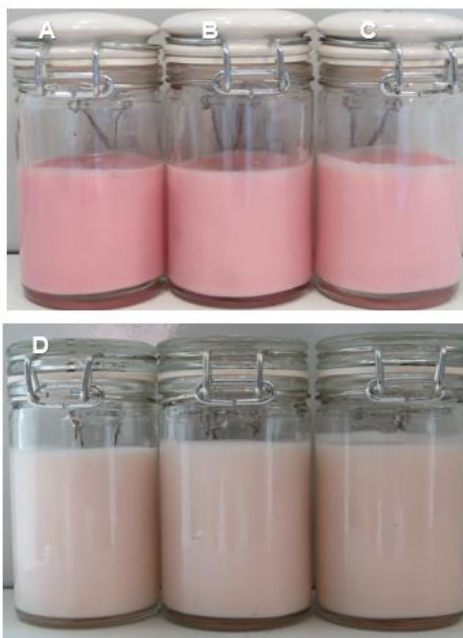


Figura 26. Muestras de yogurt con microcápsulas de betalaínas preparadas con almidón succinatado a) Fosfatado b) N-Lok c) y yogurt adicionado con extracto liofilizado de pitaya d). Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 9. Yogurt adicionado con microcápsulas de betalaínas.

Tiempo (días)	Muestras	Parámetros de color		
		L*	C*	h*
0	S	67.86	21.50	8.48
	F	70.43	19.15	10.22
	NL	71.09	18.68	11.13
4	S	69.84	20.21	10.15
	F	72.31	17.79	12.58
	NL	73.03	17.41	13.89
7	S	70.08	19.70	12.71
	F	72.60	17.66	15.51
	NL	73.24	17.07	16.86
11	S	71.38	18.64	12.20
	F	73.81	16.42	15.28
	NL	74.57	15.74	16.64
14	S	70.03	20.14	12.82
	F	72.63	17.78	15.89
	NL	73.26	17.25	17.29
18	S	69.88	19.87	13.35
	F	74.05	16.23	15.72
	NL	74.59	15.78	17.61
21	S	70.91	19.14	12.58
	F	73.60	17.08	15.74
	NL	74.11	16.22	17.42
25	S	71.29	18.80	12.34
	F	73.88	16.23	15.40
	NL	74.59	15.70	17.45
28	S	71.28	18.41	12.51
	F	73.20	16.88	15.78
	NL	74.28	16.44	17.19
32	S	71.34	18.33	12.47
	F	73.17	16.83	15.63
	NL	74.17	16.35	17.16
36	S	71.29	18.30	12.45
	F	73.18	16.78	15.57
	NL	74.22	16.29	17.06
39	S	71.24	18.21	12.38
	F	73.15	16.68	15.32
	NL	74.17	16.21	17.04

7. CONCLUSIONES

Se logró extraer betalaínas de frutos de pitaya (*Stenocereus pruinosus*) con una solución etanólica 1:1. El sistema de ATPE permitió una reducción significativa del 81.23 % en el contenido de azúcares en el extracto de betalaínas, lo cual puede considerarse una eficiencia alta del procedimiento usado, pues se aplicó una sola etapa de separación. En forma congruente, el extracto de betalaínas experimentó una reducción de 16.35 % en el contenido de sólidos solubles totales y adicionalmente, fue notoria la utilidad del procedimiento de ATPE para reducir el contenido de mucílago del extracto de betalaínas, pues la goma experimentó una disminución de 54.74 %. El pH en el extracto de pitaya antes de ATPE y después de ATPE fue de 5.35, lo cual favorece las condiciones óptimas en el uso del pigmento.

Se evaluó la estabilidad de betalaínas en soluciones acuosas a 60 °C y a 4 °C de manera diferenciada entre betacianinas (BC) y betaxantinas (BX). En ambos casos, la velocidad de degradación presentó una cinética lineal, es decir, de primer orden. La estabilidad fue afectada por la temperatura. En la condición de 4 °C no hubo modificación de la concentración de betacianinas y betaxantinas durante las rutinas realizadas con duración de 12 h.

Sin embargo, la aplicación de una condición de 60 °C causó una reducción rápida en la concentración de BC y BX, pero tal degradación ocurrió a mayor velocidad en las muestras con contenido reducido de azúcares.

En base a este estudio se propuso una alternativa para proteger a estos pigmentos de condiciones degradantes mediante la tecnología de microencapsulación usando la técnica de secado por aspersión. Debido a que existen pocos materiales de pared en la microencapsulación, se propuso obtener dos tipos de almidón modificado a partir del almidón nativo de papa por agentes de fosfatación y succinatación. Se logró hacer la modificación química con TPS se obtuvieron valores de GS de 0.038 y con n-OSA se obtuvo un GS de 0.021, lo cual se cumple con el reglamento de la FDA en los límites permitidos de estos reactivos para uso alimentario. El proceso de hidrólisis ácida y las severas condiciones de extrusión en los almidones modificados causaron la dextrinización de los almidones modificados con valores de ISA superiores al 50 % y viscosidad limitada en solución. Esto es muy favorable tomando en cuenta las especificaciones que deben cumplir los materiales de pared utilizados en el secado por aspersión. Adicionalmente los almidones mostraron disminución en la cristalinidad debido a la fragmentación de los gránulos de almidón y daño mecánico de la molienda, hidrólisis ácida en condiciones de extrusión.

Los gránulos de almidón presentan forma ovalada características del almidón de papa. Después de la modificación los almidones succinatados y fosfatados, los gránulos perdieron su integridad y se observaron formas irregulares y empaquetadas. Estos cambios drásticos en la morfología del almidón indican que el gránulo de almidón fue completamente destruido.

El secado por aspersión se llevó a cabo con temperatura de entrada de 145 °C y temperatura de salida de 80 ± 2 °C. El rendimiento de encapsulación para las betalaínas con los materiales de pared a partir de almidones S, F y NL fue de 34.77, 30.25 y 60.58 y la eficiencia de encapsulación fue de 97.56, 96.69 y 93.98 respectivamente. Este hecho es importante debido que a pesar de que el almidón N-Lok usado como control en este estudio es ampliamente utilizado comercialmente. Este tuvo eficiencia de encapsulación baja al compararlo con los almidones S y F. Las muestras presentaron en su mayoría formas esféricas con superficie colapsada o indentaciones. Esto es usualmente atribuido a la contracción de las partículas debido a la drástica pérdida de agua seguida del enfriamiento. El tamaño de partícula promedio de las microcápsulas de S, F y NL fue de 6.93 μm , 6.61 μm y 4.66 μm .

Se hizo un estudio de estabilidad de las cápsulas a 60 °C con los materiales de pared S, F y NL durante 39 días obteniendo valores de betaxantinas de 0.5528 mg BC g⁻¹ de cápsulas, 0.5384 mg BC g⁻¹ de cápsulas y 0.3456 mg BC g⁻¹ y betaxantinas con valores de 0.5319 mg BX g⁻¹ de cápsulas, 0.5384 mg BX g⁻¹ de cápsulas y 0.4030 mg BX g⁻¹ de cápsulas respectivamente.

La tonalidad de color de yogurt con betalaínas de pitaya microencapsuladas almacenado a 4 °C no mostro cambio aparente en el color, por lo que es recomendable adicionar las microcápsulas a este tipo de sistemas alimentarios, en tanto que cuando se agregaron sin encapsular modificaron de manera considerable su color.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aberoumand, A. (2011). A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. *World J Dairy Food Sci*, 6(1), 71-8.
- Agustiniano, J. C. (2004). Obtención de almidón resistente mediante extrusión a partir de almidón de mango *Manguífera indica* L. (Var. Tommy Atkins). Yautepec, Morelos. Instituto Politécnico Nacional Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias en desarrollo de productos bióticos. 5-15.
- Anderson, R.A., Conway, H.F., Pfeife, F.F. y Griffin Jr., E. L. (1969). Gelatinization of corn grits by roll-and extrusion-cooking. *Cereal Sci. Today*. 14:4–7, 11–12.
- Aparnathi, K. D., & Borkhatriya, V. N. (1999). Improved extraction and stabilization of natural food colorants. *Indian Food Industry*, 18(3), 164–168.
- Armenta, R. A., y Peña-Valdivia, C. B. (2009). Structural polysaccharides in xoconostle (*Opuntia matudae*) fruits with different ripening stages. *J Prof Assoc Cactus*, 11, 26-44.
- Attoe, E.L. y von Elbe, J.H. (1981). Photochemical degradation of betanine and selected anthocyanins. *Journal of Food Science*, 46, 1934–1937.

- Azeredo, H. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability—a review. *International journal of food science & technology*, 44(12), 2365-2376.
- Bilyk, A. & Howard, M. (1982). Reversibility of thermal degradation of betacyanins under the influence of isoascorbic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 906–908.
- Brümmer, T., Meuser, F., van Lengerich, B., y Niemann, C. (2002). Expansion and functional properties of corn starch extrudates related to their molecular degradation, product temperature and water content. *Starch-Stärke*, 54(1), 9-15.
- Cai, Y., Sun, M., y Corke, H. (1998). Colorant properties and stability of *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(11), 4491-4495.
- Cardoso-Ugarte, G. A., Sosa-Morales, M. E., Ballard, T., Liceaga, A., y San Martín-González, M. F. (2014). Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 276-282.
- Carrier, G. B. (1964). Electron Microscopic Technique for Determining the Percent Crystallinity of Glass-Ceramic Materials. *Journal of the American Ceramic Society*, 47(8), 365-367.
- Castellar, M.R., Obón, J.M., Alacid, M. y Fernández-López, J.A. (2003). Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2772–2776.

- Cejudo-Bastante, M. J., Hurtado, N., Mosquera, N., y Heredia, F. J. (2014). Potential use of new Colombian sources of betalains. Color stability of ulluco (*Ulluco tuberosus*) extracts under different pH and thermal conditions. *Food Research International*, 64, 465–471.
- Champagne, C. P., y Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current opinion in biotechnology*, 18(2), 184-190.
- Chang, Y., and Lii, C. (1992). Preparation of Starch Phosphates by Extrusion. *J. Food Sci.* 57:203-205.
- Chethana, S., Nayak, C. A., y Raghavarao, K. S. M. S. (2007). Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. *Journal of Food Engineering*, 81(4), 679-687.
- Chethana, S., Nayak, C.A., Raghavarao, K.S.M.S. (2004). In L. Duffose L (Ed.), *Proceedings of the International Conference, 3rd International Congress on Pigments in Food* (pp. 309–311). France: Quimper.
- Chethana, S., Raghavarao, K.S.M.S. (2003). An improved process for the concentration and purification of betalains, Indian patent, 388/DEL/03.
- Chiu, C. W., & Solarek, D. (2009). Modification of starches. *Starch: Chemistry and technology*, 629-655.
- Chuck-Hernández, C., Parra-Saldívar, R., Sandate-Flores, L., Caballero, B., Finglas, P. M. & Toldrá, F. (2016). *Pitaya (Stenocereus spp.)*. *Encyclopedia of Food and Health*. Oxford: Academic Press.
- Czapski, J. (1990). Heat stability of betacyanins in red beet juice and in betanin solutions. *European Food Research and Technology*, 191, 275–278.

- Delgado-Vargas, F., y Paredes-López, O. (2002). Natural colorants for food and nutraceutical uses. CRC Press.
- Desai, K. G. H., y Jin Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying technology*, 23(7), 1361-1394.
- Drunkler, D.A., Fett, R. y Bordignon-Luiz, M.T. (2006). Avaliação da estabilidade de betalaínas em extrato de beterraba (*Beta vulgaris* L.) com α -, β - e γ -ciclodextrinas. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 24, 259–276.
- Escribano, J., Gandía-Herrero, F., Caballero, N., y Pedreño, M. A. (2002). Subcellular localization and isoenzyme pattern of peroxidase and polyphenol oxidase in beet root (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6123-6129.
- Ferrari, C. C., Marconi Germer, S. P., Alvim, I. D., y de Aguirre, J. M. (2013). Storage stability of spray-dried blackberry powder produced with maltodextrin or gum arabic. *Drying Technology*, 31(4), 470-478.
- Filoková, I., Xin Huang, L., Mujumdar, A.S., (2006). Industrial spray drying systems. In: Mujumdar, A.S. (Ed.), *Handbook of Industrial Drying*. CRC Press, USA, pp. 215–256.
- Fuchs, M., C. Turchiuli, M. Bohin, M. Cuvelier, C. Ordonnaud, M. Peyrat and E. Dumoulin. 2006. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering* 75(1): 27-35.
- García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Salinas-Moreno y Luna-Morales, C. D. C. (2016). Postharvest quality, soluble phenols, betalains content, and

- antioxidant activity of *Stenocereus pruinosus* and *Stenocereus stellatus* fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 69-76.
- García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Salinas-Moreno, Y., y Joaquín-Cruz, E. (2013). Physical, chemical, and antioxidant activity characterization of Pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruits. *Plant foods for human nutrition*, 68(4), 403-410.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., y Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107-1121.
- Gunning, Y. M., Gunning, P. A., Kemsley, E. K., Parker, R., Ring, S. G., Wilson, R. H., y Blake, A. (1999). Factors affecting the release of flavor encapsulated in carbohydrate matrixes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(12), 5198-5205.
- Herbach, K.M., Rohe, M., Stintzing, F.C. y Carle, R. (2006a). Structural and chromatic stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton & Rose) betacyanins as affected by the juice matrix and selected additives. *Food Reserach International*, 39, 667–677.
- Herbach, K.M., Stintzing, F.C. y Carle, R. (2006b). Betalain stability and degradation– structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science*, 71, R41–R50.
- Herbach, K.M., Stintzing, F.C. y Carle, R. (2004). Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *Journal of Food Science* 69, C491-498.

- Herbach, K.M., Stintzing, F.C. y Carle, R. (2006). Betalain stability and degradation –structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science* 71, R41–R50
- Huang, A. S. y von Elbe, J. H. (1985). Kinetics of the degradation and regeneration of betanine. *Journal of Food Science* 50, 1115-1129.
- Hui, R., Qi-He, C., Ming-liang, F., Qiong, X., y Guo-qing, H. (2009). Preparation and properties of octenyl succinic anhydride modified potato starch. *Food Chemistry*, 114(1), 81-86.
- I Ré, M. (1998). Microencapsulation by spray drying. *Drying technology*, 16(6), 1195-1236.
- Janiszewska, E. (2014). Microencapsulated beetroot juice as a potential source of betalain. *Powder Technology*, 264, 190-196.
- Jeon, Y.S., Viswanathan, A. y Gross, R.A. (1999). Studies of starch esterification: Reactions with alkenyl-succinates in aqueous slurry systems. *Starch/Stärke* 51(2-3): 90-93.
- Kandansamy, K., y Somasundaram, P. D. (2012). Microencapsulation of colors by spray drying-a review. *International Journal of Food Engineering*, 8(2).
- Kim, C. T., Shih, F. F., Champagne, E. T. y Daigle, K. (1999). Effects of phosphorylating salts and temperature on the preparation of rice starch phosphates by extrusion. *Starch/Stärke*. 51 (8-9): 280-286.
- Kim, H. Y., Park, S. S., y Lim, S. T. (2015). Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 126, 607-620.

- Krishnaiah, D., Bono, A., Sarbatly, R., Nithyanandam, R., y Anisuzzaman, S. M. (2012). Optimisation of spray drying operating conditions of *Morinda citrifolia* L. fruit extract using response surface methodology. *Journal of King Saud University-Engineering Sciences*.
- Kuehl, R. (2001). *Diseño de experimentos: Principios estadísticos para el análisis y diseño de investigaciones*. 2da Edición. Thomson Editores. México 65 p.
- Kugler, F., Stintzing, F.C. y Carle, R. (2004). Identification of betalains from petioles of differently coloured Swiss chard (*Beta vulgaris* L. ssp. *cicla* [L.] Alef. cv. Bright Lights) by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2975–2981.
- Lewis, R. y McElhaney, R. N. (1995). Fourier Transform Infrared Spectroscopy in the Study of Hydrated Lipids and Lipid Bilayer Membranes. En: *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*. Chapter 7. Mantsch, H. y Chapman, D. Eds. John Wiley y Sons, Inc. U.S.A.
- Li, S.; He, C.; Liu, H.; Li, K.; Liu, F. (2005). Ionic liquid-based aqueous two-phase system, a sample pretreatment procedure prior to high-performance liquid chromatography of opium alkaloids. *Journal of Chromatography B* 826: 58-62.
- Liu, Q. (2005). Understanding Starches and Their Role in Foods. In “*Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications*”. Taylor and Francis Group LLC, Boca raton, Florida: 311-349.

- Liu, Z., Zhou, J., Zeng, Y., y Ouyang, X. (2004). The enhancement and encapsulation of *Agaricus bisporus* flavor. *Journal of Food Engineering*, 65, 391–396.
- Loksuwan, J. (2007). Characteristics of microencapsulated b-carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrina. *Food Hydrocolloids* 21: 928-935.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., y Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release—a review. *International journal of food science & technology*, 41(1), 1-21.
- Marcazzan, F., Vianello, F., Scarpa, M., y Rigo, A. (1999). An ESR assay for α -amylase activity toward succinylated starch, amylose and amylopectin. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 38:191-202.
- Martínez, F., López, M., San Martín, E., Zazueta, J. J. y Velez, J. J. (2007). Effects of high energy milling on some functional properties of jicama starch (*Pachyrrhizus erosus* L. Urban) and cassava starch (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Food Engineering*. 78: 1212-1220.
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., y Heredia, F. J. (2003). Application of tristimulus colorimetry to estimate the carotenoids content in ultrafrozen orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7266–7270
- Mobhammer, M.R., Stintzing, F.C. y Carle, R. (2005). Colour studies on fruit juice blends from *Opuntia* and *Hylocereus* cacti and betalain-containing model solutions derived therefrom. *Food Research International*, 38, 975–981.
- Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C. I., y Martínez-Bustos, F. (2009). Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of

- modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 91(3), 380-386.
- Neelwarne, B. (Ed.). (2012). *Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications*. Springer Science y Business Media.
- O'Brien S., Wang Y. J., Vervaet C., Remon J. P. (2009). Starch phosphates prepared by reactive extrusion as a sustained release agent. *Carbohydrate Polymers* 76: 557–566.
- Obón, J. M., Castellar, M. R., Alacid, M., y Fernández-López, J. A. (2009). Production of a red–purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 471-479.
- Ochubiojo, E. M., y Rodrigues, A. (2012). *Starch: from food to medicine*. INTECH Open Access Publisher.
- Osborne, D. R., y Voogt, P. (1986). *Análisis de los nutrientes de los alimentos*. Zaragoza, España: Ed. Acribia.
- Otálora, M. C., Carriazo, J. G., Iturriaga, L., Nazareno, M. A., y Osorio, C. (2015). Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. *Food chemistry*, 187, 174-181.
- Parra, F., Blancas, J., y Casas, A. (2012). Landscape management and domestication of *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) in the Tehuacán Valley: human guided selection and gene flow. *J Ethnobiol Ethnomed*, 8(32), 4269-8.

- Pitalua E., M. Jimenez, E.J. Vernon-Carter, C.I. Beristain, (2010). Antioxidative activity of microcapsules with beetroot juice using gum Arabic as wall material, *Food and bioproducts processing*, vol.88, pp.253–258.
- Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V., y Ramesh, V. (2011). Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules—a review. *Science and Technology*, 1(1), 7-16.
- Reineccius, G. A. (1988). Spray-drying of food flavors. In G. A. Reineccius y S. J. Risch (Eds.), *Flavor encapsulation* (pp. 55–66). Washington, DC: American Chemical Society.
- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., y Sáenz, C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International journal of food science & technology*, 45(7), 1386-1394.
- Saénz, C., Tapia, S., Chávez, J., y Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114(2), 616-622.
- Sajilata, M. G., Singhal, R. S., y Kulkarni, P. R. (2006). Resistant starch—a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5(1), 1-17.
- Sapers, G.M. y Hornstein, J.S. (1979). Varietal differences in colorant properties and stability of red beet pigments. *Journal of Food Science*, 44, 1245–1248.
- Schwartz, S.J. y von Elbe, J.H. (1983). Identification of betanin degradation products. *European Food Research and Technology*, 176, 448–453.

- Serris, G.S. y Biliaderis, C.G. (2001). Degradation kinetics of beetroot pigment encapsulated in polymeric matrices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 691–700.
- Singh, J., Kaur, L. y Mc Carthy, O. J. (2007). Factors influencing the physicochemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications. A review. *Food Hydrocolloids*. 21: 1-22.
- Sitohy, M. Z., El-Saadany, S. S., Ramadan, M. F., y Labib, S. M. (2000). Physicochemical properties of different types of starch phosphate monoesters. *Starch-Starke*, 52(4), 101-105.
- Song, X., He, G., Ruan, H y Chen, Q. (2006). Preparation and Properties of Octenyl Succinic Anhydride Modified Early Indica Rice Starch. *Starch/Stärk*. 58:109-117.
- Song, X., Pei, Y., Qiao, M., Ma, F., Ren, H., y Zhao, Q. (2015). Preparation and characterizations of Pickering emulsions stabilized by hydrophobic starch particles. *Food Hydrocolloids*, 45, 256-263.
- Stintzing, F. C., y Carle, R. (2007). Betalains—emerging prospects for food scientists. *Trends in Food Science & Technology*, 18(10), 514-525.
- Stintzing, F.C., Herbach, K.M., Mosshammer, M.R.et al. (2005). Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntiaspp.*) clones.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 442–45.
- Stintzing, F.C., Schieber, A. y Carle, R. (2002b). Identification of betalains from yellow beet (*Beta vulgaris* L.) and cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization

- mass spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2302–2307.
- Strack, D., Vogt, T., y Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62(3), 247-269.
- Sweedman, M. C., Tizzotti, M. J., Schäfer, C., y Gilbert, R. G. (2013). Structure and physicochemical properties of octenyl succinic anhydride modified starches: A review. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 905-920.
- Tester, R. F., Karkalas, J. y Qi, X. (2004). Starch–composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*. 29: 151-165.
- Tian, Y., Zhang, X., Sun, B., Jin, Z., y Wu, S. (2015). Starch sodium dodecenyl succinate prepared by one-step extrusion and its properties. *Carbohydrate polymers*, 133, 90-93.
- Vaillant, F., Perez, A., Davila, I., Dornier, M. y Reynes, M. (2005). Colourant and antioxidant properties of red-purple pitahaya (*Hylocereus* sp.) Fruits, 60, 1–10.
- Vasanthan, T., Yeung, J., Hoover, (2001). Dextrinization of starch in barley flours with thermostable alpha-amylase by extrusion cooking. *Starch/Stärke* 53, 616–622
- von Elbe, J.H. & Attoe, E.L. (1985). Oxygen involvement in betanine degradation– Measurement of active oxygen species and oxidation reduction potentials. *Food Chemistry*, 16, 49–67.
- von Elbe, J.H., Maing, I. y Amundson, C.H. (1974). Colour stability of betanin. *Journal of Food Science*, 39, 334–337.

- von Elbe, J.H., Schwartz, S.J. y Hildenbrand, B.E. (1981). Loss and regeneration of betacyanin pigments during processing of red beets. *J Food Science* 46, 1713–1715.
- Wang, G., Thompson, M. R., y Liu, Q. (2012). In situ kinetic study of solid-state crosslinking of potato starch. *Starch-Stärke*, 64(1), 55-63.
- Xue, F., Li, C., Liu, Y., Zhu, X., Pan, S., y Wang, L. (2013). Encapsulation of tomato oleoresin with zein prepared from corn gluten meal. *Journal of Food Engineering*, 119, 439e445.
- Yañez, J., J. Salazar, L. Chaires, J. Jiménez, M. Márquez y E. Ramos. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Revista Avance y Perspectiva* 21: 313-319.
- Zhu, W., Xie, H. L., Song, X. Y., y Ren, H. T. (2011). Production and Physicochemical Properties of 2-Octen-1-Ylsuccinic Derivatives from Waxy Corn Starch. *Journal of food science*, 76(3), C362-C367.
- Zobel, H. F. (1988). Molecules to granules: a comprehensive starch review. *Starch-Stärke*, 40(2), 44-50.