



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

**PROTECCIÓN DE BETALAÍNAS DE XOCONOSTLE (*Opuntia matudae*)
MEDIANTE SU INCLUSIÓN EN COMPLEJOS POLISACÁRIDO-
POLISACÁRIDO**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA



Presenta:

DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

HUMBERTO ALEJANDRO GUADARRAMA AGUILAR

Bajo la supervisión de:

Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros



Chapingo, Estado de México, Enero 2018

**PROTECCIÓN DE BETALAÍNAS DE XOCONOSTLE (*Opuntia matudae*)
MEDIANTE SU INCLUSIÓN EN COMPLEJOS POLISACÁRIDO-
POLISACÁRIDO.**

Tesis realizada por Humberto Alejandro Guadarrama Aguilar bajo la supervisión del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

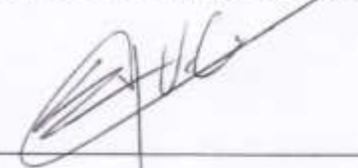
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

DIRECTOR



Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros

ASESOR



Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter

ASESOR



Dr. Cesar Ramirez Santiago

CONTENIDO

CONTENIDO.....	III
LISTA DE CUADROS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
DEDICATORIAS.....	VIII
AGRADECIMIENTOS.....	IX
DATOS BIBLIOGRÁFICOS.....	X
RESUMEN GENERAL.....	XI
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Aspectos generales del xoconostle (<i>Opuntia matudae</i>).....	4
2.1.1. Distribución geográfica del xoconostle en México.....	5
2.1.2. Uso y consumo del xoconostle en México.....	6
2.1.3. Características del xoconostle.....	6
2.1.4. Propiedades del fruto del xoconostle.....	7
2.2. Alimentos funcionales.....	8
2.3. Los vegetales como fuente de compuestos bi0activos.....	8
2.4. Polifenoles.....	9
2.5. Betalaínas.....	10
2.5.1. Propiedades de las betalaínas.....	11
2.6. Factores que afectan la estabilización de las betalaínas.....	11
2.6.1. pH.....	11
2.6.2. Temperatura.....	12
2.6.3. Luz.....	12
2.6.4. Actividad de agua (Aw).....	13
2.6.5. Oxígeno.....	13
2.7. Betalaínas en los alimentos.....	13
2.8. Coacervación.....	14
2.9. Quitosano.....	15
2.10. Goma arábica.....	16

2.11. Literatura citada.....	18
3. CUANTIFICACIÓN DE BETALAINAS EN JUGO DE XOCONOSTLE Y LA MEDICIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	24
3.1. Introducción.....	26
3.2. Materiales y Métodos.....	27
3.2.1. Materiales.....	28
3.2.2. Métodos.....	28
Purificación del jugo de xoconostle.....	30
Determinación de la actividad antioxidante por el método del radical ABTS.+.....	30
Determinación de la actividad antioxidante por el método del radical DPPH.....	32
Cuantificación de fenoles totales.....	33
Liofilización de jugo de xoconostle.....	34
Cuantificación de betalaínas.....	34
Análisis de datos.....	35
3.3. Resultados y discusión.....	36
3.4. Conclusión.....	38
3.5. Literatura citada.....	39
4. FORMACIÓN DE COACERVADOS COMPLEJOS PARA LA PROTECCIÓN DE BETALAÍNAS DE JUGO DE XOCNOSTLE	42
4.1. Introducción.....	44
4.2. Materiales y Métodos.....	45
4.2.1. Materiales.....	45
4.2.2. Métodos.....	45
Dispersiones stock de los polisacáridos.....	46
Medición del potencial zeta (ζ) de los polisacáridos y jugo de xoconostle.....	46
Diseño experimental.....	47

Elaboración de complejos.....	47
Medición del ζ -potencial del sobrenadante.....	48
Rendimiento de los coacervados complejos.....	49
Evaluación de la estabilidad de las betalaínas atrapadas.....	49
Eficiencia de atrapamiento.....	50
Medición del tamaño de partícula.....	50
Análisis de datos.....	51
4.3. Resultados y discusión.....	51
4.4. Conclusión.....	65
4.5. Literatura citada.....	66

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Curva de calibración de Trolox.....	31
Cuadro 2. Diluciones del jugo de xoconostle.....	32
Cuadro 3. Fenoles totales y capacidad antioxidante por los radicales ABTS y DPPH de jugo de xoconostle.....	36
Cuadro 4. Contenido de betalaínas en jugo de xoconostle.....	37
Cuadro 5. Variables y concentraciones usadas para la formulación de los complejos coacervados.....	47
Cuadro 6. Formulaciones de complejos coacervados.....	48
Cuadro 7. Rendimiento de complejos coacervados.....	53
Cuadro 8. ζ -potencial del sobrenadante de los complejos coacervados.....	56
Cuadro 9. Eficiencia de atrapamiento de betalaínas.....	58
Cuadro 10. ANOVA del diseño factorial para eficiencia de atrapamiento. ...	59
Cuadro 11. Valores medios de tamaño Dv (μm) de partícula en los complejos coacervados.....	60
Cuadro 12. Porcentaje de DPPH degradado por las betalaínas liberadas después de su almacenamiento.....	62
Cuadro 13. Porcentaje de humedad y sólidos totales de los coacervados liofilizados.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo de xoconostle cuaresmeño en San Martín de las Pirámides. .	6
Figura 2. Estructura química de la quitina y quitosano.	15
Figura 3. Estructura química de la goma arábica.	16
Figura 4. Protocolo experimental empleado para para la obtención del extracto a partir del fruto de xoconostle y caracterización de su actividad antioxidante....	29
Figura 5. Protocolo experimental empleado para la protección de las betalaínas contenidas en un extracto del fruto de xoconostle, mediante coacervación compleja.	45
Figura 6. ζ -potencial de las dispersiones de goma arábica (GA), quitosano (Q), Betanina (B) y jugo de xoconostle (JL) a los diferentes valores de pH.	52
Figura 7. Porcentaje de rendimiento de los coacervados complejos de goma arábica-quitosano.	54
Figura 8. ζ -potencial del sobrenadante de los coacervados complejos de Q-GA-JL.	55
Figura 9. Betacianinas, Vulgaxantinas y Betalaínas totales en jugo de xoconostle antes y posterior a su encapsulación.	57
Figura 10. Eficiencia de entrapamiento de betalaínas en todos los tratamientos.	58
Figura 11. Tamaño de partículas de los coacervados complejos (Dv 90).....	61
Figura 12. Porcentaje de DPPH degradado por las betalaínas liberadas posterior a su almacenamiento durante 30 días.	63
Figura 13. Apariencia y color de los tratamientos antes de ser retirados del liofilizador.	64
Figura 14. Apariencia y color de los tratamientos C4 y C6 respectivamente posterior a su almacenamiento durante 30 días.	64

DEDICATORIAS

A Dios por permitirme tener vida y admirar lo magnífica y sorprendente que esta puede ser.

A Luz Imelda Farfán Alba; mi esposa, amiga, compañera de vida y confidente, por ser mi gran fuente de inspiración, mi apoyo, mi fortaleza, por todo el amor y comprensión que me brindas siempre.

A mis padres Reyes Guadarrama Cerón, María Aguilar Hernández y hermano José Alfredo Guadarrama Aguilar, por ser ellos mi punto de apoyo y guías en todo momento, por las siempre atenciones y cariño recibidas de su parte.

A la Universidad Autónoma Chapingo por permitirme formar como profesionista, brindándome la entrada al maravilloso mundo del saber y también por darme la oportunidad de conocer grandes amigos durante estos dos años de estadía.

A la Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros y a todos los integrantes (Profesores y alumnos) del grupo de Alimentos funcionales, gracias por su total apoyo en todos los aspectos.

A todos mis maestros y amigos que pude hacer durante mi estancia en el posgrado, gracias a ustedes todos los días fueron más amenos y nuevas cosas pude ver en cada uno de ustedes, que ahora puedo aplicar en mi vida para ser mejor.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el financiamiento otorgado para continuar con mi formación académica.

A la Universidad Autónoma Chapingo, mi alma mater, al Departamento de Ingeniería Agroindustrial, al Departamento de Preparatoria Agrícola por las facilidades brindadas para la realización de esta investigación.

A la Dra. Consuelo Lobato Calleros, por su apoyo en la dirección de este proyecto de investigación y ser un ejemplo de dedicación.

A la Dr. Cesar Ramírez Santiago por su asesoría, apoyo y confianza brindados para realizar este proyecto.

Al grupo de trabajo de alimentos funcionales, quienes con su experiencia enriquecieron este trabajo.

A mis amigos de la 14^a generación, que siempre me brindaron su amistad y apoyaron en todo momento.

A mi familia por ser mi apoyo incondicional.

DATOS BIOGRÁFICOS

Humberto Alejandro Guadarrama Aguilar, nació el 11 de Enero de 1992, originario del municipio de Chiautla, Estado de México, con Clave Única de Registro de Población GUAH920111HMCDGM01.

Estudió su bachillerato en la Preparatoria Agrícola perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo, donde también cursó su Licenciatura en Ingeniería Agroindustrial y obtuvo su título de Ingeniero Agroindustrial en el 2013 por la institución, con número de cedula profesional 9657508. Posteriormente ejerció durante un año y medio en la evaluación de proyectos en la incubadora de empresas EMPROSER S.C., ubicada en San Juan Teotihuacán, Estado de México. Después en 2015 participa en una convocatoria para jóvenes emprendedores y gana un crédito otorgado por el Instituto Mexiquense de la Juventud.

El mismo año realiza su examen de ingreso y es admitido en el programa de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, posgrado perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo para continuar con su preparación.

RESUMEN GENERAL

PROTECCIÓN DE BETALAÍNAS DE XOCONOSTLE (*Opuntia matudae*) MEDIANTE SU INCLUSIÓN EN COMPLEJOS POLISACÁRIDO- POLISACÁRIDO.

La estabilidad de las betalaínas de xoconostle es un aspecto importante a considerar para el empleamiento de estos pigmentos como colorantes y antioxidantes en alimentos. Con el fin de favorecer la vida útil de las betalaínas, la presente investigación tuvo como objetivo determinar la estabilidad de estos compuestos mediante su protección con la técnica de coacervación compleja entre dos polisacáridos. Primeramente, se determinó el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante mediante la técnica del radical libre DPPH en el jugo de xoconostle donde se obtuvo un porcentaje de degradación del radical del 91%. Se planteó un experimento completamente al azar para realizar las diversas formulaciones utilizadas con quitosano (Q), goma arábica (GA) y jugo de xoconostle liofilizado (JL). Cada uno de los ocho tratamientos se sometieron a pruebas de medición de ζ -potencial, donde el tratamiento C4 obtuvo el valor más cercano a la neutralidad con un valor de carga de 0.0003 mV. Posteriormente en el rendimiento de coacervados complejos, también se mostró una diferencia estadísticamente significativa entre dicho tratamiento con el resto, ya que se obtuvo el valor más alto con 89.3 %. Con relación a la eficiencia de atrapamiento los tratamientos C8 y C4 mostraron tener los mejores resultados con una eficiencia del 63.43 y 63.26% respectivamente. El menor tamaño de partícula lo obtuvo el tratamiento C3 con un tamaño de 21 μm . Finalmente el tratamiento que mejor estabilizó las betalaínas después de 30 días de almacenamiento fue el C4, ya que obtuvo valores de degradación del DPPH del 89%, muy similar al inicial. Los resultados obtenidos indican que los complejos coacervados elaborados con una concentración de polisacáridos Q: 0.4 mg mL⁻¹ y GA: 0.6 mg mL⁻¹ (C4) a valores de pH 5.3, podrían ser utilizados como elementos protectores betalaínas durante su almacenamiento.

Palabras clave: actividad antioxidante, interacción electrostática, coacervación compleja, polisacáridos, protección de betalaínas.

Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria
Universidad Autónoma Chapingo
Humberto Alejandro Guadarrama Aguilar
Consuelo S.O. Lobato Calleros

GENERAL ABSTRACT

PROTECTION OF BETALAINS OF XOCONOSTLE (*Opuntia matudae*) BY THEIR INCLUSION IN POLYSACCHARIDE-POLYSACCHARIDE COMPLEXES.

The stability of xoconostle betalains is an important aspect to consider for the use of these pigments as colorants and antioxidants in foods. In order to favor the useful life of betalains, the present investigation aimed to determine the stability of these compounds through their protection with the complex coacervation technique between two polysaccharides. Firstly, the total polyphenol content and the antioxidant activity were determined by means of the free radical technique DPPH in the xoconostle juice, where a radical degradation percentage of 91% was obtained. A completely random experiment was used to perform the various formulations used with chitosan (Q), gum arabic (GA) and lyophilized xoconostle juice (JL). Each of the eight treatments was subjected to ζ -potential measurement tests, where the C4 treatment obtained the value closest to neutrality with an electric charge value of 0.0003 mV. Later, in the yield of coacervate complexes, a statistically significant difference was also shown between said treatment and the rest, because it obtained the highest value with 89.3%. Regarding the entrapment efficiency, the C8 and C4 treatments showed the best results with an efficiency of 63.43 and 63.26% respectively. The smallest particle size was obtained by the C3 treatment with a size of 21 μm . Finally, the treatment that best stabilized betalains after 30 days of storage was C4, because it obtained 89% degradation values of DPPH, very similar to the initial one. The results obtained indicate that the coacervate complexes prepared with a concentration of polysaccharides Q: 0.4 mg mL⁻¹ and GA: 0.6 mg mL⁻¹ (C4) at pH 5.3 could be used to protect betalains during storage.

Key words: antioxidant activity, electrostatic interaction, complex coacervation, polysaccharides, protection of betalains.

Master's Thesis in Food Science and Technology
Universidad Autónoma Chapingo
Humberto Alejandro Guadarrama Aguilar
Consuelo S.O. Lobato Calleros

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El xoconostle es un fruto muy apreciado por su color, su pulpa carnososa y ácida (mesocarpio), caracterizada por una parte mucilaginosa con semillas pequeñas (Osorio, Ortiz, Álvarez Dorantes y Mónica, 2011). El mesocarpio (pulpa) es la fracción comestible, tradicionalmente utilizada en México como condimento en salsas u otros platos de la cocina mexicana, así como como en la elaboración de caramelos, jaleas y bebidas para su consumo (Almanza, 1999).

El xoconostle y sus subproductos han llamado bastante la atención a los profesionales de la salud así como a los consumidores debido al descubrimiento de sus propiedades que puede brindar a la salud, funcionando como antihipoglucémico, antihiperlipidíco, hipocolesterolémico, antiinflamatorio, antidiurético, actividad antiulcerogénica e inmunoestimulante, así como en la prevención de cáncer (Chávez *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2013; Morales *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2013). El mesocarpio de este fruto ha sido estudiado por el contenido de compuestos antioxidantes, como polifenoles (Osorio, Ortiz, Herrera, y Hernández., 2013), ácido ascórbico y tocoferoles (Morales, Ramírez, Sánchez, Carvalho y Ferreira., 2012; Schwenke, 2002). Además, Osorio *et al.* (2011) informaron que las diferentes partes del fruto proporcionan actividad antioxidante en porcentajes diferentes (62,96% en pericarpio, 42,27% en mesocarpio y 51,70% en endocarpio).

Diferentes autores (Morales *et al.*, 2012, Osorio *et al.*, 2011; Prieto *et al.*, 2006) describen que el xoconostle y sus subproductos (semillas, pericarpio y mucílagos del endocarpio) se podrían utilizar como ingredientes funcionales para la industria alimentaria, ya sea como pigmentos, antioxidantes, formulaciones enriquecidas que incluyan tocoferoles, ácido ascórbico y compuestos fenólicos, en lugar de ser desechados. Además, este fruto una de las pocas fuentes disponibles para la

extracción de betalaínas en la naturaleza, representando una alternativa atractiva, barata, para remplazar aditivos alimentarios sintéticos, siendo esto además una ventaja para el uso integral del fruto en la elaboración de productos derivados del mismo, lo cual ayudaría a los productores al dar un realce en la producción y utilización del fruto.

En este sentido, Morales, Ramírez, Santos y Ferreira (2014) mencionan que las betalaínas son los principales pigmentos que se producen en los frutos de xoconostle. De acuerdo a su estructura química, pueden clasificarse como betacianinas (pigmentos rojo-violeta) y betaxantinas (exhiben color amarillo-naranja). La estabilidad es un aspecto importante a considerar antes de utilizar estos compuestos naturales como colorantes y antioxidantes en los alimentos. Los principales factores que afectan dicha estabilidad de las betalaína son el pH, la actividad del agua, temperatura, oxígeno, exposición a la luz, entre otras (Herbach, Stintzing and Carle., 2004). Por ello, la tecnología de encapsulación mediante la técnica de coacervación puede utilizarse para la estabilización, protección y prolongación de la vida útil de estos compuestos sensibles, así como otras aplicaciones en la industria alimentaria, incluyendo la liberación controlada, entrega y enmascaramiento de sabores, colores y olores (Anal and Singh, 2007), además, esta tecnología podría ofrecer ventajas sobre tecnologías ya existentes, debido a su fácil implementación y costo relativamente bajo.

Es por ello que para el presente trabajo se planteó como hipótesis de trabajo que mediante la técnica de microencapsulación (coacervación compleja), se protegerán de los factores deteriorantes las betalaínas de xoconostle, en consecuencia, se mejorará la vida útil de los mismos, preservando sus propiedades funcionales y aumentando su estabilidad durante el almacenamiento. De esta forma, se dispondrá de un colorante natural con propiedades saludables el cual podrá incorporarse a alimentos con sistemas acuosos. Debido a ello, el objetivo principal de la investigación fue la de determinar la estabilidad de las betalaínas de xoconostle microencapsuladas mediante la técnica de coacervación compleja entre dos polisacáridos (goma

arábiga-quitosano) como materiales de protección, en almacenamiento durante 30 días.

La investigación comprende de dos fases experimentales; la primera de ellas comprende básicamente en la obtención del jugo de xoconostle en forma de polvo liofilizado, para poder cuantificar su contenido de polifenoles totales, de betalaínas así como medir la actividad antioxidante del mismo con el fin de conocer su potencial nutracéutico para su posible adición durante la formulación de alimentos que permitan obtener beneficios a la salud del consumidor.

La segunda etapa de la investigación está orientada a la protección de las betalaínas del jugo de xoconostle, mediante su inclusión en coacervados complejos de quitosano (Q) – goma arábica (GA), para lo cual fue necesario la medición de diversos factores que permitieran la formación de estos, tales como mediciones turbidimétricas, la medición del potencial- ζ de los materiales de pared y matriz, el rendimiento, la eficiencia de entrapamiento y tamaño de partícula. Finalmente, se midió la estabilidad de los coacervados después de 30 días de almacenamiento para determinar el grado de protección que estos ofrecieron a las betalaínas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Aspectos generales del xoconostle (*Opuntia matudae*)

En diversas regiones de la República Mexicana existen especies de *Opuntia* conocidas como xoconostle. De acuerdo con Almanza (1999), su nombre proviene de la lengua Náhuatl: Xoco (Ácido) y Nochtli (Tuna). La morfología del fruto se encuentra constituido por el pericarpio, el cual se constituye por la piel y los tejidos distantes; el mesocarpio y endocarpio por la pulpa y las semillas respectivamente. Estas últimas se encuentran en el núcleo del fruto, unidas y compactadas firmemente por un compuesto mucilaginoso (Reyes, Aguirre y Valiente, 2005).

Nobel (2002), menciona que las especies del género *Opuntia* son tolerantes a las sequías, ya que las plantas presentan adaptaciones fisiológicas tales como la apertura de estomas durante la noche, con el fin de evitar la transpiración debido a las altas temperaturas características de las zonas áridas y semiáridas en donde crecen.

Por otro lado, existe una gran dificultad para diferenciar los frutos del género *Opuntia*, ya que se pueden presentar colores similares en diversas especies. De acuerdo a Casas y Barbera (2002), existen 8 especies de xoconostle (*O. joconostle* A. Web., *O. matudae* Scheinvar, *O. duranguensis* Britton & Rose, *O. heliabravona* Scheinvar, *O. imbricata* DC., *O. leucotricha* DC., *O. velutina* F.A.C. Weber y *O. zamudioi* Scheinvar). Estas especies crecen en nopaleras silvestres en las regiones semiáridas de México, pero también se producen en plantaciones comerciales.

Entre las principales características fisicoquímicas del xoconostle, destaca su acidez, la cual se encuentra en un rango de pH que va de 3.7 a 4.5

aproximadamente, lo cual restringe su consumo, sin embargo, también es una ventaja ya que debido a esa característica su vida de anaquel es más larga, a diferencia de la tuna dulce, que presenta valores entre 5.2 y 6.0 (Bravo, 1978).

El color característico de los frutos de xoconostle se debe a las betalaínas, pigmentos naturales hidrosolubles con nitrógeno en su estructura que se sintetizan a partir del aminoácido tirosina. Las betalaínas se dividen en dos grupos: betacianinas, que brindan tonalidades rojas y se forman por condensación de una estructura ciclo-DOPA (dihidroxifenilalanina) con el ácido betalámico, y betaxantinas que proporcionan coloraciones amarillas y se sintetizan a partir de diferentes compuestos amino y el ácido betalámico (Gandía *et al.*, 2010; Strack *et al.*, 2003).

Además de dar coloración a los frutos y poseer actividad antioxidante, las betalaínas son reconocidas por otras importantes actividades biológicas, tales como la inducción de la quinona reductasa, potente enzima de detoxificación en la quimio prevención del cáncer (Azeredo, 2009), y su actividad antiproliferativa de células de melanoma maligno (Wu *et al.*, 2006).

2.1.1. Distribución geográfica del xoconostle en México

El cultivo de xoconostle se centra principalmente en el estado de San Luis Potosí, en el Estado de México, en el estado de Hidalgo y en la zona árida queretana-hidalguense. El Consejo Mexicano de Nopal y Tuna (COMENTUNA) y el Consejo Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), en 2008, reportaron que en el Estado de México se producen 10,000 ton/año de xoconostle, cerca del 80% del cultivado en el país principalmente de la especie *O. matudae*, conocida como xoconostle cuaresmeño, la cual es la especie más explotada y comercializada, seguida de por la *O. matudae* Scheinvar cv. Rosa (Guzmán *et al.*, 2010).



Figura 1. Cultivo de xoconostle cuaresmeño en San Martín de las Pirámides.

2.1.2. Usos y consumo del xoconostle en México

El fruto de xoconostle es considerado como un valioso alimento, que es consumido como fruto fresco, como un vegetal en ensaladas y salsas, como un ingrediente principal en postres, secado en hojas como un aperitivo, en bebidas alcohólicas y es frecuentemente usado, añadiendo este a sopas para mejorar el sabor (Almanza, 1999). También es también procesado a pequeña escala en la industria alimentaria como jalea, como fruta completa en almíbar o salmuera, en salsas y licores, entre otros productos alimentarios (Corrales y Flores, 2000).

En medicina tradicional esta fruta es usada como remedio para diabetes, hipertensión, obesidad y enfermedades respiratorias (Scheinvar, 1999).

2.1.3. Características del xoconostle

De acuerdo a Bravo (1978), morfológicamente, el fruto se caracteriza por tener una forma de ovoide o esférica (dependiendo el cultivar), con una depresión en el extremo distal, conocida como “cicatriz umbilical”, lugar donde se encontraba el perianto de la flor.

El xoconostle está conformado por el epicarpio, formado por la cáscara; el mesocarpio y endocarpio, formado por la pulpa y las semillas, donde estas últimas se encuentran en el centro del fruto unidas y compactas por mucílago.

2.1.4. Propiedades del fruto de xoconostle

Morales *et al.* (2012), menciona que las semillas del xoconostle (*O. joconostle*) son una buena fuente de fibra, compuestos fenólicos, flavonoides, ácidos grasos poliinsaturados y tocoferoles (especialmente γ -tocoferol), que proporcionan una buena capacidad antioxidante.

Hoy en día, la producción de productos alimenticios más saludables con actividad funcional que puede ayudar en la prevención de enfermedades crónicas y las enfermedades degenerativas se han convertido en un reto importante para las industrias alimentarias.

Algunos de los compuestos bioactivos identificados en el xoconostle, como tocoferoles, debido a su papel como eliminador de radicales libres, se cree que protegen contra procesos degenerativos, como el cáncer y enfermedades cardiovasculares (Burton and Traber, 1990; Schwenke, 2002).

Del mismo modo, los polifenoles son moléculas con posibles efectos beneficiosos sobre la salud humana, incluida la regulación de la proliferación y muerte celular, vías que conducen al cáncer (Carocho y Ferreira, 2013).

Pimienta, Méndez, Ramírez, García y Domínguez (2008), informaron que el consumo de cáscara de *O. joconostle* podría ser útil para controlar niveles séricos de glucosa en individuos con *diabetes mellitus* tipo 2, así como en personas sanas, ayudando a prevenir condiciones de hiperglucemia y alteración en la concentración de colesterol y triglicéridos. Además, otras bioactividades saludables han sido atribuidas a este fruto; de este modo, Osorio *et al.* (2013), evaluó el efecto protector de la suplementación de extractos ricos en polifenoles de diferentes partes de *O. joconostle* contra el tetracloruro de carbono, posibles

mecanismos de protección incluida la inhibición de la peroxidación lipídica y el aumento de actividad superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa.

Por lo tanto, la piel (pericarpio) y los mucílagos (endocarpio), como subproductos comunes del procesamiento del xoconostle, podría considerarse como un objetivo atractivo para su uso en la industria alimentaria, considerando su composición nutricional y fitoquímica, así como sus propiedades antioxidantes.

2.2. Alimentos funcionales

Araya y Lutz (2003) definieron los alimentos funcionales como “alimentos cuyos componentes afectan funciones del organismo de manera positiva, promoviendo un aspecto fisiológico más allá de su valor nutritivo tradicional”.

En la actualidad y desde hace varios años, a los compuestos funcionales de los alimentos se les presta una gran atención en medicina y salud pública ya que desempeñan funciones importantes en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades degenerativas. En ese sentido, se ha comprobado que muchos componentes de los alimentos, especialmente los de algunas frutas, hortalizas, cereales, legumbres, especias y yerbas aromáticas son bioactivos y participan en determinadas actividades metabólicas humanas, además de que carecen de efectos secundarios perjudiciales, aunque su bioactividad se parezca más a los fármacos que a la de los nutrientes (Wrick, 1994).

2.3. Los vegetales como fuente de compuestos bioactivos

Es claro que hay componentes en la dieta a base de plantas además de los nutrientes tradicionales, los cuales pueden reducir el riesgo de cáncer. Steinmetz y Potter (1991), identificaron más de una docena de clases de químicos biológicamente activos en plantas, ahora llamados “fitoquímicos”.

En 1992, un estudio en 200 casos epidemiológicos (Block, Patterson and Subar., 1992) mostró que el riesgo de cáncer en personas que consumían una dieta alta en frutas y vegetales fue solamente de la mitad respecto de aquellos que tenían una baja ingesta de estos alimentos.

Existen cientos de compuestos fitoquímicos, muchos de ellos son similares en función o composición, por lo que son agrupados por categorías o familias. Algunas de las familias más conocidas de estos compuestos son los carotenoides, polifenoles, isoflavonas, isoprenoides, isotiocianatos, monoterpénos, flavonoides, fitoesteroles y ácidos grasos, entre otros (Deustch, 2001).

2.4. Polifenoles

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos podemos denominarlos polifenoles. Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.). Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido idroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Murcia y Martínez, 2000).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe sobre todo a las propiedades redox, que les permite actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, bloqueantes del oxígeno en singulete y captadores de radicales $\text{OH}\cdot$ (Murcia y Martínez, 2000). Los compuestos fenólicos tienen un potencial de quelación, es decir, una alta capacidad de “secuestrar” a los radicales libres de metales pesados. Velioglu, Mazza, Gao and Oomah (1998) observaron que el coeficiente de correlación entre el contenido de compuestos fenólicos totales y las actividades antioxidantes estaban relacionadas de gran manera, es decir, a mayor contenido de compuestos fenólicos, la capacidad antioxidante del alimento era mayor.

2.5. Betalaínas

El color característico de los frutos de xoconostle, tuna roja y otros cactus como la pitaya, se le atribuye a la presencia de betalaínas, los cuales son pigmentos hidrosolubles N-heterocíclicos, depositados en las vacuolas (Figueroa, 2010).

Las betalaínas comprenden dos tipos principales de pigmentos hidrosolubles: las betacianinas (pigmentos rojo-violetas) y las betaxantinas (pigmentos amarillos), siendo estas las betalaínas más importantes en cactus (Piattelli e Imperato, 1969).

Las betacianinas son conocidas por mostrar dos absorciones máximas, uno en el rango de UV entre 270 y 280 nm (estructura Ciclo-Dopa) y una segunda a aproximadamente 535-538 nm dependiendo del sistema solvente. (Kobayashi, Schmidt, Wray and Schliemann, 2001).

Se ha demostrado en una amplia gama de ensayos que las betalaínas son pigmentos con potentes propiedades antioxidantes (Gentile *et al.*, 2004; Kaner *et al.*, 2001).

Las betalaínas y las antocianinas no se encuentran al mismo tiempo en las plantas, ya que, como lo reportan Nobel y Gibson (1990), las plantas que sintetizan betalaínas han perdido la habilidad de convertir flavonoides en antocianinas, porque no presentan la enzima que cataliza una de las reacciones cruciales para la síntesis de antocianinas. Las betalaínas se encuentran en 10 familias de vegetales y de éstas solamente dos familias son comestibles por el ser humano; la *Chenopodiaceae* (Remolacha) y *Cactaceae* (el cactus o nopal y la pitaya) (Stintzing, Scheieber and Carle, 2001).

2.5.1. Propiedades de las betalaínas

Fisiológicamente, contribuyen a evitar la degradación de la clorofila en condiciones de temperatura y radiación solar extremas y, de la misma forma, a reducir los efectos oxidantes de los radicales libres. Actualmente, estos pigmentos están llamando la atención por su actividad antioxidante en modelos

de oxidación lipídica, por su capacidad de atrapar radicales alcoholoxido y peróxido. También se ha demostrado que la betanina (una de las betacianinas principales) inhibe la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, y a baja concentración tiene mayor capacidad antioxidante que la catequina y el tocoferol (Stintzing *et al.*, 2001).

Hace algunos años, se documentó que los colores naturales de los alimentos pueden inhibir la proliferación celular de una variedad de células tumorales humanas (Muntha, Ruby, Lindo, Alexander and Muraleed-haran, 2005). Otros autores informaron que las betalaínas inhibieron el crecimiento celular e inducción de cambios ultraestructurales y fragmentación de células K562 en mieloides crónicos humanos (Sreekantha *et al.*, 2007).

En un estudio más reciente, Gengatharan, Dykes and Choo (2015) mencionan que además de su relevancia como colorantes, las betalaínas juegan un papel importante en la salud humana debido a sus actividades farmacológicas tales como antioxidante, anticancerígeno, antilipidémico y antimicrobiano.

2.6. Factores que afectan la estabilización de las betalaínas

En diversos estudios, cuando las betalaínas se han utilizado como colorantes de alimentos, la estabilidad del color es una de las mayores preocupaciones. Los principales factores que afectan la estabilidad del pigmento se describen a continuación.

2.6.1. pH

De acuerdo con Huang y Von Elbe (1987), el color de las betalaínas no es afectado por el pH entre 3.5 a 7. La longitud de onda (λ) máxima para betacianinas se encuentra entre 537 y 538 nm, mientras el máximo para betaxantinas se encuentra aproximadamente a 475 nm. A pH ácido (3.5), se desplaza a un valor más bajo; por arriba de pH 7, cambia a un valor más elevado; fuera de este intervalo, la intensidad del espectro visible decrece.

Además los autores mencionados, durante un estudio sobre las betalaínas de betabel, demostraron que el pH óptimo para la estabilidad máxima de la betanina en presencia de oxígeno está entre 5.5 y 5.8. Las soluciones de betabel mostraron la máxima estabilidad a pH=5.5, correspondiente al pH normal del betabel fresco.

Por otro lado, Sánchez (2006), realizó un estudio en la extracción y caracterización de los principales pigmentos de *Opuntia joconostle*, donde encontró que los pigmentos del xoconostle fueron estables a pH ácido-neutro (3-7), mostrando su mayor estabilidad a pH 5.

2.6.2. Temperatura

Uno de los factores más importantes en la estabilización de las betalaínas es la temperatura. Con relación a la degradación térmica de la betanina, se ha observado que al calentar soluciones de betanina se produce una reducción gradual del color rojo característico de este pigmento, apareciendo en consecuencia un color ligeramente marrón (Altamirano *et al.*, 1993, Drdák y Vallová, 1990, Huang y Von Elbe, 1987).

De acuerdo con Attoe y Von Elbe (1985), si se calienta la betanina a altas temperaturas (mayores de 60 °C) y por tiempos prolongados (mayores a una hora), se acelera la hidrólisis de este compuesto en solución, produciendo ácido betalámico y el ciclodopa-5-O-glucósido como productos intermediarios.

2.6.3. Luz

Von Elbe (1975), encontró que el índice de degradación de la betanina aumentó 15.6%, después de su exposición a la luz del sol a 15°C. Además, se observó que las betacianinas al ser expuestas a luz fluorescente, la degradación presentada fue mayor a pH = 3.0 ($k = 0.35 \text{ días}^{-1}$) que a pH = 5.0 ($k = 0.11 \text{ días}^{-1}$); en ausencia de luz las betacianinas fueron más estables ($k = 0.07 \text{ días}^{-1}$). Cabe mencionar que el mecanismo de la fotodegradación para las betalaínas no ha sido determinado con certeza.

2.6.4. Actividad de agua (Aw)

La mayor estabilidad del pigmento se encuentra en alimentos con un bajo contenido de humedad y de Aw, lo cual se atribuye a la reducida movilidad del reactivo o a la solubilidad limitada del oxígeno (Simon, Drdák and Altamirano, 1993). Cohen y Saguy (1983), reportaron que la estabilidad del pigmento decreció hasta en un orden de magnitud cuando el Aw aumentó de 0.32 a 0.75.

2.6.5. Oxígeno

La presencia de oxígeno causa el oscurecimiento del producto y la pérdida del pigmento. Von Elbe, (1975), almacenó en solución buffer a pH 7, betanina, bajo atmósfera de aire y nitrógeno hasta por 6 días a 15°C; observando que la degradación del color aumentó hasta un 15% cuando la betanina fue expuesta al aire. La betanina reaccionó con el oxígeno molecular, produciendo la degradación del pigmento en soluciones saturadas con oxígeno (Attoe y Von Elbe, 1985). De acuerdo a lo reportado por estos autores, la degradación de la betanina es una reacción parcialmente reversible y se ha recomendado que para aumentar la estabilidad del pigmento es necesario colocar las muestras en atmósferas con bajas concentraciones de oxígeno. Así, las soluciones calentadas de betanina (pH 4.75, 130 minutos, 15°C) con bajos niveles de oxígeno mostraron un incremento (de 54 a 92%) en la retención de betanina (Huang y Von Elbe, 1987).

2.7. Betalainas en los alimentos

La betanina, aprobado como colorante alimentario rojo por el Unión Europea (Downham and Collins, 2000) y en la Sección 73.40 en el capítulo 21 del Código de Regulaciones Federales (CFR), se ha utilizado como colorante para productos alimenticios, como caramelos duros, yogures, helados, aderezos para ensaladas, mezclas para pasteles, sustitutos de la carne, mezclas para bebida en polvo, salsas, dulces de malvavisco, refrescos y gelatina postres. En la mayoría de las aplicaciones de colorantes alimentarios, una cantidad estimada de menos de 50

mg de betanina/kg podría producir el color deseado (Delgado, Jiménez y Paredes., 2000).

Gracias a que las betalaínas muestran gran estabilidad a pH entre 4 y 6, y sin son almacenadas a 4 °C, pueden utilizarse en alimentos congelados con corta vida de anaquel. Sin embargo, como se describió anteriormente, las betalaínas son propensas a diversos factores fisicoquímicos, tales como la luz, oxígeno, calor, valores de pH mayores a 6 y a algunos metales tales como Fe³⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Cu⁺, Sn²⁺, Al³⁺, Hg²⁺, Cr³⁺ (Herbach *et al.*, 2006). Los usos de betalaínas se han reducido considerablemente debido a su escasa estabilidad, que plantea un problema significativo al competir con sintéticos tintes (Ozela, 2004).

Para aumentar sus aplicaciones comerciales, los pigmentos de betalaínas necesitan resistir o ralentizar estos cambios a través de técnicas de estabilización. Entre las diversas formas de estabilizar betalaínas, se encuentran la formación de complejos, copigmentación y encapsulación como técnicas prometedoras.

2.8. Coacervación

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define a la coacervación como la separación en dos fases líquidas de sistemas coloidales; la fase más concentrada en coloides es conocida como “fase coacervada” y la segunda como “fase en equilibrio”.

En general, el fenómeno es dividido en coacervación simple y coacervación compleja. La coacervación simple involucra el uso de una sola macromolécula y una sal, mientras que la coacervación compleja involucra el uso de dos biopolímeros con carga opuesta (Espinosa, Báez, Cruz y Vernon, 2007).

En general el proceso de coacervación consiste de tres pasos: 1) Formación de un sistema de tres fases químicamente inmiscibles (una fase líquida o fase continua, un material a recubrir y un material de cobertura o de pared); 2)

Deposición del material polimérico líquido que formará la cubierta, sobre el material a cubrir y 3) Solidificación de la cubierta.

Tiene como ventajas que pueden elaborarse microcápsulas tan pequeñas como de 4 μm , su forma es esférica, pueden tener una carga de material a encapsular de alrededor de 90%. Proporciona buena protección contra pérdidas por volatilización y contra la oxidación.

Como un método de entrapamiento, la técnica de coacervación ha sido utilizada como medio de protección o vehículo de saborizantes, conservadores, enzimas y células microbianas, entre otros (John *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2007).

2.9. Quitosano

En años recientes, las nanopartículas basadas en polisacáridos, han demostrado un gran potencial en las aplicaciones biológicas, farmacéuticas y en la industria de los alimentos. El uso del quitosano, un polisacárido producido por la deacetilación de la quitina (Figura 2), es muy prometedor debido a que no es tóxico y por su biocompatibilidad (Younes & Rinaudo, 2015).

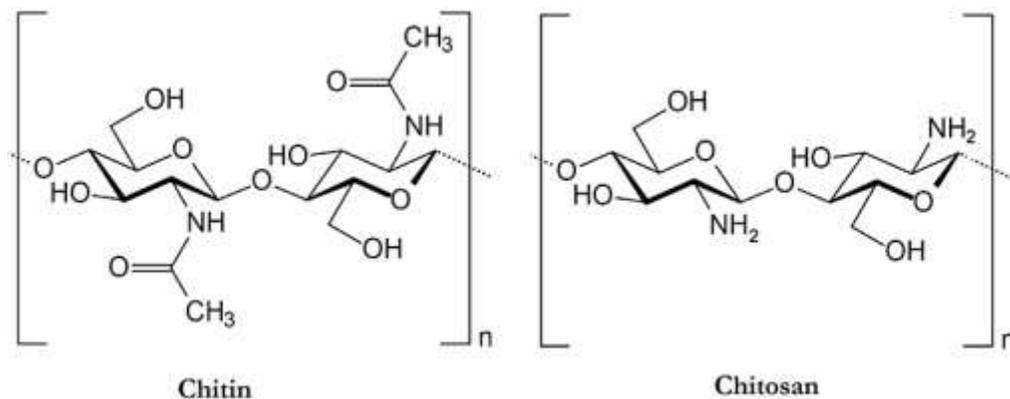


Figura 2. Estructura química de la quitina y quitosano.

A pH ácido, sus grupos amino se encuentran ionizados, permitiendo así ser un material hidrosoluble con carga positiva. Estas propiedades le permiten interactuar polímeros de carga opuesta por interacción electrostática intermolecular, formando complejos polielectrolitos (PEC). Algunos polisacáridos

cargados negativamente pueden complejarse con el quitosano para generar nanopartículas de PEC, incluida carboximetilcelulosa, sulfato de dextrano (Anitha *et al.*, 2011), alginato (Das, Kasoju and Bora, 2010), goma arábiga (Espinosa *et al.*, 2007), heparina (Lin *et al.*, 2013), entre otros.

Además, el quitosano ha sido ampliamente investigado por su potencial como un potenciador de absorción a través del epitelio intestinal para péptidos y proteínas (Illum, Jabbal-Gill and Hinchcliffe, 2001).

2.10. Goma arábiga

Es un arabinogalactano compuesto de tres fracciones distintas con diferentes contenidos de proteína y diferentes pesos moleculares. El análisis de la composición de la goma arábiga revela la presencia de una cadena principal de galactano (Figura 3) llevando cadenas laterales de galactosa / arabinosa fuertemente ramificadas. La mitad de carbohidratos se compone de D-galactosa (40% de los residuos), L-arabinosa (24%), L-ramnosa (13%) y dos tipos de ácidos urónicos, responsables del carácter polianiónico de la goma, ácido D-glucurónico (21%) y 4-O-metil-D- ácido glucurónico (2%). Se ha sugerido que este polisacárido tiene una estructura tipo "flor de acacia" con un número de unidades de polisacáridos unidos a una cadena de polipéptido (Weinbreck, Tromp and de Kruif, 2004).

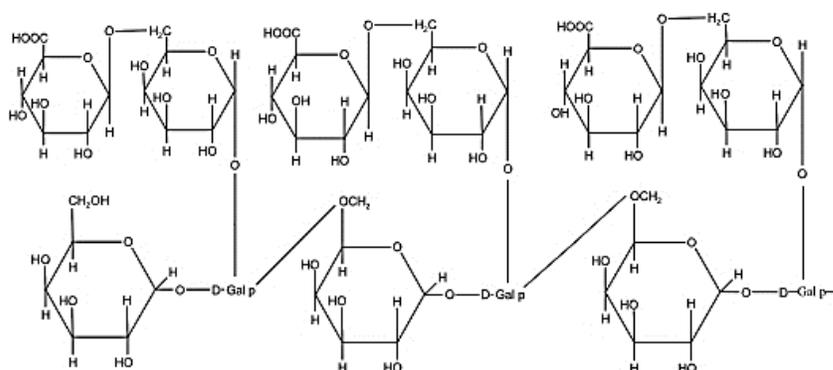


Figura 3. Estructura química de la goma arábiga.

La goma arábica es un polisacárido biocompatible y biodegradable, es ampliamente utilizado en productos farmacéuticos orales y tópicos, formulaciones alimenticias como agente de suspensión y emulsionante (Phillips y Phillips, 2011). A pH cercano a neutro, sus grupos carboxilo se disocian en gran medida y la repulsión culombiana resultante de los grupos carboxilato cargados negativamente, causarán que la molécula asuma una estructura altamente cargada y expandida. Esta característica contribuye a su buena actividad superficial y capacidad de formación de película viscoelástica (Dickinson, 2009). Además, en comparación con otros polisacáridos, se demuestra que la goma arábica tiene más sitios de interacción y carga negativa para la interacción con el quitosano policatiónico (Avadi *et al.*, 2010).

2.11. Literatura Citada

- Almanza, R.A. (1999). "Cocina Indígena y Popular. Recetario Guanajuatense del Xoconostle". Comisión Nacional para la Cultura y las Artes, Distrito Federal: CONACULTA.
- Altamirano, R. C., Drdák, M., Simon, P., Rajniakoba, A., Karovicová, J., & Preclík, L., (1993). Thermal degradation of betanine in various wáter alcohol model systems, *Food Chem.*, 46, 73-75, doi: 10.1016/0308-8146(93)90078-T.
- Anal A.K., & Singh H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 240–251, doi: 10.1016/j.tifs.2007.01.004.
- Anitha, A., Deepagan, V. G., Rani, V. V. D., Menon, D., Nair, S. V., & Jayakumar, R. (2011). Preparation, characterization, in vitro drug release and biological studies of curcumin loaded dextran sulphatechitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 84(3), 1158e1164, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.01.005.
- Araya, L. H., Lutz, R. M. (2003). Functional and Healthy Foods. *Rev. Chil. Nutr.* 30,1.
- Attoe, E. L. & Von Elbe, J. H. (1985). Oxygen Involvement in Betanine Degradation: Effect of antioxidants. *J. Food Sci.*, 50:106, doi: 10.1111/j.1365-2621.1985.tb13287.x
- Avadi, M. R., Sadeghi, A. M. M., Mohammadpour, N., Abedin, S., Atyabi, F., Dinarvand, R. (2010). Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1), 58e63, doi: 10.1016/j.nano.2009.04.007.
- Azeredo, H M C (2009) Betalains: properties, sources, applications, and stability—a review. *Int. J. Food Sci. Tech.* 44:2365-2376, doi: 10.1111/j.1365-2621.2007.01668.x.
- Block, G., Patterson, B., Subar, A. (1992). Fruit, vegetables, and cáncer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer* 18: 1-29, doi: 10.1080/01635589209514201.
- Burton, G. W., & Traber, M. G. (1990). Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annual Review of Nutrition*, 10, 357–382, doi: 10.1143/annurev.nu.10.070190.002041.
- Bravo H., E. (1978). *Las Cactáceas de México. Vol I.* Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria. D.F., México. 743 p.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). The role of phenolic compounds in the fight against cancer — A review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13, 1236–1258, doi: 10.2174/18715206113139990301.

- Casas A. y Barbera G. (2002). Mesoamerican domestication and diffusion. In "Cacti: Biology and Uses". P.S. Nobel (Ed.) p. 143-162. University of California Press, Berkeley-Los Angeles- London.
- Chavez, S. R. A., Gutierrez, U. J. A., & Serna S.S.O. (2009). Phenolic composition, antioxidant capacity and in vitro cancer cell cytotoxicity of nine prickly pear (*Opuntia* spp.) juices. *Plant Food for Human Nutrition*, 64, 146–152.
- COMENTUNA, Red Nopal y CONABIO. (2008). Nopales, tunas y xoconostles. Consejo Mexicano de Nopal y Tuna, A.C., Red Nopal y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 1ª edición, México.
- Corrales, G.J. y Flores, V.C.A. (2000). "Tendencias Actuales y Futuras en el Procesamiento del Nopal y la Tuna. Reporte de Investigación". Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México.
- Cohen, E., Saguy, I. (1983). Effect of water activity and moisture content on the stability of beet powder pigments. *J. Food Sci.* 48 703-707, doi: 10.1111/j.1365-2621.1983.tb14879.x.
- Das, R. K., Kasoju, N., & Bora, U. (2010). Encapsulation of curcumin in alginatechitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1), 153e160, doi: 10.1016/j.nano.2009.05.009.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 173–289, doi:10.1080/10408690091189257.
- Deustch, L. (2001). Foods that fight disease. Discover the healing power of food. 13-22.
- Díaz V. J., Totosa A., Cruz G.A.E., & Pérez C.M.L. (2013). In vitro evaluation of the fermentation of added-value agroindustrial by-products: cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.) peel and pineapple (*Ananas comosus*) peel as functional ingredients. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 1460–1467, doi: 10.1111/ijfs.12113.
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1473e1482, doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.08.005.
- Downham, A., & Collins, P. (2000). Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science & Technology*, 35, 5–22, doi: 10.1046/j.1365-2621.2000.00373.x.
- Drdák, M., & Vallová, M., (1990). Kinetics of the thermal degradation of betanine, *Die Nahrung, Molecular Nutrition*, 34, 307-310, doi: 10.1002/food.19900340402.

- Espinosa-Andrews, H., Báez-González, J. G., Cruz-Sosa, F., & Vernon-Carter, E. J. (2007). Gum Arabic–chitosan complex coacervation. *Biomacromolecules*, 8(4), 1313–1318, doi: 10.1021/bm0611634.
- Gandía-Herrero F, M Jiménez-Atiénzar, J Arbanes, F García-Carmona, J Escribano. (2010). Stabilization of the bioactive pigment of *Opuntia* fruits through maltodextrin encapsulation. *J. Agric. Food Chem.* 58:10646-10652, doi: 10.1021/jf101695f.
- Gengatharan, A., Dykes, G., & Choo, W. (2015). Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 645-649, doi: 10.1016/j.lwt.2015.06.052.
- Gentile, C., Tessoriere, L., Allegra, M., Livrea, M. A., & Alessio, P. D. (2004). Antioxidant betalains from cactus pear (*O. ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1028, 481–486, doi: 10.1196/annals.1322.057.
- Guzmán-Maldonado, S. H., Morales-Montelongo, A. L., Mondragón-Jacobo, C., Herrera-Hernández, G., Guevara-Lara, F., & Reynoso-Camacho, R. (2010). Physicochemical, nutritional, and functional characterization of fruits xoconostle (*Opuntia matudae*) pears from central-México region. *Journal of Food Science*, 75, 485–492, doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01679.x.
- Herbach K.M., Stintzing F.C., & Carle R. (2004). Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *Journal of Food Science*, 6, 491–498, doi: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb10994.x.
- Herbach, K. M., Rohe, M., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). Structural and chromatic stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton & Rose) betacyanins as affected by the juice matrix and selected additives. *Food Research International*, 39, 667–677, doi: 10.1016/j.foodres.2006.01.004.
- Huang, A. S., & Von Elbe, J. H. (1987). Effect of pH on the Degradation and Regeneration of Betanine. *J. Food Sci*, 52, 1689-1693, doi: 10.1111/j.1365-2621.1987.tb05907.x.
- Illum, L., Jabbal-Gill I., Hinchcliffe M. (2001). Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv Drug Del Rev*; 51:81-96, doi: 10.1016/S0169-409X(01)00171-5.
- John, R. P., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Surampalli, R. Y., Prevost, D. (2011). Bioencapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31 (3): 211–226, doi: 10.3109/07388551.2010.513327.
- Kaner, J., Harel, S., & Granit, R. (2001). Betalains—A new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5178–5185, doi: 10.1021/jf010456f.

- Kobayashi, N., Schmidt, J., Wray, V., & Schliemann, W. (2001). Formations and occurrence of dopamine-derived betacyanins. *Phytochemistry*, 56, 429–436.
- Lin, Y.-H., Tsai, S.-C., Lai, C.-H., Lee, C.-H., He, Z. S., & Tseng, G.-C. (2013). Genipincross-linked fucose-chitosan/heparin nanoparticles for the eradication of *Helicobacter pylori*. *Biomaterials*, 34(18), 4466e4479, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.02.028.
- Morales, P., Ramírez-Moreno, E., Sanchez-Mata, M., Carvalho, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Nutritional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xoconostle cultivars (*Opuntia joconostle* F.A.C. Weber ex Diguët and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. *Food Research International*, 46, 279–285, doi: 10.1016/j.foodres.2011.12.031.
- Morales, P.B.L., Ramírez M.E., Santos B.C., & Ferreira I.C.F.R. (2014). Exploring xoconostle by products as sources of bioactive compounds. *Food Research International*, 65, 437–444, doi: 10.1016/j.foodres.2014.05.067.
- Murcia, M. A., Martínez-Tomé M. (2000). Antioxidant activity of resveratrol compared with common food additives. *J Food Protect.* 64: 379-384, doi: 10.4315/0362-028X-64.3.379.
- Muntha-Reddy, K., Ruby, L., Lindo, Alexander, & Muraleed-haran Nair, G. (2005). Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes and human tumor cell proliferation by natural food colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9268–9273, doi: 10.1021/jf051399j.
- Nobel, P., Gibson, A. (1990). *The cactus primer*. Harvard University Press. Pp 188-190.
- Nobel, P. (2002). *Cacti. Biology and uses*. University of California Press. Pp 57-62.
- Oliveira, A. C., Moretti, T. S., Boschini, C., Baliero, J. C. C., Freitas, L. A. P., Freitas, O., Favaro-Trindade, S. (2007). Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying. *Drying Technology*, 25(10): 1687–1693, doi: 10.1080/07373930701590939.
- Osorio, E. O., Ortiz M.A., Álvarez V., Dorantes A.L., & Mónica G. (2011). Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. *Food Research International*, 44, 2160–2168, doi: 10.1016/j.foodres.2011.02.011.
- Osorio-Esquivel, O., Ortiz-Moreno, A., Herrera-Martínez, J., & Hernández-Navarro, M.D. (2013). Protective effect of phenolic-rich extracts from different parts of *Opuntia joconostle* fruit against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in mice. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 4, 35–42, doi: 10.4236/jbnb.2013.43A005.
- Ozela, E. F. (2004). Caracterização de flavonóides e estabilidade de pigmentos de frutos de Bertalha (*Basella rubra* L.). (Tesis Doctoral en Ciencia y

- Tecnología de Alimentos, Universidad Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil). Consultado en: <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/9040>.
- Phillips, A. O., & Phillips, G. O. (2011). Biofunctional behaviour and health benefits of a specific gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 165e169, doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.03.012.
- Piattelli, M., Imperato, F. (1969). Betacyanins of the family *Cactaceae*. *Phytochemistry* 8.1503-1507, doi: 10.1016/S0031-9422(00)85921-X.
- Pimienta-Barrios, E., Méndez-Morán, L., Ramírez-Hernández, B., García, A., & Domínguez-Arias, R. (2008). Efecto de la ingestión del fruto de xoconostle (*Opuntia joconostle* Web.) sobre la glucosa y lípidos séricos. *Agrociencia*, 42, 645–653.
- Prieto G.F., Filardo K.S., Pérez C.E., Beltrán H.R., Román G.A., & Méndez M.M. (2006). Caracterización física y química de semillas de Opuntias (*Opuntia* spp.) cultivadas en el estado de Hidalgo, México. *Bioagrociencia*, 18, 163–169.
- Reyes-Agüero J.A., Aguirre R.J.R. and Valiente B.A. (2005). Reproductive biology of Opuntia: a review. *J. Arid Environ.* In press, doi: 10.1016/j.jaridenv.2005.06.018.
- Sánchez, N. (2006). Extracción y caracterización de los principales pigmentos del *Opuntia joconoste* c.v. (xoconostle). (Tesis de maestría, Centro de investigación en ciencia aplicada y tecnología avanzada), Instituto Politécnico Nacional. Mexico D.F. Consultado en: http://repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/10716/1/PTA_M_20061219_001.PDF.
- Sánchez N., Jaime F.M., San Martin M.E., & Zepeda G. (2013). Extraction, stability, and separation of betalains from *Opuntia joconostle* cv. using response surface methodology. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 61, 11995–12004, doi: 10.1021/jf401705h.
- Simon, P., Drdák, M., & Altamirano, R. (1993). Influence of water activity on the stability of betanin in various water/alcohol model systems. *Food Chem.* 46: 155-158, doi: 10.1016/0308-8146(93)90029-F.
- Scheinvar L. (1999). Biosistemática de los xoconostles mexicanos y su potencial económico. In “Memoria del VIII Congreso Nacional y VI Internacional Sobre Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal”.. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.
- Schwenke, D. C. (2002). Does the lack of tocopherols and tocotrienols put women at increased risk of breast cancer?. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 13, 2–20, doi: 10.1016/S0955-2863(01)00207-8.
- Sreekantha, D., Arunasree, M. K., Roy, R. K., Reddy, C. T., Reddy, V. G., & Reddanna, P. (2007). Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* índices apoptosis in human chronic myeloid leukemia

- Cell line-k562. *Phytomedicine*, 14, 739–746, doi: 10.1016/j.phymed.2007.03.017.
- Steinmetz, K.A., Potter, J.D. (1991). Vegetables, fruit and cancer II. Mechanisms. *Cancer Causes Control* 2: 427-442, doi: 10.1007/BF00054304.
- Stintzing, C., Scheieber, A., Carle, R. (2001). Betacyanins in fruits from redpurple pitaya, *Hylecereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose. *Food Chemistry*. 77(1), doi: 10.1016/S0308-8146(01)00374-0.
- Strack D, T Vogt, W Schlieman (2003) Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* 62:247-269, doi: 10.1016/S0031-9422(02)00564-2.
- Velioglu, Y.S., Mazza G., Gao L., Oomah B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4113-4117, doi: 10.1021/jf9801973.
- Von Elbe, J. H. (1975). Stability of Betalains as Food Colors. *Food Technol.* 29, 42-46.
- Weinbreck, F., Tromp, R. H., de Kruif, C. G. (2004). *Biomacromolecules*, 5, 1437-1445.
- Wrick K.L. (1994). The potential role of functional foods in Medicine and Public Health. *Functional Foods*. Ed. Goldberg. Chapman and Hall. New York.
- Wu L-C, H Hsiu-Wen, C Yun-Chen, C Chih-Chung, L Yu-In, A H Ja-An. (2006). Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chem.* 95:319-327, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.01.002.
- Younes, I., Rinaudo, M. (2015). Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Mar. Drugs* 2015, 13(3), 1133-1174, doi: 10.3390/md13031133.

3. CONTENIDO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE BETALAÍNAS EN JUGO DE XOCONOSTLE

El jugo de xoconostle en la agroindustria es un subproducto que deriva de la transformación del fruto en otros productos, tales como mermeladas, licores, confitados, salsas, y generalmente es desechado por desconocimiento del potencial nutracéutico que este podría ofrecer a la industria alimentaria para la formulación de alimentos funcionales. El objetivo principal fue el de cuantificar el contenido de polifenoles y betalaínas, así como la medición de su actividad antioxidante mediante las metodologías del radical libre DPPH y ABTS. Los resultados obtenidos para el contenido de polifenoles totales en jugo de xoconostle fue de 0.318 mg GAE mL⁻¹, valores similares reportados para jugo de tuna cv. Rosa de castilla con 0.230 mg GAE mL⁻¹ y a tuna cv. Amarilla diamante con 0.348 mg GAE mL⁻¹. El contenido de betalaínas del fruto fue de 2.5 mg 100 g⁻¹, valores similares reportados para xoconostle de la variedad Querétaro con 2.11 mg 100 g⁻¹. Finalmente la actividad antioxidante por la metodología ABTS fue de 570 μ mol EqTrolox 100 mL⁻¹, siendo esta mayor a la del jugo de otros frutos como maracuyá (*Passiflora edulis Sims*) y guayaba (*Psidium guajava L.*), valores que oscilan entre los 150 y 200 μ mol EqTrolox 100 mL⁻¹, respectivamente. La metodología del DPPH arrojó resultados con índice de degradación del radical del 91%. El jugo de xoconostle, pese a ser un producto de desecho en la agroindustria, presentó una buena fuente de compuestos bioactivos con alta actividad antioxidante, por lo cual pudiese utilizarse como una alternativa de adición durante la formulación de nuevos alimentos con propiedades benéficas a la salud humana.

Palabras clave: **xoconostle (*Opuntia matudae*), subproductos, compuestos bioactivos, polifenoles, betalaínas, actividad antioxidante.**

¹Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria
Universidad Autónoma Chapingo
Humberto Alejandro Guadarrama Aguilar
Consuelo S.O. Lobato Calleros

QUANTIFICATION OF BETALAINS IN XOCONOSTLE JUICE AND THE MEASUREMENT OF ITS ANTIOXIDANT ACTIVITY.

The xoconostle juice in the agroindustry is a by-product that derives from the transformation of the fruit in other products, such as jams, liqueurs, candied, sauces and is generally discarded due to ignorance of the nutraceutical potential that this could offer to the food industry for the formulation of functional foods. The main objective was to quantify the content of polyphenols and betalains, as well as the measurement of their antioxidant activity using the free radical methodologies DPPH and ABTS. The results obtained for the content of total polyphenols in xoconostle juice was 0.318 mg GAE mL⁻¹, similar values reported for tuna juice cv. Rosa de castilla with 0.230 mg GAE mL⁻¹ and a tuna cv. Yellow diamond with 0.348 mg GAE mL⁻¹. The betalaine content of the fruit was 2.5 mg 100 g⁻¹, similar values reported for xoconostle of the Querétaro variety with 2.11 mg 100 g⁻¹. Finally, the antioxidant activity by the ABTS methodology was 570 µmol EqTrolox 100 mL⁻¹, being higher than the juices of other fruits such as passion fruit (*Passiflora edulis Sims*) and guava (*Psidium guajava L.*), values ranging between 150 and 200 µmol EqTrolox 100 mL⁻¹, respectively. The DPPH methodology yielded results with radical degradation index of 91%. The juice of xoconostle, despite being a waste product in the agroindustry, presented a good source of bioactive compounds with high antioxidant activity, so it could be used as an alternative of addition during the formulation of new foods with beneficial health properties human.

Key words: xoconostle (*Opuntia matudae*), byproduct, bioactive compounds, polyphenols, betalains, antioxidant activity.

Master's Thesis in Food Science and Technology
Universidad Autónoma Chapingo
Humberto Alejandro Guadarrama Aguilar
Consuelo S.O. Lobato Calleros

3.1. Introducción

El desarrollo de nuevos ingredientes basados en subproductos agroindustriales es un reto para la industria alimentaria, ya que su uso permitiría la obtención de alimentos procesados de valor agregado, al mismo tiempo que contribuiría a disminuir problemas de contaminación ambiental. Para ello debe considerarse no sólo la calidad nutricional de estos ingredientes, sino también su distribución, costo y otros beneficios adicionales, ya que el uso de estos materiales como ingredientes alimentarios otorgaría productos de valor agregado (Bensadón, Hervert, Sáyago and Goñi 2010).

Diferentes autores (Morales *et al.*, 2012, Osorio *et al.*, 2011; Prieto *et al.*, 2006) describen que el xoconostle y sus subproductos (semillas, pericarpio y mucílagos del endocarpio) se podrían utilizar como ingredientes funcionales para la industria alimenticia, ya sea como pigmentos, antioxidantes, formulaciones enriquecidas que incluyan tocoferoles, ácido ascórbico y compuestos fenólicos, en lugar de ser desechados.

Sin embargo no existen reportes del estudio del jugo de xoconostle por separado, es decir, no se ha hecho la extracción y purificación exclusivamente de este para determinar su contenido en cuanto componentes bioactivos tales como polifenoles y betalaínas, que pudiesen aportar beneficios a la salud humana de los consumidores, además de la medición de la actividad antioxidante de estos compuestos.

El jugo de xoconostle en la agroindustria nopalera del valle de Teotihuacán es un residuo que deriva del despulpado, molienda y corte del fruto durante su transformación en otros productos con mayor valor agregado tales como mermeladas, jaleas, licores y dulces. No existen datos oficiales sobre la cantidad de jugo que puede extraerse durante un día de proceso en la agroindustria, sin embargo durante visitas de trabajo (anteriores al ingreso del posgrado en 2015), se realizaron recolecciones de jugo durante cuatro jornadas de trabajo (ocho horas diarias) en el “Grupo Agroindustrial Teotihuacano” (San Martín de las

Pirámides, Estado de México), donde se obtuvieron cantidades en promedio de 120 L de jugo diariamente desechado. Durante el procesamiento del xoconostle, tal cantidad simplemente es desechada por los trabajadores, durante el lavado de mesas y tinas, sin conocer que beneficios podría ofrecer a la empresa y a los consumidores si tuviese una aplicación real.

Es por ello que en este capítulo se realiza una investigación orientada a ello y de ese modo determinar el potencial nutracéutico que podría tener en la industria agroalimentaria el jugo de esta cactácea para la formulación de alimentos funcionales o como complemento para otros alimentos.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Materiales

Se recolectaron frutos (20 kg) de xoconostle de la variedad cuaresmeño (*Opuntia matudae*) en el poblado de Xala, Nopaltepec, Estado de México (19°47'45" de latitud norte, 98°42'43" de longitud oeste, altura de 2,400 msnm). Fecha de colecta: Septiembre de 2016.

Folin Ciocalteu (2 M), ABTS ($\geq 98\%$ HPLC) y DPPH (D9132), fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V. (Toluca de Lerdo, Estado de México, México).

3.2.2. Métodos

El protocolo experimental para llevar a cabo la realización de la investigación en este capítulo fue de acuerdo con el siguiente diagrama de bloques (Figura 4).

Material biológico

Los frutos fueron colectados en el momento que presentaron color rosado en la epidermis, ya que no existen datos de referencia para conocer la madurez del fruto y fueron llevados al Laboratorio de Alimentos funcionales del Departamento de Preparatoria Agrícola, de la Universidad Autónoma Chapingo. Se seleccionaron los frutos con los menores daños físicos y mecánicos, se lavaron y se almacenaron a 4°C hasta su uso en bolsas de polipropileno transparentes con cierre hermético (Ziploc®).

Posteriormente se procedió a la extracción de la pulpa y jugo del fruto. Los frutos se cortaron manualmente en mitades longitudinales y se desecharon las mitades o secciones con presencia o con daño causado por insectos o gusanos. Se introdujeron en una despulpadora Reeves Modelo 133A (Reeves Pulley Division, Indiana, EUA) ubicada en el Departamento de Ingeniería Agroindustrial; el rendimiento en pulpa de xoconostle fue de 7.8 kg (39% en base húmeda). La

pulpa se almacenó a -20 °C hasta su uso en botes de plástico cubiertos con aluminio para evitar la entrada de luz.

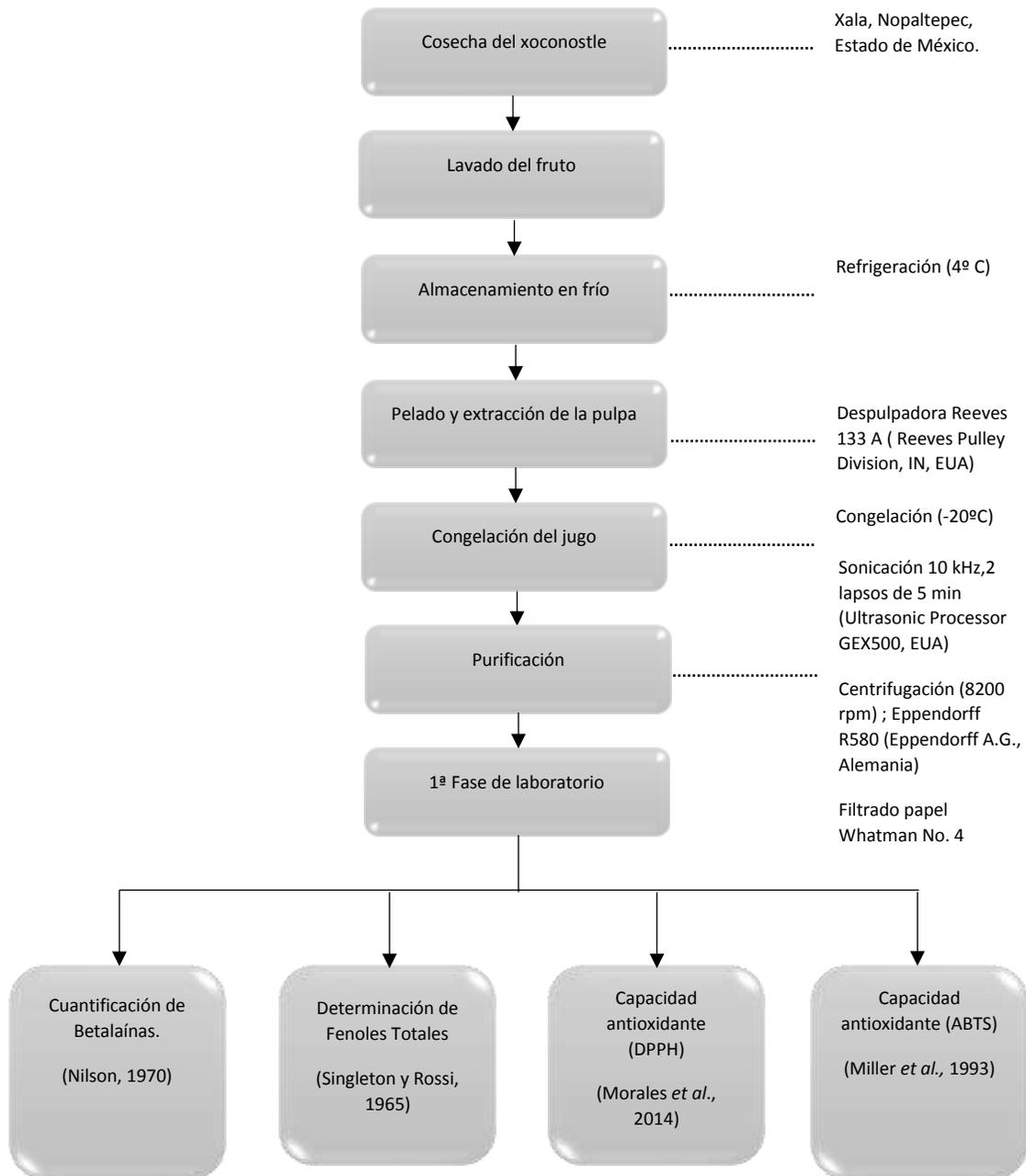


Figura 4. Protocolo experimental empleado para para la obtención del extracto a partir del fruto de xoconostle y caracterización de su actividad antioxidante.

Purificación del jugo de xoconostle

Para desprender la mayor cantidad de jugo atrapado en la pulpa, esta última en lotes de 250 mL se sometió a sonicación (Ultrasonic Processor GEX500, USA). La amplitud fijada para el proceso fue a 10 kHz por 2 lapsos de 5 min cada uno con tiempo de reposo entre cada lapso de 10 min.

Para la separación final del jugo se utilizó una centrífuga eppendorff R580 (Eppendorff A.G., Alemania) a 8000 rpm por 10 min. Después, el jugo se filtró con papel Whatman No. 1 para eliminar impurezas que hayan quedado remanentes. El rendimiento obtenido de jugo fue de 3.2 L, después, en condiciones de oscuridad todo mezcló en una tina de plástico, donde una parte se almacenó en refrigeración en 2 viales ámbar de cristal (cubiertos con aluminio) con capacidad de 250 mL a 4 °C, para la medición de actividad antioxidante, el resto se almacenó en congelación en botes de plástico forrados con aluminio con capacidad de 1 L cada uno a -40 °C para su liofilización.

Determinación de la Actividad Antioxidante por el método del radical ABTS.+

El ensayo de la capacidad antioxidante expresada como equivalentes de trolox fue desarrollado inicialmente por Miller *et al.* (1993) y se basa en el atrapamiento aniones de larga vida como el 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato-HCl) (ABTS.+). En este análisis, el ABTS es oxidado por el oxidante (metamioglobina y por el peróxido de hidrógeno, dióxido de manganeso, persulfato de potasio, además de reacciones enzimáticas). La reacción presenta una coloración intensa y puede detectarse espectrofotométricamente a 734 nm. La capacidad antioxidante del material bajo estudio se basa en su capacidad para disminuir el color, reaccionando directamente con el radical ABTS.+ (Prior *et al.*, 2005).

Para la preparación de la disolución del radical ABTS.+ , se siguió la metodología propuesta por Re *et al.* (1999); brevemente, una mezcla conteniendo 10 mL de ABTS.+ (7.4 mM) con 10 mL de persulfato de sodio 2.6 mM se preparó y dejó

incubar a temperatura ambiente durante 16 h en un lugar oscuro. Pasado dicho tiempo se tomaron 600 μL de la mezcla y se aforó a 10 mL con metanol puro.

Para asegurar que dicha disolución funcionara correctamente, se verificó mediante un espectrofotómetro de microplacas BioTek Microwave XS (Lionheart Technologies, Inc., Vermont, USA) que su absorbancia estuviera entre 0.7 a 1.2 a 734 nm de longitud de onda. Logrado lo anterior se procedió a la formación de la curva de calibración de Trolox para lo cual se pesaron 12.5 mg de Trolox y se aforaron a 50 mL (concentración inicial $250 \mu\text{g mL}^{-1}$) con metanol al 80%. A partir de esta disolución madre, se tomaron las alícuotas indicadas en el Cuadro 1 y se aforaron a 1mL también con metanol al 80%.

Cuadro 1. Curva de calibración de Trolox.

Alícuotas de la disolución madre de Trolox (μL)	Metanol al 80% (μL)	Concentración final ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
50	950	12.5
100	900	25
150	850	37.5
200	800	50
300	700	75
400	600	100
500	500	125
600	400	150

Finalmente cantidades diferentes de jugo de xoconostle se depositaron en la placa de lectura, se aforaron a 250 μL con la disolución de ABTS y se leyó su absorbancia a 734 nm, cuidando que dichas lecturas cayeran en el rango de la curva de calibración de Trolox.

Los datos obtenidos de las lecturas de absorbancia se sometieron a regresión lineal simple y se obtuvo la ecuación que permite calcular los mL de jugo que equivalen en μM a trolox para capturar el radical ABTS.+.

Determinación de la Actividad Antioxidante por el método del radical DPPH

Para este caso se siguió la metodología propuesta por Morales *et al.* (2014). El proceso de evaluación de la capacidad antioxidante por este método consiste en utilizar 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), el cual es un radical libre que al mezclarse con una sustancia donadora de átomos de hidrógeno, pasa a su forma reducida. Este proceso puede ser observado y cuantificado ya que cuando la molécula se encuentra como radical es coloreada (violeta) y al reducirse cambia a color amarillo (Brand, Cuvelier and Berset, 1995 ;Molyneux, 2004).

Para el protocolo desarrollado en el presente estudio se preparó una solución stock de DPPH 1 mM, la cual posteriormente se diluyó (1:1) usando metanol al 80 % (v/v). Se realizaron pruebas para determinar la concentración de jugo que degradara aproximadamente un 50 % del DPPH, esto se hizo mezclando 200 μ L de jugo, con 50 μ L de la disolución de prueba de DPPH, hasta alcanzar una coloración de la mezcla rosa pálido.

A partir de la disolución de jugo obtenida en el paso anterior, se tomaron las alícuotas que se indican en el Cuadro 2 y se diluyeron con metanol para obtener un volumen final de 1000 μ L.

Cuadro 2. Diluciones del jugo de xoconostle.

Alícuotas de la disolución del jugo (μ L)	Metanol al 80 % (μ L)
100	900
300	500
500	300
700	100
1000	0

En una microplaca de lectura se colocaron 200 μ L las disoluciones del jugo y se adicionaron 50 μ L de la disolución de prueba de DPPH. Como blanco se utilizaron 250 μ L de Metanol al 80% (v/v).

Cada minuto se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro de microplacas a la longitud de onda de 516 nm hasta que su valor fue estable. La operación se repitió por triplicado.

El porcentaje de inhibición (% I) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% I = \left[\frac{(A_0 - A_c)}{A_0} \right] \times 100 \quad (1)$$

Donde: A_0 = absorbancia inicial; A_c = absorbancia final.

Con los datos obtenidos se realizó una regresión lineal simple, en donde se obtuvo la ecuación de la recta ($y=mx+b$) mediante la cual se calculó el IC_{50} al que Molyneux (2004) lo define como la concentración del sustrato que causa la pérdida del 50% de la actividad del DPPH (Color) ,con la siguiente ecuación:

$$IC_{50} = \left(\frac{50-b}{m} \right) \quad (2)$$

Dónde: b = punto de corte en el eje Y; m = la pendiente.

Cuantificación de fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales se utilizó el ensayo Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) fundamentado en el carácter reductor de los polifenoles; brevemente: se preparó una disolución patrón de ácido gálico 0.2 N (12.5 mg de ácido gálico se colocaron en un matraz aforado de 25 mL y se llevaron a volumen con metanol al 80 %).

A partir de la disolución patrón de ácido gálico, se hicieron las diluciones necesarias con agua destilada para obtener la curva de calibración. Esto se realizó tomando alícuotas de 20 en 20 μ L, iniciando con un volumen de 20 μ L hasta 180 μ L de la solución de ácido gálico y se vertieron en una microplaca. A cada pozo de la placa se adicionaron 25 μ L de ácido gálico o jugo, 125 μ L de agua destilada, 20 μ L del reactivo de Folin Ciocalteu 0.2 N y 30 μ L de carbonato de sodio al 20% (p/v). Cuando se tuvieron los reactivos mezclados en los pozos se dejó reposar por 1 h. También se preparó un blanco con todos los

componentes excepto la disolución de ácido gálico. Finalmente se leyó la absorbancia a 760 nm en el espectrofotómetro de microplacas. El procedimiento se realizó por triplicado.

Liofilización de jugo de xoconostle

Este procedimiento se llevó a cabo para eliminar el agua del jugo de xoconostle y obtener un concentrado en polvo que permitiera saber la cantidad en unidades de masa (mg) que se adicionarían a las formulaciones para la elaboración de los complejos coacervados.

Primeramente el jugo de xoconostle se vertió en viales de 20 mL al 50% de su volumen (10 mL) para evitar derramamientos del extracto durante el proceso. Antes de colocar los viales en el liofilizador Labconco Free Zone 2.5 (Labconco Corporation, MO, EUA), previamente se congelaron en nitrógeno líquido durante 10 min para asegurar su estado durante todo el proceso. La máquina trabajó en condiciones de -55°C a 1.6 Pa durante tres días.

Una vez concluido el proceso, el jugo en polvo se extrajo y se almacenó en viales cubiertos por papel aluminio para evitar el contacto con la luz, además de almacenarlos en un desecador para evitar en lo posible el contacto con humedad y oxígeno, ya que como se sabe, estos también son factores degradadores de los antioxidantes.

Cuantificación de betalaínas

Nilson (1970) desarrolló un método espectrofotométrico para la determinación directa de betalaínas y betaxantinas sin una separación inicial. Este método se basa en que las vulgaxantinas absorben luz a longitudes de onda de 476-478 nm; mientras que las betacianinas lo hacen a 535-540 nm, así como también en el máximo del espectro visible en que las vulgaxantinas absorben luz (600 nm).

El cálculo de la relación de absorbancia a 600 nm, 538 nm y 477 nm, determina la concentración de las betalaínas.

Se pesaron 100 mg de fruto liofilizado para diluirlo con 10 mL de metanol al 80% y agitación por 30 min en un Vórtex Genie 2 (Scientific Industries Inc., NY, EUA) después se filtró con papel filtro (Whatman # 4), se enjuagó el tubo con 5 mL de metanol (2 veces) y se filtró con el mismo papel. La absorbancia se leyó a 476, 538 y 600 nm. Los resultados se expresaron en términos de concentración de betacianinas y vulgaxantinas totales, de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

Ecuaciones de Nilsson:

$$\% \text{ Betacianinas} = \left(\frac{X}{1120} \right) (FD)(100) \quad (3)$$

$$\% \text{ Vulgaxantinas o Betaxantinas} = \left(\frac{Y}{750} \right) (FD)(100) \quad (4)$$

Donde: $A = \text{Abs } 538 \text{ nm}$ $B = \text{Abs } 476 \text{ nm}$ $C = \text{Abs } 600 \text{ nm}$

$$X=1.095 (A-C) \quad (5)$$

$$Z=A-X \quad (6)$$

$$Y=B-Z \cdot \left(\frac{X}{3.1} \right) \quad (7)$$

FD=Factor de dilución

Análisis de datos

Los análisis se llevaron a cabo por triplicado a partir de 3 experimentos independientes utilizando un modelo de regresión lineal en todos los casos. Los valores informados corresponden a las medias y desviación estándar. Los datos se sometieron a Análisis de Varianza (ANOVA) utilizando el paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS institute, Inc, Cary, NC, EUA).

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Fenoles totales y actividad antioxidante del jugo de xoconostle

Las frutas y hortalizas, además de estar compuestas por nutrientes indispensables para los procesos metabólicos en humanos, también contienen otras sustancias que pueden servir como protectores frente a ciertas enfermedades, éstas son conocidas como compuestos bioactivos o funcionales y entre ellos se encuentran las betalainas, compuestos fenólicos, vitaminas A, C y E, fibra, etc. (Butera *et al.* 2002).

Cuadro 3. Fenoles totales y capacidad antioxidante por los radicales ABTS y DPPH de jugo de xoconostle.

Fenoles mg ^Z GAE mL ⁻¹	^Y ABTS+. (μmol ^X ET mL ⁻¹)	^W IC ₅₀ (μmol de Trolox)	^V DPPH inhibido (%)
0.318 ± 0.0125	570.16 ± 0.201	19.86 ± 1.29	91.003 ± 1.85

^ZGAE: Equivalentes de Ácido Gálico; ^YABTS: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato-HCl); ^XET: Equivalentes de Trolox; ^WIC₅₀: Concentración Inhibitoria del 50%; ^VDPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.

El contenido promedio de polifenoles totales en jugo de xoconostle fue de 0.318 mg GAE mL⁻¹, valores similares a lo informado por Figueroa (2010) con 0.230 mg GAE mL⁻¹ para jugo de tuna cv. Rosa de Castilla, 0.245 mg GAE mL⁻¹ para jugo de tuna cv. Cacalote y valores similares para jugo tuna cv. Amarilla diamante y cv. Mango con valores de 0.348 y 0.328 mg GAE mL⁻¹, respectivamente.

Hasta ahora no existen reportes de cuantificación de polifenoles exclusivamente en jugo de xoconostle, pero diversos autores han analizado la pulpa del fruto, por ejemplo López, García, Gallegos y Sahagún (2015) reportan un valor de 0.206 mg GAE g⁻¹ de pulpa liofilizada, por lo cual se aprecia que esta variedad (cuaresmeño) en específico tiene un alto contenido de estos compuestos.

Por otro lado, con relación a la prueba de actividad antioxidante por la metodología del radical ABTS se encontró que el jugo de xoconostle, presentó un valor de 570 μmol ET mL⁻¹, sin embargo, tampoco existen reportes de la

medición de la actividad antioxidante en jugo de xoconostle, pero si en pulpa liofilizada, tal como informa Morales (2009), quien reporta un valor de 390 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ de pulpa para la misma variedad.

Bajo este contexto el jugo de xoconostle presentó mayor actividad antioxidante que el jugo de otros frutos como maracuyá (*Passiflora edulis Sims*) y guayaba (*Psidium guajava L.*), cuyos valores oscilan entre los 150 y 200 $\mu\text{mol ET mL}^{-1}$, respectivamente (Rodríguez, López y García, 2010).

En el caso la metodología del radical DPPH, los valores se expresan en el porcentaje de inhibición del mismo, encontrando un valor promedio de 91 ± 1.85 % en el jugo. Nuevamente, no existen reportes al momento sobre actividad antioxidante en jugo de xoconostle pero si en pulpa donde Osorio *et al.* (2011) reportan valores de 75 ± 0.9 %.

3.3.2. Contenido de betalaínas en jugo de xoconostle liofilizado

Los valores obtenidos para el contenido de betalaínas totales en jugo de xoconostle liofilizado se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Contenido de betalaínas en jugo de xoconostle.

Betacianinas (mg 100 g ⁻¹)	Vulgaxantinas (mg 100 g ⁻¹)	Betalaínas totales (mg 100 g ⁻¹)
1.193 ± 0.008	1.30 ± 0.004	2.49 ± 0.013

Ya se ha mencionado que no existen reportes sobre ningún parámetro anterior analizado en jugo de xoconostle, incluyendo el contenido de betalaínas, sin embargo, los valores hallados en el jugo liofilizado no varían mucho con respecto a lo informado por Hernández, Franco, Gallegos, Campos y Pinedo (2015) quienes reportan valores para pulpa de xoconostle liofilizada de la variedad Querétaro de 1 mg 100 g⁻¹ para Betacianinas y 1.10 mg 100 g⁻¹ para Vulgaxantinas (Total de betalaínas 2.11 mg 100 g⁻¹).

En la actualidad el betabel (*B. vulgaris*) es la fuente más importante de betalaínas, las cuales se utilizan para dar color a diversos alimentos como jugos, néctares,

yogurt, productos cárnicos, etc., pero esta raíz presenta un desagradable aroma, causado por un compuesto llamado geosmina (Acree, Lee, Butts and Barnard 1976), lo cual ha limitado su uso. Por lo tanto, el jugo de xoconostle al ser un residuo en las plantas agroindustriales procesadoras de nopal, podría presentarse como una alternativa para la extracción de betalaínas con características diferentes a las del betabel al momento de su consumo.

3.4. Conclusión

Los resultados anteriores sugieren que el jugo de xoconostle cuaresmeño (*Opuntia matudae*) puede ser considerado como una fuente importante de compuestos bioactivos como los polifenoles y betalaínas, presentando una actividad antioxidante superior a otros jugos como el de guayaba y maracuyá por lo cual, dicho jugo de xoconostle podría utilizarse como una alternativa de adición durante la formulación de nuevos alimentos con propiedades benéficas a la salud humana.

3.5. Literatura citada

- Acree, T.E., Lee, C.Y., Butts, R.M., Barnard, J. (1976). Geosmin, the earthy component of table beet odor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24: 430-431, doi: 10.1021/jf60204a059.
- Aquino B. E., Chavarría M. Y., Chávez S. J., Guzmán G. R., Silva H. E., Verdalet G. I. (2012). Caracterización fisicoquímica de siete variedades de tuna (*Opuntia* spp.) color rojo-violeta y estabilidad del pigmento de las dos variedades con mayor concentración. *Investigación y Ciencia* No. 55 (2012) 3-10. Consultado en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67424409001>.
- Bensadón S., Hervert H.D., Sáyago A.S.G., & Goñi I. (2010). Byproducts of *Opuntia ficus-indica* as a source of antioxidant dietary fiber. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 210–216, doi: 10.1007/s11130-010-0176-2.
- Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset, C. (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. Technology/Food Science and Technology*; 28: 25-30.
- Butera, D., L. Tesoriere, F. Di Gaudio, A. Bongiorno, M. Allegra, A.M. Pintaudi, R. Kohen & M. Livrea. (2002). Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(23): 6895-6901, doi: 10.1021/jf025696p.
- Figuroa C. I., Martínez D. M., Rodríguez P. E., Colinas L. M., Valle G. Ramírez R. S., Gallegos V. C. (2010). Contenido de pigmentos, otros compuestos y capacidad antioxidante en 12 cultivares de tuna (*Opuntia* spp.) de México. *Agrociencia*, 44, 763-771.
- Gracia L.C., Valle G.S., Salinas Y.M., & Luna M.C. (2015). Postharvest quality, soluble phenols, betalains content, and antioxidant activity of *Stenocereus pruinosus* and *Stenocereus stellatus* fruit. *Journal Postharvest Biology and Technology*, 111, 69-76, doi: 10.1016/j.postharvbio.2015.07.004.
- Hernández, F. A., Franco, B. A., Gallegos, V. C., Campos, M. R., Pinedo E. J. (2015). Actividad Antioxidante de genotipos de xoconostle (*Opuntia joconostle*) del estado de Zacatecas, México. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, vol. 16, núm. 1, 81-85. Consultado en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81339864012>.
- López M. C., García M. R., Gallegos V. C., Sahagún C. J. (2015). Antioxidant components and nutritional quality of 15 genotypes of Xoconostle (*Opuntia* spp.) Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México, Mexico. Consultado en: http://jpacd.org/downloads/Vol17/03-PACD17_Lopez.pdf.
- Miller, N. J., Diplock, A., Rice-Evans, C., Davies, M., Gopinathan, V., Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant and its application to

monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin. Sci. 84, 407-412, doi: 10.1042/cs0840407.

- Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical DPPH for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology; 26 (2): 211-219. Consultado en: <https://wenku.baidu.com/view/7c54dbc4da38376baf1fae39.html>.
- Morales M.A. (2009). Caracterización fitoquímica funcional del fruto de xoconostle cuaresmeño (*Opuntia matudae*) y el efecto de su consumo en parámetros bioquímicos de ratas diabéticas. (Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México). Consultado: <http://ri.uaq.mx/xmlui/handle/123456789/3403>.
- Morales, P., Ramírez-Moreno, E., Sanchez-Mata, M., Carvalho, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Nutritional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xoconostle cultivars (*Opuntia joconostle* F.A.C. Weber ex Diguët and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. Food Research International, 46, 279–285.
- Morales, P.B.L., Ramírez M.E., Santos B.C., & Ferreira I.C.F.R. (2014). Exploring xoconostle by products as sources of bioactive compounds. Food Research International, 65, 437–444, doi: 10.1016/j.foodres.2014.05.067.
- Nilson, I. (1970). Studies into the pigments in beet root. Lantbrukshögskoleans Annals. 36:179-183.
- Osorio E.O., Ortiz M.A., Álvarez V., Dorantes A.L., & Mónica G. (2011). Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. Food Research International, 44, 2160–2168, doi: 10.1016/j.foodres.2011.02.011.
- Prieto G.F., Filardo K.S., Pérez C.E., Beltrán H.R., Román G.A., & Méndez M.M. (2006). Caracterización física y química de semillas de Opuntias (*Opuntia* spp.) cultivadas en el estado de Hidalgo, México. Bioagrociencia, 18, 163–169.
- Prior, R., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J. Agric. Food Chem. 53:4290-4302, doi: 10.1021/jf0502698.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A. Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radicals in Biology and Medicine, 26(9/10), 1231– 1237, doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
- Rodríguez, L., López, L., & García, M. (2010). Determinación de la composición química y actividad antioxidante en distintos estados de madurez de frutas de consumo habitual en Colombia, Mora (*Rubus glaucus* B.), Maracuyá (*Passiflora edulis* S.), Guayaba (*Psidium guajava* L.) y Papayuela (*Carica cundinamarcensis* J.). Revista Alimentos Hoy, 19(21): 16-34. Consultado

en: <https://hortintl.cals.ncsu.edu/articles/determinacion-de-la-composicion-quimica-y-actividad-antioxidante-en-distintos-estados-de-ma>.

4. FORMACIÓN DE COACERVADOS COMPLEJOS PARA LA PROTECCIÓN DE BETALAÍNAS DE JUGO DE XOCONOSTLE

El uso de tecnologías modernas e innovadoras de microencapsulación podrían ayudar a mejorar la estabilización y alargar la vida útil de las betalaínas, fitoquímicos con gran potencial de uso en la industria alimentaria como colorantes y antioxidantes, por ello el objetivo de esta investigación fue el de evaluar algunos de los factores que influyen en la preparación de complejos coacervados poco investigados como el de quitosano (Q) - goma arábiga (GA) como sistemas de protección y liberación de betalaínas de xoconostle. Se planteó un experimento completamente al azar. Los principales factores evaluados fueron el potencial ζ de los materiales de pared, rendimiento de los coacervados, eficiencia de entrapamiento, tamaño de partícula y actividad antioxidante de las betalaínas después de 30 días de almacenamiento. Los materiales de pared resultaron tener la mayor diferencia de interacciones electrostáticas en un rango de pH entre cuatro y cinco, por lo cual se decidió elaborar los coacervados en ese rango. Los datos se sometieron a análisis de varianza y un análisis de comparación de medias de Tukey. El valor de significancia se estableció en $p \leq 0.05$. El rendimiento obtenido del tratamiento C4 fue de 89%, siendo superior y estadísticamente diferente al resto de los tratamientos. En la eficiencia de entrapamiento no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos C8, C6 y C4, los cuales tuvieron los valores más altos, cercanos al 63%. El tratamiento C3 fue estadísticamente diferente al resto, ya que obtuvo el valor más pequeño para tamaño de partícula con 21 μm . Finalmente el tratamiento C4 protegió mejor a las betalaínas, obteniendo valores de degradación del radical DPPH del 89%. Los coacervados elaborados con una concentración de polisacáridos Q: 0.4 y GA: 0.6 mg mL^{-1} a valores de pH 5.3, podrían ser utilizados como elementos protectores de betalaínas durante el almacenamiento.

Palabras clave: coacervados complejos, quitosano, goma arábiga, actividad antioxidante, estabilización, betalaínas.

¹Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria
Universidad Autónoma Chapingo
Humberto Alejandro Guadarrama Aguilar
Consuelo S.O. Lobato Calleros

FORMATION OF COACERVATE COMPLEXES FOR THE PROTECTION OF BETALAINES OF XOCONOSTLE JUICE

The use of modern and innovative microencapsulation technologies could help to improve the stabilization and lengthen the shelf life of betalains, phytochemicals with great potential for use in the food industry as dyes and antioxidants, therefore the objective of this investigation was to evaluate some of the factors that influence the preparation of coacervate complexes little investigated as the one of chitosan (Q) – gum arabic (GA) as systems of protection and liberation of betalainas of xoconostle. A completely random experiment was proposed. The main factors evaluated were the ζ potential of the wall materials, coacervate performance, entrapment efficiency, particle size and antioxidant activity of the betalains after 30 days of storage. The wall materials were found to have the greatest difference in electrostatic interactions in a pH range between four and five, so it was decided to elaborate the coacervates in that range. The data were subjected to analysis of variance and a comparison analysis of Tukey means. The significance value was established at $p \leq 0.05$. The yield obtained from the C4 treatment was 89%, being superior and statistically different from the rest of the treatments. In the entrapment efficiency, no significant difference was found between treatments C8, C6 and C4, which had the highest values, close to 63%. The C3 treatment was statistically different from the rest, since it obtained the smallest value for particle size with 21 μm . Finally, the C4 treatment better protected the betalains, obtaining degradation values of the DPPH radical of 89%. The coacervates prepared with a concentration of polysaccharides Q: 0.4 and GA: 0.6 mg mL^{-1} at pH 5.3 could be used as protective elements of betalains during storage.

Key words: **coacervates complexes, chitosan, arabic gum, antioxidant activity, stabilization, betalains.**

Master's Thesis in Food Science and Technology
Universidad Autónoma Chapingo
Humberto Alejandro Guadarrama Aguilar
Consuelo S.O. Lobato Calleros

4.1. Introducción

Entre los metabolitos característicos encontrados en frutos de *Opuntia* se han señalado a las betalaínas, compuestos solubles en agua derivados del ácido betalámico y principales pigmentos que se producen en los frutos de xoconostle (Morales *et al.*, 2014). De acuerdo a su estructura química, pueden clasificarse como betacianinas (pigmentos rojo-violeta) y betaxantinas (color amarillo-naranja). La estabilidad de estos pigmentos es un aspecto importante a considerar antes de utilizar estos compuestos naturales como colorantes y antioxidantes en los alimentos, ya que son bastantes propensos a la degradación en presencia de factores como el pH ácido, la alta actividad del agua, altas temperaturas, oxígeno, exposición a la luz, entre otras (Herbach *et al.*, 2004).

En este contexto, el uso de tecnologías modernas e innovadoras de microencapsulación podrían ayudar a mejorar la estabilización y alargar la vida útil de estos fitoquímicos en la industria alimentaria, por ello resulta muy interesante explorar la preparación de complejos coacervados poco investigados como el de quitosano (Q) - goma arábica (GA) (polisacárido - polisacárido) como sistemas de protección y liberación de betalaínas de jugo de xoconostle liofilizado (JL).

En este capítulo la investigación va orientada en la utilización de la tecnología de encapsulación mediante la técnica de coacervación compleja para la protección y prolongación de la vida útil de estos compuestos sensibles durante su almacenamiento, por ello, es importante conocer las interacciones que se pueden dar entre los biopolímeros de carga opuesta que pueden participar en la formación de coacervados.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Materiales

Goma Arábica (Alimentaria Mexicana Bekarem S.A. de C.V., Nezahualcóyotl, Estado de México, México) y Quitosano de peso molecular elevado (310-375 kDa, >75% de deacetilación; Sigma-Aldrich Química S.A. de C. V., Toluca de Lerdo, Estado de México, México).

Ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, etanol absoluto y cloruro de sodio grado analítico fueron adquiridos en Química Laitz, S.A. de C.V. (Ciudad de México, México). Toda el agua usada en los experimentos fue destilada y desionizada (ADI).

4.2.2. Métodos

La segunda fase experimental de la investigación está relacionada con la formación y caracterización de los complejos coacervados; a continuación se representa mediante un diagrama de bloques (Figura 5) el proceso de dicha fase.

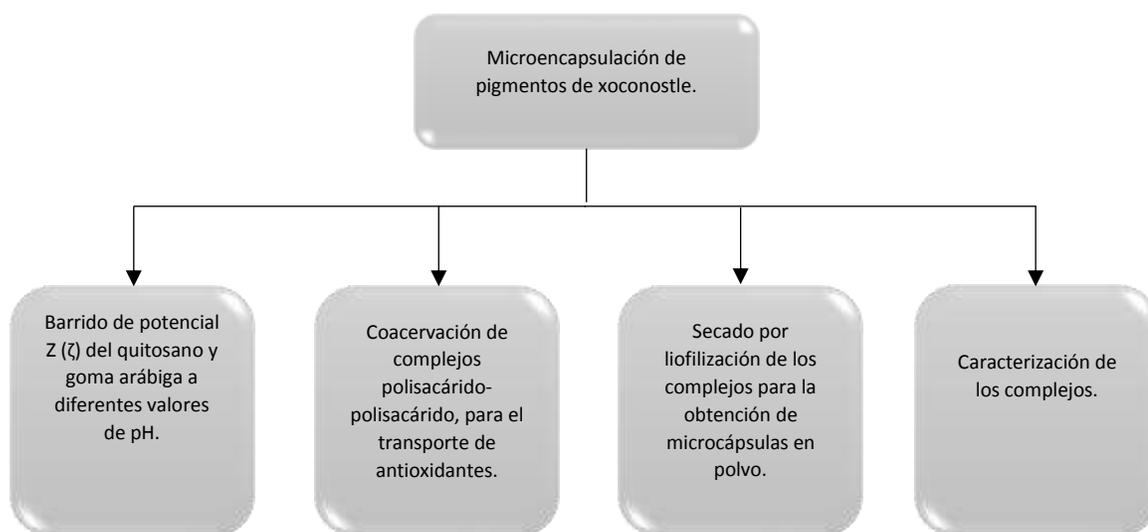


Figura 5. Protocolo experimental empleado para la protección de las betalainas contenidas en un extracto del fruto de xoconostle, mediante coacervación compleja.

Dispersiones stock de los polisacáridos

Dispersiones stock de quitosano (Q) y goma arábica (GA) se prepararon de acuerdo a la metodología propuesta por Espinosa *et al.* (2013), con ligeras modificaciones. Se preparó una dispersión acuosa de quitosano al 1% (p/p) con ácido acético al 1% (v/v) y una dispersión de goma arábica (GA) al 1% p/p. Ambas dispersiones se sometieron a agitación vigorosa por 12 h a 6000 rpm mediante un agitador magnético IKA RO 15 power (IKA Works Inc., Staufen, Alemania). Posteriormente, las dispersiones se dejaron en reposo bajo refrigeración a 4 ± 1 °C para asegurar su completa hidratación. Finalmente las dispersiones se filtraron con papel Whatmann No. 4 con el fin de eliminar impurezas.

Medición del potencial zeta de los polisacáridos y jugo de xoconostle

Se determinó el potencial zeta (ζ -potencial) de los polisacáridos y el jugo de xoconostle liofilizado (JL) mediante el equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Volúmenes de 10 mL de las dispersiones stock de los polisacáridos, previamente diluidas con ADI a una concentración de 0.01% p/p, se colocaron en el autotitulador MPT-2 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) para tomar las lecturas del ζ -potencial en un rango de pH de 2 a 7. Se tomaron mediciones cada 0.5 unidades de pH. Este último se varió mediante la inyección automática de NaOH 0.1 N o HCl 0.1 N, según el caso. De forma similar se determinaron los valores de ζ -potencial de dispersiones de JL al 0.01% p/p.

A partir de los resultados, se determinó el rango de pH donde existió la mayor diferencia estequiométrica entre valores de ζ -potencial de signo opuesto, con el fin de delimitar el rango de pH en el que los polisacáridos y JL pudieran interactuar electrostáticamente, dando origen a complejos biopoliméricos.

Diseño experimental

Para la formulación y obtención de los complejos coacervados se planteó un experimento completamente al azar, donde las concentraciones de quitosano (x_1), goma arábica (x_2) y de jugo de xoconostle liofilizado (x_3) se eligieron como las variables independientes (Cuadro 5). La eficiencia de entrapamiento de los pigmentos del jugo liofilizado (y) fue la variable de respuesta.

Cuadro 5. Variables y concentraciones usadas para la formulación de los complejos coacervados.

Variables independientes	Concentración	Concentración
	baja	alta
Concentración de quitosano (mg mL^{-1})	0.4	0.7
Concentración de goma arábica (mg mL^{-1})	0.3	0.6
Concentración de jugo liofilizado (mg mL^{-1})	20	40

Elaboración de los complejos

Los complejos coacervados fueron preparados de acuerdo a la metodología descrita por Tan *et al.* (2015), con modificaciones. Brevemente, las cantidades de Q determinadas (Cuadro 6) se disolvieron en una solución de ácido acético (1% v/v) con aplicación de agitación a 6000 rpm (IKA RO 15 power) hasta su total disolución. El pH de la dispersión de Q se ajustó a 5.3 con NaOH 2 y 0.1 N y se dejó reposar durante 20 h en refrigeración para su total hidratación. Posteriormente las dispersiones se filtraron a través de papel Whatman No.1 para eliminar las sustancias insolubles. Las dispersiones de GA se prepararon con ADI, usando las mismas condiciones de agitación y ajustando el pH al mismo valor que en la dispersión de Q.

Cantidades de JL se incorporaron a las dispersiones de Q con agitación magnética a temperatura ambiente (20 ± 2 °C). La agitación se mantuvo durante una hora para permitir la interacción entre las cargas de estos materiales.

Finalmente, para la formación de los complejos coacervados, entre Q y GA, a la dispersión de Q-JL correspondiente a cada formulación, se le adicionó por goteo

la dispersión de GA respectiva, manteniendo agitación a 3000 rpm (IKA RO 15 power) durante 1 h. Los ocho tratamientos experimentales se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Formulaciones de complejos coacervados.

Código de formulación	$^Z X_1$ (mg mL ⁻¹)	$^Y X_2$ (mg mL ⁻¹)	$^X X_3$ (mg mL ⁻¹)
C ₁	0.4	0.3	20
C ₂	0.4	0.3	40
C ₃	0.4	0.6	20
C ₄	0.4	0.6	40
C ₅	0.7	0.3	20
C ₆	0.7	0.3	40
C ₇	0.7	0.6	20
C ₈	0.7	0.6	40

$^Z X_1$: Concentración de quitosano; $^Y X_2$: Concentración de goma arábica; $^X X_3$: Concentración de jugo de xoconostle liofilizado.

La suspensión obtenida se centrifugó a 8 200 rpm, por 15 min, a 4 °C. Al sobrenadante se le determinó ζ -potencial y se liofilizó para la posterior cuantificación de betalaínas libres en el mismo. El pellet (residuo sólido o coacervado) también se liofilizó para su subsecuente caracterización y determinación de rendimiento.

Medición del ζ -potencial del sobrenadante.

El ζ -potencial del sobrenadante obtenido de la coacervación de GA y Q se determinó en el equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) para cada una de las formulaciones. Para ello se tomó 1 mL de sobrenadante y se traspasó a la celda de medición; finalmente la celda se colocó en el equipo para proceder a la medición de cada caso. Cada medición fue realizada por triplicado.

Rendimiento de los coacervados complejos

El rendimiento de los Complejos Coacervados (CC's) se calculó con la ecuación propuesta por Huang, Xiao, Wang and Qiu (2017):

$$\text{Rendimiento del complejo coacervado (\%)} = \frac{m_i}{m_o} \times 100 \quad (8)$$

Donde: m_o = peso total del biopolímero utilizado para elaborar las soluciones de polisacáridos; m_i = peso final del complejo coacervado deshidratado.

Evaluación de la estabilidad de las betalainas entrampadas

Los CC's liofilizados se almacenaron en tubos de centrifuga cubiertos por bolsas de polipropileno negras durante 30 días en un desecador, evitando la entrada de humedad, en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente. Transcurrido dicho tiempo, se retiraron del desecador y se les determinó actividad antioxidante mediante la metodología del radical DPPH.

El primer paso fue la liberación de los pigmentos, para lo cual se utilizó agua destilada desionizada, ajustando su pH a 7.10 ± 0.1 (NaOH 0.1 N). A este valor de pH, la carga eléctrica de la GA fue cercana a -20 mV, evidenciada mediante determinación de ζ -potencial, lo que ocasiona la disociación de los CC's.

Se utilizaron 500 mg de cada CC y se diluyeron en 10 mL de ADI mediante la agitación con un vórtex durante 5 min; posteriormente, se trasladaron a refrigeración durante 3 h para asegurar la completa disociación de los polisacáridos y nuevamente se agitaron por otros 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se dejaron reposar por 1 h más en refrigeración para lograr la separación del pigmento. La medición de la actividad antioxidante, utilizando la metodología anteriormente descrita para el radical DPPH, se llevó a cabo para cada formulación

Eficiencia de entrapamiento

Para determinar la eficiencia de entrapamiento de betalaínas en los CC's, primero se cuantificaron las betalaínas entrapadas en los CC's, mediante su previa liberación de los CC's con ADI, como se describió para la determinación de la estabilidad de las betalaínas. Las betalaínas liberadas se cuantificaron aplicando la metodología propuesta por Nilson (1970): 3 mL del líquido obtenido de cada formulación se leyeron en el espectrofotómetro a una absorbancia de 476 nm, 538 nm, y 600 nm. Los resultados fueron expresados en términos de concentración de betacianinas y betaxantinas totales.

La eficiencia de entrapamiento (%) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de entrapamiento (\%)} = \frac{BT_l \times 100}{BT_i} \quad (9)$$

Donde: BT_i = cantidad de betalaínas totales iniciales antes del proceso de coacervación; BT_l = cantidad de betalaínas liberadas a partir de los CC's.

Medición del tamaño de partícula

El procedimiento para la medición del tamaño de partícula de los coacervados se llevó a cabo mediante la utilización de un equipo Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido), cuyo funcionamiento se basa en la difracción de rayo láser. Esta técnica de medición de tamaño de partícula es ampliamente utilizada para materiales con tamaños que varían desde cientos de nanómetros hasta varios milímetros.

De acuerdo con la descripción por Malvern Instruments, la difracción láser utiliza la teoría Mie de la dispersión de la luz para calcular la distribución de tamaño de partícula, suponiendo un modelo de esfera equivalente al volumen. Para ello y de acuerdo con la teoría Mie, es necesario que se conozcan la propiedad óptica índice de refracción y la densidad de la muestra que se va a medir, junto con el índice de refracción del dispersante.

Para la medición del tamaño de partícula, todos los CC's se encontraban dispersos en agua, por lo cual primeramente se procedió a la medición del índice de refracción de cada tratamiento mediante un refractómetro Abbe 5 (Bellingham + Stanley Ltd, Tunbridge Wells, Reino Unido) y la determinación de la densidad de cada muestra se llevó a cabo con un picnómetro.

Previo a la determinación del tamaño también fue necesario la medición del valor de pH de todos los tratamientos con el fin de ajustar a ese mismo valor con HCl (0.2 N) el agua en que se traspasarían para la medición y de ese modo lograr que los coacervados no se disociaran y perdieran cualquier característica original.

Finalmente cantidades diferentes de coacervados de cada tratamiento se colocaron en un vaso de precipitado hasta lograr un índice de oscuración requerido y con la ayuda del software del equipo se obtuvieron los resultados, expresados mediante el parámetro Dv90. Cada medición se realizó por triplicado.

Análisis de datos

Todos los experimentos se realizaron por triplicado de manera independiente, usando un diseño completamente al azar. Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado y los valores informados corresponden a las medias y desviación estándar. Los resultados se sometieron a análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA) y en los casos pertinentes a prueba de comparación de medias de Tukey. El nivel de significancia se estableció en $p \leq 0.05$. El análisis de datos se realizó con el software Statistical Analysis System (SAS institute, Inc, Cary, NC, EUA).

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. ζ - potencial de las dispersiones de polisacáridos y jugo de xoconostle

Las dispersiones de quitosano mostraron un comportamiento de polielectrolito cargado débilmente, exhibiendo valores positivos de ζ -potencial en todos los valores de pH estudiados, en el cual la carga positiva decrece considerablemente

al aumentar los valores de pH. Este fenómeno de acuerdo con Guzey y McClements (2006) es comúnmente atribuido a la pérdida de cargas de los segmentos de glucosamina (pK_a 6.3-7.5).

La conformación del quitosano y su interacción con el solvente dependen de la cantidad de cargas positivas (NH_3^+) en su columna vertebral, el pH y la fuerza iónica del disolvente. Por otro lado las dispersiones de goma arábica presentan valores negativos de ζ -potencial en todo el rango de pH en general, debido a los valores de pK_a de los grupos carboxilo (1.8-2.2) (Espinosa *et al.*, 2013). El pK_a de la betanina es de 1.46 (Tutone, Lauria and Almerico, 2016), por ello de igual manera se mostraron valores negativos en todo el rango de pH analizado.

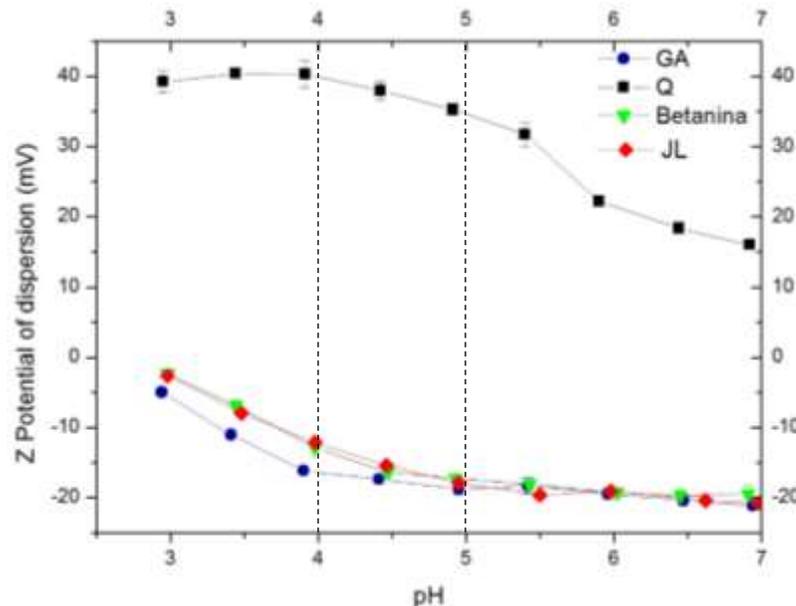


Figura 6. ζ -potencial de las dispersiones de goma arábica (GA), quitosano (Q), Betanina (B) y jugo de xoconostle (JL) a los diferentes valores de pH.

Como se muestra en la figura anterior el potencial se volvió cada vez más negativo ya que el pH de la dispersión aumentó de 2 a 7, alcanzando un máximo valor (-21.14 ± 0.39 mV) a pH de 7.0, valores muy cercanos (-25.7 mV) a los reportados por Espinosa *et al.* (2013).

La fortaleza de las interacciones electrostáticas (SEI) entre los polielectrolitos cargados opuestamente son indicadores de los valores de pH donde las

atracciones de los polímeros son más fuertes. En este caso la SEI de valor más alta se encontró en un rango de pH de 4 a 5, sin embargo, se decidió formar los complejos coacervados a un pH de 5.3 (ajustando los polisacáridos y jugo a ese pH) ya que de ese modo se seguiría teniendo un valor alto de las SEI y se lograría una buena estabilidad de las betalaínas, ya que de acuerdo con Delgado *et al.* (2000), las betalaínas (betacianina y betaxantina) alcanzan su máxima estabilidad en un rango de pH de entre 5-6.

4.4.2. Rendimiento de los coacervados

En el Cuadro 7 se muestra el rendimiento de coacervado obtenido como función de la relación entre el peso de cada biopolímero y la concentración total de los biopolímeros. Se obtuvo un rendimiento máximo en el tratamiento 4 con un nivel bajo de quitosano y un nivel alto de goma arábica.

De acuerdo con Espinosa *et al.* (2007), la coacervación compleja entre los dos biopolímeros es el resultado de las interacciones que tienen lugar entre los grupos carboxílicos (-COO-) de goma arábica y los grupos amino (-NH₃⁺) del quitosano.

Cuadro 7. Rendimiento de complejos coacervados.

Tratamiento	Rendimiento de los CC`s (%)
C ₁	86.2 ± 0.30 e ^z
C ₂	80.9 ± 0.41 d
C ₃	82.3 ± 0.55 d
C ₄	89.3 ± 0.30 f
C ₅	75.4 ± 0.55 b
C ₆	70.7 ± 0.90 a
C ₇	78.8 ± 0.35 c
C ₈	82.0 ± 0.72 d

^z Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre medias ($p \leq 0.05$).

En la Figura 7, se observa una diferencia entre las concentraciones bajas de los polisacáridos (C1-C4) y los niveles altos de los mismos (C5-C8), donde en estos últimos tratamientos existe una disminución en el rendimiento de los coacervados. Estos resultados son relevantes ya que indican que a concentraciones bajas de biopolímeros existe una tendencia a obtener mayores rendimientos que con concentraciones altas, sin embargo existe diferencia estadísticamente significativa en el tratamiento cuatro con relación a las demás, donde la concentración utilizada fue para quitosano de 0.4 mg mL^{-1} (baja) y 0.6 mg mL^{-1} (alta) para goma arábica, lo cual tiene sentido y podría atribuirse a lo mencionado por Avadi *et al.* (2010) quien describe se ha demostrado que la goma arábica tiene más sitios de interacción y carga negativa para la interacción con el quitosano policatiónico, por lo cual al haber una mayor concentración de goma arábica, permite que la mayoría de sus sitios de interacción sean ocupados por los grupos NH_3^+ del quitosano, causando que prácticamente toda la cantidad de polisacáridos se unan y formen los coacervados complejos.

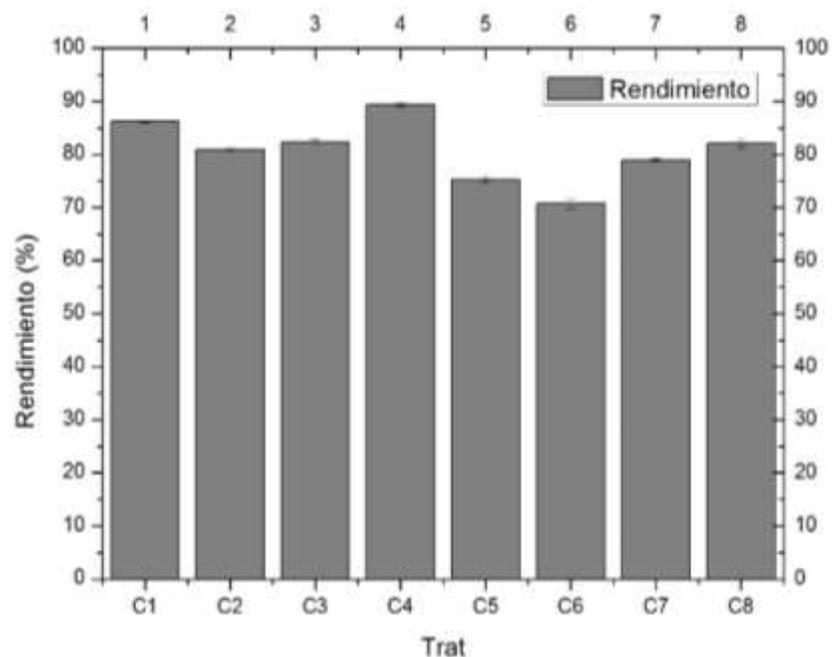


Figura 7. Porcentaje de rendimiento de los coacervados complejos de goma arábica-quitosano.

4.4.3. ζ -potencial del sobrenadante de los complejos coacervados.

La prueba se llevó a cabo con el fin de conocer la carga eléctrica que quedaba en este material de residuo, debido a que las interacciones atractivas entre el quitosano y la goma arábica pueden conducir a precipitación de ambos polímeros cuando la neutralización mutua de polisacáridos aniónicos disminuye la carga neta y la hidrofiliidad de las zonas de unión y también cuando reduce la rigidez de la columna vertebral macromolecular, que induce la fase separación del sistema y, por lo tanto, la coacervación compleja (Espinosa *et al.*, 2010). Los valores obtenidos para esta prueba tras la medición del ζ -potencial se muestran en la Figura 8, donde se observa que para todos los tratamientos los valores oscilan en un rango de entre 3 mV y -6.5 mV.

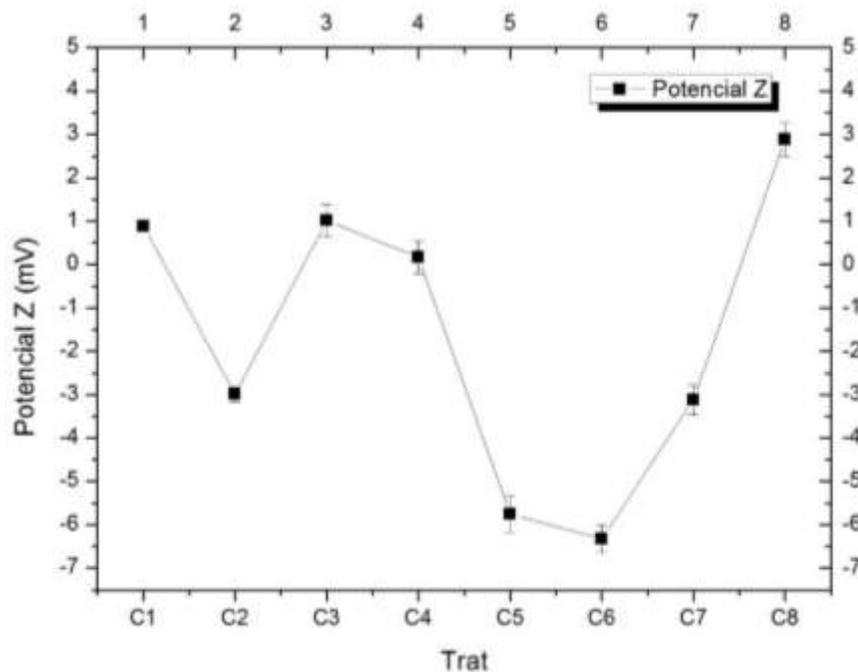


Figura 8. ζ -potencial del sobrenadante de los coacervados complejos de Q-GA-JL.

Para esta prueba en específico se busca que los valores de medición sean lo más cercanos o tiendan a cero, ya que este resultado indicaría que todas las cargas de los materiales se neutralizaron y con ello se aseguraría que se realizó una buena coacervación entre los biopolímeros y el material a proteger. En el Cuadro 8 se muestran los resultados obtenidos de manera numérica, por lo cual

se observa que la eficiencia de coacervación entre los tres materiales se llevó de distinta manera para cada uno de los tratamientos.

Cuadro 8. ζ -potencial del sobrenadante de los complejos coacervados.

Tratamiento	ζ -potencial (mV)
C1	0.86 ± 0.11 d ^z
C2	-3.04 ± 0.16 b
C3	1.21 ± 0.36 d
C4	0.00 ± 0.37 c
C5	-6.05 ± 0.42 a
C6	-6.25 ± 0.30 a
C7	-3.11 ± 0.34 b
C8	3.05 ± 0.39 e

^z Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre medias ($p \leq 0.05$).

Los valores más cercanos a neutralidad son los arrojados por los primeros cuatro tratamientos, sin embargo existe una diferencia estadísticamente significativa entre el tratamiento C4 y el resto ya que el valor obtenido fue de 0.00 ± 0.378 mV, prácticamente un valor neutro, por ello también se reflejan los resultados de rendimiento, donde para el tratamiento C4 se obtuvieron los mejores valores. Como se mencionó anteriormente en la prueba de rendimiento de los coacervados, los resultados pueden atribuirse a que la goma arábica tiene más sitios de interacción y carga negativa para la interacción con el quitosano, por lo cual al haber una mayor concentración de goma arábica, permite que la mayoría de sus sitios de interacción sean ocupados por los grupos NH_3^+ del quitosano, causando que prácticamente toda la cantidad de polisacáridos se unan y formen los coacervados complejos y quede una carga en el sobrenadante muy cercana a la neutralidad.

4.4.4. Eficiencia de entrapamiento de las betalaínas.

La eficiencia de encapsulación (EE) es una medida que indica el grado de interacción entre el compuesto activo y el agente encapsulante. En general la EE

para betalaínas alcanzó valores máximos del 63.4 % para todos los tratamientos estudiados. Valores de EE de betalaínas similares a los encontrados en este estudio se reportaron previamente para micropartículas de *Opuntia ficus-indica* con dextrina de tapioca (Castillo, 2013) quien reporta valores de recuperación de betalaínas entre 62.6-69.4 %. En la Figura 9 se reporta la cuantificación de betacianinas, vulgaxantinas y betalaínas totales del jugo de xoconostle inicial y del jugo de xoconostle posterior a su liberación para cada tratamiento.

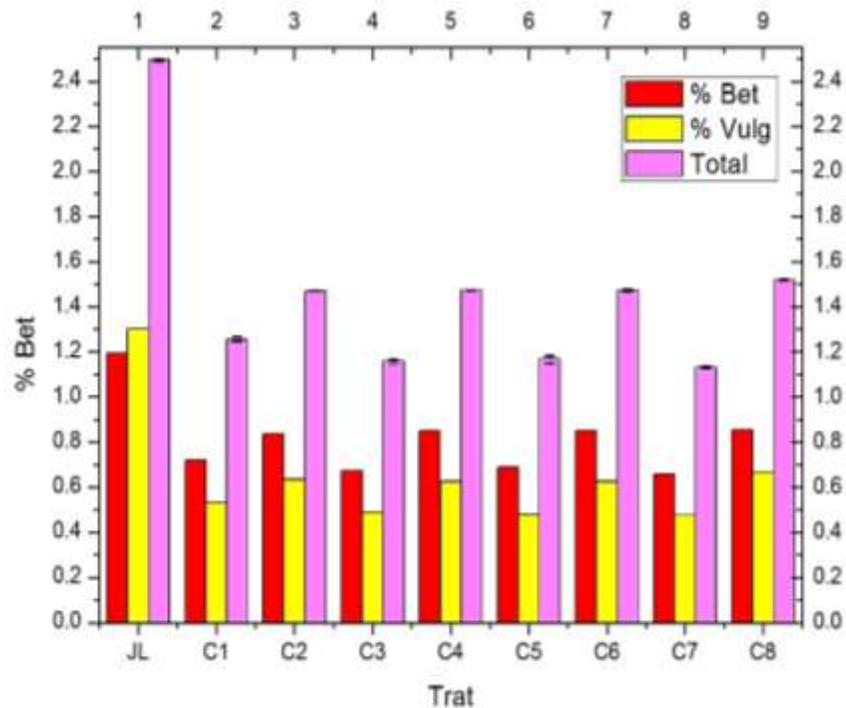


Figura 9. Betacianinas, Vulgaxantinas y Betalaínas totales en jugo de xoconostle antes y posterior a su encapsulación.

De acuerdo con los valores obtenidos (Cuadro 9), se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos C8, C6 y C4, con respecto al resto para las EE de betalaínas, mostrando que hay un efecto de la concentración del extracto adicionada sobre la eficiencia de encapsulación de betalaínas.

Cuadro 9. Eficiencia de entrapamiento de betalaínas.

Tratamiento	E. E. (%)
C1	53.00 ± 0.69 c ^z
C2	61.94 ± 0.30 b
C3	49.58 ± 0.76 d
C4	63.26 ± 0.30 de
C5	48.76 ± 1.02 b
C6	62.01 ± 0.58 de
C7	47.28 ± 0.45 a
C8	63.43 ± 0.31 e

^z Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre medias ($p \leq 0.05$).

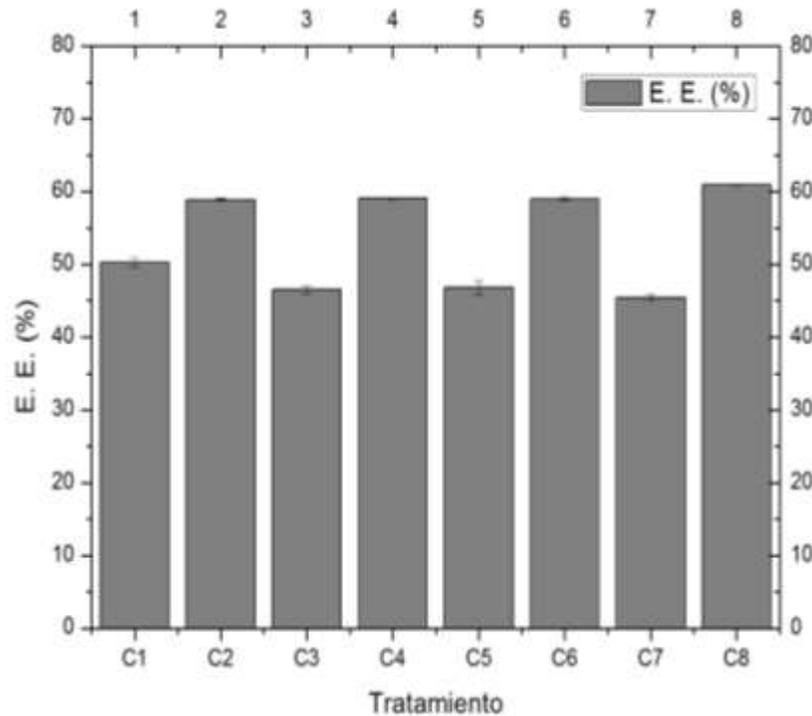


Figura 10. Eficiencia de entrapamiento de betalaínas en todos los tratamientos.

En la Figura 10, se observa que existe una tendencia en el aumento de la E.E. cuando la cantidad de xoconostle liofilizado adicionado se encuentra en el nivel alto para los tratamientos C2, C4, C6 y C8, por lo cual la eficiencia de entrapamiento puede atribuirse a la fuerte interacción betalaínas-polisacárido debido a las interacciones electrostáticas y formación de puentes de hidrógeno

(Castillo, 2013), ya que al existir una mayor concentración de betalaínas en los tratamientos antes mencionados, la interacción de estos compuestos con las cargas positivas del quitosano es también mayor.

De acuerdo con el Análisis de Varianza del diseño (Cuadro 10), el factor que más influye en la eficiencia de entrapamiento de betalaínas es la concentración de jugo de xoconostle agregado a los tratamientos, ya que este factor tiene el valor más alto y por mucho del cuadrado de la media.

Cuadro 10. ANOVA del diseño factorial para eficiencia de entrapamiento.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
^Z CQ	1	14.862684	14.862684	57.05	<.0001
^Y CGA	1	1.727315	1.727315	6.63	0.0203
^X CXL	1	1015.142705	1015.142705	3896.93	<.0001
CQ*CGA	1	1.545508	1.545508	5.93	0.0269
CGA*CXL	1	21.855231	21.855231	83.90	<.0001
CQ*CGA*CXL	2	18.544022	9.272011	35.59	<.0001

^ZCQ: Concentración de quitosano; ^YCGA: Concentración de goma arábica; ^XCXL: Concentración de jugo de xoconostle.

Factores como las propiedades del agente encapsulante, características del agente activo, y las condiciones del proceso de secado deben ser consideradas al momento de diseñar un estudio con la finalidad de lograr altos porcentajes de EE (Jafari, Assadpoor and Bhandari, 2008).

4.4.5. Tamaño de partícula de los coacervados complejos.

El tamaño de partícula de los coacervados se reportan en el Cuadro 11, para lo cual se utilizó el parámetro Dv90 (tamaño en micras que equivale al 90% de las partículas por debajo de dicho valor).

Cuadro 11. Valores medios de tamaño Dv (μm) de partícula en los complejos coacervados.

Tratamiento	Tamaño Dv 90 (μm)
Blanco (Q-GA)	116.5 \pm 7.76
C1	32.57 \pm 1.67 ab ^z
C2	87.37 \pm 4.40 d
C3	20.97 \pm 1.36 a
C4	68.40 \pm 5.20 cd
C5	29.43 \pm 1.22 ab
C6	71.80 \pm 2.55 cd
C7	24.43 \pm 0.73 a
C8	44.57 \pm 1.83 b

^z Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre medias ($p \leq 0.05$).

En los resultados obtenidos en el cuadro anterior, se observa que los tamaños de partícula de los tratamientos son muy grandes si se compara con los valores obtenidos en otros estudios de emulsiones de coacervados complejos de quitosano-goma arábica como los que reportan Butstraen y Salaün (2013), quienes durante la encapsulación de Miglyol 812 N obtuvieron valores de tamaño de partícula que van de las 1.5 μm a 8.5 μm , aunque cabe mencionar que para el proceso de coacervación utilizaron concentraciones mayores de quitosano y goma arábica, así como valores de pH y tiempos de agitación diferentes a los de esta investigación, ya que su objetivo fue evaluar diferentes parámetros y valores durante la formación de los coacervados.

Por otro lado Tan, Xie, Zhang, and Xia (2016), elaboraron emulsiones de coacervados complejos de Q-GA para la protección de curcumina y reportó valores de tamaño de partícula de 1.5 μm aproximadamente, con pH para la formación de los coacervados de 4.5, similar al valor que se utilizó en esta investigación.

Tomando en cuenta lo anterior, es posible que los tamaños pequeños obtenidos en dichas investigaciones se deban a que se utilizó un proceso de emulsificación

para realizar los coacervados, por lo cual redujo en gran medida el tamaño de partícula final, siendo valores menores a las 10 μm para ambos casos.

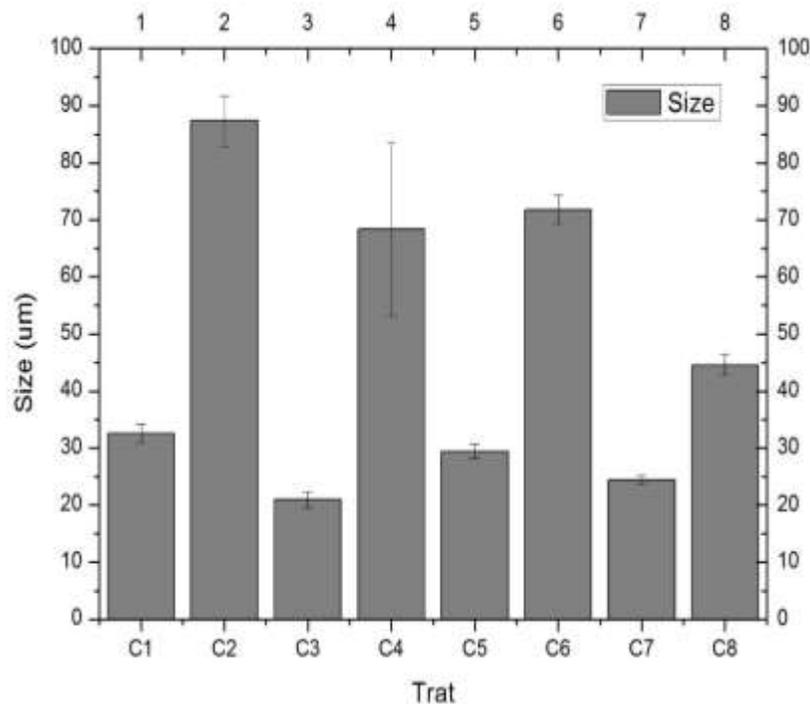


Figura 11. Tamaño de partículas de los coacervados complejos (Dv 90).

De acuerdo a los valores obtenidos en la presente investigación y retomando lo mencionado por Butstraen y Salaün (2013) y Tan *et al.* (2016), el tamaño de partícula de los coacervados se ve influenciado por la concentración de los polisacáridos, así como la relación de mezclado durante el proceso de coacervación, además en los valores del Cuadro 11 es notable que la adición de jugo de xoconostle liofilizado a los tratamientos cambia también el tamaño de los coacervados reduciéndolos de los 116.5 μm (Blanco) hasta valores aproximados de 20 μm , posiblemente por la adición de nuevas interacciones entre las cargas de las betalainas con los sitios del quitosano en lugar de solo la interacción entre goma arábica-quitosano, lo cual influenciaría en la formación de partículas mucho más pequeñas.

4.4.6. Efecto protector proporcionado a las betalaínas por los coacervados complejos durante 30 días de almacenamiento.

Una vez realizado la prueba del radical libre DPPH a las betalaínas liberadas de los coacervados, almacenadas durante 30 días, los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 12, donde se observa que para cada uno de los tratamientos se obtuvieron valores muy diferentes, es decir, cada tratamiento protegió a las betalaínas con distinto grado.

Aunque la diferencia en cuanto el porcentaje de degradación entre el tratamiento C1 y el tratamiento C4 es muy poca, estadísticamente esa diferencia es significativa, así también con el resto de los tratamientos, donde el valor más bajo de la actividad antioxidante se presentó en el tratamiento C6, seguido del C5 con valores de porcentaje de degradación de DPPH del $36.7\% \pm 0.591$ y $59.4\% \pm 0.670$ respectivamente.

Cuadro 12. Porcentaje de DPPH degradado por las betalaínas liberadas después de su almacenamiento.

Tratamiento	% DPPH degradado
C1	82.7 ± 0.59 f ^z
C2	74.1 ± 0.77 cd
C3	79.0 ± 0.59 e
C4	89.9 ± 0.38 g
C5	59.4 ± 0.67 b
C6	36.7 ± 0.59 a
C7	72.8 ± 0.59 c
C8	75.7 ± 0.58 d

^z Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre medias ($p \leq 0.05$).

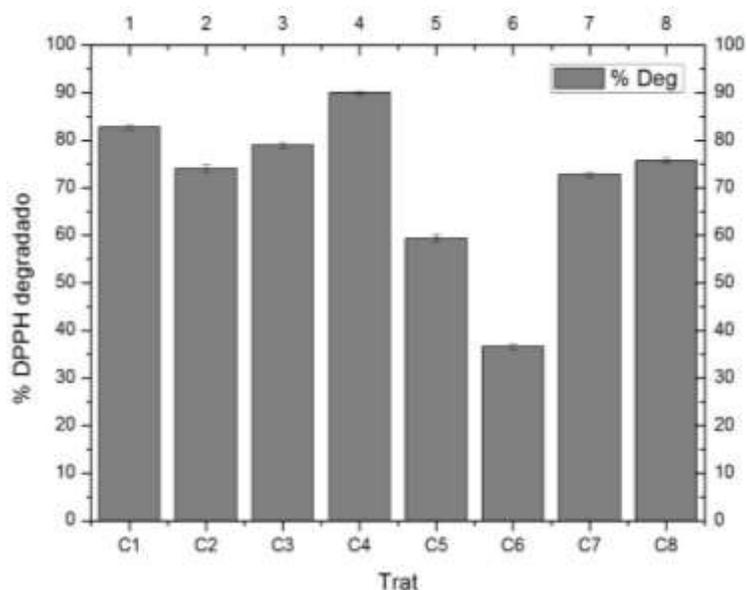


Figura 12. Porcentaje de DPPH degradado por las betalaínas liberadas posterior a su almacenamiento durante 30 días.

Estos resultados están directamente relacionados con las mediciones turbidimétricas de los coacervados así como con las pruebas del ζ -potencial del sobrenadante ya que los resultados de estos indican que también los tratamientos C5 y C6 obtuvieron los peores valores, por lo cual es de suponer que al no existir una eficiente coacervación de los polisacáridos, estos no protegen de la mejor manera a las betalaínas dejándolas expuestas a los diferentes factores de degradación de las mismas, inclusive a la humedad propia de los materiales de pared, ya que como se muestra en el Cuadro 13, el porcentaje de humedad media de todos coacervados posterior a su liofilización fue del 5.163 ± 0.053 %.

Cuadro 13. Porcentaje de humedad y sólidos totales de los coacervados liofilizados.

Coacervados liofilizados	% Humedad	% Sólidos Totales
	4.78 ± 0.09	95.22 ± 0.05

Pese a haber almacenado los tratamientos en un desecador, sigue presente en los propios coacervados una humedad relativa baja, lo cual pudo haber sido el principal factor de degradación de los antioxidantes, notándose inclusive en el

color del polvo, ya que los tratamientos con mayor grado de coacervación y mayor actividad antioxidante conservaban el color rojo característico de las betalaínas y los tratamientos con menor actividad antioxidante y peor grado de coacervación se tornaron de color amarillo, señal característica de la degradación de las betalaínas, tal como se muestra en la Figura 14 comparando el mejor resultado obtenido para los tratamientos contra el que menos protegió a las betalaínas.



Figura 13. Apariencia y color de los tratamientos antes de ser retirados del liofilizador.



Figura 14. Apariencia y color de los tratamientos C4 y C6 respectivamente posterior a su almacenamiento durante 30 días.

4.5. Conclusión

Los complejos coacervados C1 y C4, obtenidos a partir de la interacción entre quitosano (Q) y goma arábica (GA) con una concentración Q: 0.4 mg mL⁻¹, GA: 0.3 mg mL⁻¹ para C1 y Q: 0.4 mg mL⁻¹ y GA: 0.6 mg mL⁻¹ para C4 a valores de pH de 5.3, respectivamente, proporcionaron a las betalaínas de xoconostle un medio de protección adecuado contra sus factores de degradación, obteniendo porcentajes de inhibición de DPPH de 87.7% y 89.9% respectivamente. Estos porcentajes de inhibición fueron superiores a los observados para el resto de los tratamientos, así también se mostraron los mejores resultados en estos últimos con respecto a la evaluación del rendimiento de los CC's.

En la prueba de eficiencia de encapsulación el tratamiento C4 obtuvo también el mejor resultado con un porcentaje de 63.26%, no así en la parte de tamaño de partícula donde este tratamiento obtuvo un tamaño medio de 68.4 µm, siendo uno de los tres tratamientos con valores más altos en esta prueba.

En conclusión, los complejos coacervados elaborados con una concentración de polisacáridos Q: 0.4 mg mL⁻¹, GA: 0.6 mg mL⁻¹ a valores de pH 5.3, podrían ser utilizados como elementos protectores de betalaínas de jugo de xoconostle durante su almacenamiento, permitiendo a su vez la utilización integral del fruto evitando el desperdicio del jugo durante su procesamiento.

4.6. Literatura Citada

- Avadi, M. R., Sadeghi, A. M. M., Mohammadpour, N., Abedin, S., Atyabi, F., Dinarvand, R., et al. (2010). Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1), 58e63, doi: 10.1016/j.nano.2009.04.007.
- Butstraen, C., & Salaün, F. (2013). Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum Arabic and Chitosan. *Carbohydrate polymers*; 99, 608 – 616, doi: 1016/j.carbpol.2013.09.006.
- Castillo, G. I. (2013). Estabilidad de betalaínas en una mezcla seca para bebidas refrescantes, a base de pulpa y extracto de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) microencapsuladas. (Tesis profesional, Universidad de Chile, Santiago de Chile). Consultada en <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/113994>.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 173–289, doi: 10.1080/10408690091189257.
- Devi, N., & Maji, T. (2010). Microencapsulation of isoniazid in genipin-crosslinked gelatin-A- κ -carrageenan polyelectrolyte complex. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 36, 56-63, doi: 10.1016/j.cis.2016.05.009.
- Espinosa-Andrews, H., Báez-González, J. G., Cruz-Sosa, F., & Vernon-Carter, E. J. (2007). Gum Arabic–chitosan complex coacervation. *Biomacromolecules*, 8(4), 1313–1318, doi: 10.1021/bm0611634.
- Espinosa-Andrews, H., Sandoval-Castilla, O., Vazquez-Torres, H., Vernon-Carter, E. J., & Lobato-Calleros, C. (2010). Determination of the gum Arabic-chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. *Carbohydrate Polymers*, 79(3), 541e546. doi:10.1016/j.carbpol.2009.08.040
- Espinosa-Andrews, H., Enriquez-Ramirez, K. E., Garcia-Marquez, E., Ramirez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C., & Vernon-Carter, J. (2013). Interrelationship between the zeta potential and viscoelastic properties in coacervates complexes. *Carbohydrate Polymers*, 95, 161–166, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.02.053.
- Guzey D. & McClements D. J. (2006). Characterization of b-lactoglobulin-chitosan interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20, 124-131, doi: 10.1016/j.foodhyd.2005.03.009.

- Herbach K.M., Stintzing F.C., & Carle R. (2004). Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *Journal of Food Science*, 6, 491–498, doi: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb10994.x.
- Huang, G. Q., Xiao, J. X., Wang, S. Q., & Qiu, H. W. (2017). Effect of coacervation conditions on the viscoelastic properties of N, Ocarboxymethyl chitosan – gum Arabic coacervates. *Food Chemistry*, 228, 236-242.
- Jafari S., Assadpoor E., He Y. and Bhandari B. (2008). Encapsulation efficiency of foods flavors and oils during spray drying. *Drying Technology* 26: 816-835.
- Morales, P.B.L., Ramírez M.E., Santos B.C., & Ferreira I.C.F.R. (2014). Exploring xoconostle by products as sources of bioactive ompounds. *Food Research International*, 65, 437–444, doi: 10.1016/j.foodres.2014.05.067.
- Nilson, I. 1970. Studies into the pigments in beetroot. *Lantbrukshoegshoegskolans Anals*. 36:179-183.
- SAS ®. (2002). System Version 9 for Microsoft ® Windows ®, Copyright c .Institute Inc., Cary, North Carolina, USA.
- Tan, C., Xie, J., Zhang, X., and Xia, S. (2016). Polysaccharide-based nanoparticles by chitosan and gum arabic polyelectrolyte complexation as carriers for curcumin. *Food Hydrocolloids*, 57, 236 – 245, doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.01.021.
- Tutone, M., Lauria, A., and Almerico, A. M. (2016). Theoretical Determination of the pK_a Values of Betalamic Acid Related to the Free Radical Scavenger Capacity: Comparison Between Empirical and Quantum Chemical Methods. *Interdisciplinary Sciences: Computatinal Life Sciences*, 8:177-185, doi: 10.1007/s12539-015-0101-3.