



# UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

División de Estudios de Posgrado

Maestría en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos

Microencapsulación por coacervación compleja de betalaínas y antocianinas obtenidas de *Stenocereus pruinosus*, empleando proteína y aceite de cacahuete para la formación de la emulsión

## TESIS

Para obtener el grado de:  
Maestro en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos

Presenta:

I. A. Juan Carlos Barragán Ambrosio

Director:

Dr. Raúl Salas Coronado

Huajuapán de León Oaxaca, México a 17 de marzo del 2023

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bromatología y el Laboratorio de Principios Bioactivos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca (UTM), bajo la dirección del Dr. Raúl Salas Coronado. Durante los dos años del programa de maestría recibí una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), con número de becario: 1081708

Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en el XV Congreso Internacional "Sobre inocuidad, calidad y funcionalidad de los alimentos en la industria y servicios de alimentación (virtual)" en la modalidad ponencia oral, organizado por la Sociedad Mexicana de Inocuidad y Calidad para los Consumidores de Alimentos (SOMEICA), el día 17 de noviembre del 2022.

## Dedicatorias

El presente trabajo de tesis se lo dedico a mi familia y seres queridos. Por todo el amor y apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida.

En memoria de mi tía Lizbeth y mi mamá Lidia, las madres más maravillosas que la vida me pudo haber dado.

## Agradecimientos

Agradezco a mi director de tesis, Dr. Raúl Salas Coronado, por todo el apoyo y orientación que me brindó en estos años del proyecto. Permitiéndome el desarrollarme a nivel personal y profesional.

Asimismo, a mis revisores la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez, Dra. Mirna Patricia Santiago Gómez, Dra. Beatriz Hernández Carlos y el Dr. Héctor Manuel Arreaga González, por todos los consejos y aportes realizados al trabajo de investigación.

A los integrantes del grupo de trabajo del Laboratorio de Análisis Instrumental por todo el apoyo recibido en la parte experimental de este trabajo de investigación. En especial a la auxiliar del laboratorio, la Ing. Angélica López Luis, por todos los consejos y enseñanzas brindadas, que me permitieron desempeñarme de la mejor manera durante los experimentos realizados.

A mi compañera de maestría Ing. Yarely Espinoza Ramírez, por apoyarme y aconsejarme durante estos años de posgrado. Así como al Ing. Rafael Matadamas, por esos días de charla en los cuales compartíamos entre los tres, nuestros logros y desaciertos tanto personales como profesionales. De igual forma a mis más recientes compañeros el M. C. Jerzain Guillermo Martínez Gómez y al Ing. Germán Pérez Gonzáles, los cuales han contribuido grandemente a mi desarrollo profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca de manutención con número de becario: 1081708, la cual me permitió el poder realizar los estudios de posgrado. De igual forma a la Universidad Tecnológica de la Mixteca por brindarme una beca de colegiatura del 75%, así como al personal administrativo y de mantenimiento. En especial a Sarita, Lucy, Celes, Blanca y Carmen.

Al Dr. Rogelio Valadez Blanco y el Dr. Domingo Salazar Mendoza, por todo el apoyo que recibí de su parte en puntos clave de mi vida.

Al M. C. Leonardo Daniel Soto Rodríguez y a la M. C. Rosa Isela Ruíz Ruíz, por ser mis grandes amigos, con cuya amistad sé que siempre contaré. Y a mis compañeras

Ing. Itzel Eugenio Avendaño, Karla S. Ramírez Ruíz, Ing. Janet Salvador Larios, Ing. Evelin Trujillo Santiago y Ing. Ariadna Aparicio García. Por permitirme aprender de todos ustedes, y por todas las risas y enojos que me hicieron pasar durante esos años. Sin olvidar a mis buenos amigos, el Ing. Darwin Guzmán y la Ing. Marlitt Sánchez Cruz, personas que hicieron de mi estancia en la carrera la mejor experiencia de mi vida.

A mis amigos de años, Rogelio Nicolás Martínez Martínez y Bulmaro García Ávila por estar conmigo desde que salimos del Conalep. Por siempre apoyarme a su manera, y por todas esas horas de risas interminables.

A las personas más importantes de mi vida. A mis hermanos Ita, Susana y Miguel, los cuales desde que tengo memoria jamás me han abandonado y siempre han estado ahí para apoyarme en todo lo que han podido. A mi tía, Rocío por todos los consejos y apoyo que me ha dado, siendo ella una hermana más que una tía. A mi primita Hannia la cual en estos años se ha vuelto mi fuerza para afrontar todo lo que la vida me ha mandado y por la cual seguiré esforzándome para alcanzar cada día cosas más grandes. A mi madre Teresita y a mi hermana Yanty, que, a pesar de no estar cerca de mí, sé que siempre podré contar con ellas.

Por último, a las mujeres más importantes de mi vida, mi tía Lizbeth Ambrosio Delgado y mi abuela Lidia Delgado Castrejón. Las madres que todo niño debería tener y jamás perder. A pesar de ya no estar a mi lado, sé que me están observando desde arriba, guiando cada uno de mis pasos y dándome todo el apoyo y amor que jamás me faltó.

## Resumen

El cultivo del fruto de pitaya (*Stenocereus pruinosus*) es representativo en la región Mixteca del estado de Oaxaca y se caracteriza por sus coloraciones intensas, incluyendo la roja. Las betalaínas, responsables de estas coloraciones, son sensibles a las condiciones ambientales, oxidándose rápidamente y perdiendo sus propiedades antioxidantes. Por tal motivo, en el presente trabajo se propuso un método de microencapsulación por coacervación compleja de extractos de pitaya ricos en betalaínas y antocianinas. Llevando a cabo la etapa de formación de las emulsiones w/o (agua-aceite) y w/o/w (agua-aceite-agua) a un pH de 2 y empleando proteína de cacahuete y goma xantana como material de pared. La identificación de los pigmentos se realizó por FT-MIR-ATR y RMN de  $^1\text{H}$ , y se cuantificaron por espectrofotometría de UV-Vis. La caracterización morfológica de los microencapsulados se evaluó por microscopía óptica, un procesamiento de micrografías empleando el software ImageJ y un análisis de datos de distribución y tamaño de partícula por ANOVA robusto a través de RStudio. De los espectros obtenidos de FT-MIR-ATR y RMN de  $^1\text{H}$  se identificaron señales propias de antocianinas en  $627\text{ cm}^{-1}$  y con un  $\delta = 6.9$ , respectivamente; así como las señales de betacianina y betaxantina. Las microcápsulas obtenidas de los tratamientos de proteína al 1% y 2% fue de  $5.32 \pm 3.98\ \mu\text{m}$  (mediana =  $4.16\ \mu\text{m}$ ) y  $3.86 \pm 3.54\ \mu\text{m}$  (mediana =  $2.57\ \mu\text{m}$ ), respectivamente, los cuales fueron significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ). Estos microencapsulados fueron estables a condiciones típicas de ruptura como el uso de ultrasonido con MeOH y un método de digestión *in vitro* dinámico.

**Palabras claves:** Pitaya (*Stenocereus pruinosus*), betalaínas, antocianinas, capacidad antioxidante, coacervación compleja, digestión *in vitro*, proteína de cacahuete.





## Índice de contenido

Resumen .....	VII
Índice de figuras .....	XII
Índice de tablas .....	XIV
Lista de abreviaturas .....	XV
Capítulo 1. Introducción .....	- 17 -
1.1 Originalidad .....	- 19 -
1.2. Hipótesis .....	- 20 -
1.3. Objetivos .....	- 20 -
1.3.1. Objetivo general.....	- 20 -
1.3.2. Objetivos particulares .....	- 20 -
1.4. Importancia del estudio.....	- 21 -
1.5. Limitaciones del estudio.....	- 21 -
Capítulo 2. Análisis de fundamentos.....	- 23 -
2.1. Producción de pitaya en el Estado de Oaxaca .....	- 23 -
2.2. Propiedades físicas de la pitaya y sus constituyentes.....	- 25 -
2.2.1. Pigmentos en la pitaya .....	- 28 -
2.2.2. Propiedades funcionales de las betalaínas y antocianinas .....	- 33 -
2.3. Métodos de encapsulación de compuestos bioactivos.....	- 35 -
2.3.1. Microencapsulación por coacervación compleja .....	- 35 -
2.3.2. Emulsiones .....	- 37 -
2.4. Transglutaminasa como agente reticulante .....	- 41 -
2.5. Proteína y aceite de cacahuete en la formación de las microcápsulas.....	- 44 -
2.6. Métodos de determinación de proteínas en alimentos .....	- 48 -
2.7. Bioaccesibilidad .....	- 51 -
2.7.1. Modelos de digestión colónicos.....	- 51 -
2.7.2. Modelos de digestión estáticos.....	- 51 -
2.7.3. Modelos de digestión dinámicos.....	- 52 -
2.8. Microscopía óptica .....	- 52 -
Capítulo 3. Metodología .....	- 53 -
3.1. Materiales y reactivos .....	- 53 -

3.2. Equipos .....	- 54 -
3.3. Preparación de la muestra para almacenamiento .....	- 54 -
3.4. Preparación del jugo para análisis fisicoquímicos .....	- 55 -
3.5. Acondicionamiento del jugo de pitaya para la obtención del extracto ..	- 55 -
3.6. Análisis morfológicos .....	- 56 -
3.7. Análisis fisicoquímicos .....	- 56 -
3.8. Determinación de color .....	- 56 -
3.9. Determinación de antocianinas monoméricas totales .....	- 57 -
3.10. Determinación de betalaínas totales (betacianinas y betaxantinas)..	- 58 -
3.11. Limpieza del jugo de pitaya por columna de intercambio iónico al eliminar azúcares.....	- 59 -
3.12. Obtención de la proteína y aceite de cacahuete.....	- 60 -
3.13. Determinación de proteína soluble de cacahuete.....	- 61 -
3.14. Formación de microcápsulas por coacervación compleja .....	- 62 -
3.15. Determinación de la eficiencia del proceso de microencapsulación..	- 64 -
3.16. Procesamiento y análisis de las micrografías para la determinación del tamaño de los microencapsulados de forma automatizada mediante el software ImageJ 1.53K. ....	- 64 -
3.17. Evaluación de la bioaccesibilidad <i>in vitro</i> .....	- 65 -
3.18. Obtención de espectros de IR .....	- 68 -
3.19. Obtención de espectros de RMN de <sup>1</sup> H.....	- 68 -
3.20. Análisis estadístico de los resultados de tamaño de los microencapsulados. ....	- 68 -
Capítulo 4. Resultados y discusión .....	- 69 -
4.1. Análisis morfológico del fruto de pitaya .....	- 69 -
4.2. Análisis fisicoquímicos realizados al fruto de pitaya .....	- 70 -
4.3. Cuantificación de betalaínas totales y antocianinas monoméricas, en el jugo de pitaya.....	- 71 -
4.4. Análisis del método de limpieza del jugo de pitaya para la obtención de espectros de RMN, mediante la remoción de azúcares y pectinas .....	- 72 -
4.5. Obtención de aceite (AC) y proteína (APC) de cacahuete .....	- 75 -
4.6. Análisis de la calidad de la proteína y aceite empleando FT-MIR-ATR- 79 -	- 79 -
4.7. Contenido de proteína en PCA por el método de Biuret.....	- 81 -
4.8. Pigmentos en el extracto de pitaya.....	- 83 -

4.9. Cuantificación de pigmentos en el extracto por UV-Vis.....	- 84 -
4.10. Formación de los microencapsulados y su análisis morfológico .....	- 86 -
4.11. Resultados del procesamiento y análisis estadístico de los datos de diámetro y distribución de partículas en las micrografías.....	- 87 -
4.12. Evaluación de la estabilidad de los microencapsulados a distintas condiciones de fractura de la pared.....	- 91 -
Capítulo 5. Conclusiones .....	- 93 -
Capítulo 6. Perspectivas .....	- 95 -
Capítulo 7. Referencias.....	- 97 -
Capítulo 8. Apéndices .....	- 105 -
Apéndice A. Datos obtenidos de la determinación de las características morfológicas de pitaya .....	- 105 -
Apéndice B. Datos obtenidos de la estandarización del proceso de obtención de proteína y aceite de cacahuete.....	- 106 -
Apéndice C. Curva de calibración obtenida para la cuantificación de proteína por el método de Biuret.....	- 107 -
9. Anexos .....	- 109 -
Anexo A. Curva de calibración para cuantificación de proteína mediante FT-MIR-ATR (Martínez-Gómez, 2021).....	- 109 -
Anexo B. Comprobante de evaluación antiplagio de la tesis.....	- 110 -

## Índice de figuras

- Figura 1. Producción de pitaya (criolla, pitaya de mayo y sin clasificar) en el Estado de Oaxaca. Datos recuperados de SIACON, 2021.....- 24 -
- Figura 2. De izquierda a derecha *S. pruinosus* color roja (SpR), *S. pruinosus* color naranja (SpO), *S. stellatus* color roja (SsR), *S. stellatus* color blanca (SsW), respectivamente. Imagen recuperada de García-Cruz et al., (2016). .....- 25 -
- Figura 3. Contenido de Betacianinas (Bc), Betaxantinas (Bx) y Betalaínas totales (Bt) en *S. pruinosus* roja (SpR) y *S. pruinosus* naranja (SpO); Contenido total de fenoles solubles expresado en mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) (García-Cruz et al., 2013). .....- 27 -
- Figura 4. AA: capacidad antioxidante; ORAC: ensayo de capacidad de absorbanza de radicales libres; TE: equivalentes de trolox; ABTS<sup>+</sup>: 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico); ms: muestra seca; SpR: *S. pruinosus* roja; SpO: *S. pruinosus* naranja.....- 28 -
- Figura 5. Ejemplos de estructuras de betalaínas y precursores (Paredes-López, 2002). Estructuras elaboradas con el programa Avogadro.....- 29 -
- Figura 6. Reacciones de degradación de betanina por oxidación y cambios de pH (Herbach et al., 2006). .....- 31 -
- Figura 7. Cambios en la estructura de las antocianinas por causa de cambios del pH (Paredes-López, 2002). .....- 32 -
- Figura 8. Proceso de coacervación compleja con doble emulsión (Mendanha et al., 2009). Estructuras elaboradas con el programa Chemix. ....- 37 -
- Figura 9. Procesos que ocurren durante la formación de las emulsiones y su almacenamiento (Tharwat, 2006). .....- 38 -
- Figura 10. Tipos de surfactantes de acuerdo con su carga. Encerrado en rojo se muestra la parte hidrofílica del tensoactivo (Stauffer, 1999). .....- 39 -
- Figura 11. Valores de BHL adecuados al tipo de emulsión (Stauffer, 1999). ....- 40 -
- Figura 12. Principales reacciones catalizadas por la enzima transglutaminasa.- 43 -
- Figura 13. Sitio activo de la transglutaminasa microbiana obtenida de *Streptomyces mobaraensis*, Cys<sup>64</sup> (Yokoyama et al., 2004). Estructura obtenida y modificada con la aplicación web de RCSB. ....- 44 -
- Figura 14. Fitoquímicos presentes en el aceite de cacahuete (Akhtar et al., 2014). - 46 -
- Figura 15. A) Ácidos grasos presentes en el cacahuete. B) Relación entre ácidos grasos saturados e insaturados (Liu et al., 2019). .....- 46 -
- Figura 16. Principales aminoácidos presentes en las proteínas de semilla de cacahuete. Los valores de cada aminoácido representan un porcentaje del total de aminoácidos presentes (Davis & Dean, 2016). .....- 47 -
- Figura 17. Complejo de iones libres de cobre con Biuret. Estructura elaborada en el software Avogadro (Zheng et al., 2017). .....- 49 -
- Figura 18. a) Distintas coloraciones del fruto de pitaya en el mes de mayo; b) Coloración deseada en el fruto de pitaya. ....- 69 -

Figura 19. a) Determinación cualitativa de la presencia de azúcares en los eluatos; b) Fracciones de interés llevadas a RMN de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ . En la muestra C3F7,8,9 se juntaron 3 fracciones de interés.....	- 73 -
Figura 20. Espectros de $^1\text{H}$ en $\text{D}_2\text{O}$ a 400 MHz correspondientes a la fracción C3F4. .....	- 74 -
Figura 21. Espectros de RMN $^1\text{H}$ a 400 MHz de la fracción C3F6 en $\text{D}_2\text{O}$ (Stintzing et al., 2004) (Stintzing et al., 2006). ....	- 75 -
Figura 22. Resultado de un control inadecuado de temperatura en el prensado de semilla de cacahuete. A) Temperaturas inferiores a $80\text{ }^\circ\text{C}$ ; B) Temperaturas superiores a $80\text{ }^\circ\text{C}$ . ....	- 76 -
Figura 23. Equipo de prensado empleado en la extracción parcial de aceite de cacahuete. Esquema realizado con el software AutoCAD 2019 con licencia para estudiantes. ....	- 77 -
Figura 24. Aceite de cacahuete (AC) obtenido después de centrifugar.....	- 77 -
Figura 25. Región de $1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ de los espectros de FT-MIR-ATR de APC (proteína de cacahuete, azul), HCD (harina de cacahuete desgrasada, amarillo) y HCPD (harina de cacahuete parcialmente desgrasada, naranja). ....	- 79 -
Figura 26. Región de $1800\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ del espectro de FT-MIR-ATR de APC. ....	- 80 -
Figura 27. a) Espectro de FT-MIR-ATR en la región de $1800\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ de AC (aceite claro libre de sólidos); b) Ampliación del espectro en la región de $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ de AC, donde se observan señales características de alcanos y alquenos. ....	- 81 -
Figura 28. Precipitación de azúcares de jugo de pitaya en acetona a); Extracción de pigmentos del precipitado con etanol destilado b); Residuo sólido obtenido de la centrifugación. ....	- 84 -
Figura 29. Espectros de FT-MIR-ATR en la región de $1800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ del extracto de pitaya a 1 y 2 h de evaporación a presión reducida, respectivamente. ....	- 84 -
Figura 30. Determinación de eficiencia de extracción de pigmentos a partir del jugo de pitaya.....	- 85 -
Figura 31. Formación de los microencapsulados.....	- 87 -
Figura 32. Resultados del tratamiento de las imágenes. Del lado izquierdo se muestran las micrografías obtenidas mediante el software ToupView. Del lado derecho se muestran las micrografías después del tratamiento de la imagen mediante el software ImageJ 1.5K. ....	- 88 -
Figura 33. Resultados del análisis estadístico. a) Histogramas representativos de la distribución del tamaño de los microencapsulados; b) Diagrama de cajas y bigotes; c) Diagrama representativo de los comparativos de tratamientos y repeticiones. ....	- 90 -
Figura 34. Microencapsulados sometidos a condiciones de digestión in vitro....	- 92 -
Figura 35. Microencapsulados sometidos a condiciones de MeOH con ultrasonido. .....	- 92 -

## Índice de tablas

Tabla 1. Caracterización física y química de frutos de pitaya SpR: <i>S. pruinosus</i> (roja) y SpO: <i>S. pruinosus</i> (naranja) en muestras frescas (Tukey, $\alpha=0.05$ ) (García-Cruz et al., 2013).....	26 -
Tabla 2. Estabilidad de las betalainas expuestas a distintos factores ambientales (Paredes-López, 2002).....	30 -
Tabla 3. Efecto de betacianinas y antocianinas en distintas patologías. ....	34 -
Tabla 4. Número de BHL correspondiente al grupo hidrofílico o lipofílico del tensoactivo. ....	41 -
Tabla 5. Aplicaciones de la transglutaminasa microbiana en la industria de los alimentos (Akbari et al., 2021).....	42 -
Tabla 6. Análisis fisicoquímico de cacahuete (Liu et al., 2019).....	45 -
Tabla 7. Comparativo de métodos para la cuantificación de proteínas en alimentos (Zheng et al., 2017). ....	50 -
Tabla 8. Disoluciones empleadas en el proceso de microencapsulación. ....	63 -
Tabla 9. Constituyentes y concentraciones de los fluidos sintéticos en la simulación de la digestión de las microcápsulas; FSS= Fluido salival simulado, FGS = Fluido gástrico simulado, LDS = Líquido duodenal simulado, LBS = Líquido biliar simulado (Versantvoort et al., 2005). ....	67 -
Tabla 10. Resultados del análisis morfológico realizado a la pitaya. ....	70 -
Tabla 11. Caracterización fisicoquímica del fruto de pitaya. ....	71 -
Tabla 12. Concentración de pigmentos en el fruto de pitaya. ....	72 -
Tabla 13. Resultados del proceso de extracción estandarizado de prensado de 100 g de cacahuete. ....	76 -
Tabla 14. Resultado del desgrasado de la harina y el aislado de proteína con base en 1.5 g de HCD.....	78 -
Tabla 15. Concentración de proteína de las muestras.....	82 -

## Lista de abreviaturas

AAP	Clorhidrato de 2,2'-azobis(2-amidino-propano)
AC	Aceite de cacahuete
ABTS <sup>+</sup>	Catión radical 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
APC	Aislado de proteína de cacahuete
Bc	Betacianinas
Bt	Betalaínas totales
Bx	Betaxantinas
BHL	Balance hidrofílico-lipofílico
C*	Croma
EAG	Equivalentes de ácido gálico
FT-MIR-ATR	Espectroscopía de infrarrojo medio con transformada de Fourier con muestreador de reflectancia total atenuada
<i>Hue</i> *	Ángulo de <i>Hue</i>
HCPD	Harina de cacahuete parcialmente desgrasada
HCD	Harina de cacahuete desgrasada
<i>L</i> *	Luminosidad
ORAC	Capacidad de absorción de radicales libres
pI	Punto isoeléctrico
SADER	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
SIACON	Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta
SpO	<i>Stenocereus pruinosus</i> de color naranja
SpR	<i>Stenocereus pruinosus</i> de color rojizo
SsW	<i>Stenocereus stellatus</i> de color blanca
SsR	<i>Stenocereus stellatus</i> de color rojo
TE	Equivalente de trolox por sus siglas en inglés
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente en trolox





## Capítulo 1. Introducción

El fruto de *Stenocereus pruinosus*, representativo de la región Mixteca del Estado de Oaxaca, tiene una coloración intensa. Esta coloración se debe principalmente a la presencia de compuestos antioxidantes tales como las betalaínas y antocianinas (Solymosi et al., 2015). Comercialmente, estos compuestos se emplean como colorantes en la industria alimentaria, obtenidos principalmente de remolacha roja (betalaínas) y de moras (antocianinas). Los cuales aportan propiedades funcionales para el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares, diabetes y alzheimer (Parizad et al., 2019). Dichas propiedades se atribuyen a la estructura química de las betalaínas y antocianinas. Las betalaínas son compuestos derivados de tirosina, con una estructura base de ácido betalámico como grupo cromóforo. Cuando este ácido está sustituido por ciclo-dihidroxifenilalanina (ciclo-DOPA) se obtienen las betacianinas (rojo-violetas), mientras que una sustitución con aminas o aminoácidos conducirá a las betaxantinas (amarillas) (Timoneda et al., 2019). Las antocianinas están formadas por una estructura de antocianidina unida a uno o más fragmentos de azúcar. Tanto las betalaínas como las antocianinas son susceptibles a cambios en el pH y luz UV-Visible, provocando cambios en su coloración. A un pH cercano a 3, las antocianinas se encuentran estables en su forma de un catión flavilo, similar a las betalaínas (Paredes-López, 2002).

Al igual que los factores externos, los factores internos también afectan la estabilidad de los pigmentos. El contenido de carbohidratos alto del fruto puede afectar la estabilidad de estos compuestos, por lo cual se recomienda removerlos previamente a su procesamiento (García-Cruz et al., 2016). Un método aplicable para la remoción de carbohidratos consiste en precipitarlos desde una disolución con acetona.

Los extractos secos y libres de interferentes conteniendo a los pigmentos se pueden procesar para prolongar su vida media, entre estos procesos se encuentra la microencapsulación. El método de microencapsulación permite mejorar tanto la

estabilidad como la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos de interés. Cabe señalar que estos encapsulados se pueden incorporar a una gran variedad de alimentos, produciendo diversos alimentos funcionales (Ballesteros et al., 2017). Uno de los métodos de microencapsulación que conduce a productos de calidad alta es la coacervación compleja empleando una doble emulsión. La cual se lleva a cabo primeramente por la formación de una emulsión simple *w/o* (agua-aceite), seguido de una emulsión doble *w/o/w* (agua-aceite-agua), para pasar a una coacervación, que consiste en la formación del material de pared y una reticulación (Tian et al., 2021). Para estabilizar a las emulsiones es posible emplear agentes tensoactivos como la lecitina, la cual reduce la tensión interfacial de las gotas formadas (Stauffer, 1999). De igual forma, el uso de enzimas como la transglutaminasa mejoran la eficiencia de encapsulación al favorecer la formación de interacciones entre proteínas (Mihalcea et al., 2018).

En la formación de la emulsión doble se lleva a cabo la adición de una disolución de proteína a pH alcalino, en el cual la mayoría de las proteínas son solubles en agua (Wang et al., 2018). Sin embargo, las betalaínas y antocianinas son susceptibles a la oxidación a pHs neutros y alcalinos, generando cambios estructurales (Paredes-López, 2002). Por lo cual, durante el proceso de microencapsulación es recomendable el mantener condiciones ácidas. Las proteínas de origen vegetal, como la del cacahuate presentan porcentajes de disolución superiores al 80% a pH tanto ácidos (pH de 2) como básicos (pH  $\geq 7$ ) (Zayas, 2006). Lo que permite llevar a cabo procesos de emulsión en compuestos de betalaínas y antocianinas a pH ácidos.

Por lo señalado anteriormente, en el presente trabajo se obtuvieron microencapsulados de extractos con betalaínas y antocianinas presentes en el fruto de pitaya (*Stenocereus pruinosus*). Los cuales se obtuvieron del jugo del fruto bajo en azúcares mediante una precipitación con acetona. La evaluación de la presencia de los pigmentos de interés en el extracto se realizó por el análisis de los datos de FT-MIR-ATR y RMN de  $^1\text{H}$ , para su posterior cuantificación por espectroscopía de UV-Vis. Los extractos se emplearon en la formación de una emulsión *w/o*,

agregando lecitina en aceite de cacahuete como tensoactivo. Esta emulsión se llevó a una doble emulsión *w/o/w*, mediante la disolución de la proteína a pH de 2, para ser llevada a una coacervación ajustando el pH a 4.4. Posteriormente, se adicionó goma xantana para la formación del material de pared y una disolución de la enzima transglutaminasa como agente reticulante. Se realizaron dos tratamientos, variando la concentración de proteína de cacahuete (1 y 2%). La caracterización morfológica de los microencapsulados se evaluó por microscopía óptica, un procesado de micrografías empleando el software ImageJ y un análisis de datos de distribución y tamaño de partícula por ANOVA robusto a través de RStudio. La eficiencia de encapsulación se determinó mediante la evaluación de la concentración de betalaínas por métodos espectrofotométricos de UV-Vis. Para determinar la bioaccesibilidad de los microencapsulados, se llevó a cabo un proceso de digestión *in vitro*, determinando la presencia de las microcápsulas de emulsión *w/o/w* por microscopía óptica, al final de la digestión.

### **1.1 Originalidad**

En la literatura existen diversos reportes en los cuales se evalúa la presencia de betalaínas en el fruto de pitaya, así como su capacidad antioxidante. Sin embargo, el uso del método de microencapsulación por coacervación compleja de compuestos antioxidantes de este fruto aún no ha sido reportado. De igual forma todavía no se ha reportado la presencia de antocianinas en el fruto de pitaya. El presente estudio permitió el desarrollo de un método de encapsulación de betalaínas y antocianinas, empleando como material de pared la proteína de cacahuete. La cual, por sus propiedades emulsificantes y su solubilidad a pH ácidos fue adecuada para el presente estudio. Cabe señalar que tanto la proteína como el aceite de cacahuete no se han empleado como material de pared y agentes emulsificantes, respectivamente, en procesos de microencapsulación.

## **1.2. Hipótesis**

El proceso de microencapsulación de extractos de pitaya ricos en betalaínas y antocianinas por coacervación compleja, empleando proteína de cacahuete (soluble a pH ácidos), permitirá obtener productos con una eficiencia de encapsulación superior al 65% y una bioaccesibilidad bajo condiciones de digestión *in vitro* mayor al 90% a un nivel de significancia de 0.05.

## **1.3. Objetivos**

### **1.3.1. Objetivo general**

Obtener microcápsulas estables y bioaccesibles, con una eficiencia de encapsulación mayor al 65% de betalaínas y antocianinas, obtenidas de pitaya (*Stenocereus pruinosus*) empleando proteína de cacahuete y goma xantana como material de pared.

### **1.3.2. Objetivos particulares**

- Obtener un aislado de proteína de cacahuete a una concentración superior al 80%.
- Generar una emulsión *w/o* de los pigmentos de pitaya empleando aceite de cacahuete.
- Obtener una emulsión *w/o/w* estable a partir de la emulsión *w/o*, empleando lecitina de soya como agente reticulante.
- Determinar el contenido de betalaínas y antocianinas en el jugo de pitaya a través de métodos espectrofotométricos de UV-Vis.
- Obtener un extracto rico en betalaínas y antocianinas a partir del jugo de pitaya.
- Obtener microencapsulados de extractos de betalaínas y antocianinas utilizando proteína de cacahuete y goma xantana como material de pared, así como transglutaminasa como agente reticulante.
- Evaluar la estabilidad y bioaccesibilidad de las betalaínas y antocianinas en las microcápsulas, empleando métodos espectrofotométricos y métodos de digestión *in vitro*, respectivamente.

#### **1.4. Importancia del estudio**

Las betalaínas y antocianinas son empleadas de manera habitual como colorantes en la industria alimentaria, siendo de interés para el consumidor debido a sus propiedades antioxidantes. Sin embargo, el fruto de pitaya solo es posible cosecharlo en los meses de mayo y junio, siendo importante la implementación de estrategias que permitan el almacenamiento y aprovechamiento de sus pigmentos. Para lograr este objetivo, es necesario implementar estrategias que limiten la exposición de los pigmentos al ambiente. De esa manera, se evitarán cambios estructurales que afecten la coloración y la pérdida de las propiedades funcionales de los pigmentos. Por tal motivo, resulta relevante el desarrollo de métodos de microencapsulación que permitan almacenar a los pigmentos de pitaya, sin disminuir su bioaccesibilidad durante la ingesta.

#### **1.5. Limitaciones del estudio**

El método de encapsulación por coacervación compleja se llevó a cabo a concentraciones de 1 y 2% de proteína de cacahuete. La proteína se obtuvo de cacahuete crudo a partir de una extracción sólido-líquido y una precipitación posterior en el punto isoeléctrico de las proteínas para obtener un producto de una concentración superior al 80%. La etapa de emulsión se realizó a pH de 2. El polisacárido empleado fue goma xantana, adicionando la enzima transglutaminasa como agente reticulante y lecitina de soya como tensoactivo. Las cuantificaciones de betalaínas (a partir de la suma de betacianinas y betaxantinas totales) y antocianinas totales se realizaron por los métodos espectrofotométricos de UV-Vis correspondientes. La eficiencia de encapsulación se realizó a partir de los datos de betalaínas totales. En el proceso de microencapsulación se empleó la fracción rica en la mezcla de betalaínas y antocianinas.



## Capítulo 2. Análisis de fundamentos

En la presente sección se describirá la producción de pitaya (*Stenocereus pruinosus*) en el estado de Oaxaca en años recientes. Además, se mencionarán las generalidades de las betalaínas y antocianinas obtenidas a partir de este fruto, sus propiedades funcionales, estabilidad y los métodos para su caracterización. Se describirán los procesos de encapsulación y su uso en la conservación de compuestos bioactivos de manera general. Por último, se llevará a cabo una revisión de los métodos para cuantificar la estabilidad de las microcápsulas en un proceso de digestión *in vitro*.

### 2.1. Producción de pitaya en el Estado de Oaxaca

La pitaya es una cactácea cuyo cultivo se da preferentemente en zonas de clima semiárido, en las cuales la precipitación pluvial es escasa y errática. Aunque cerca de un 34% del territorio nacional presenta este tipo de clima, pocos son los estados donde se cultiva este fruto (Martínez-González, 2010). En el Estado de Oaxaca, específicamente en la región de la Mixteca, el cultivo del fruto es representativo de la misma. Por lo cual, durante su temporada de cosecha podemos encontrarlo a la venta en distintos mercados locales.

La producción de pitaya en el Estado de Oaxaca en la última década ha fluctuado para las variedades criolla, de mayo y sin clasificar, Figura 1. En el período de 2013 a 2016, se detectó una estabilidad en la producción de pitaya en Oaxaca. Sin embargo, en el período comprendido del 2017 al 2019, la producción se redujo un 31.9% (1819-1238 toneladas), reducción que no se observaba desde el 2011. Para el año 2020 la producción crece nuevamente en un 37.9%; sin embargo, en el 2021 ocurrió una reducción en un 14.3%. Las fluctuaciones observadas en su producción son una señal de la problemática que enfrentan los productores de este fruto en la región.

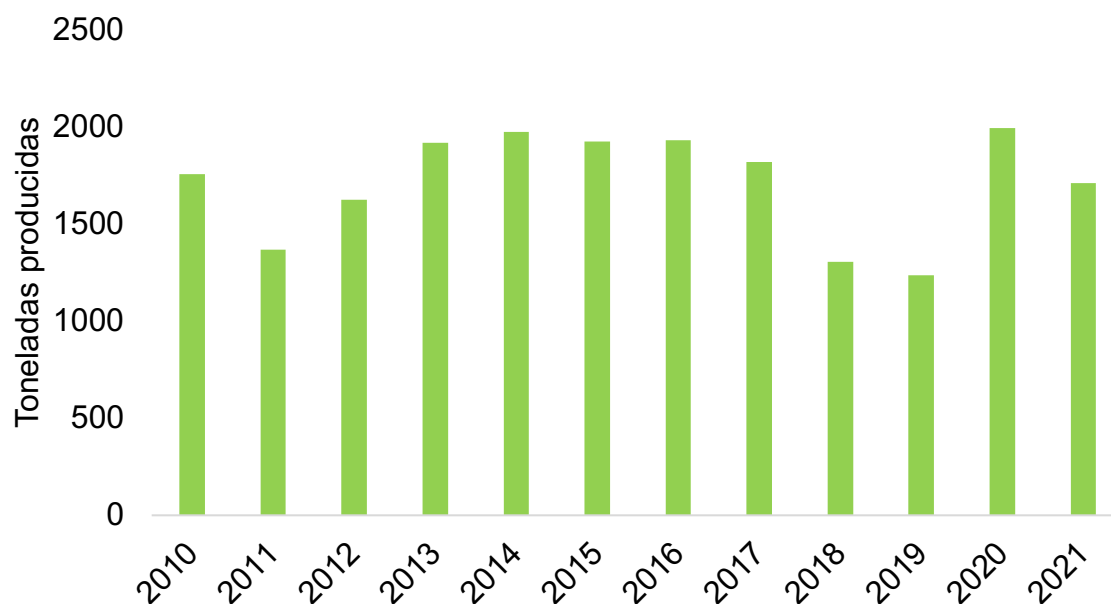


Figura 1. Producción de pitaya (criolla, pitaya de mayo y sin clasificar) en el Estado de Oaxaca. Datos recuperados de SIACON, 2021.

La disminución en la producción de pitaya puede ser el resultado de diversos factores como la introducción de nuevas tecnologías de siembra. Las cuales, permitieron sembrar una variedad de cultivos más redituables económicamente, en comparación con las especies originales. Otro factor es la búsqueda de otras alternativas de trabajo, resultado de la escasez de agua. En los últimos años se busca regresar a la siembra de cultivos endémicos, que no necesiten de sistemas de riego. Una de las estrategias que tienen por objetivo la reactivación del cultivo de pitaya, es la exportación del fruto a Estados Unidos. En el año 2020, la Dirección general de sanidad vegetal reportó que Oaxaca exportó aproximadamente 91 toneladas de este fruto a Estados Unidos. Las cuales fueron producidas por 12 huertos del municipio de Santiago Chazumba.



## 2.2. Propiedades físicas de la pitaya y sus constituyentes

La pitaya (*S. pruinosus*) crece en forma de cactus columnares en climas áridos y semiáridos. Por sí mismos, estos cactus se han empleado como material de construcción, forraje y para delimitar los terrenos de los agricultores. Sin embargo, se reconoce principalmente por su fruto comestible (García-Cruz et al., 2013). El fruto resulta atractivo para el consumidor por los colores intensos de su pulpa. Estos colores son por la presencia de pigmentos antioxidantes como las betalaínas, las cuales comprenden dos subgrupos de pigmentos, las betaxantinas (Bx) con coloraciones rojo-violeta y betacianinas (Bc) con coloraciones amarillas. En la Figura 2, se observan las coloraciones diferentes encontradas en las especies *S. pruinosus* y *S. stellatus* del género *Stenocereus*. Para las coloraciones rojas, su coloración resulta muy intensa, lo cual podría ser un indicador de una mayor concentración de betalaínas.



Figura 2. De izquierda a derecha *S. pruinosus* color roja (SpR), *S. pruinosus* color naranja (SpO), *S. stellatus* color roja (SsR), *S. stellatus* color blanca (SsW), respectivamente. Imagen recuperada de García-Cruz et al., (2016).

La diferencia en la coloración entre variedades de *Stenocereus pruinosus* puede ser cuantificada por métodos colorimétricos. En el caso de *S. pruinosus*, los resultados muestran que existe una diferencia significativa para los parámetros de color  $L^*$  (Luminosidad),  $Hue^*$  y  $C^*$  (Tabla 1). En cuanto a sus características morfológicas (Tabla 1) no existe diferencia significativa en las variables de peso y diámetro polar del fruto. Sin embargo, el índice de forma sí resulta mayor para el caso de SpR. El

índice de forma es la relación entre los diámetros ecuatorial/polar, permitiendo conocer el grado de circularidad del fruto. Además, se puede observar que SpR y SpO, muestran una diferencia significativa en sólidos solubles totales, siendo menor para SpR. Un contenido alto de azúcar puede favorecer los procesos de fermentación, ocasionando la degradación de compuestos de interés. Por lo que, en estudios relacionados con betalaínas es recomendable utilizar la variedad SpR, considerando que la cantidad de carbohidratos a retirar del extracto sería menor.

Tabla 1. Caracterización física y química de frutos de pitaya SpR: *S. pruinosus* (roja) y SpO: *S. pruinosus* (naranja) en muestras frescas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) (García-Cruz et al., 2013).

Variable	SpR	SpO
<b>Características morfológicas</b>		
Diámetro ecuatorial (cm)	6.9 ± 0.8 <sup>a</sup>	6.3 ± 0.7 <sup>b</sup>
Diámetro polar (cm)	7.9 ± 0.9 <sup>a</sup>	8.5 ± 0.9 <sup>a</sup>
Índice de forma	0.87 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.09 <sup>b</sup>
Peso (g)	180.9 ± 72.6 <sup>a</sup>	177.0 ± 46.4 <sup>a</sup>
<b>Análisis proximal</b>		
Humedad (%)	87.1 ± 1.4 <sup>b</sup>	89.0 ± 1.05 <sup>a</sup>
Carbohidratos (%)	10.2 ± 0.24 <sup>a</sup>	8.5 ± 0.16 <sup>b</sup>
Proteínas (%)	1.3 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.013 <sup>a</sup>
Grasas (%)	0.12 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.001 <sup>b</sup>
Fibra cruda (%)	0.67 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.02 <sup>a</sup>
Cenizas (%)	0.63 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.16 <sup>a</sup>
<b>Caracterización química</b>		
Sólidos solubles totales (°Brix)	9.3 ± 1.1 <sup>b</sup>	10.3 ± 0.9 <sup>a</sup>
Acidez valorable (% ácido málico)	0.17 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.05 <sup>a</sup>
<b>Color</b>		
Luminosidad ( <i>L</i> <sup>*</sup> )	19.4 ± 2.7 <sup>b</sup>	25.7 ± 5.2 <sup>a</sup>
Ángulo Hue ( <i>Hue</i> <sup>*</sup> )	19.8 ± 4.0 <sup>b</sup>	28.9 ± 7.3 <sup>a</sup>
Croma ( <i>C</i> <sup>*</sup> )	24.7 ± 7.2 <sup>b</sup>	35.0 ± 8.7 <sup>a</sup>

Nota. Tukey; Prueba de comparación de medias, donde las medias con la misma letra en la misma fila indican una diferencia no significativa.

Como se ha mencionado con anterioridad, la diferencia de coloración en SpR y SpO, es resultado de la diferencia de concentración de Bc y Bx presentes. En la Figura 3, se muestra un contenido de betalaínas totales (Bt) para SpR. Otro aspecto para resaltar es que la concentración de Bc es 83.6% mayor en SpR en comparación con

SpO, lo cual resulta importante al atribuírsele propiedades funcionales a las Bc. En cuanto al contenido de fenoles solubles totales, SpR presenta un 33% más respecto a SpO. En general, ambas coloraciones de pitaya presentan una concentración mayor a la reportada para mora (1-4 mg/g) y arándano (2.1 mg/g), frutos ricos en estos compuestos (García-Cruz et al., 2013).



Figura 3. Contenido de Betacianinas (Bc), Betaxantinas (Bx) y Betalaínas totales (Bt) en *S. pruinosa* roja (SpR) y *S. pruinosa* naranja (SpO); Contenido total de fenoles solubles expresado en mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) (García-Cruz et al., 2013).

El contenido de Bt y fenoles solubles les confieren a los extractos de *S. pruinosa* capacidad antioxidante. En la Figura 4 se muestran los resultados del ensayo de capacidad antioxidante equivalente en trolox (análogo de la vitamina E) (TEAC) empleando al catión radical 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS<sup>+</sup>), y el ensayo de capacidad de absorción de radicales libres (ORAC), usados para determinar la capacidad antioxidante en muestras frescas de SpR y SpN. El ensayo de ORAC se basa en que los compuestos antioxidantes presentes en una muestra (por ejemplo, betalaínas) inhibirán la formación de radicales libres, provocando una disminución de la fluorescencia de una sonda fluorescente (3',6'-dihidroxi-epiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanten]-3-ona) después de combinarla con el clorhidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH), usando trolox como estándar. El ensayo de reducción de ABTS<sup>+</sup>, consiste en evaluar la capacidad de

un antioxidante para neutralizar al radical  $ABTS^{+\cdot}$ , empleando métodos espectrofotométricos para cuantificar el efecto. En las determinaciones de la Figura 4, SpR presenta una capacidad antioxidante mayor que SpO (García-Cruz et al., 2013). Estos resultados permiten concluir que SpR proporciona extractos ricos en compuestos antioxidantes con estructuras capaces de neutralizar radicales libres, tal como las Bc y Bx.



Figura 4. AA: capacidad antioxidante; ORAC: ensayo de capacidad de absorbancia de radicales libres; TE: equivalentes de trolox;  $ABTS^{+\cdot}$ : 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico); ms: muestra seca; SpR: *S. pruinosus* roja; SpO: *S. pruinosus* naranja.

### 2.2.1. Pigmentos en la pitaya

El color en la pitaya es consecuencia de la presencia de pigmentos como las betalaínas. En plantas, este tipo de compuestos funcionan como atractores de animales para su polinización y diseminación de semillas. En la industria de los alimentos, estos pigmentos son usados como colorantes y aditivos comerciales. Este es el caso del colorante betanina (E162), que es la forma glucosilada de la betanidina, la cual se extrae principalmente de la raíz de remolacha (Solymosi et al., 2015). Las betalaínas son derivados de tirosina, las cuales presentan en general en su estructura al ácido betalámico como grupo cromóforo central. Como ya se mencionó en la sección 2.2, estos heterociclos comprenden dos clases de

compuestos, las Bc y las Bx. Las Bc son el resultado de la conjugación del ácido betalámico con una ciclo-dihidroxifenilalanina (ciclo-DOPA), Figura 5, y las Bx un derivado del ácido betalámico conjugado con aminas o aminoácidos diferentes. Las Bc presentan un espectro con absorbancia máxima centrada en  $\lambda = 536$  nm (rojo-violeta), mientras que las Bx presentan coloraciones amarillas, con una absorbancia en 480 nm (Timoneda et al., 2019).

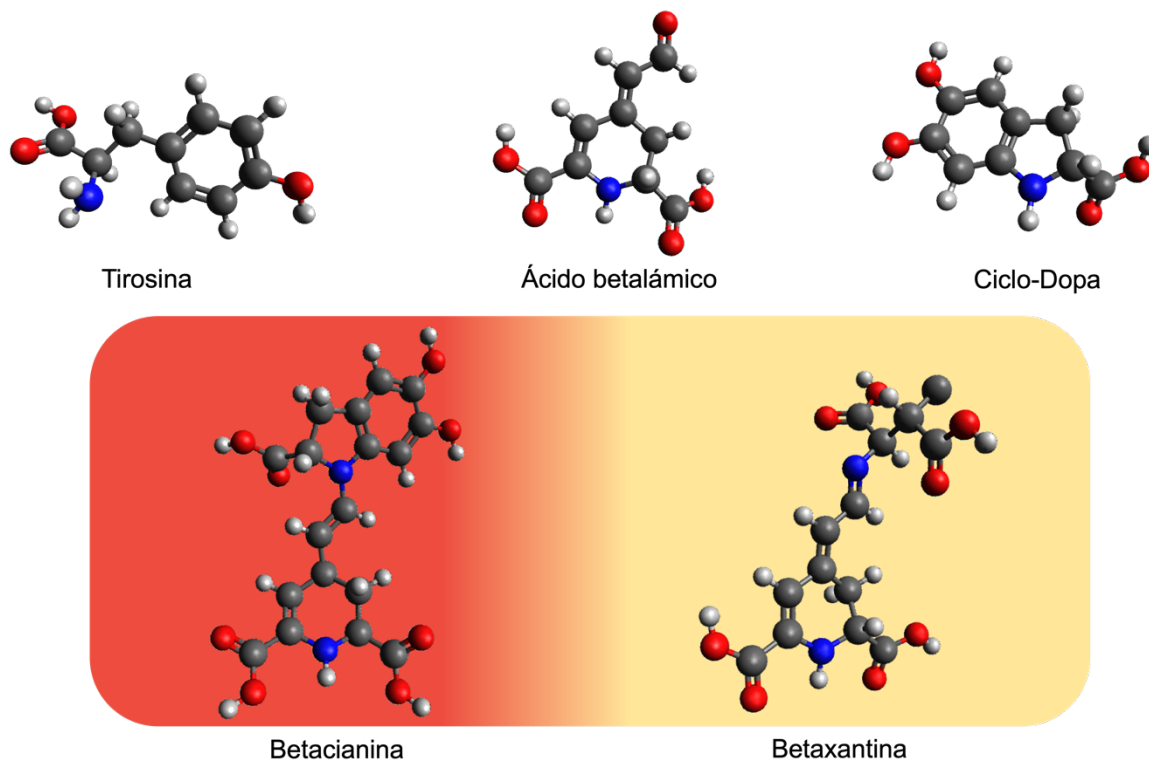


Figura 5. Ejemplos de estructuras de betalainas y precursores (Paredes-López, 2002). Estructuras elaboradas con el programa Avogadro.

Cuando se procesan las betalainas, resulta importante considerar su estabilidad, en la Figura 6 se muestran algunos factores que afectan dicha estabilidad, tales como el pH, el cual resulta fundamental para mantener la coloración deseada.

Estos factores afectan de manera distinta a la estructura de betalainas, llevándose a cabo reacciones de isomerización, desglicosilación, hidrólisis, descarboxilación, recondensación y deshidrogenación. Para el caso de las Bc, cuando estas se encuentran en un medio alcalino tienden a hidrolizarse. En cambio, en un medio

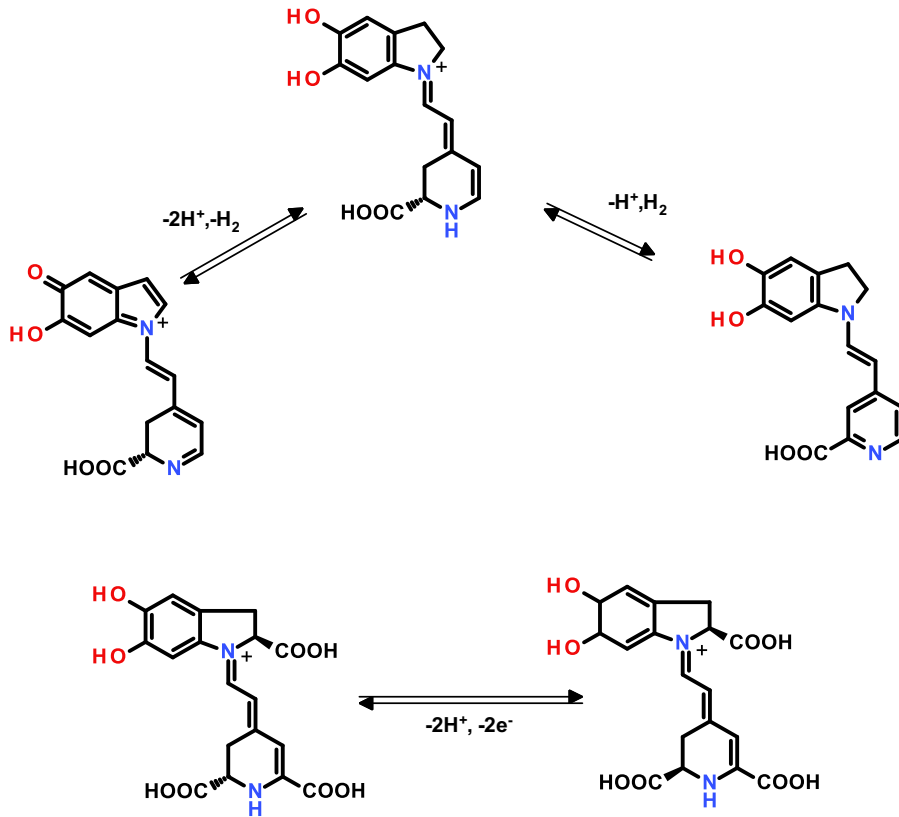
ácido es posible una recondensación tanto para las Bc como para las Bx, Figura 6 (Herbach et al., 2006).

Tabla 2. Estabilidad de las betalaínas expuestas a distintos factores ambientales (Paredes-López, 2002).

<b>Factor</b>	<b>Sistema modelo</b>	<b>Observaciones</b>
<b>pH</b>	Disoluciones de betalaínas	Estabilidad máxima de color a pH de 3.5-7. $\lambda_{\text{máx}}$ de Bc = 537–538 nm $\lambda_{\text{máx}}$ de Bx = 475–478 nm A pH $\leq$ 3.5, disminuye $\lambda_{\text{máx}}$ y $\epsilon$ disminuye. A pH $\geq$ 7, $\lambda_{\text{máx}}$ incrementa y $\epsilon$ disminuye.
	Disoluciones de betalaínas con oxígeno	Estabilidad del color a un pH de 5.5-8.0
<b>Temperatura</b>	Disoluciones de betalaínas	El calentamiento reduce la coloración roja, pero el enfriamiento puede revertir la reacción.
<b>Luz</b>	Disoluciones de betalaínas	Aumenta la tasa de degradación en un 15.6% con la exposición a la luz del día a 15 °C. Con una tasa de degradación de primer orden mayor a pH de 3 ( $K = 0.35/\text{día}$ ) que a 5 ( $K = 0.11/\text{día}$ ) con luz fluorescente.
<b>Oxígeno</b>	Disoluciones de betalaínas	A un pH de 7, la tasa de degradación de las betalaínas es un 15% más alta en aire, en comparación con atmósferas controladas.

Nota: Para betaninas (Bc)  $\epsilon = 60000 \text{ L}^*(\text{mol}*\text{cm})^{-1}$  y para indicaxantina (Bx)  $\epsilon = 48000 \text{ L}^*(\text{mol}*\text{cm})^{-1}$ .

Degradación de betalainas por oxidación



Degradación de betalainas por cambios de pH

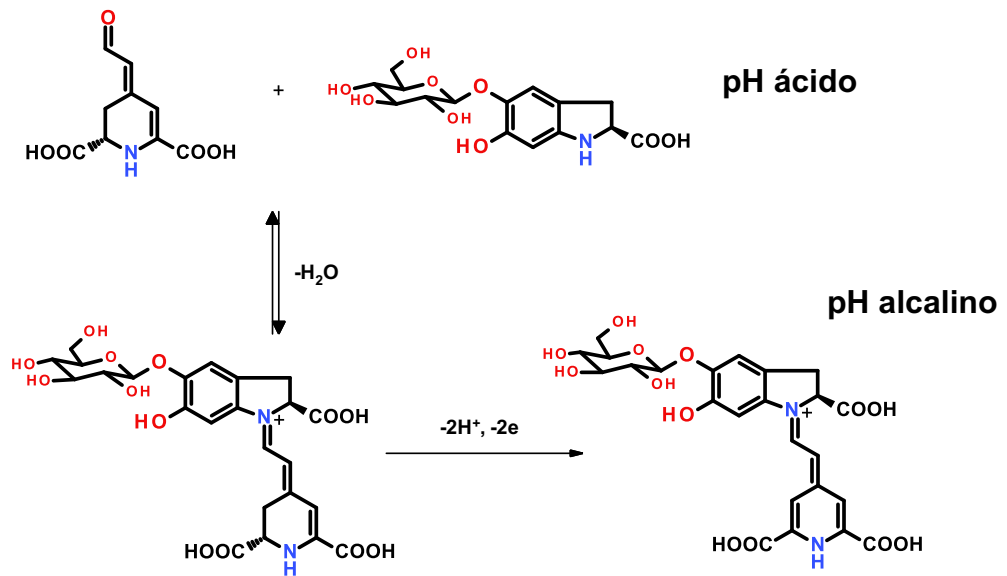


Figura 6. Reacciones de degradación de betanina por oxidación y cambios de pH (Herbach et al., 2006).

De igual forma, es posible que exista la presencia antocianinas en la pitaya. Esto al formar parte del grupo de los flavonoides, grupo de compuestos que están presentes en concentración similar ( $0.30 \pm 0.07$  mg equivalentes de quercetina/g de peso fresco) a las betalainas totales (0.38 mg/g de peso fresco) para una variante de *S. stellatus*. Existen reportes de la presencia de antocianinas en cactáceas como la pitaya, como *Hylocereus spp.* (pitahayas) (Fan et al., 2020), las cuales son cultivadas de igual forma en la región mixteca del estado de Oaxaca.

Las antocianinas son flavonoides que se encuentran en frutos y flores. Están formadas por una estructura de antocianidina con uno o más azúcares. El anillo A está fusionado a un anillo heterocíclico con oxígeno (anillo C) unido a otro anillo aromático (anillo B) (Figura 7). Los colores de estos compuestos en disolución se ven afectados por cambios de pH. La forma catiónica (ion flavilo) se encuentra favorecida a pH ácidos, mientras que a pH alcalinos se favorecen sus formas incoloras como la chalcona (Paredes-López, 2002).

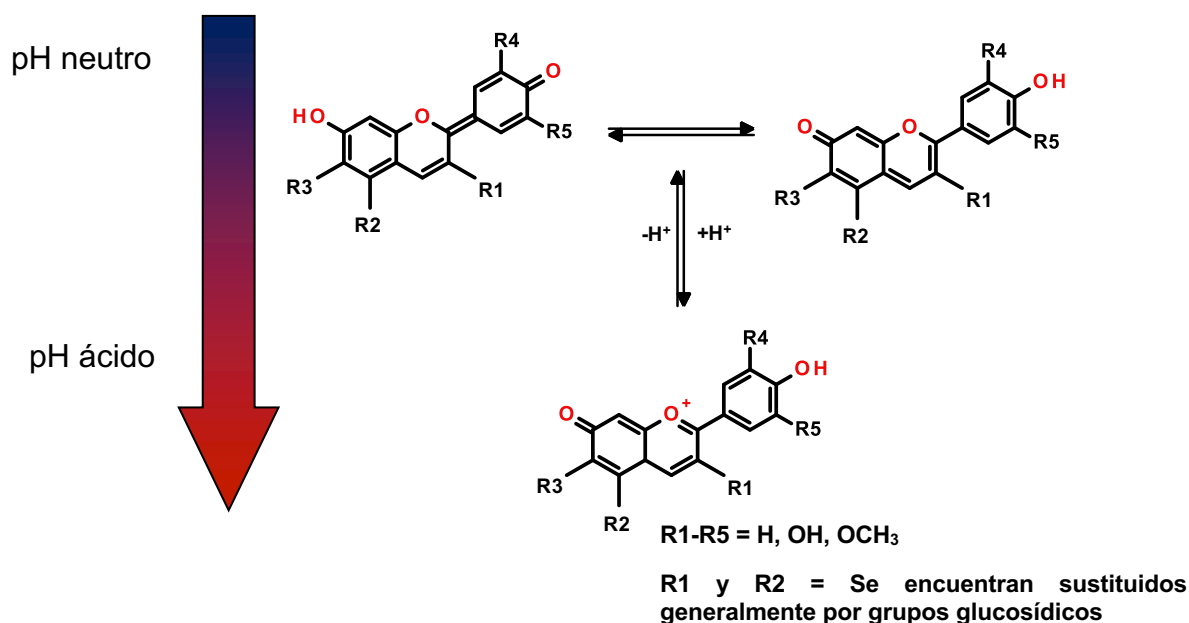


Figura 7. Cambios en la estructura de las antocianinas por causa de cambios del pH (Paredes-López, 2002).



### **2.2.2. Propiedades funcionales de las betalainas y antocianinas**

El cuerpo humano es susceptible a un envejecimiento acelerado resultado de su exposición a especies reactivas de oxígeno (radicales peroxilo) y nitrógeno (óxido nítrico). Las cuales pueden ser generadas por reacciones metabólicas, o provenientes de la exposición a la contaminación atmosférica. De forma natural el organismo produce enzimas como la glutatión peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa, encargadas de reducir el estrés oxidativo. Sin embargo, cuando estas se ven superadas por los radicales exógenos, es necesario el consumo de compuestos antioxidantes tales como betalainas y antocianinas (Stintzing & Carle, 2004).

Este tipo de compuestos no solo permiten regular el estrés oxidativo en el organismo, de igual forma se ha reportado su injerencia en distintas patologías. En el caso de las antocianinas se ha visto que tienen un efecto reductor en las respuestas inflamatorias, así como la inhibición de enzimas como  $\alpha$ -amilasa pancreática y  $\alpha$ -glucosidasa intestinal auxiliando en la regulación de la glucosa en sangre. La inhibición de estas enzimas retarda la digestión y absorción de carbohidratos, con una disminución de la glucemia postprandial.

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de tres ensayos *in vivo* e *in vitro* en los cuales se evalúa el efecto del consumo de estos compuestos en afecciones cardíacas y diabetes. Las propiedades funcionales antes mencionadas reflejan la importancia del desarrollo de métodos que permitan el aumento de su bioaccesibilidad en el organismo. Así como mantenerlos estables durante largos periodos de almacenamiento.

Tabla 3. Efecto de betacianinas y antocianinas en distintas patologías.

Compuesto bioactivo	Origen	Ensayo aplicado	Resultados	Referencia
<b>Betacianina</b>	<i>Opuntia stricta</i> (nopal tunero) y remolacha roja.	Pacientes con aterosclerosis, 50 mg a cada paciente de betalaínas/betacianinas. Toma de muestra de sangre y orina cada 3, 8 y 24 h.	Reducción de homocisteína, glucosa, colesterol total, triacilgliceroles y LDL.	(Rahimi et al., 2019)
<b>Antocianina</b>	Maíz y trigo pigmentado	Inhibición de enzimas como la $\alpha$ -amilasa pancreática y $\alpha$ -glucosidasa intestinal. Propiedad inmunomodular, empleando cultivos de células Caco-2, de 20 a 50 $\mu$ M/L de antocianinas	Inhibición de la actividad enzimática de la $\alpha$ -amilasa pancreática y $\alpha$ -glucosidasa intestinal. Capacidad antiinflamatoria.	(Parizad et al., 2019)
<b>Betalaínas Antocianinas</b>	Extractos de <i>S. stellatus</i> [Pfeiffer] Riccobono	Prueba de tolerancia oral a la glucosa. Metformina como control positivo en ratas Wistar.	Reducción de niveles de glucosa en sangre.	(Cervantes-Arista et al., 2020)

### **2.3. Métodos de encapsulación de compuestos bioactivos**

En la actualidad existen diversos métodos que permiten estabilizar durante su almacenamiento a compuestos bioactivos de interés, tales como la encapsulación (Ballesteros et al., 2017). Este método permite el desarrollo de distintos alimentos funcionales al recubrir el agente activo de interés con un material de pared, permitiendo una posterior liberación controlada (Julia Martín, Eugenia Marta Kuskoski, 2017). Recientemente se han desarrollado investigaciones con el objetivo de obtener sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos altamente eficientes. Tal es el caso de estudios en los cuales la interacción de alginato con dextrano aumenta su estabilidad de los microencapsulados en condiciones típicas de pH del tracto digestivo (Aguirre-Calvo et al., 2018).

El tamaño de las cápsulas formadas varía dependiendo del método aplicado para su formación. Tal es el caso del método de esferificación empleado en la cocina molecular, en donde se obtienen cápsulas de tamaño macro. Las cuales emplean como material de pared principalmente alginato de sodio, permitiendo su ruptura en la boca (de Farias & Zapata Noreña, 2019). Por otra parte, en el área de conservación de compuestos bioactivos se emplean técnicas de microencapsulación como la coacervación compleja, que conducen a cápsulas de tamaño de 1 a 100  $\mu\text{m}$ .

#### **2.3.1. Microencapsulación por coacervación compleja**

En la microencapsulación, los compuestos bioactivos o los ingredientes alimentarios de interés son almacenados dentro de un material de pared de tamaño microscópico para su protección. Este material de pared debe ser insoluble y no reactivo con el compuesto bioactivo, para evitar cualquier tipo de interacción química. Dicho material puede ser desde proteínas, polisacáridos, lípidos o polímeros sintéticos obteniendo cápsulas de tamaño de 1 a 100  $\mu\text{m}$ . Los microencapsulados se pueden obtener en dos morfologías, en microcápsulas o microesferas, dependiendo del método de obtención y del material de pared. Las microcápsulas tienen una morfología núcleo/capa bien definida y se forman tradicionalmente por medios químicos. En el caso de las microesferas, se forman por medio de un proceso de

atomización o molienda, distribuyendo los compuestos bioactivos dentro de la matriz (Sobel et al., 2014) .

La microencapsulación por coacervación se subdivide en simple o compleja. En la coacervación simple se emplea un solo polímero, mientras que en la compleja se llevan a cabo interacciones iónicas entre dos o más polímeros de carga opuesta. En la coacervación compleja se emplean generalmente polisacáridos y proteínas, llevándose a cabo interacciones electrostáticas, de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas (Timilsena et al., 2019). En este tipo de coacervación, cuando los compuestos de interés son polares se emplea una doble emulsión. Para esto, primeramente, se realiza una primera emulsión (*w/o*) en la cual el compuesto de interés se mezcla con una fase oleosa y un tensoactivo. La emulsión (*w/o*), posteriormente se agrega a una disolución de proteína/polisacárido generando una emulsión *w/o/w*. Posteriormente, se lleva a cabo la coacervación mediante un ajuste de pH a 4.4 (punto isoeléctrico de las proteínas) seguida de una posible reticulación enzimática, Figura 8. Finalmente, la temperatura se lleva a 10 °C con agitación constante y se almacena a dicha temperatura (Rocha-Selmi et al., 2013).

Debido al interés y la importancia de las emulsiones en el presente proyecto, se describirán en la sección siguiente.

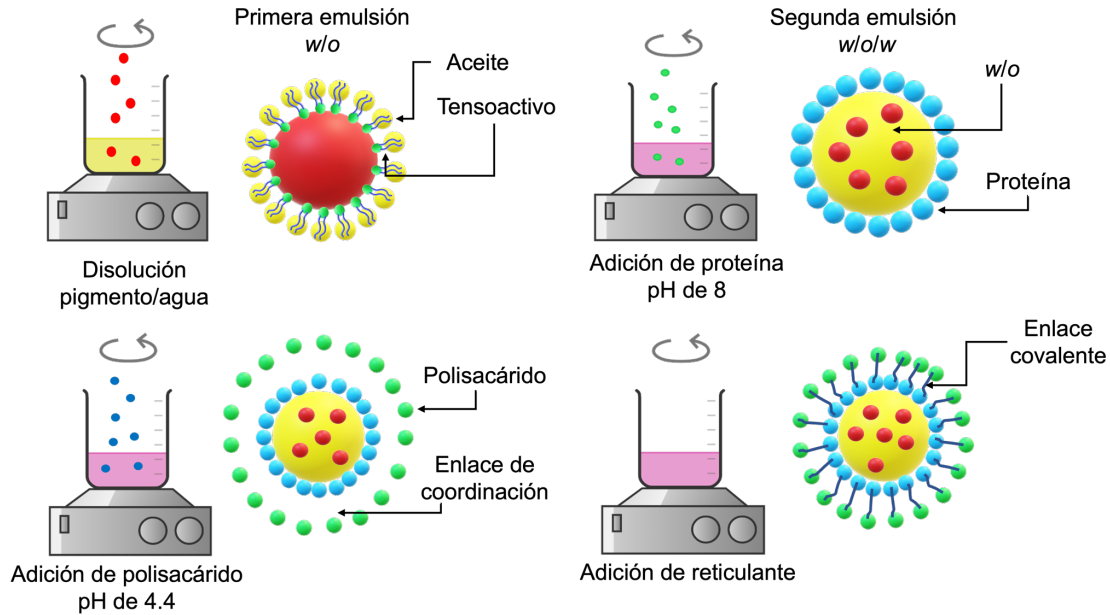


Figura 8. Proceso de coacervación compleja con doble emulsión (Mendanha et al., 2009). Estructuras elaboradas con el programa Chemix.<sup>1</sup>

### 2.3.2. Emulsiones

Las emulsiones son empleadas de forma regular en la industria de los alimentos para la preparación de productos como mayonesas, postres como el helado y cremas. Esta consta de dos fases inmiscibles que forman sistemas dispersos que contienen gotas de una fase dispersa en un medio líquido conocido como fase continua. Entre los principales tipos de emulsiones podemos encontrar aceite en agua (*o/w*), agua en aceite (*w/o*) y aceite-aceite (*o/o*), formada por un aceite polar y un aceite no polar. Este tipo de emulsiones forman generalmente gotas de un tamaño en el intervalo de 100 nm a 100  $\mu\text{m}$ .

Para llevar a cabo la formación de la emulsión es necesario aplicar una fuerza positiva, la cual puede ser suministrada por equipos de agitación. Dicha fuerza, deberá ser mayor a la diferencia de presión entre el interior y el exterior de la gota (presión de Laplace). En la Ecuación 1, se expresa una diferencia de presión como la razón de la tensión interfacial entre dos veces el radio de la gota.

<sup>1</sup> <https://chemix.org/>. Consultada por última vez el 28 de febrero de 2023.

$$\Delta p = \frac{\gamma}{2r} \quad \text{para gotas esféricas} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde  $\Delta p$  es la diferencia de presión entre la parte interior y exterior de la gota;  $\gamma$  es la tensión interfacial positiva y  $r$  es el radio de la gota.

De igual forma, en la Ecuación 1 se puede apreciar cómo la tensión interfacial afecta proporcionalmente la  $\Delta p$ . Por lo cual, entre menor sea su valor, menor será la fuerza por vencer durante la formación de la emulsión. Aunado a esto, entre mayor sea la viscosidad del medio, el tiempo que tardará en desfragmentarse una gota durante la formación de la emulsión aumentará, incrementando de esta manera el tiempo de agitación necesario para la formación de una emulsión estable (Paipetis, 2010). Durante la formación de la emulsión, así como su almacenamiento pueden llevarse a cabo diversos procesos como los que se ilustran en la Figura 9. Los cuales son dependientes de los tamaños de las gotas, su densidad y las fuerzas intermoleculares que estas presenten.

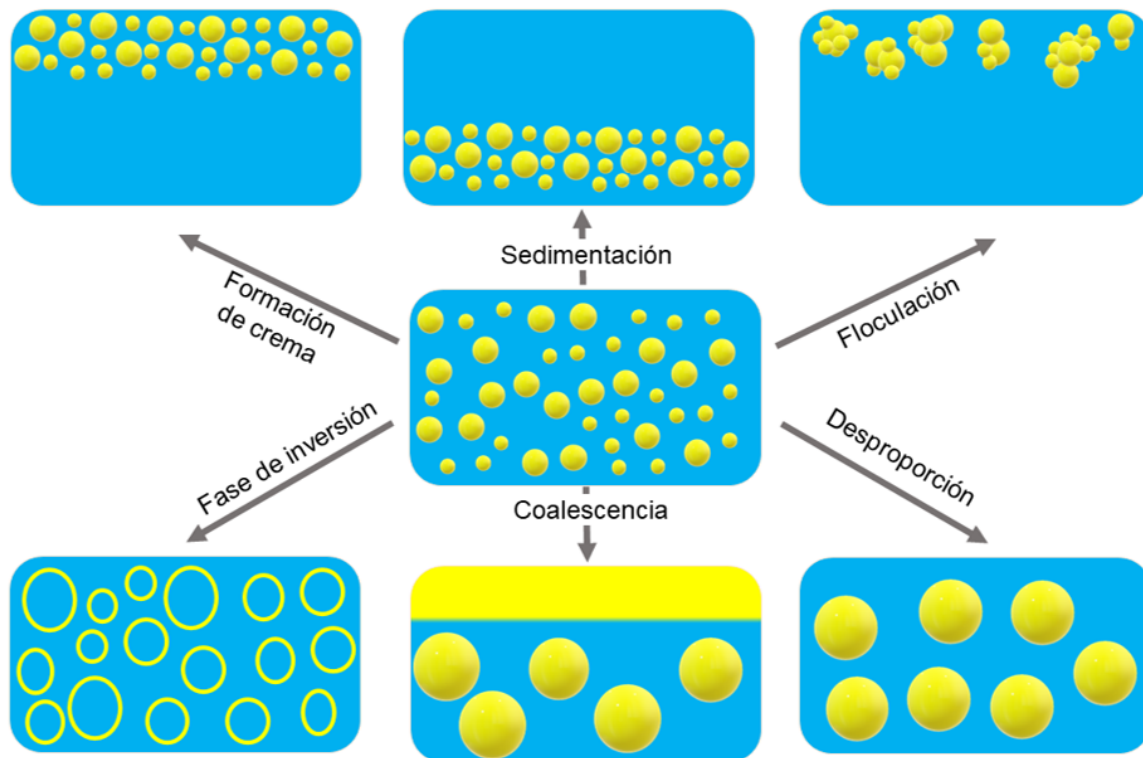


Figura 9. Procesos que ocurren durante la formación de las emulsiones y su almacenamiento (Tharwat, 2006).

La tensión interfacial de la gota puede disminuir mediante el uso de compuestos tensoactivos. Los cuales, favorecen tanto la formación de la emulsión como su estabilidad. Este tipo de compuestos se caracterizan por ser anfifílicos, con una parte de su estructura presentando afinidad a medios polares mientras que la otra a medios no polares. En la industria alimentaria, se usan generalmente tensoactivos no iónicos, iónicos y anfóteros como la lecitina (Stauffer, 1999), Figura 10.

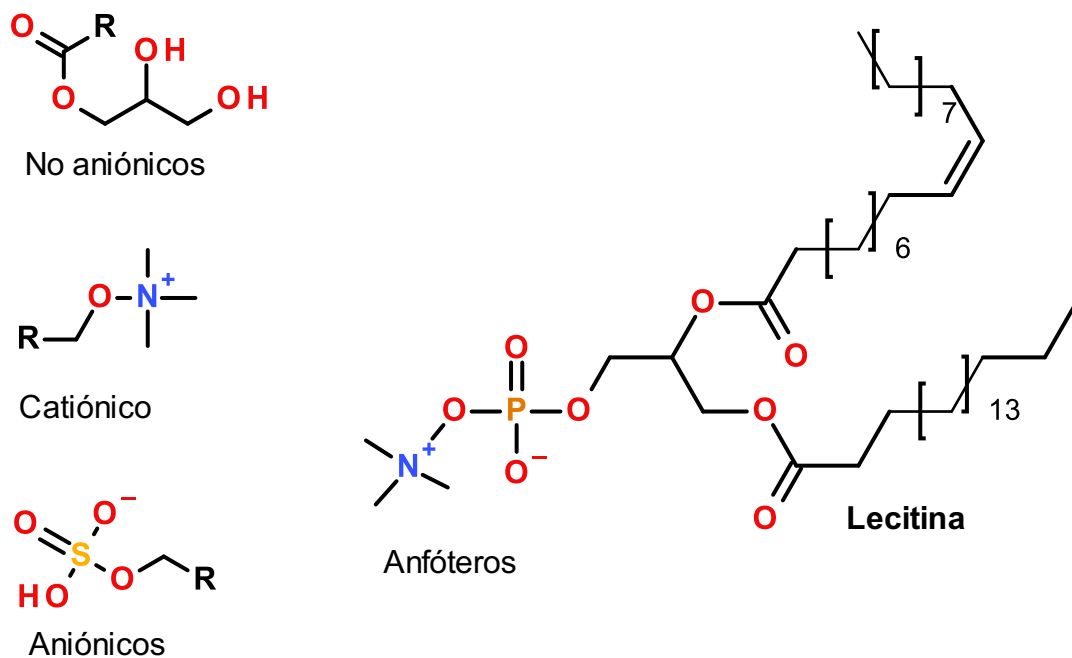


Figura 10. Tipos de surfactantes de acuerdo con su carga. Encerrado en rojo se muestra la parte hidrofílica del tensoactivo (Stauffer, 1999).

El tipo de tensoactivo a emplear como emulsificante dependerá en gran medida del número de balance hidrofílico-lipofílico (BHL). El BHL consiste en una escala que se basa en el porcentaje relativo de grupos hidrofílicos a lipofílicos (hidrofóbicos) con respecto a las moléculas de tensoactivo. Dicho valor es posible calcularlo mediante la Ecuación 2.

$$BLH = \frac{L}{T} * 20 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $L$  es la masa molar de la parte hidrofílica de la molécula y  $T$  es la masa molar total.

De igual forma es posible determinar el BHL al considerar las contribuciones de los respectivos grupos funcionales. En la Tabla 4, se muestran algunos números de BHL para los correspondientes grupos hidrofílicos y lipofílicos de los tensoactivos (Stauffer, 1999). Al considerar dichos valores, es posible calcular el valor de BHL mediante la Ecuación 3.

$$BHL = \sum(\text{valores hidrofílicos}) - \sum(\text{valores lipofílicos}) + 7 \quad \text{Ecuación 3}$$

Se ha determinado que para cada tipo de emulsión existe un valor de BHL sugerido.

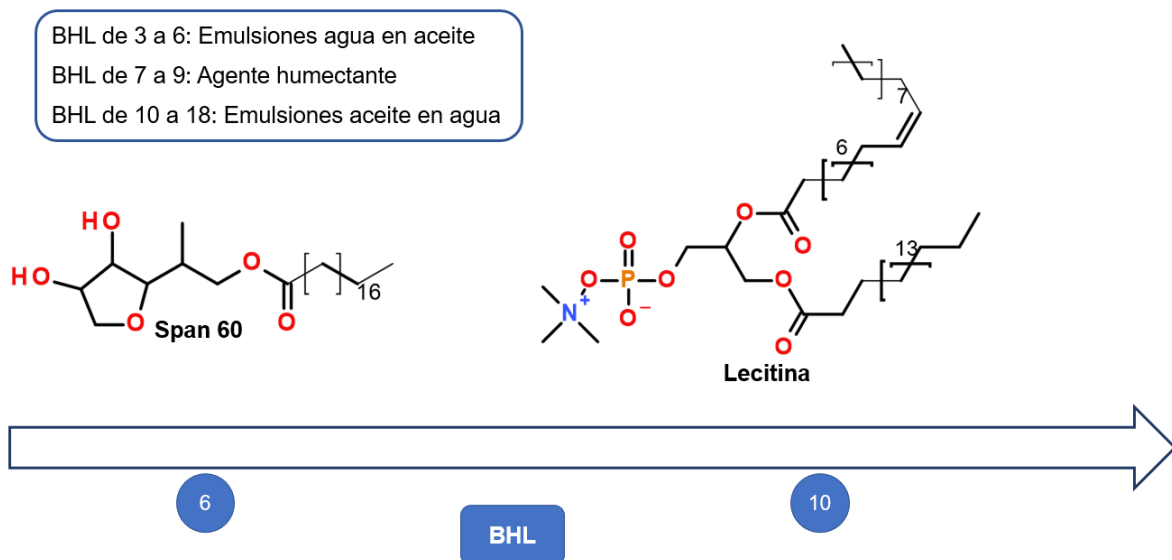


Figura 11. Valores de BHL adecuados al tipo de emulsión (Stauffer, 1999).

Uno de los tensoactivos más empleados en la industria de los alimentos es la lecitina de soya. La cual presenta principalmente fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y fosfatidilinositol. Estos tres compuestos difieren en sus valores de BHL; sin



embargo, presentan un valor de BHL en conjunto de 10 por lo cual es ideal para la formación de emulsiones *w/o* (Stauffer, 1999).

Tabla 4. Número de BHL correspondiente al grupo hidrofílico o lipofílico del tensoactivo.

Grupo	Número de BHL
<b>Hidrofílico</b>	
-OSO <sub>3</sub> Na	38.7
-COONa	19.1
-N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	9.4
-OH (anillo de sorbitan)	0.5
-OH	1.9
-(CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O)-	0.33
<b>Lipofílico</b>	
-CH-	-----
-CH <sub>2</sub> -	0.475
-CH <sub>3</sub>	-----
=CH-	-----

#### 2.4. Transglutaminasa como agente reticulante

Se han buscado alternativas que permitan favorecer el endurecimiento de las paredes de las microcápsulas con el uso de agentes de reticulación. Sin embargo, varios de estos agentes presentan cierto grado de toxicidad o mal sabor, por lo cual no resultan adecuados para su uso en productos alimentarios. Una alternativa a emplear en alimentos, es el uso de la enzima transglutaminasa, la cual permite el entrecruzamiento de moléculas de proteína. Esta enzima genera reacciones de transferencia de acilo (Figura 12a), desaminación y entrecruzamiento (Figura 12b), siendo esta última la más aplicable en la industria de los alimentos (Kuraishi et al., 2000). Al permitir la formación de enlaces isopeptídicos entre el grupo amino de las lisinas de los polipéptidos y el grupo carboxiamida de las glutaminas (Dong et al., 2008). Cabe señalar, que las moléculas de agua y/o alcohol, se comportan como aceptores de grupos acilo en la ausencia de aminas primarias (Figura 12c y d) (Akbari et al., 2021).

La transglutaminasa obtenida de *Streptomyces mobaraensis* se utiliza ampliamente como coadyuvante, con la denominación GRAS (generalmente reconocida como segura) (Amirdivani et al., 2018). El sitio activo en esta enzima se ubica en el péptido Cys<sup>64</sup> (Figura 13). En la Tabla 5, se muestran las aplicaciones principales en la industria alimenticia de la enzima antes mencionada.

Tabla 5. Aplicaciones de la transglutaminasa microbiana en la industria de los alimentos (Akbari et al., 2021).

<b>Producto</b>	<b>Aplicaciones</b>
<b>Carnes</b>	Aplicada en la reestructuración de la carne. Mejora la textura mediante la formación de enlaces isopeptídicos.
<b>Yogurt</b>	Ayuda a la formación de un gel más estable, mediante la formación de enlaces covalentes y de entrecruzamiento.
<b>Quesos</b>	Mejora los rendimientos de obtención y las propiedades sensoriales y reológicas.
<b>Pan</b>	Aumenta la velocidad de producción, la calidad del pan y confiere una mayor vida de anaquel.

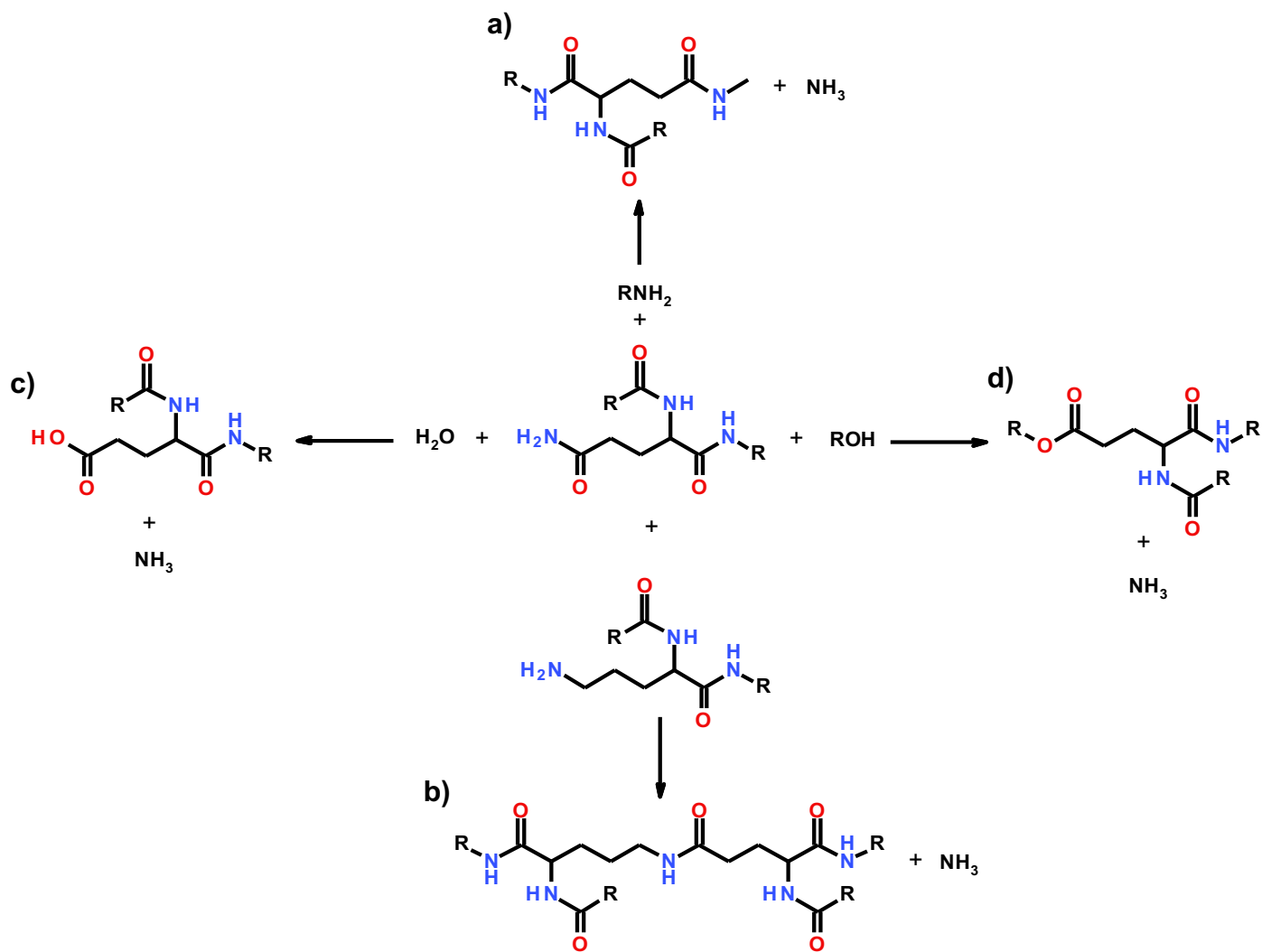


Figura 12. Principales reacciones catalizadas por la enzima transglutaminasa.

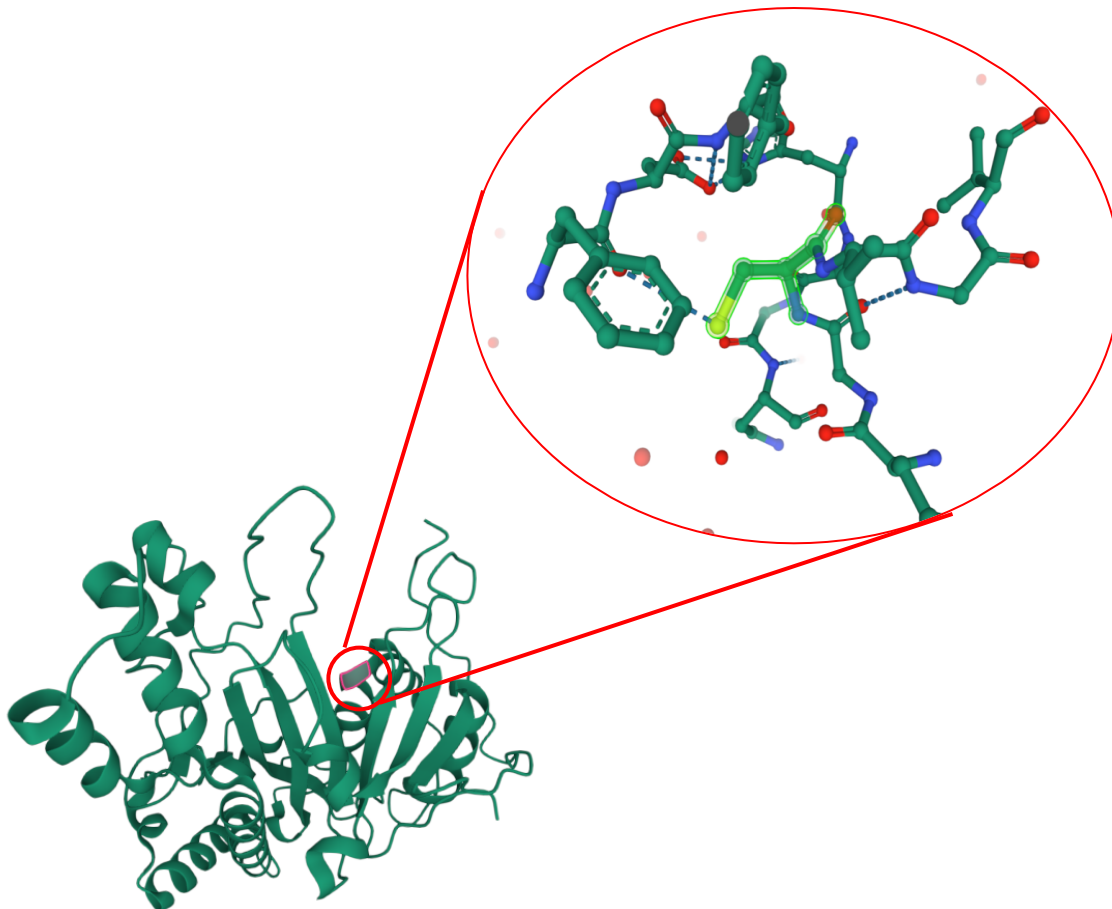


Figura 13. Sitio activo de la transglutaminasa microbiana obtenida de *Streptomyces mobaraensis*, Cys<sup>64</sup> (Yokoyama et al., 2004). Estructura obtenida y modificada con la aplicación web de RCSB<sup>2</sup>.

## 2.5. Proteína y aceite de cacahuate en la formación de las microcápsulas

El cacahuate es un cultivo que se consume preferentemente de forma directa y es empleado en la elaboración de productos de confitería como galletas. Sin embargo, desde hace algunos años existe un interés en diversificar su mercado al explotar sus propiedades funcionales en la prevención de enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer (Akhtar et al., 2014a). Estas propiedades funcionales son principalmente atribuidas a su contenido de proteína y aceite (Tabla 6), los cuales

<sup>2</sup> <https://www.rcsb.org/3d-view/1IU4/1>. Consultada por última vez el 28 de febrero de 2023.

representan aproximadamente un 66% de su masa total. En la Figura 15, se muestra el perfil lipídico del aceite de cacahuete en el que se observa una proporción de ácidos grasos insaturados mayor con respecto a los saturados (4.08:1). Entre los aminoácidos principales que se encuentran conformando las proteínas en la semilla de cacahuete están los ácidos glutámico, aspártico y la arginina (Figura 16). La presencia de este tipo de aminoácidos, le atribuye propiedades funcionales para la prevención de enfermedades cardiovasculares (Davis & Dean, 2016). En los insaturados podemos encontrar en gran proporción al ácido oleico y linoleico, 41.48 y 37.14%, respectivamente (Liu et al., 2019). De igual forma, la presencia de  $\beta$ -sitosterol, resveratrol, campesterol y estigmasterol en el aceite de cacahuete se ha observado tiene injerencia en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas, y su actividad antiinflamatoria (Figura 14). Así como por su contenido de vitamina E y niacina, en la prevención de enfermedades neuronales como Alzheimer (Akhtar et al., 2014b).

Tabla 6. Análisis fisicoquímico de cacahuete (Liu et al., 2019).

Variable	% (m/m)
Humedad	3.65 $\pm$ 0.05
Carbohidratos	13.27 $\pm$ 0.51
Proteínas	24.21 $\pm$ 0.01
Grasas	42.47 $\pm$ 0.24
Cenizas	2.38 $\pm$ 0.01

Los valores medios de tres mediciones  $\pm$  desviación estándar.

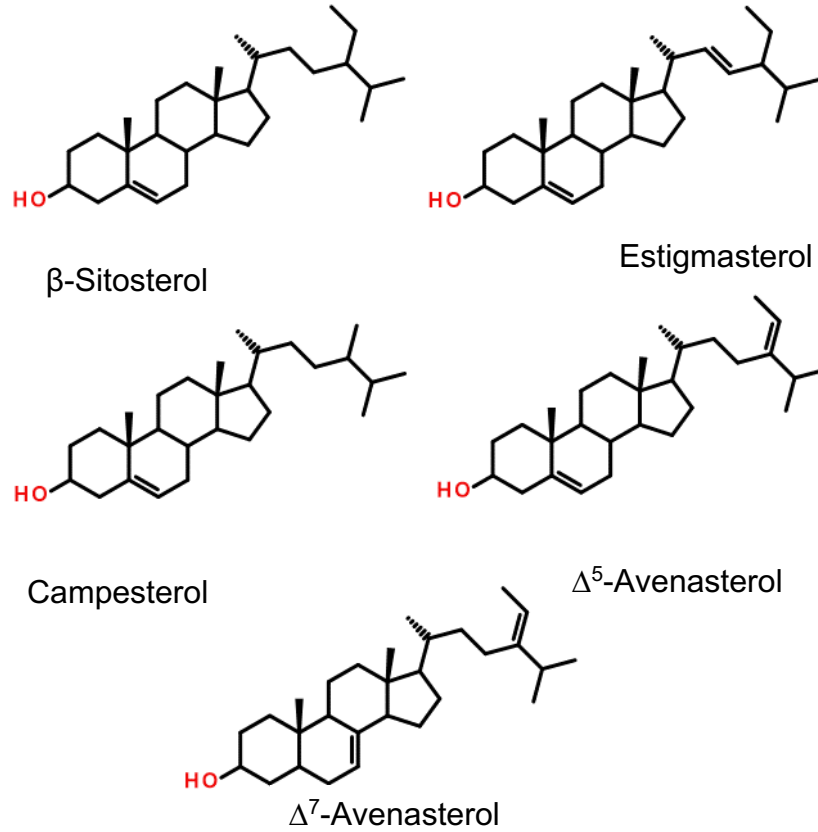


Figura 14. Fitoquímicos presentes en el aceite de cacahuete (Akhtar et al., 2014).

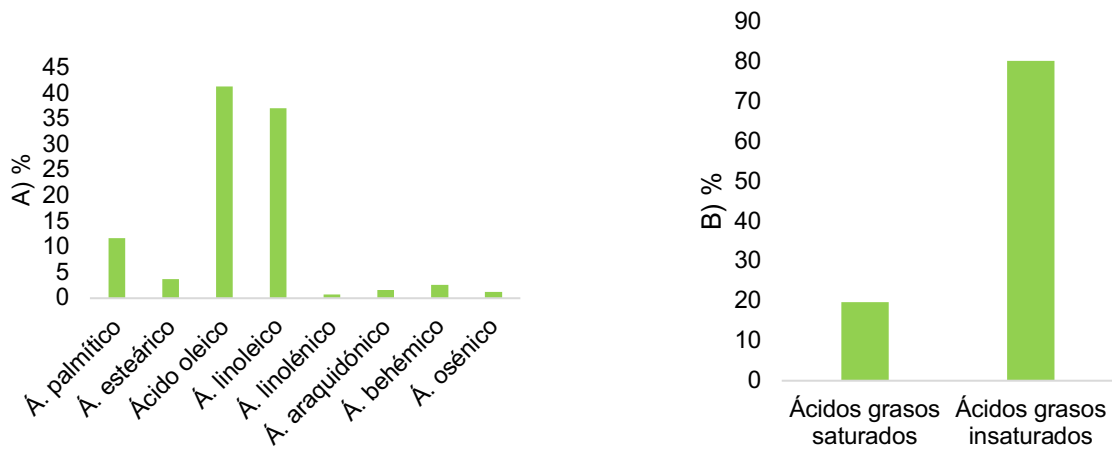


Figura 15. A) Ácidos grasos presentes en el cacahuete. B) Relación entre ácidos grasos saturados e insaturados (Liu et al., 2019).

En la industria de alimentos existen reportes de materiales de pared a base de polímeros para procesos de microencapsulación. Sin embargo, el uso de este tipo de materiales en alimentos se complica al considerar aspectos tales como su costo y las restricciones alimentarias. Además, dependerán de la naturaleza del material de pared seleccionado y las propiedades fisicoquímicas del producto de microencapsulación. Una de las alternativas como material de pared son las proteínas, las cuales son polímeros naturales constituidos de aminoácidos con una gran variedad estructural. Esta versatilidad química y estructural las vuelve candidatas idóneas para la formación de microcápsulas por coacervación. Sin embargo, es importante tener en cuenta sus características eléctricas, puesto que la unión electrostática resulta fundamental en la coacervación compleja (Wang et al., 2018).

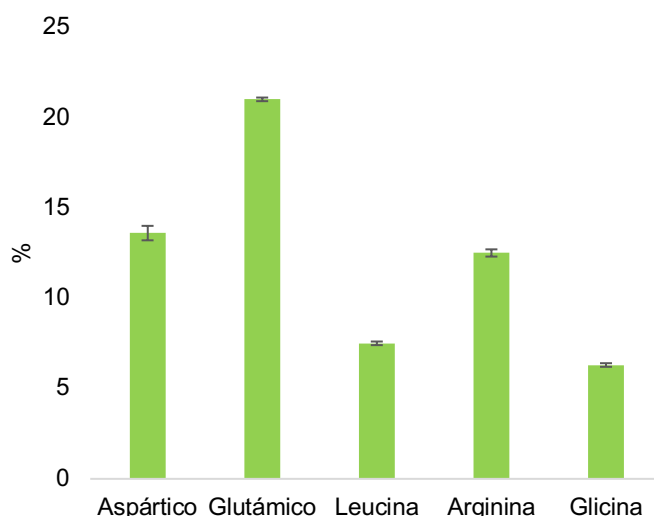


Figura 16. Principales aminoácidos presentes en las proteínas de semilla de cacahuate. Los valores de cada aminoácido representan un porcentaje del total de aminoácidos presentes (Davis & Dean, 2016).

La carga superficial de la proteína dependerá del medio, si este se encuentra en un pH por encima/debajo de su punto isoeléctrico (pI). Por encima del pI, se encontrará una proteína cargada negativamente; mientras que, por debajo, se encontrará cargada positivamente. Otras características importantes para tener en cuenta son,

la solubilidad, la actividad emulsionante, la viscosidad, la tensión superficial y su susceptibilidad a la fuerza iónica. El uso de proteínas en la coacervación compleja se debe a su excelente solubilidad, actividad emulsificante y capacidad gelificante. Esto permite que se puedan emplear junto con polímeros aniónicos como goma arábica, goma agar agar, pectina, goma gellan y hexafosfato de sodio (Wang et al., 2018). Ravichandran et al., (2014) determinaron que la goma xantana presenta una eficiencia de encapsulación de betalaínas superior al 65%, por lo cual podría ser una opción adecuada a emplear junto con la proteína.

Las harinas de cacahuate presentan un contenido de proteína de 28 y 57% en harina sin desgrasar y desgrasada, respectivamente. Este grupo de proteínas son proteínas globulares, donde su solubilidad es dependiente del pH. Estas alcanzan su solubilidad mínima en su pl (pH de 4-5), solubilizándose alrededor del 95% de la proteína a un pH por debajo de 2.5 y por arriba de 7.5 (Zayas, 2006). Estos resultados son similares a los encontrados por Rahman et al., (2018), en el cual a un pH de 2.5 y 7 se solubiliza cerca del 70% de la proteína, mientras que a pH > 10 se solubiliza cerca del 90%. Esto permite desarrollar metodologías de emulsión en las cuales los compuestos sean inestables a pH neutros, tal como las betalaínas y las antocianinas.

## **2.6. Métodos de determinación de proteínas en alimentos**

Las proteínas son importantes en la industria de los alimentos debido a sus propiedades funcionales tecnológicas emulsificantes y espumantes (Mæhre et al., 2018). Las propiedades nutricionales y tecnológicas hacen de la cuantificación de proteínas algo esencial en el análisis de alimentos. Los métodos para llevar a cabo la cuantificación son diversos y difieren entre ellos tanto en su fundamento como en el equipo que emplean. Como se muestra en la Tabla 7 entre métodos puede variar su selectividad, límite de cuantificación, tiempo de obtención de resultados o costos. Entre estos métodos podemos destacar a la cuantificación por el método de Biuret, en el cual se forma un complejo de color púrpura, producto de la formación de enlaces entre los grupos peptídicos de residuos de aminoácidos y los iones de cobre



libre en un medio alcalino (Figura 17). Dicho método se destaca por su buena precisión y por no presentar interferencias. Sin embargo, solo es aplicable a muestras a concentraciones en el intervalo de 0.2-1.7 g/L (Zheng et al., 2017).

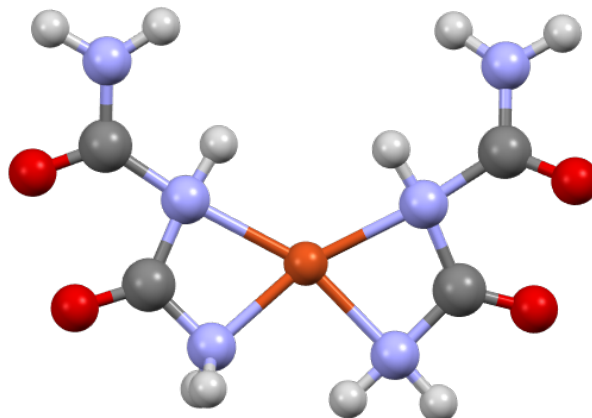


Figura 17. Complejo de iones libres de cobre con Biuret. Estructura elaborada en el software Avogadro (Zheng et al., 2017).

Tabla 7. Comparativo de métodos para la cuantificación de proteínas en alimentos (Zheng et al., 2017).

Método	Principio	Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
<b>Kjeldahl</b>	Cuantifica el N orgánico.	Su costo es bajo, al no requerir equipo especializado.	Cuantifica todo el N orgánico e inorgánico, no solo el presente en proteínas. Requiere de tiempos de análisis prolongados. Uso de sustancias corrosivas.	Prácticamente en todos los alimentos
<b>Dumas</b>	N total liberado. Mediante un cromatógrafo de gases.	No requiere sustancias corrosivas. Los tiempos son cortos.	Uso de equipos de costo elevado. Cuantifica todo el N total, no solo el presente en proteínas.	Aplicable en el control de calidad.
<b>Ácido bicinchonínico</b>	Formación de complejos entre enlaces peptídicos y $\text{Cu}^{2+}$ .	Sensibilidad de 0.5-10 $\mu\text{g}$ . Los amortiguadores no interfieren con la reacción de reducción.	Complejo colorido no estable con el tiempo. Interferencia por azúcares reductores. Pueden obtenerse distintas coloraciones dependiendo de la muestra.	Procesos de aislamiento de proteínas.
<b>Absorbancia a 280 nm</b>	Aminoácidos aromáticos generan absorbancia a 280 nm.	Sensibilidad a partir de 100 $\mu\text{g}$ de proteína. Tiempos cortos. La muestra se puede reutilizar.	Interferencia por ácidos nucleicos a 280 nm. Contenido de aminoácidos aromáticos variable entre muestras. Requiere muestras claras e incoloras.	Proteínas purificadas.
<b>Biuret</b>	Formación de un complejo entre enlaces peptídicos y $\text{Cu}^{2+}$ en condiciones alcalinas.	Pocas interferencias por compuestos no proteicos. Rápida obtención de resultados.	Se requiere un contenido relativamente alto de proteína en el medio.	Proteína soluble en medio alcalino

## **2.7. Bioaccesibilidad**

La bioaccesibilidad se define como la eficiencia de digestión y absorción de un determinado componente alimentario ingerido de forma oral. Este concepto puede ser confundido con biodisponibilidad la cual es la proporción utilizada o almacenada de la cantidad total administrada (Shahidi & Peng, 2018). Existen modelos *in vivo* e *in vitro* que permiten evaluar la bioaccesibilidad de compuestos de interés. Los modelos *in vitro* difieren entre sí por el número de etapas de digestión incorporadas, tiempos de digestión, la naturaleza de las enzimas digestivas y concentraciones de electrolitos y ácidos biliares. Este tipo de modelos de digestión *in vitro* se pueden clasificar en modelos colónicos, estáticos y dinámicos (Wojtunik-Kulesza et al., 2020).

### **2.7.1. Modelos de digestión colónicos**

Este tipo de modelos tienen por objetivo reproducir un consorcio microbiano relevante para las condiciones *in vivo*. Los cuales varían desde incubaciones fecales empleando microbiota fecal estrictamente anaeróbica hasta modelos continuos que imitan diferentes partes del colon humano o modelos gastrointestinal-colónicos dinámicos *in vitro*. Las limitaciones de este modelo implican que no pueden representar completamente la microbiota presente en el lumen colónico y la mucosa (Wojtunik-Kulesza et al., 2020).

### **2.7.2. Modelos de digestión estáticos**

Durante la digestión se pueden observar procesos dinámicos que pueden llegar a ocurrir durante la digestión humana, como fuerzas mecánicas y cambios de pH. En los modelos de digestión estáticos no hay una variación del pH ni temperatura. Este tipo de estudios se emplea principalmente para evaluar la digestión de alimentos simples o compuestos purificados, mediante la hidrólisis de muestras homogenizadas inducida por pepsina (Wojtunik-Kulesza et al., 2020).

### **2.7.3. Modelos de digestión dinámicos**

Los modelos dinámicos son capaces de simular los cambios continuos de pH, que se pueden llevar a cabo durante el proceso digestivo. Se simulan los cambios de pH al pasar de la boca al estómago y el intestino, alterando las concentraciones de secreción enzimática, y las fuerzas peristálticas en el tracto gastrointestinal. Este tipo de modelo permite evaluar múltiples condiciones experimentales, con lo cual se pueden probar un gran número de muestras. Siendo este tipo de modelo el más cercano a las condiciones de digestión *in vivo* (Wojtunik-Kulesza et al., 2020)

### **2.8. Microscopía óptica**

La microscopía óptica es una de las técnicas de análisis de forma, tamaño y distribución de partículas que puede utilizarse de forma rutinaria en el análisis físico de microencapsulados. Esto se debe a que en microscopía se pueden emplear un amplio número de marcadores y se pueden adquirir tanto imágenes como video de las muestras de interés con resoluciones altas. De la información digital obtenida, es posible realizar mediciones cuantitativas, así como videos en tiempo real de muestras biológicas. En el microscopio óptico, la imagen que observamos tanto a ojo desnudo como a través de cámara es el resultado de la combinación de la luz directa e indirecta emitida por la lámpara. La luz directa, se refiere a la porción de luz que no entra en contacto directo con la muestra o que no es absorbida por la misma. Mientras que, la luz indirecta se refiere a la luz que es absorbida por la muestra. La luz directa o indirecta pasa a través del objetivo y se distribuye uniformemente por todo el plano de la imagen en el diafragma del ocular. Esta luz difractada por la muestra se enfoca en varios lugares localizados en el mismo plano de la imagen, donde la luz difractada causa una interferencia destructiva y reduce la intensidad dando como resultado áreas oscuras. Esta combinación de luz y zonas oscuras, son lo que generan la imagen que observamos de la muestra (Davidson & Abramowitz, 2012).

## Capítulo 3. Metodología

### 3.1. Materiales y reactivos

**Material vegetal, reactivos, disolventes.** Jugo de *Stenocereus pruinosos* (frutos obtenidos en el centro de la ciudad de Huajuapán de León, Oaxaca, México en el mes de mayo del 2021), cacahuete (Semillas y Cereales de León Guanajuato); resina de intercambio iónico, goma xantana, ácido clorhídrico 36%,  $\alpha$ -amilasa tipo VI-B, mucina de estómago porcino tipo II, D-(+)-glucosa 99.5%, azida de sodio 99.7%, ácido glucorónico, clorhidrato de glucosamina, pepsina de mucosa gástrica porcina 3,200-4,500 unidades/mg de proteína, ácido gálico monohidratado 98%, rutina, agua deuterada, todos de la marca Sigma-Aldrich; hidróxido de sodio 98%, fosfato de potasio dibásico anhidro de la marca Meyer; fosfato monosódico monohidratado, cloruro de potasio 99.67%, cloruro de hierro (III) hexahidratado, sulfato de sodio anhidro, bicarbonato de sodio, cloruro de calcio anhidro, 99.7%, cloruro de amonio 99.5%; cloruro de magnesio 99.5%, todos de la marca J.T. Baker; bifosfato de sodio 58.5%, de la marca Monterrey; cloruro de sodio, de la marca Merck; urea 99%, de la marca Wako Pure Chemical Industries; pancreatina cantidad por tableta constituida de amilasa 25,000 unidades USP, proteasa 25,000 unidades USP, lipasa 2,000 unidades USP, de la marca NaturesPlus; ácido biliar, de la marca Jarrow Formulas; albúmina de huevo 99.8%, de la marca FAGA<sup>LAB</sup>; albúmina de huevo 86%, Food Technologies Trading; amortiguador de Mallvaine (ácido cítrico monohidratado, de la marca J. T. Baker; fosfato de potasio dibásico anhidro 98.2%, de la marca Meyer); hexano  $\geq 98.5\%$ , de la marca Meyer; agua tipo 1, etanol 96%, Conquimex; metanol 99.8%, acetona  $\geq 99.5\%$ , de la marca Química Rique S. A. de C. V.

**Materiales.** Filtros con membrana de nylon 0.45  $\mu\text{m}$ ; microplacas de polipropileno claras de 96 pozos de fondo plano con capacidad de 360  $\mu\text{L}$  marca Costar; viales; material de vidrio en general; celdas de cuarzo de 1 cm; desecador de polipropileno; tubos para espectrómetro de RMN.

### **3.2. Equipos**

Microscopio óptico, marca Quasar (modelo QM15); microscopio óptico, marca OMAX (modelo DC5V); agitador vortex Ika; espectrofotómetro de UV-vis, marca Cgoldenwall (modelo 721); parrilla de agitación, marca Thermolyne (modelo Cat. SP-131325); espectrofotómetro de FT-IR-ATR, marca Bruker (modelo Alpha Platinum); potenciómetro, marca OHAUS (modelo STARTER 3100); tina de ultrasonido, marca Dadi (modelo DA-968); tina de ultrasonido, marca Baku (modelo BK-2400); balanza analítica, marca Sartorius (modelo BL 210 S); balanza, marca Tefal (modelo Optiss); vernier digital; refractómetro Abbe; centrífuga, marca AOSHEN (modelo Mlnl-10k); centrífuga, marca CAPP Rondo (modelo CR-68x); centrífuga, marca VELAB PRIME; lector de microplacas, marca BioTeK Instruments (modelo ELx808); agitadores Mini Mixer, marca Norpro; extractor de jugos casero T.fal; molino de grano, marca Westinghouse; desecador de plástico con válvula de vacío; prensa Moline Oil Press; rotavapor, marca Büchi (modelo R-3); bomba de vacío, marca *vacuubrand* (modelo MZ 2C); campana de humos marca PRENDO (modelo CH-180), espectrómetro de RMN de líquidos, marca Bruker (modelo Ascend™ 400).

### **3.3. Preparación de la muestra para almacenamiento**

El fruto de pitaya (*S. pruinosus*) a utilizar fue lavado con agua potable y jabón, para posteriormente enjuagarlo con agua filtrada por ósmosis inversa, los frutos se secaron y se les retiró la cáscara. La pulpa obtenida se almacenó a temperaturas de congelación. La pulpa descongelada se trató en un procesador de alimentos para obtener el jugo, removiendo una porción importante de semilla. Finalmente, el jugo se almacenó en frascos de plástico en un ultracongelador (-75 °C) hasta su uso posterior.

### **3.4. Preparación del jugo para análisis fisicoquímicos**

Los jugos obtenidos del extractor de jugos (sección 3.3) se filtraron a través de papel filtro de cafetera en un embudo Büchner al vacío. Posteriormente, se filtró a través de papel filtro (0.45  $\mu\text{m}$ ) en un embudo Büchner al vacío. Finalmente, los jugos libres de sólidos suspendidos se almacenaron a temperatura de congelación en frascos de plástico hasta su uso posterior.

### **3.5. Acondicionamiento del jugo de pitaya para la obtención del extracto**

En un tubo de ensaye de 10 mL se colocaron 5 mL del jugo de pitaya previamente obtenido en el extractor de jugos y posteriormente se adicionó acetona destilada en una relación 2:1 (jugo:acetona). La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 min y después se centrifugó a 900 g por 15 min. A la muestra centrifugada se le retiró el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur y se transfirió a un segundo tubo de ensaye. Posteriormente, al precipitado formado en el primer tubo de ensaye se adicionaron 2.5 mL de etanol, la mezcla se agitó en vortex por 30 s y por ultrasonido durante 15 min. Esta mezcla se centrifugó a 900 g por 10 min, después se retiró el sobrenadante y se transfirió al segundo tubo de ensaye con la dilución en acetona. A la mezcla de disolución acetona-etanol se procedió a eliminar los disolventes en rotavapor al vacío. Finalmente, al extracto seco se le realizaron espectros de IR para monitorear la eliminación del disolvente y la mayor cantidad de agua posible.

### 3.6. Análisis morfológicos

A un lote de pitaya se le determinó su masa inicial empleando una balanza Tefal Optiss. A los frutos se les midieron los diámetros ecuatoriales ( $D_e$ ) y polar ( $D_p$ ) empleando un vernier. A partir de los valores obtenidos se calculó el índice de forma del fruto ( $I_f = D_e/D_p$ ). Posteriormente se retiró la cáscara del fruto para ser pesada en una balanza analítica Ohaus y se determinó el rendimiento de la pulpa del fruto. La pulpa molida se filtró, y el retenido se pesó para determinar los sólidos en la pulpa ( $\% R_e = (\text{Peso del retenido}/\text{Peso de la Pulpa}) * 100$ ) y los sólidos totales del fruto ( $R_f = [(\text{Peso cáscara} + \text{Peso del retenido})/\text{Peso fruto}] * 100$ ).

### 3.7. Análisis fisicoquímicos

Los análisis se realizaron por triplicado para cada prueba y se expresaron como el valor promedio  $\pm$  desviación estándar.

*Determinación de pH.* Al jugo previamente obtenido de acuerdo con el apartado 3.4, se le determinó el pH de acuerdo con el método de la AOAC 981.12 (2005).

*Humedad.* El contenido de humedad ( $\% H$ ) se determinó mediante el método de la AOAC 964.22 (1990). Se secaron 5.0 g de muestra a 105 °C en crisoles llevados previamente a peso constante. Posteriormente, el crisol con la muestra se transfirió a un desecador para su atemperado.

Para determinar el porcentaje de humedad se empleó la Ecuación 4.

$$\% H = \left( \frac{\text{Peso final (crisol + muestra)} - \text{Peso inicial(crisol)}}{\text{Peso inicial (muestra)}} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

*°Brix.* Se determinó con ayuda de un refractómetro Abbe de acuerdo con el método de la AOAC 931.12 (2005).

### 3.8. Determinación de color

El color de la cáscara del fruto jugo filtrado se determinó con un colorímetro HunterLab (Ultra Scan Vis), con el iluminante D65 en un ángulo de observación de



10° y un diámetro de observación de 0.9525 cm. Los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  se determinaron y se utilizaron para calcular los valores de croma  $C^*$  y el ángulo  $Hue^*$ , a partir de las ecuaciones siguientes:

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$Hue^* = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad \text{Ecuación 6}$$

### 3.9. Determinación de antocianinas monoméricas totales

*Fundamento.* Las antocianinas monoméricas, a diferencia de las poliméricas, presentan un cambio de color reversible a diferentes niveles de pH. A un pH de 1.0 predomina la forma del ion flavilio colorido y a un pH de 4.5 la forma hemiacetal incolora. La diferencia de absorbancia de estos pigmentos a una longitud de onda de 520 nm es proporcional a la concentración del pigmento. Los resultados obtenidos se expresan como mg equivalentes del glucósido de cianidina-3/100 g de masa seca (Gharanjig et al., 2020).

*Disolución de HCl de pH 1.0 en cloruro de potasio, 0.025 M.* 1.86 g de KCl se pesaron y se transfirieron a un vaso de precipitados de 1 L y después se agregó agua destilada hasta aproximadamente 980 mL. A esta disolución se le midió el pH y se ajustó a  $1.0 \pm 0.05$  con HCl concentrado (aproximadamente 6.3 mL). Posteriormente se transfirió a un matraz volumétrico de 1 L y se aforó con agua tipo 1.

*Amortiguador de pH 4.5 (acetato de sodio, 0.4 M).* 54.43 g de  $CH_3CO_2Na \cdot 3H_2O$  se pesaron en un vaso de precipitados de 1 L y se adicionó agua tipo 1 hasta alcanzar aproximadamente un volumen de 960 mL. El pH se midió y se ajustó a  $4.5 \pm 0.05$  con HCl concentrado (aproximadamente 20 mL). La disolución se transfirió a un matraz volumétrico de 1 L y se aforó con agua tipo 1.

*Preparación de muestra.* Para llevar a cabo la determinación de antocianinas monoméricas totales, se pesaron dos disoluciones a partir de volúmenes de muestra no mayores a 10 mL. Para cumplir la Ley de Lambert-Beer se determinó un factor de dilución adecuado, que implicó diluir un volumen de la muestra con la disolución de pH 1.0 o de pH 4.5 hasta que la absorbancia a 520 nm se encontró en el intervalo

lineal del espectrofotómetro (0.2-1.4 AU). Con un factor de dilución de la muestra obtenido de 50, se prepararon dos disoluciones de la muestra de prueba, una con la disolución de pH 1.0 y otra con el amortiguador de pH 4.5. Cada una se llevó a cabo por triplicado.

*Medición de absorbancias.* Las disoluciones preparadas en la sección anterior se llevaron a una medición de absorbancias a longitudes de onda de 520 y 700 nm. Como blanco de la muestra se utilizó agua tipo 1. Cabe señalar que las absorbancias se midieron dentro de un intervalo de tiempo de 20 a 50 min después de su preparación.

*Cálculos.* El contenido de antocianinas se expresó en equivalentes de cianidina 3-glucósido, empleando la Ecuación 7.

$$\text{Antocianinas (cianidina 3 - glucósido)} \frac{\text{mg}}{\text{L}} = \frac{A * PM * FD * 10^3}{\epsilon * L} \quad \text{Ecuación 7}$$

Dónde: A = (A<sub>520 nm</sub> - A<sub>700 nm</sub>)<sub>pH 1.0</sub> - (A<sub>520 nm</sub> - A<sub>700 nm</sub>)<sub>pH 4.5</sub>; PM (masa molar) = 449.2 g/mol para cianidina 3-glucósido; FD = factor de dilución establecido; L = longitud del camino del haz en cm; ε = 26 900 absortividad molar, en L\* $\text{mol}^{-1}$ \* $\text{cm}^{-1}$ , para cianidina-3-glucósido; y 10<sup>3</sup> = factor de conversión de g a mg.

### **3.10. Determinación de betalaínas totales (betacianinas y betaxantinas)**

Una disolución del amortiguador de McIlvaine se preparó ajustando a un pH de 6.5 (citrato-fosfato 99.95:0.05 v/v) con un volumen de muestra. Para cumplir la Ley de Lambert-Beer se determinó un factor de dilución adecuado. Esto implicó diluir un volumen de la muestra con el amortiguador de McIlvaine hasta que la absorbancia medida en 200-700 nm se encontró en el intervalo lineal del espectrofotómetro (0.9-1.1 AU) (Castellanos-Santiago & Yahia, 2008). La cuantificación de betacianinas y betaxantinas se llevó a cabo por espectrofotometría, midiendo su absorbancia a 538 y 483 nm, respectivamente (Rodríguez-Sánchez et al., 2017).

*Cálculos.* Las concentraciones de betaxantinas y betacianinas se calcularon empleando la Ecuación 8 y las betalaínas totales a partir de la Ecuación 9.

$$B = \frac{A * PM * FD * V}{\epsilon * L * P} * 1000 \quad \text{Ecuación 8}$$

$$B_t = B_c + B_x \quad \text{Ecuación 9}$$

Dónde: B = Betacianinas (Bc) o betaxantinas (Bx) expresadas como µg de betanina o indicaxantina por g de materia seca, respectivamente; A = Absorbancia a 538 nm para betacianinas y a 483 nm para betaxantinas; FD = factor de dilución establecido; PM (masa molar) = betaninas 550 g·mol<sup>-1</sup> y indicaxantina 308 g·mol<sup>-1</sup>; V = volumen del extracto (mL); ε = absortividad molar (betaninas = 60000 L·(mol·cm)<sup>-1</sup> y indicaxantina = 48000 L·(mol·cm)<sup>-1</sup>; P = masa de la muestra (g); L = Camino de la celda (1 cm); B<sub>t</sub> = suma de betacianinas más betaxantinas. Los resultados serán expresados como µg/g de materia seca.

### **3.11. Limpieza del jugo de pitaya por columna de intercambio ionico al eliminar azúcares**

La limpieza de los azúcares del jugo de pitaya se realizó de acuerdo con la metodología modificada de Marconi et al., (2007). La muestra se llevó a un pH de 7 con NaOH 0.1 M.

*Acondicionamiento de la columna.* 2.5 g de resina de intercambio iónico (fase estacionaria) se adicionaron a una jeringa de 10 mL, colocando previamente una base de algodón en la salida de la jeringa. Posteriormente, se adicionaron 20 mL de NaOH 0.01 M para activar la fase estacionaria, verificando que el efluente alcance un pH de 10. Finalmente se agregó agua tipo 1 hasta alcanzar un pH neutro en el efluente.

*Preparación de la muestra.* 20 mL del jugo de pitaya previamente obtenido de acuerdo con el apartado 3.4 se llevaron a un pH de 7 con NaOH 0.1 M. Posteriormente, esta disolución se adicionó a una columna de intercambio iónico en porciones de 2 mL de disolución de muestra + 10 mL de agua tipo 1, hasta alcanzar los 20 mL de muestra adicionada. La adición del agua tipo 1 permitió eluir todos los componentes no iónicos de la muestra, evitando así la saturación de la columna y la retención temporal de todos los componentes ácidos, incluyendo los pigmentos.

Posteriormente, se adicionó agua tipo 1 en porciones de 50 mL, interrumpiendo la elución para tomar una muestra de dos gotas de eluato para verificar la presencia de azúcares reductores. Para esto, se emplearon 0.5 mL del reactivo de Benedict que se mezclaron con las dos gotas del eluato. La generación de un precipitado rojo indicó la presencia de azúcares reductores. La adición de agua a la columna se suspendió hasta que no se observó la presencia del precipitado rojo en la reacción del eluato con el reactivo de Benedict. A partir de esta etapa se procedió a adicionar una disolución de HCl 0.1 M en volúmenes de 4 mL hasta completar un volumen total de 36 mL, que correspondió a nueve fracciones. Estas fracciones se resguardaron en frascos de plástico cubiertos de aluminio a temperatura de congelación hasta su posterior uso.

Las fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina de celulosa de tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  en disolución ácida, observando en UV-Visible a una longitud de onda de 325 nm.

### **3.12. Obtención de la proteína y aceite de cacahuete**

*Desgrasado parcial del cacahuete.* El cacahuete se sometió a un prensado mecánico, para lo cual se empleó una prensa marca Westinghouse previamente acondicionada. Este acondicionamiento consistió en precalentar el cilindro de la prensa con un mechero de etanol durante 10 min a una temperatura de alrededor de 80°C. Posteriormente, la muestra se colocó en la tolva para iniciar con el prensado, procurando mantener la velocidad de giro del manillar en 40 giros por minuto. De la prensa se obtuvieron dos fracciones de interés, una manteca compuesta mayoritariamente por aceite con trazas de sólidos y agua. La segunda fracción constituida de un sólido de cacahuete parcialmente desgrasado (HCPD). Ambas fracciones fueron recolectadas en recipientes previamente pesados para determinar después la eficiencia del proceso.

*Desgrasado de la harina de cacahuete.* El cacahuete prensado parcialmente desgrasado se molió en un molino de grano para posteriormente ser tamizado para la obtención de una harina. La harina se sometió a un lavado con hexano en una

relación 1:9 (m/v) en un baño de ultrasonido a 30 W durante 30 min. Finalmente, el hexano fue retirado por filtración y evaporación obteniendo una harina desgrasada seca de cacahuete (HDC) que se almacenó a 4 °C.

*Obtención del aislado de proteína.* Una mezcla de harina con agua tipo 1 en una relación 1:9 se preparó y el pH de esta mezcla se ajustó a 9 con NaOH 1 N. La mezcla se mantuvo en agitación por 20 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la mezcla se centrifugó a 900 g durante 30 min, retirando el sobrenadante por decantación. El precipitado consistió en la fracción de fibra de la harina. Al sobrenadante se le ajustó el pH a 4.5 con HCl 1 N, para inducir la precipitación de la proteína. Esta mezcla, posteriormente se centrifugó a 900 g durante 10 min para separar la proteína por remoción del sobrenadante (Tang et al., 2006). Los sólidos ricos en proteínas fueron lavados dos veces con etanol en un embudo Büchner con un papel filtro previamente pesado y los polvos retenidos se dejaron reposar hasta lograr eliminar todo el disolvente. Posteriormente, se procedió a calcular el rendimiento de extracción. Los polvos de aislados de proteína (APC) se almacenaron en frascos para su posterior uso en la preparación de disoluciones de pH 2.

*Obtención de aceite de cacahuete.* La manteca obtenida del prensado se centrifugó a 900 g durante 5 min para remover los sólidos presentes. El aceite obtenido fue almacenado en viales a 4 °C.

### **3.13. Determinación de proteína soluble de cacahuete**

La determinación de proteína soluble se realizó por el método modificado de Zheng et al., (2017).

*Curva de calibración.* 0.250 g de albúmina al 99.8% y lauril sulfato de sodio al 0.1% se mezclaron con 8 mL de NaOH 6 M en un matraz Erlenmeyer de 10 mL, agitando con una barra magnética durante 12 h. En las primeras 3 h, la mezcla se agitó cada 30 min en vortex y 2 min en un baño de ultrasonido. Transcurridas las 12 h de agitación, se aforó a 10 mL la disolución con NaOH 6 M, para obtener una concentración de 25 mg/mL. A partir de esta disolución se prepararon cinco estándares a concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 mg/mL para construir la curva

de calibración. En una microplaca de 96 pozos con capacidad de 360  $\mu\text{L}$  en cada pozo, se colocaron 30  $\mu\text{L}$  de cada uno de los estándares por triplicado. Posteriormente, se le agregaron 120  $\mu\text{L}$  del reactivo de Biuret en cada uno de los pozos. Para el blanco se añadieron 30  $\mu\text{L}$  del estándar de 25 mg/mL + 120  $\mu\text{L}$  de tartrato de sodio alcalino 6 N. Por último, la microplaca se colocó en el lector de microplacas, dejando reposar por 1 min para después llevar a una agitación rápida por 5 min. La lectura de absorbancia se determinó a una longitud de onda de 595 nm. Con las absorbancias obtenidas de los estándares se obtuvo la ecuación de calibración lineal que representa el cambio de coloración en función de la concentración de proteína.

*Lectura de absorbancia de las muestras.* La concentración de proteína se determinó tanto en la HCPD, HCD y APC. Para esto se pesaron 150 mg de cada muestra y se mezclaron con 8 mL de NaOH 6 M, en un matraz Erlenmeyer de 10 mL, agitando con una barra magnética durante 12 h. Posteriormente, se aplicó el mismo procedimiento descrito para los estándares.

*Obtención de la concentración de la proteína de cacahuete.* A partir de la ecuación de calibración construida a partir de los estándares de albumina y la absorbancia de la muestra se calculó la concentración de proteína expresada en mg equivalentes de albúmina/mL.

Finalmente, se obtuvo la concentración de la proteína mediante la Ecuación 10.

$$\text{Concentración de proteína} = \frac{\text{mg de proteína/mL}}{\text{mg de muestra/mL}} * 100. \quad \text{Ecuación 10}$$

### **3.14. Formación de microcápsulas por coacervación compleja**

*Preparación del amortiguador de citrato-fosfatos de pH 2.* Un volumen de 1.95 mL de una disolución de fosfato de potasio dibásico 0.2 M se llevó a un matraz volumétrico 100 mL y este se aforó con una disolución de ácido cítrico 0.1 M.

*Disolución de extracto de pitaya.* 1.25 g de extracto de pitaya se disolvieron en 50 mL de amortiguador a pH 2 (25 mg/mL).

*Disolución de aceite de cacahuate con lecitina de soya al 2.5%.* 5 g de lecitina de soya se mezclaron con 200 mL de aceite de cacahuate obtenido de acuerdo con el apartado 3.12, agitando con barra magnética durante 30 min.

*Disolución de proteína de cacahuate al 1% y 2%.* 0.4 g de carboximetil celulosa y la cantidad correspondiente de aislado de proteína de cacahuate (Tabla 8) obtenido de acuerdo con el apartado 3.12, se agitaron con 380 mL de amortiguador a pH 2 con barra magnética durante 24 h. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 1600 g durante 20 min. Posteriormente el sobrenadante se decantó y se llevó a un volumen de 400 mL con la disolución amortiguadora de pH 2.

Tabla 8. Disoluciones empleadas en el proceso de microencapsulación.

Tratamiento	% de proteína	g de proteína
E1	Proteína de cacahuate 1%	4
E2	Proteína de cacahuate 2%	8

*Disolución de goma xantana al 0.05%.* 0.2 g de goma xantana se disolvieron en 400 mL de agua tipo 1, agitando con barra magnética durante 30 min.

*Preparación de la emulsión w/o.* 50 mL de la disolución de extracto de pitaya (25 mg/mL) se mezclaron con 200 mL de aceite de cacahuate con lecitina de soya. La mezcla se agitó a 13500 rpm durante 2 min. Para verificar la presencia de la emulsión se observó por microscopía óptica con un aumento de 100X.

*Preparación de la segunda emulsión w/o/w.* 50 mL de la emulsión w/o se mezclaron con 250 mL de la disolución de proteína (al 1% o 2%) ajustando el pH a 2 con HCl 0.1 M. La mezcla se agitó a 19000 rpm durante 1 min y después se ajustó el pH a 4.4 con NaOH 0.2 M. Posteriormente, se adicionaron 250 mL de una disolución de goma xantana al 0.05% en agitación con barra magnética durante 30 min (Shiroodi & Lo, 2015). El pH se monitoreó y se mantuvo constante a 4.4. La formación de la

segunda emulsión, *w/o/w*, se observó por microscopía óptica con un aumento de 400X.

*Reticulación con la enzima transglutaminasa.* 6 g de transglutaminasa se adicionaron a la emulsión *w/o/w*, agitando con barra magnética durante 12 h a pH 4.4 (Ho et al., 2000). Una vez transcurrido este tiempo, se dejó en reposo a temperatura ambiente por 1 h.

*Coacervación.* El sobrenadante se colocó en baño de hielo, disminuyendo la temperatura lentamente hasta alcanzar los 10 °C después de transcurridas 2 h del proceso. Finalmente, se le adicionó azida de sodio para tener una concentración 0.01% para ser almacenado a 4 °C hasta su posterior uso.

### **3.15. Determinación de la eficiencia del proceso de microencapsulación**

La eficiencia del proceso de encapsulación se determinó a partir del contenido total de betalaínas (CTB) y antocianinas (CTA), así como el contenido superficial de estos compuestos (CSB y CSA) en las microcápsulas (Apéndice F). Para determinar CTB y CTA se usaron 200 mg de las microcápsulas obtenidas y se mezclaron con 2 mL de metanol:ácido acético:agua (50:8:42 v/v/v) a un pH de 3.5. Posteriormente esta mezcla se sometió a un baño de ultrasonido durante 20 min para promover la ruptura de las microcápsulas. Para determinar CSB y CSA, se utilizaron 200 mg de las microcápsulas, estas se lavaron con 2 mL de etanol:metanol (1:1 v/v) en un vortex durante 1 min. Ambas suspensiones se centrifugaron a 900 g en una centrifuga (AOSHEN MInl-10k) durante 20 min a 4 °C (Gharanjig et al., 2020).

### **3.16. Procesamiento y análisis de las micrografías para la determinación del tamaño de los microencapsulados de forma automatizada mediante el software ImageJ 1.53K.**

Se tomaron 10 µL de la crema de los microencapsulados y se disolvieron en 30 µL de agua tipo 1 sobre un portaobjetos. Se tomaron 10 µL de la disolución anterior y se esparcieron en el portaobjetos con ayuda del cubreobjetos.

Las micrografías se obtuvieron con un microscopio óptico de la marca OMAX empleando un aumento de 400X, adquiriendo las micrografías con el software



ToupView y guardándolas en formato tiff de 16 bits para facilitar el procesamiento de la imagen. Posteriormente, las imágenes se procesaron y analizaron con el software ImageJ 1.53K<sup>3</sup>.

El procesamiento consistió en disminuir la cantidad de información de color de la micrografía al convertirlas a una escala de grises de 8 bits por píxel. Posteriormente, estas imágenes se transformaron a un formato binario de 1 bit por píxel (imagen en blanco y negro). Esto se llevó a cabo con la finalidad de hacer más precisa la detección de la periferia de las partículas en 2D. Después, se llevó a cabo una remoción de píxeles atípicos mediante la función Remove outliers. Finalmente, se realizó el análisis del tamaño de los microencapsulados mediante la herramienta Análisis de partículas empleando un valor de circularidad igual a la unidad.

Los datos de tamaño obtenidos de las micrografías fueron sometidos a dos criterios de discriminación. Primeramente, el límite superior de tamaño de los microencapsulados se definió a partir de una exclusión de los valores de diámetro superiores a 60  $\mu\text{m}$ . Esto tuvo como finalidad evitar contabilizar a aglomerados de microencapsulados o proteína. El segundo criterio se estableció basado en la resolución máxima de la cámara OMAX A3503S de 640 x 480 píxeles. La cual se calculó de manera experimental, este cálculo se basó en la relación de píxeles/unidad de medida durante la calibración de la escala para llevar a cabo las mediciones experimentales de tamaño de partícula. Siendo que 1.8 píxeles equivalen a un  $\mu\text{m}$ , se estableció el límite en 0.5  $\mu\text{m}$ . El análisis estadístico de los datos obtenidos en esta sección se llevó a cabo de acuerdo con la sección 3.20.

### **3.17. Evaluación de la bioaccesibilidad *in vitro***

Para la prueba de bioaccesibilidad las microcápsulas se sometieron a cuatro disoluciones digestivas que representaron el fluido salival, gástrico, duodenal y biliar. Las concentraciones y constituyentes de estas disoluciones digestivas se muestran en la Tabla 9 (Versantvoort et al., 2005). 1 g de las microcápsulas se

---

<sup>3</sup> <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>. Consultada por última vez el 28 de febrero de 2023.

suspendieron en 10 mL de agua tipo 1. A esta mezcla posteriormente se le adicionaron 6 mL del líquido salival simulado (FSS) a pH 6.8, se incubó a 37 °C durante 5 min en agitación constante. A continuación, se agregaron 12 mL de líquido gástrico simulado (LGS) a pH 1.3, incubando a 37 °C durante 2 h con agitación constante. Finalmente, se agregaron 12 mL de líquido duodenal simulado (LDS) a pH 8.1 + 6 mL de líquido biliar simulado (LBS) a pH 8.2 + 2 mL de disolución de NaHCO<sub>3</sub> 1 M, incubando a 37 °C durante 2 h. Una vez terminado el proceso de digestión simulado se recuperó una alícuota. La alícuota obtenida se sonicó a temperatura ambiente durante 30 min, para posteriormente centrifugar a 900 g durante 20 min.

Tabla 9. Constituyentes y concentraciones de los fluidos sintéticos en la simulación de la digestión de las microcápsulas; FSS= Fluido salival simulado, FGS = Fluido gástrico simulado, LDS = Líquido duodenal simulado, LBS = Líquido biliar simulado (Versantvoort et al., 2005).

	FSS	LGS	LDS	LBS
<b>Disolución inorgánica</b>	10 mL de KCl (89.6 g/L)	15.7 mL de NaCl (175.3 g/L)	40 mL de NaCl (175.3 g/L)	30 mL de NaCl (175.3 g/L)
	10 ml de KSCN (20 g/L)	3.0 mL de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (88.8 g/L)	40 mL de NaHCO <sub>3</sub> (84.7 g/L)	68.3 mL de NaHCO <sub>3</sub> (84.7 g/L)
	10 mL de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (88.8 g/L)	9.2 mL de KCl (89.6 g/L)	10 mL de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (8 g/L)	4.2 mL de KCl (89.6 g/L)
	10 mL de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (57 g/L)	18 mL de CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O (22.2 g/L)	6.3 mL de KCl (89.6 g/L)	150 µL de HCl (37 % p/p)
	1.7 mL de NaCl (175.3 g/L)	10 mL de NH <sub>4</sub> Cl (30.6 g/L)	10 mL de MgCl <sub>2</sub> (5 g/L)	
	20 mL de NaHCO <sub>3</sub> (84.7 g/L)	6.5 mL de HCl (37 % p/p)	180 µL de HCl (37 % p/p)	
<b>Disolución orgánica</b>	8 mL de urea (25 g/L)	3.4 mL de urea (25 g/L)	4 mL de urea (25 g/L)	10 mL de urea (25 g/L)
		10 mL de glucosa (65 g/L)		
		10 mL de ácido glucorónico (2 g/L)		
		10 mL de clorhidrato de glucosamina (33 g/L)		
<b>Añadir a la mezcla de las disoluciones orgánica + inorgánica</b>	290 mg de α-amilasa	1 g ASB	1 g ASB	1.8 g ASB
	15 mg de ácido úrico	2.5 g de pepsina	9 mL de CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O (22.2 g/L)	10 mL de CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O (22.2 g/L)
	25 mg de mucina	3 g de mucina	9 g de pancreatina	30 g de bilis
<b>pH</b>	6.8 (±0.02)	1.30 (±0.02)	8.1 (±0.02)	8.2 (±0.02)

### **3.18. Obtención de espectros de IR**

Los espectros de los extractos obtenidos en la sección 3.5 fueron adquiridos mediante el uso de un equipo FT-MIR-ATR, con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ , empleando 24 scans, en un intervalo de  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ . El procesamiento de los datos se llevó a cabo con el software OPUS 7.2.139.1294. Los espectros obtenidos se manipularon mediante el software SpectraGryph 1.2<sup>4</sup>.

### **3.19. Obtención de espectros de RMN de $^1\text{H}$**

Los espectros se obtuvieron en un equipo de Resonancia Magnética Nuclear de 400 MHz de la marca Bruker. Las fracciones obtenidas en el apartado 3.12 se prepararon en  $\text{D}_2\text{O}$  y posteriormente se adquirieron los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  a partir de 96 scans utilizando la secuencia de pulsos zg30.

### **3.20. Análisis estadístico de los resultados de tamaño de los microencapsulados.**

El análisis estadístico de los datos de diámetro y distribución de los microencapsulados obtenidos de acuerdo con la sección 3.16 se llevó a cabo mediante el software RStudio. Primeramente, se realizó una eliminación de datos atípicos mediante la función `identify_outliers` contenida en el paquete `rstatix` (Kassambara, A. 2023). A partir de estos datos, se procedió a realizar la estadística descriptiva para determinar el diámetro promedio de los microencapsulados mediante la función `Sum`. Posteriormente se realizó una prueba de normalidad mediante la función `shapiro_test`. La homocedasticidad de los datos mediante la función `leveneTest` contenida en el paquete `car` (John Fox & Sanford Weisberg, 2019). Finalmente, se realizó un ANOVA robusto mediante la función `ANOVA_modificador_M` contenida en el paquete `WRS2` (Mair, P., & Wilcox, R. R. 2020).

---

<sup>4</sup> <https://www.effemm2.de/spectragryph/down.html>. Consultada por última vez el 10 de marzo de 2023.

## Capítulo 4. Resultados y discusión

### 4.1. Análisis morfológico del fruto de pitaya

Al momento de adquirir un fruto el consumidor basa su criterio de selección en función de las características morfológicas del mismo. Aspectos como el color, tamaño, forma y peso, resultan ser el primer criterio de calidad de cualquier fruto. En condiciones de almacenamiento la cuantificación de °Brix y pH permiten determinar la presencia de reacciones de fermentación.

El primer criterio de selección del fruto, objeto de estudio de este trabajo, fue el color de la cáscara, debido a que en la temporada de mayo es común encontrar la coloración roja y naranja del fruto de pitaya. En la Figura 18a, se observan las distintas coloraciones que lograron encontrar a la venta en el mes de mayo para el fruto de pitaya en la región de la Mixteca de Oaxaca. Siendo de interés para el estudio la que se muestra en la Figura 18b. Posteriormente, se determinaron los parámetros de color CIE  $L^*a^*b^*$  y a partir de estos  $Hue^*$  y  $C^*$  de estos frutos de pitaya mediante un colorímetro manual, los cuales se muestran en la Tabla 10. Cabe señalar que estos resultados no difieren de manera importante con lo reportado por García-Cruz et al., (2013), siendo indicativos de una coloración rojiza.



Figura 18. a) Distintas coloraciones del fruto de pitaya en el mes de mayo; b) Coloración deseada en el fruto de pitaya.

Los resultados de la evaluación de las características morfológicas para un lote de 26 frutos de pitaya se muestran en la Tabla 10. Específicamente, el índice de forma

es un parámetro que permite determinar la geometría del fruto. El lote de pitaya evaluado presentó una forma ovalada,  $0.75 \pm 0.075$ . Dicho resultado difiere a lo reportado por García-Cruz et al., (2013), quienes reportaron un valor de  $0.87 \pm 0.06$ . También, en la Tabla 10 se puede observar que la masa del fruto varía de forma importante al tener una desviación estándar de  $S = 46.88$  g. Sin embargo, dicha diferencia resulta menor a la reportada por García-Cruz et al., (2013),  $S = 72.6$  g. Esto muestra que el tamaño de los frutos de pitaya tiene una variabilidad alta.

Tabla 10. Resultados del análisis morfológico realizado a la pitaya.

<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>
<b>Diámetro ecuatorial (mm)</b>	$61.35 \pm 5.80$
<b>Diámetro polar (mm)</b>	$82.23 \pm 10.16$
<b>Índice de forma</b>	$0.75 \pm 0.08$
<b>Masa (g)</b>	$164.65 \pm 46.88$
<b>Luminosidad (L)</b>	$40 \pm 9.23$
<b>Ángulo Hue (Hue*)</b>	$12.3 \pm 22.33$
<b>Croma (C*)</b>	$26 \pm 30.08$

Los valores medios de tres mediciones  $\pm$  desviación estándar; índice de forma = Diámetro ecuatorial / Diámetro polar.

#### 4.2. Análisis fisicoquímicos realizados al fruto de pitaya

Durante el procesado de la pulpa de pitaya se observó que el jugo resultante es espeso, lo cual dificulta el filtrado simple del mismo. Por tal motivo se procedió a realizar un filtrado a vacío.

El contenido de humedad es importante debido a que influye en distintas reacciones químicas, microbiológicas y enzimáticas. Por lo cual, es un aspecto para considerar la estabilidad del jugo durante su almacenamiento.

El fruto de pitaya, como la mayoría de los frutos, está constituido principalmente por agua. El resultado obtenido del contenido de humedad fue de  $87.45 \pm 1.00\%$ , resultado similar al obtenido por García-Cruz et al., (2013) el cual fue de  $87.1 \pm 1.4\%$ .

La determinación de sólidos solubles (expresados en °Brix) permitió tener una aproximación del contenido de azúcares totales presentes en el fruto. En el caso del fruto de pitaya, se ha determinado que la eliminación de azúcares permite mejorar la estabilidad de los pigmentos (Badui Dergal, 2006). Para el fruto evaluado se obtuvo un valor de  $10.66 \pm 1.10$  °Brix, valor similar al obtenido por García-Cruz et al., (2013) ( $9.3 \pm 1.1$  °Brix). Lo que sugiere que es una fruta rica en azúcares.

Para los frutos en general, el valor de pH puede ser un indicativo del estado de maduración de este. Este parámetro incrementa con el aumento en la concentración de azúcares en el fruto. Esto se debe a la relación inversa que tiene el pH respecto a la concentración de los ácidos presentes en los frutos. El contenido de ácidos disminuye al madurar el fruto. El valor del pH para el fruto evaluado fue de  $5.57 \pm 0.13$  (Tabla 11).

Tabla 11. Caracterización fisicoquímica del fruto de pitaya.

Parámetro	Resultado
Humedad (%)	$87.45 \pm 1.00$
°Brix	$10.66 \pm 1.10$
pH	$5.57 \pm 0.13$

Los valores medios de tres mediciones  $\pm$  desviación estándar.

En conjunto, los parámetros antes mencionados sirven de indicadores del estado de maduración del fruto, con lo cual se asumió que en el estudio se emplearon frutos en un estado de madurez similar a los frutos de *S. pruinosa* estudiados previamente por García-Cruz et al. (2013).

#### 4.3. Cuantificación de betalainas totales y antocianinas monoméricas, en el jugo de pitaya

La determinación de humedad en el jugo,  $89.89 \pm 0.04\%$ , permitió expresar la concentración de pigmentos en el jugo de pitaya en mg/g de materia seca. La concentración de betacianinas y betaxantinas no difiere de manera importante con lo reportado por García-Cruz et al., (2013). Siendo las concentraciones de betacianinas y betaxantinas similares para una coloración roja en el fruto de pitaya. En la Tabla 12 se puede observar que la concentración de antocianinas determinada

es aproximadamente 12 veces menor a la de Bt. Por lo cual resulta importante el desarrollar métodos que permitan estabilizar a este tipo de compuesto durante su extracción.

Tabla 12. Concentración de pigmentos en el fruto de pitaya.

<b>Pigmento</b>	<b>mg/g de materia seca</b>	<b>mg/g de materia seca (García-Cruz et al., 2013)</b>
<b>Betacianinas</b>	2.60 ± 0.01	2.86 ± 0.038
<b>Betaxantinas</b>	2.42 ± 0.01	3.21 ± 0.056
<b>Betalaínas totales</b>	5.02 ± 0.01	6.07 ± 0.094
<b>Antocianinas monoméricas totales</b>	0.40 ± 0.005	-----

Los valores medios de tres mediciones ± desviación estándar.

#### **4.4. Análisis del método de limpieza del jugo de pitaya para la obtención de espectros de RMN, mediante la remoción de azúcares y pectinas**

En el jugo de pitaya, el contenido de pectina y azúcares puede interferir en la obtención de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , dificultando la obtención de información de los pigmentos presentes en el mismo. Por lo cual, se implementaron técnicas de limpieza de extractos que permitieron remover los azúcares y otros compuestos orgánicos no iónicos sin degradar los compuestos de interés. Las columnas de resina de intercambio iónico de aminas cuaternarias permiten la retención de ácidos. Los compuestos no iónicos son eluidos de la muestra al hacer pasar una fase continua a un pH neutro. Posteriormente, los compuestos de interés son separados de la columna mediante una fase continua de una disolución ácida. Este tipo de columnas se recomiendan para la purificación de compuestos tales como las betalaínas (Marconi et al., 2007). Por lo que solamente se procedió a preparar cartuchos de resina de intercambio iónico para separar los compuestos no iónicos, incluyendo los azúcares simples, de las betalaínas y posteriormente identificar la estructura base de estos compuestos.



El monitoreo de la eliminación de los azúcares se realizó cualitativamente con el reactivo de Benedict como se muestra en la Figura 19a. De las observaciones realizadas en cromatografía de capa fina de celulosa de todas las fracciones obtenidas inicialmente, se seleccionaron cuatro de estas fracciones para realizar un análisis por espectroscopía de RMN de  $^1\text{H}$ , Figura 19b.

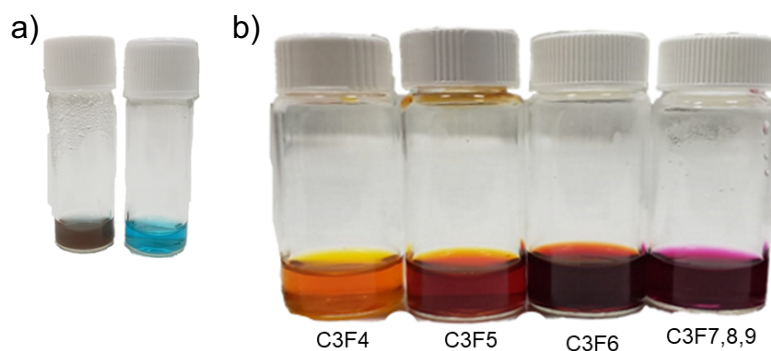


Figura 19. a) Determinación cualitativa de la presencia de azúcares en los eluatos; b) Fracciones de interés llevadas a RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . En la muestra C3F7,8,9 se juntaron 3 fracciones de interés.

El análisis por RMN de  $^1\text{H}$  de las fracciones seleccionadas confirmó la remoción de azúcares y en general de todos aquellos compuestos no iónicos. Así como, la presencia de ácidos orgánicos de cadena corta y uno de ellos insaturado. Para apoyar la asignación de la estructura de estos ácidos, se llevó a cabo una revisión de los ácidos orgánicos presentes en los frutos de pitaya. Los estudios relacionados con estos compuestos han reportado la presencia de los ácidos cítrico, málico, fumárico y láctico (Hernández-Valencia et al., 2019). También fue de gran utilidad el empleo de la base de datos SDBS<sup>5</sup> para la asignación de las señales de  $^1\text{H}$  para cada compuesto en la fracción C3F4, Figura 20, en la región de  $\delta = 0-4.5$  ppm. En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la fracción C3F6, también fue posible observar señales

<sup>5</sup> [https://sdbns.db.aist.go.jp/sdbns/cgi-bin/cre\\_index.cgi](https://sdbns.db.aist.go.jp/sdbns/cgi-bin/cre_index.cgi). Consultada por última vez el 28 de febrero de 2023.

características para betalainas en la región de  $\delta$  6-9 ppm, tal como se muestra en el trazo superior del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la Figura 21. De igual forma, se puede inferir la presencia de antocianinas, al observarse una señal característica de la estructura base de antocianidina, etiquetada con la letra f.

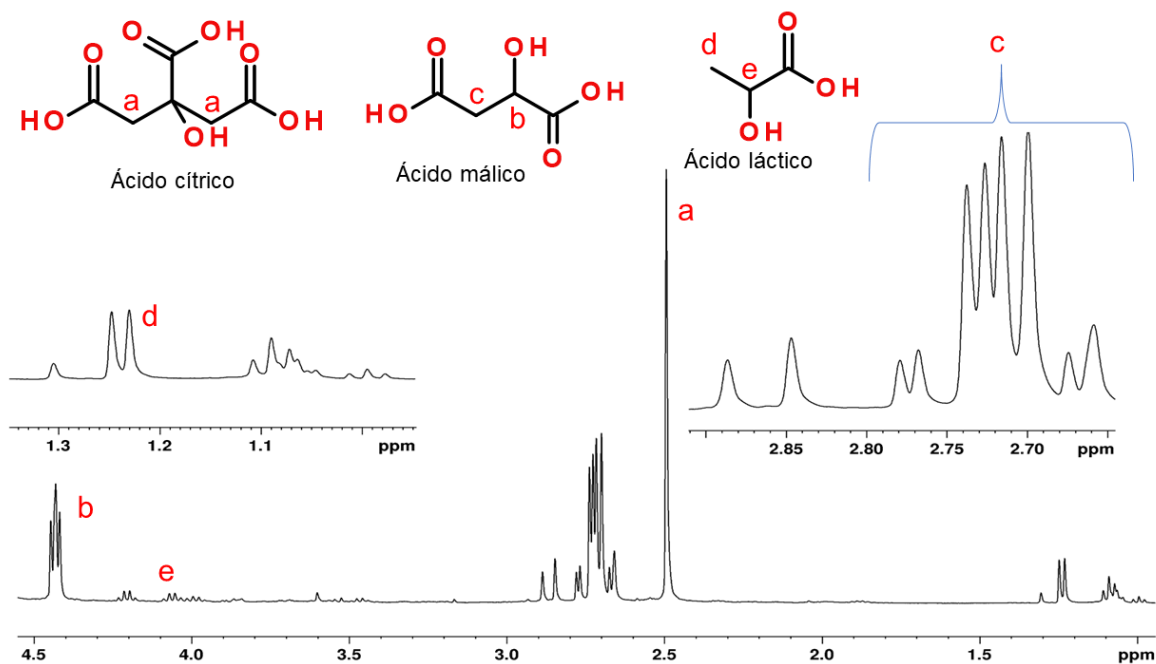


Figura 20. Espectros de  $^1\text{H}$  en  $\text{D}_2\text{O}$  a 400 MHz correspondientes a la fracción C3F4.

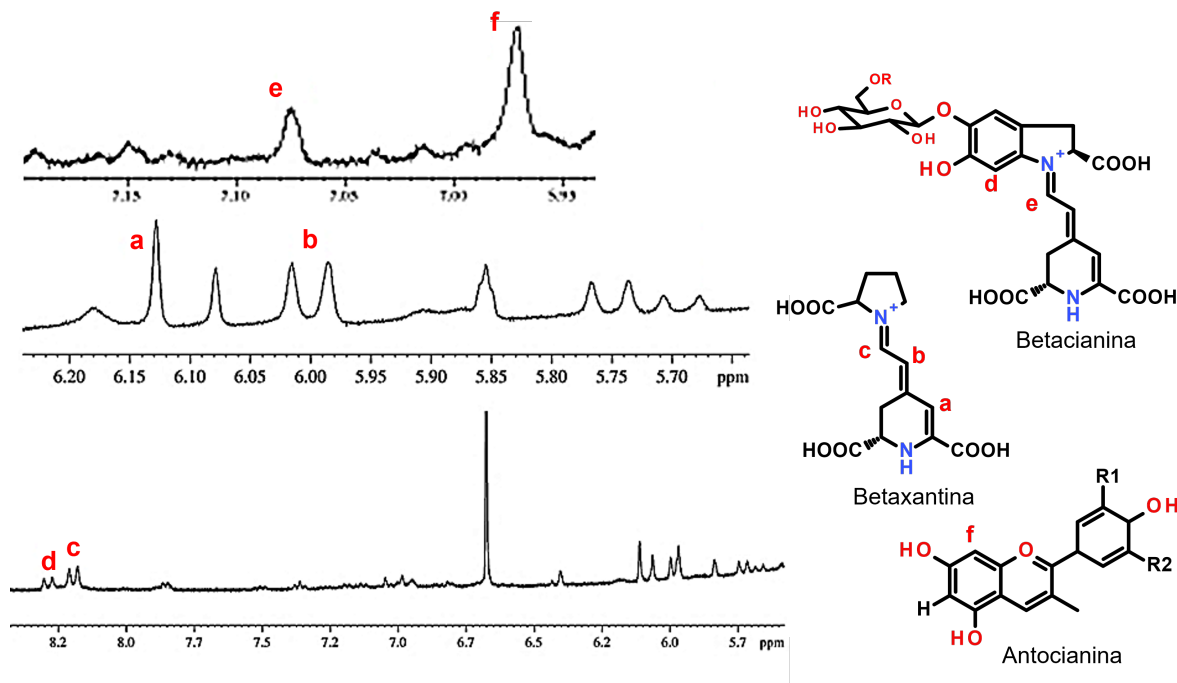


Figura 21. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz de la fracción C3F6 en  $\text{D}_2\text{O}$  (Stintzing et al., 2004) (Stintzing et al., 2006).

#### 4.5. Obtención de aceite (AC) y proteína (APC) de cacahuete

Durante el prensado de cacahuete se buscó la estandarización del proceso, esto con el objetivo de que la calidad de la harina y del aceite no difiriera entre cada prueba. Para esto, se determinó una altura de flama del mechero (Figura 23) sin estar en contacto directo con la cámara de prensado (cilindro). Procurando alcanzar la temperatura mínima de operación establecida por el fabricante del equipo,  $80\text{ }^\circ\text{C}$ . Cabe señalar que a temperaturas  $< 80\text{ }^\circ\text{C}$  la extracción del aceite es limitada mientras que experimentos de extracción a temperaturas  $> 80\text{ }^\circ\text{C}$ , provocaron cambios importantes de coloración en la manteca de cacahuete y el sólido obtenido (Figura 22). De igual forma, el mantener una velocidad de giro del manillar de 40 giros/min impedía obstrucciones en la salida del cacahuete desgrasado. En la Tabla 13 se muestran los resultados del proceso, después de lograr el estandarizado, en los cuales podemos resaltar la eficiencia alta de remoción de la manteca. El proceso

de prensado permitió retirar alrededor del 43% de la manteca. Sin embargo, el proceso presenta una pérdida de producto de cerca del 16%.

Tabla 13. Resultados del proceso de extracción estandarizado de prensado de 100 g de cacahuate.

Fracción	Resultado
<b>Cacahuate parcialmente desgrasado (CPD) (g)</b>	41.09 ± 0.50
<b>Manteca obtenida (g)</b>	43.07 ± 0.34
<b>Masa no recuperada (g)</b>	15.86 ± 0.81

Los valores medios de tres mediciones ± desviación estándar

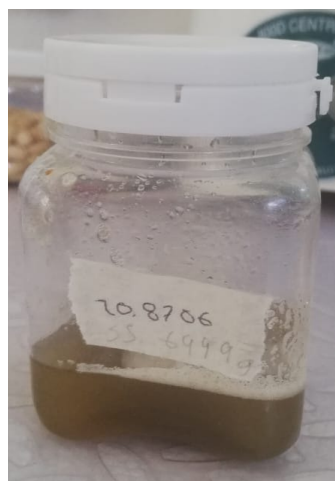


Figura 22. Resultado de un control inadecuado de temperatura en el prensado de semilla de cacahuate. A) Temperaturas inferiores a 80 °C; B) Temperaturas superiores a 80 °C.

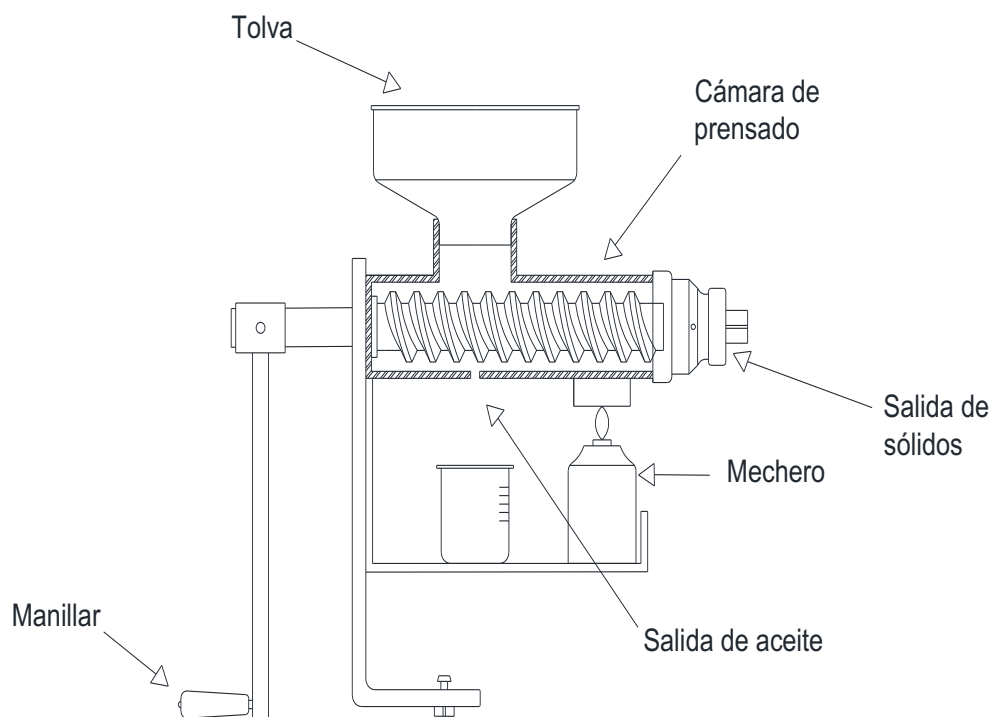


Figura 23. Equipo de prensado empleado en la extracción parcial de aceite de cacahuate. Esquema realizado con el software AutoCAD 2019 con licencia para estudiantes.

A la manteca obtenida se le realizó un proceso de centrifugación, para asegurar la remoción de la parte sólida de esta fracción. El aceite fue separado por decantación (Figura 24) y posteriormente analizado por FT-MIR-ATR (Figura 27).



Figura 24. Aceite de cacahuate (AC) obtenido después de centrifugar.

El otro producto del prensado que se obtuvo fue una harina parcialmente desgrasada (HCPD) que posteriormente se desgrasó a partir de una extracción con hexano asistida por ultrasonido. En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos después de realizar el desgrasado de HCPD. Donde se muestra que se logró remover un  $3.50 \pm 1.16\%$  de aceite remanente en HCPD. Con base en la cantidad de manteca obtenida a partir de 100 g de cacahuete y asumiendo que no existen pérdidas de aceite en el prensado, se infiere un contenido de aceite en la muestra de  $43.07 \pm 0.34\%$ . A este valor se le suma el valor de aceite extraído de HCPD obteniendo una concentración final de aceite de  $46.57 \pm 1.21\%$ . Este valor es similar al 42.47% reportado por Rahman et al., (2018). El prensado de la muestra permitió retirar el 92.5% del aceite. Consecuentemente, ayudó a usar un volumen mínimo de hexano durante la extracción de la grasa remanente en HCPD.

Una vez obtenida la harina de cacahuete desgrasada (HCD) se llevó a cabo el aislamiento de la proteína de cacahuete (APC). Se emplearon dos etapas, una primera etapa de solubilización de la proteína presente en HCD en un medio alcalino (pH de 9.0), para separarla mediante centrifugación. Se procedió a precipitarla en un medio ácido (pH de 4.5) para finalmente separarla por centrifugación. El APC se obtuvo con un rendimiento de  $30.28 \pm 5.32\%$  de la HCD, con lo cual es posible suponer que en el aislado de proteína tenemos una concentración de alrededor del 80%. La concentración de proteína en APC se determinó mediante el método de Biuret señalado en el apartado 3.13.

Tabla 14. Resultado del desgrasado de la harina y el aislado de proteína con base en 1.5 g de HCD.

<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>
<b>Aceite extraído (%)</b>	$3.50 \pm 1.16$
<b>Proteína aislada (%)</b>	$30.28 \pm 5.32$

Los valores medios de tres mediciones  $\pm$  desviación estándar.

#### 4.6. Análisis de la calidad de la proteína y aceite empleando FT-MIR-ATR

Para determinar la eficiencia del método de extracción de aceite con hexano, se adquirieron los correspondientes espectros de IR de las muestras de HCPD y HCD (Figura 25). La presencia de bandas de tensión de grupos carbonilos alrededor de  $1744\text{ cm}^{-1}$  característicos de C=O en los aceites, indica su presencia en HCPD. En el caso del espectro de HCD, ya no se observa la presencia de esta banda. Su ausencia es un indicativo de la remoción de la fracción oleosa en HCPD. Tanto en HCPD y HCD se observan bandas en aproximadamente  $1634\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la tensión del carbonilo para amidas I y en  $1532\text{ cm}^{-1}$  para amidas II.

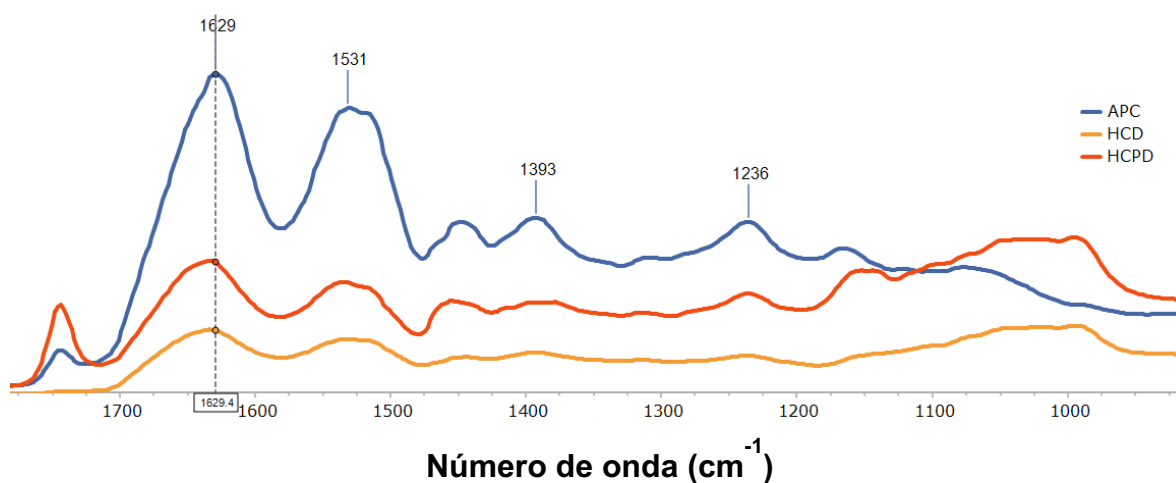


Figura 25. Región de  $1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$  de los espectros de FT-MIR-ATR de APC (proteína de cacahuete, azul), HCD (harina de cacahuete desgrasada, amarillo) y HCPD (harina de cacahuete parcialmente desgrasada, naranja).

En la Figura 26 se muestra la región de  $1800\text{-}800\text{ cm}^{-1}$  del espectro de FT-MIR-ATR de APC. Donde se destaca la intensidad de las bandas de amida I y II a  $1629\text{ C=O}$  y  $1531\text{ C-N-H cm}^{-1}$ , respectivamente. Esto es un indicativo de una concentración alta de proteína en APC. Cabe señalar, la ausencia de bandas características de la degradación de proteínas, tal como bandas para grupos disulfuros  $500\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  (Silverstein & Webster, 1996).

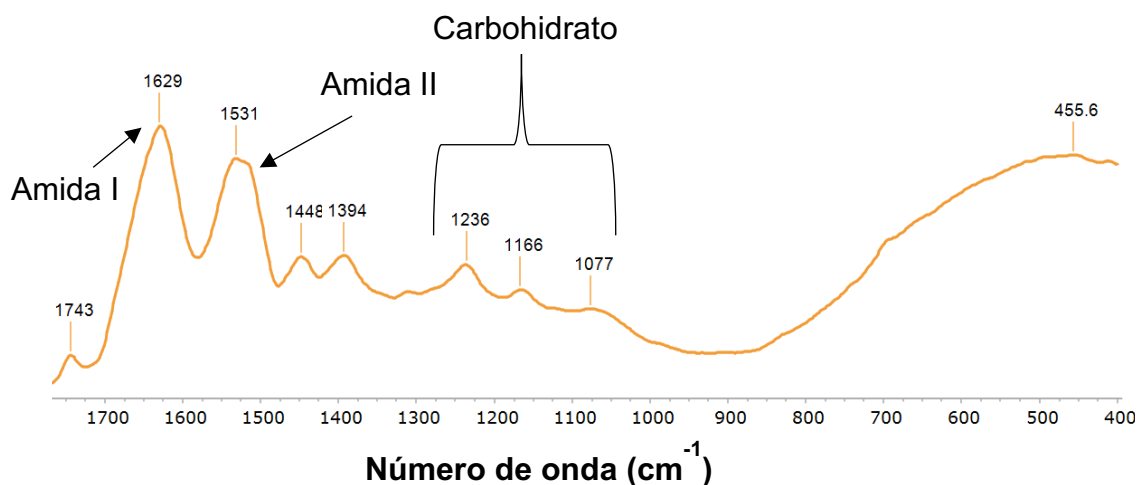


Figura 26. Región de 1800-800 cm<sup>-1</sup> del espectro de FT-MIR-ATR de APC.

Por otro lado, a la manteca obtenida del prensado se le realizó una centrifugación a 900 g durante 5 min, de la cual se obtuvo un aceite claro libre de sólidos (AC). En la Figura 27, se puede observar la intensidad de la banda en la región de 1744 cm<sup>-1</sup> característica de C=O, resaltando la presencia de una banda en la región de 720 cm<sup>-1</sup> característica de vibraciones de cadenas lineales de metilenos (al menos cuatro metilenos unidos de manera consecutiva), así como para vibraciones de flexión de C=C con configuración Z. Esto es un indicativo de la presencia de ácidos grasos insaturados con configuración Z. A este tipo de ácidos grasos se les atribuye una serie de propiedades funcionales, por lo cual se relacionan con ácidos grasos de buena calidad (Akhtar et al., 2014a).

Cabe señalar que no se observa en el espectro la banda característica de flexión fuera del plano de C-H de C=C con configuración E a 960 cm<sup>-1</sup>.



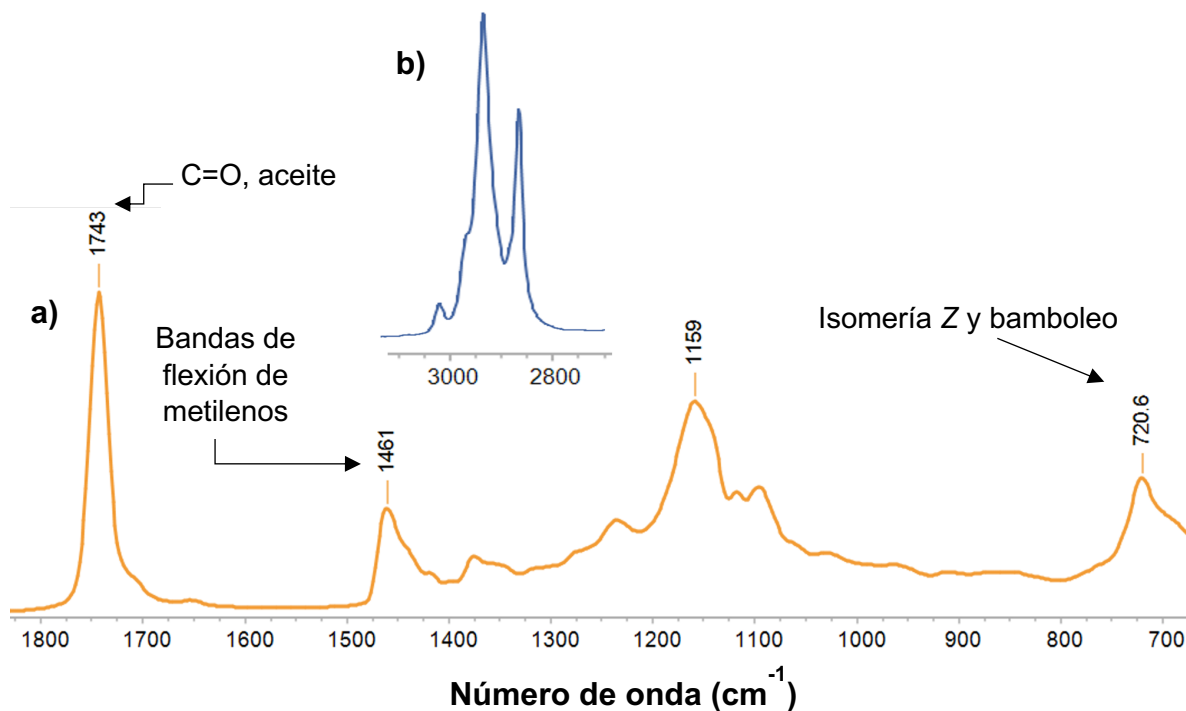


Figura 27. a) Espectro de FT-MIR-ATR en la región de 1800-700  $\text{cm}^{-1}$  de AC (aceite claro libre de sólidos); b) Ampliación del espectro en la región de 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  de AC, donde se observan señales características de alcanos y alquenos.

#### 4.7. Contenido de proteína en PCA por el método de Biuret

En los espectros de FT-MIR-ATR de HCPD, HCD y PCA se observa un cambio en el cociente de las absorbancias características de los polisacáridos y proteína ( $A_{1035}/A_{1655}$ ) que corresponden a las bandas de tensión C-O y C=O de amida primaria (Figura 25). Esto se utilizó como un indicador de la relación de composición de estos compuestos en la harina. Entre más pequeño sea el valor, es un indicador de mayor concentración de proteína en la muestra. Sin embargo, fue necesario cuantificar dicho cambio de concentración por métodos espectrofotométricos, tal como el método de Biuret.

En trabajos anteriores de cuantificación de proteína de cacahuete por el método de Biuret (Liu et al., 2019), se ha utilizado como estándar de la curva, albúmina de suero bovino. Para este trabajo se utilizó albúmina de huevo al 99.8% para la construcción de una curva de calibración. El uso de albúmina de huevo se debió a

su solubilidad alta, bajo las condiciones alcalinas del medio de reacción aplicadas al método de Biuret. Esto hace confiable la determinación de la proteína en muestras de harina. Cabe mencionar, que se empleó como control positivo del método, albúmina de huevo al 86%. Durante la preparación de la disolución del estándar, se pensó en favorecer una disolución alta de la proteína de albúmina de huevo al 99.8% al añadir lauril sulfato de sodio como surfactante. De igual manera, la combinación de tres tipos de mezclado (vórtex, sonicado y agitación con barra magnética) permitió asegurar la disolución completa de la proteína soluble en el medio alcalino. En la Tabla 15, se observa un cambio cercano al 10% en la concentración de la proteína contenida en las muestras de HCPD (39.64%) y HCD (49.39%), resultado de la remoción de la fracción oleosa de la muestra de HCPD. En la muestra de APC, se encontró una concentración de proteína de 84.08%, dicho valor resulta similar a lo reportado por Yu et al., (2007). Esto permitió estimar que la APC retuvo un 51.52% desde la HCD. Adicionalmente, empleando una curva de calibración de caseína en goma arábiga en estado sólido (Martínez-Gómez, 2021) es posible extrapolar un valor de concentración de proteína a partir de esta curva, siendo superior al 85%. A partir de los resultados anteriores, es posible confirmar que la proteína se encuentra con una concentración adecuada para ser empleada como material de pared en la formación de microcápsulas (Zayas, 2006).

Tabla 15. Concentración de proteína de las muestras.

<b>Muestra</b>	<b>Cociente de absorbancias</b>	<b>% de concentración (Proteína)</b>
<b>HCPD</b>	0.98	39.64
<b>HCD</b>	0.87	49.39
<b>APC</b>	0.31	84.08

HCPD: harina de cacahuete parcialmente desgrasada; HCD: harina de cacahuete desgrasada, APC: proteína de cacahuete. Cociente de absorbancias: Absorbancia de la banda de 1035  $\text{cm}^{-1}$  (polisacáridos)/ Absorbancia de la banda de 1655  $\text{cm}^{-1}$  (proteínas).

#### **4.8. Pigmentos en el extracto de pitaya**

El jugo de pitaya presenta una concentración elevada de compuestos de carbohidratos y pectinas. Siendo los carbohidratos, sustratos de reacciones de fermentación (García-Cruz et al., 2016). De igual forma los carbohidratos podrían interferir en la formación de las microcápsulas. Mientras que las pectinas, generan una consistencia viscosa que dificulta su remoción desde el jugo. También están presentes otros sólidos en menor concentración, entre ellos proteínas. Para lograr la remoción de estos compuestos se indujo una precipitación con acetona en una relación 1:3 (acetona:jugo). En la Figura 28a, se puede observar una clara separación de sólidos insolubles, en la disolución de acetona:jugo. Para favorecer la separación de los sólidos, se sometió a centrifugación a 900 g durante 15 min. Al sólido precipitado se le añadió un volumen de etanol similar al de acetona, para llevar a cabo la extracción de los pigmentos en el disolvente polar, mediante un sonicado por 15 min. Cabe señalar que este paso solo se procedió a realizar una sola vez, al no observarse una remoción importante de pigmentos en un segundo lavado, Figura 28b. Posteriormente, se procedió a remover los disolventes y una porción importante de agua por evaporación a presión reducida. En la Figura 29, se muestran los espectros de IR para el extracto concentrado a 1 h y 2 h. Se puede observar un claro aumento de la absorbancia para las bandas en  $1596\text{ cm}^{-1}$  (estrechamiento de C=C) y  $1024\text{ cm}^{-1}$  (estrechamiento C-O-C), características de betalaínas (Hu et al., 2020). De igual forma podemos observar bandas en  $627\text{ cm}^{-1}$ , características de flexiones fuera del plano de antocianinas (Tziolas et al., 2021). La sola presencia de estas bandas no proporciona información suficiente para afirmar la presencia de betalaínas y antocianinas en el extracto. Cabe mencionar, que la confirmación de la presencia de ambos grupos de compuestos se logró por espectroscopía de RMN de  $^1\text{H}$ .

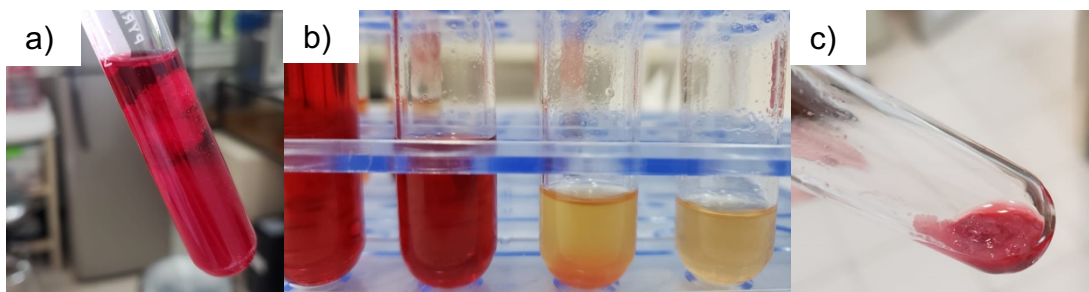


Figura 28. Precipitación de azúcares de jugo de pitaya en acetona a); Extracción de pigmentos del precipitado con etanol destilado b); Residuo sólido obtenido de la centrifugación.

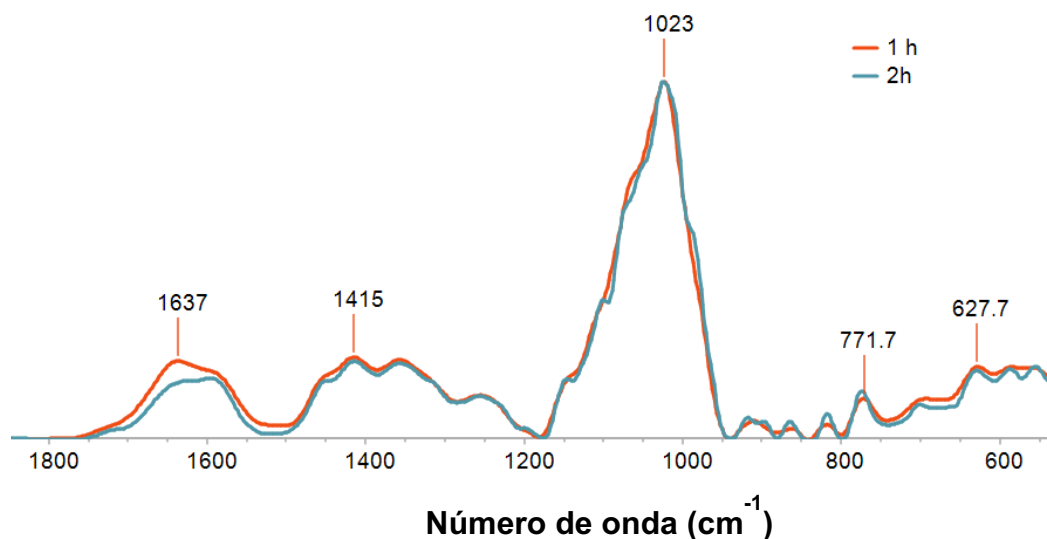


Figura 29. Espectros de FT-MIR-ATR en la región de 1800-600  $\text{cm}^{-1}$  del extracto de pitaya a 1 y 2 h de evaporación a presión reducida, respectivamente.

#### 4.9. Cuantificación de pigmentos en el extracto por UV-Vis

El contenido de betalaínas y antocianinas es posible determinarlo mediante métodos espectrofotométricos en la región del visible. Esto se realiza leyendo la absorbancia a una longitud de onda donde se ha reportado que presentan su máxima absorción de energía. A partir de la determinación de pigmentos en el extracto, se determinó un porcentaje de extracción a partir del jugo. En la Figura 30 se observa que para betaxantinas (Bx), el porcentaje de recuperación fue de 6.51%

en comparación con las betacianinas (Bc). Dando un indicativo de la susceptibilidad de este tipo de betalaínas a las condiciones de extracción. Cabe señalar, que la cuantificación de antocianinas no fue posible realizarla en el extracto, principalmente debido a la combinación de los dos factores siguientes:

- Una parte de las antocianinas presentes en el jugo de pitaya se degradó durante el proceso de extracción. Cabe recordar que en el apartado 4.5, se muestra evidencia de estos compuestos.
- A diferencia del jugo, en el extracto tenemos un incremento de la concentración de Bc. Por lo cual, es posible que exista una interferencia debido a la cercanía a la cual se realizan sus respectivas determinaciones (538 nm para Bc y 520 nm para antocianinas).

Por lo anterior señalado, se recomienda que en etapas de determinación de eficiencia de encapsulación o bioaccesibilidad, estos parámetros se determinen con base en el contenido de betalaínas.

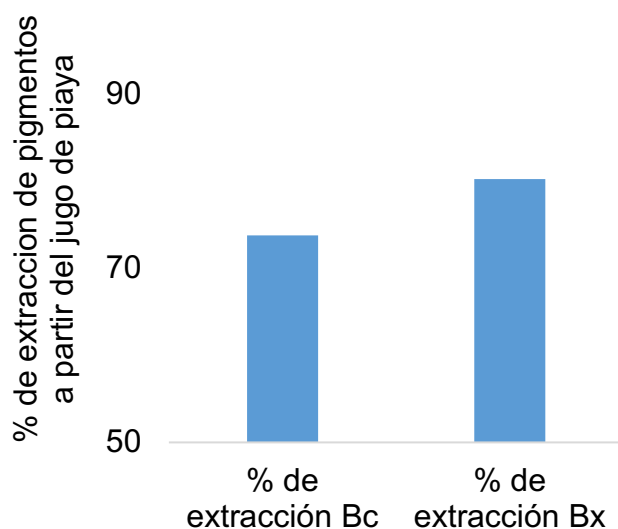


Figura 30. Determinación de eficiencia de extracción de pigmentos a partir del jugo de pitaya.

Con estas determinaciones se concluyó la caracterización del fruto de pitaya y su extracto, permitiendo iniciar la preparación de las microcápsulas.

#### **4.10. Formación de los microencapsulados y su análisis morfológico**

En la formación de las emulsiones agua en aceite (*w/o*), la viscosidad del aceite empleado influye en la formación de una emulsión estable. Puesto que entre más viscoso sea se necesitará un tiempo mayor de agitación para formar una emulsión estable (Paipetis, 2010). Para reducir los tiempos de agitación y favorecer su estabilidad se optó por llevar a cabo la emulsión *w/o* a 13500 rpm durante 2 min. Esto permitió conservar la emulsión estable durante su almacenamiento a 4 °C, durante 24 h. El motivo de la inestabilidad de las emulsiones simples (*w/o*) se debió a un efecto de floculación en las gotas formadas (Tharwat, 2006), Figura 31b. Las emulsiones simples (*w/o*) después de haberlas formado se emplearon en un período de tiempo no mayor a 1 h para producir las emulsiones *w/o/w* (agua/aceite/agua). La estabilidad de las gotas formadas se determinó por microscopía óptica con un aumento de 100X.

En la formación de la emulsión *w/o/w* a pH de 2, se consideró tanto la solubilidad de la proteína como la estabilidad de los pigmentos a este pH. Obteniéndose gotas de emulsión *w/o/w* de  $2.34 \pm 1.03$  y  $2.77 \pm 1.75$   $\mu\text{m}$  de diámetro a concentraciones de proteína del 1 y 2 %, respectivamente. Esta emulsión resultó ser estable durante 4 semanas en almacenamiento a 4 °C. Posteriormente, la goma xantana se adicionó a pH de 4.4, favoreciendo la interacción proteína-polisacárido de acuerdo con lo reportado por (Shiroodi & Lo, 2015). Cabe señalar que, al añadir el polisacárido fue posible observar la formación de una crema (Figura 31c). Lo cual es resultado de una diferencia de densidades entre las microcápsulas y el medio continuo (Paipetis, 2010).

La etapa de reticulación de la enzima transglutaminasa se realizó a pH de 4.4, cabe señalar que a este pH aún se mantiene cerca del 80 % de la actividad enzimática (Ho et al., 2000). Permitiendo conservar las condiciones de pH adecuadas para la estabilización de los pigmentos de interés. Finalmente, las microcápsulas se

sometieron a temperaturas cercanas a los 10 °C, favoreciendo la separación de la crema y el endurecimiento de la pared formada. De las micrografías obtenidas de la crema fue posible observar la formación de aglomerados de microcápsulas. Estos aglomerados son un indicativo de la generación de reacciones enzimáticas. Cabe señalar, que durante el almacenamiento estas reacciones continuaron aportando una mayor estabilidad a los microencapsulados formados.

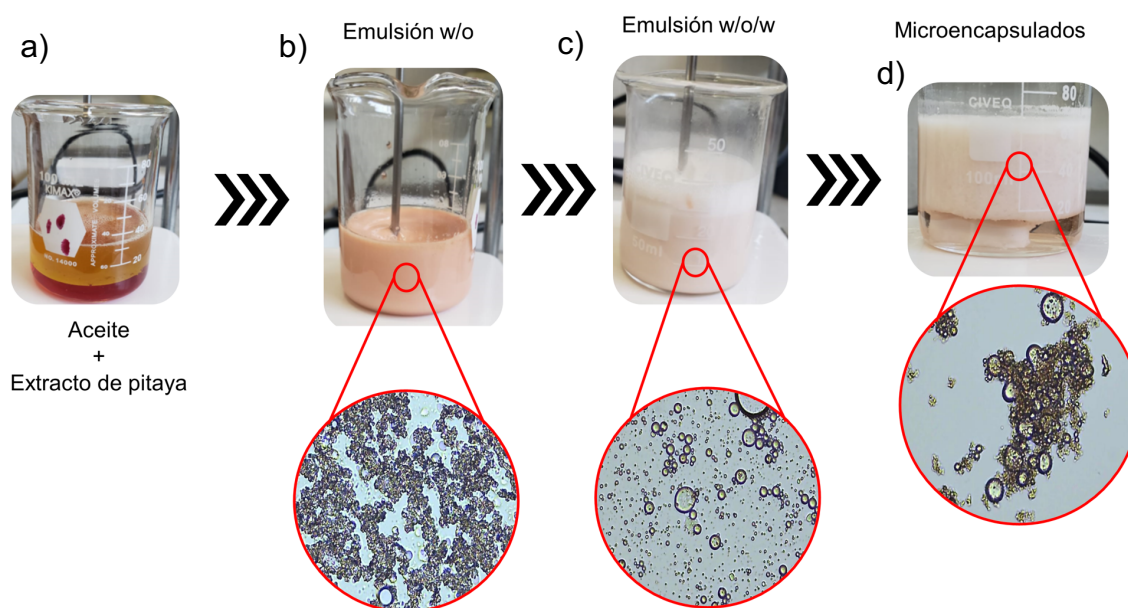


Figura 31. Formación de los microencapsulados.

#### 4.11. Resultados del procesamiento y análisis estadístico de los datos de diámetro y distribución de partículas en las micrografías.

El procesamiento de las micrografías de acuerdo con la sección 3.16 permitió el poder realizar una determinación del diámetro de la población total de las microcápsulas presentes en la micrografía. Limitando el error o sesgo que podría representar el determinar este parámetro de forma individualizada. En la Figura 32, se muestran los resultados del procesamiento de las micrografías obtenidas inicialmente. Las microcápsulas contabilizadas se encuentran delimitadas por una

línea de color azul. Es de resaltar que los aglomerados no son tomados en cuenta durante el análisis, siendo esto un indicativo de la efectividad del tratamiento de la imagen.

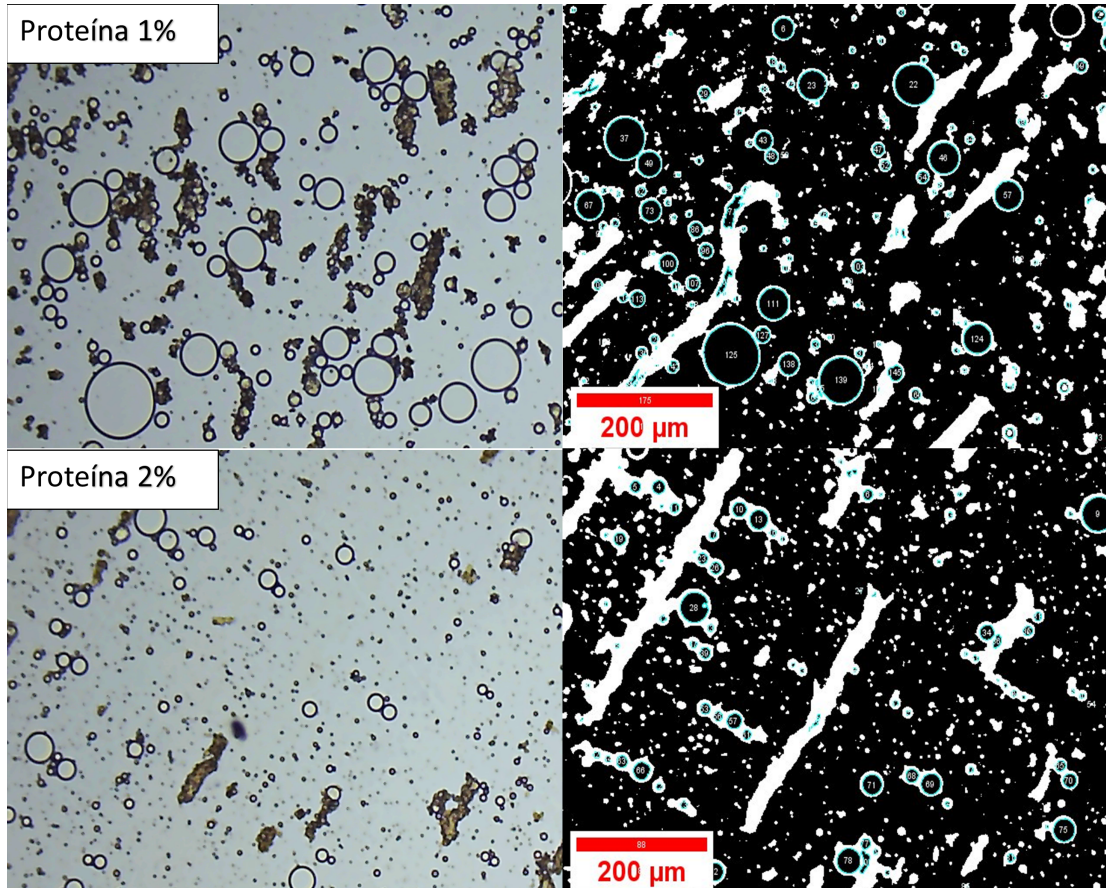


Figura 32. Resultados del tratamiento de las imágenes. Del lado izquierdo se muestran las micrografías obtenidas mediante el software ToupView. Del lado derecho se muestran las micrografías después del tratamiento de la imagen mediante el software ImageJ 1.5K.

De acuerdo con el análisis estadístico realizado (sección 3.20), se determinó que el diámetro promedio de las microcápsulas para el tratamiento de proteína al 1 % y 2 % fue de  $5.32 \pm 3.98 \mu\text{m}$  (mediana =  $4.16 \mu\text{m}$ ) y  $3.86 \pm 3.54 \mu\text{m}$  (mediana =  $2.57 \mu\text{m}$ ), respectivamente. Lo cual difiere con otros métodos de microencapsulación de betalaínas en los cuales se observan intervalos de tamaño de  $0.409 - 0.275 \mu\text{m}$  (Li et al., 2022) y  $6 - 51 \mu\text{m}$  (Otálora et al., 2015).



De la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, los resultados mostraron un comportamiento no normal ( $p < 0.05$ ) para cada repetición de los tratamientos. Los resultados de la prueba de homocedasticidad de Levene mostraron que las varianzas de los tratamientos son diferentes ( $P_{\text{calc}} = 2.2 \times 10^{-16}$ ). La falta de normalidad de los datos se puede observar en los histogramas de la Figura 33a. Por tal motivo, se procedió a realizar un ANOVA robusto con un estimador M-modificado que permitiera identificar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos y las repeticiones de los tratamientos. Dando como resultado que los tratamientos son diferentes ( $P_{\text{calc}} = 0.00$ ), mientras que las repeticiones dentro de los tratamientos son iguales ( $P_{\text{cal}} = 0.066$ ). Lo cual puede observarse gráficamente en la Figura 33c. Estos resultados estadísticos comprueban que el método implementado para la determinación de tamaño resulta reproducible permitiendo identificar diferencias en tamaño de microcápsulas entre los tratamientos que emplearon concentraciones de proteína al 1 y 2%. Cabe señalar, que este método es susceptible a mejorar mediante la implementación de cámaras de una mayor resolución (1080 x 720 píxeles). Aunado a esto, es posible considerar el uso de luz polarizada con la cual se observen únicamente los microencapsulados.

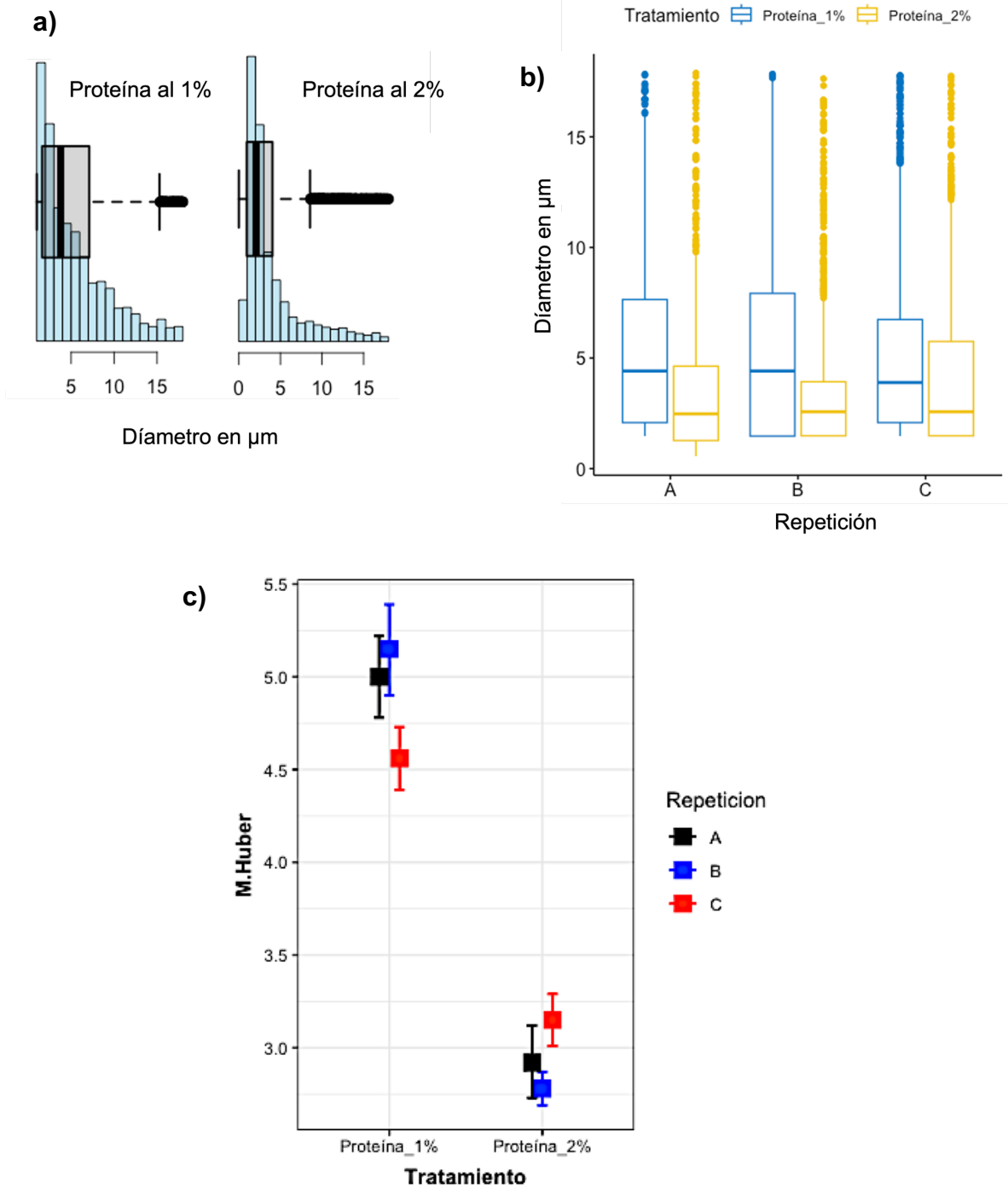


Figura 33. Resultados del análisis estadístico. a) Histogramas representativos de la distribución del tamaño de los microencapsulados; b) Diagrama de cajas y bigotes; c) Diagrama representativo de los comparativos de tratamientos y repeticiones.

#### **4.12. Evaluación de la estabilidad de los microencapsulados a distintas condiciones de fractura de la pared.**

Los microencapsulados obtenidos se sometieron a distintas condiciones para promover la ruptura de la pared de los microencapsulados, esto incluyó el uso de MeOH y ultrasonido (Gharanjig et al., 2020). Condiciones que fueron propuestas para llevar a cabo la determinación de la eficiencia de encapsulación. Sin embargo, después de haber sido sometidas a este proceso no se logró observar la liberación de pigmentos y aceite, Figura 35. Lo cual se reflejaría en un cambio en la coloración del sobrenadante del tubo de ensaye, así como la formación de una capa oleosa de aceite. En estas micrografías también se observan los microencapsulados y los aglomerados. Los microencapsulados también fueron estables en condiciones de digestión *in vitro*, método en el cual, la acción de las proteasas y lipasas favorecen la ruptura de los enlaces peptídicos de las proteínas (Szabo et al., 2021). Sin embargo, como se muestra en las micrografías de la Figura 34, los microencapsulados siguen presentes después de dicho proceso. Es de resaltar que contrastando con las micrografías de la Figura 32, los aglomerados de microcápsulas y proteínas no se observan.

Los resultados obtenidos de las pruebas de digestión *in vitro* de los microencapsulados mostraron una nula bioaccesibilidad. Por lo cual es necesario la búsqueda de alternativas que permitan el incremento de su bioaccesibilidad. Esto posiblemente puede lograrse al controlar la reacción de reticulación enzimática.

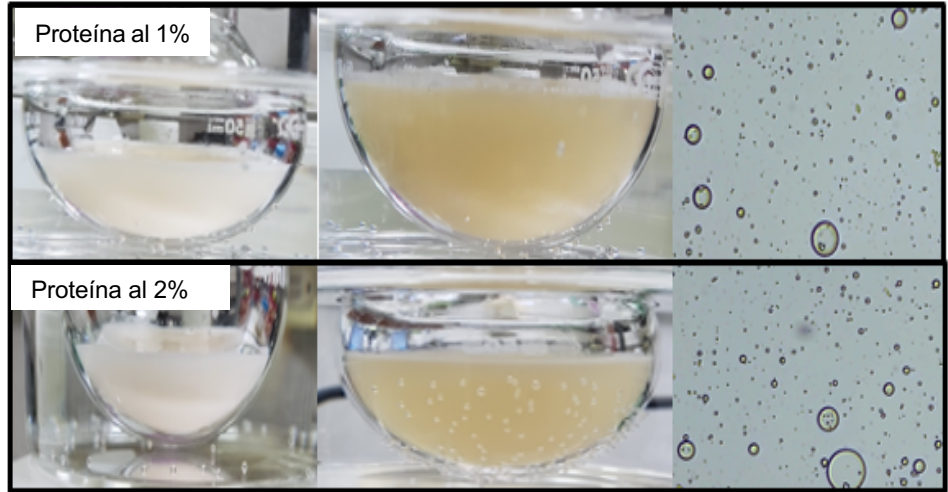


Figura 34. Microencapsulados sometidos a condiciones de digestión *in vitro*.

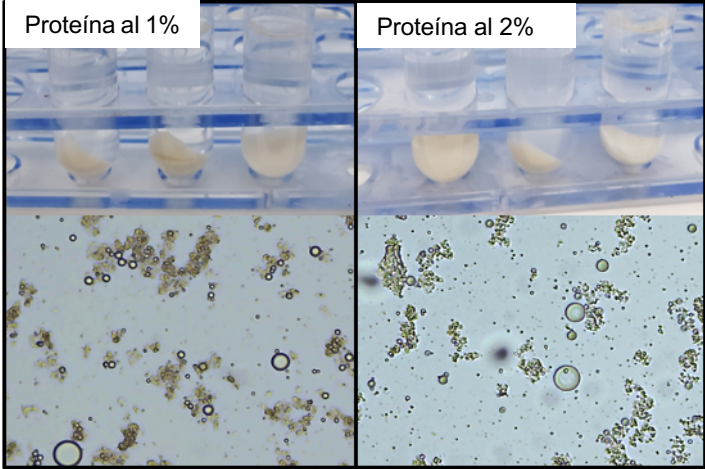


Figura 35. Microencapsulados sometidos a condiciones de MeOH con ultrasonido.

## Capítulo 5. Conclusiones

A partir de cacahuete se logró aislar proteína con una concentración superior al 80%. Además, como sub-producto se obtuvo aceite, el cual se empleó para la formación de la emulsión *w/o* con la disolución de extracto de pitaya.

A partir del fruto de pitaya se obtuvo un extracto con más del 70% de betalaínas totales recuperadas del fruto. En el caso de las antocianinas no se logró cuantificar su contenido en el extracto, solamente se logró identificar una banda característica de estos compuestos en los espectros de FT-MIR-ATR a  $627\text{ cm}^{-1}$ . La identificación de las antocianinas se confirmó, a partir del fraccionamiento del extracto del jugo de pitaya a través de una columna de intercambio iónico y la adquisición de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de estas fracciones, encontrándose un  $\delta = 6.9$  correspondiente a un  $^1\text{H}$  del anillo A de las antocianinas.

La proteína de cacahuete disuelta a un pH de 2 permitió la obtención de una emulsión *w/o/w* para ser llevada al proceso de reticulación con transglutaminasa. Los microencapsulados obtenidos presentaron un diámetro en el intervalo de  $6.84 \pm 4.5\ \mu\text{m}$  a  $5.62 \pm 4.36\ \mu\text{m}$ , y una estabilidad alta, la cual impidió su fragmentación a condiciones de agitación por ultrasonido en MeOH y de digestión *in vitro*, en presencia de proteasas. Evitando la determinación de la eficiencia de microencapsulación y la evaluación de la bioaccesibilidad.



## Capítulo 6. Perspectivas

En esta sección se desglosan las perspectivas de la presente investigación.

1. Durante los análisis de RMN de  $^1\text{H}$  y FT-MIR-ATR, se observaron en el extracto señales características de azúcares. Los cuales resultan ser interferentes cuando se pretende llevar a cabo una caracterización de los pigmentos presentes. Por lo tanto, se sugiere que en estudios posteriores se implemente el uso de cartuchos de C18 y columna flash para aislar los pigmentos. Permitiendo llevar a cabo una caracterización de cada uno de estos compuestos.
2. El análisis estadístico de la determinación de tamaño de los microencapsulados comprueba que es un método fiable y reproducible, pero aún susceptible a mejoras. Por lo cual, se recomienda el uso de cámaras con una resolución mayor a 640 x 480 píxeles, además de implementar luz polarizada que permita observar de forma selectiva a los microencapsulados y aglomerados de proteína. Esto posiblemente permitiría detectar los cambios estructurales en la superficie de los microencapsulados que ocurren durante la etapa de reticulación enzimática.
3. Los microencapsulados obtenidos presentaron una pared altamente estable, que impidió su ruptura durante pruebas de digestión *in vitro* y bajo ultrasonido. Por lo cual, se recomienda implementar un seguimiento de la reacción enzimática, con el objetivo de determinar tiempos de reacción y concentraciones de proteína y transglutaminasa que conduzcan a microencapsulados estables y bioaccesibles.





## Capítulo 7. Referencias

- Aguirre-Calvo, T. R., Perullini, M., & Santagapita, P. R. (2018). Encapsulation of betacyanins and polyphenols extracted from leaves and stems of beetroot in Ca (II)-alginate beads: A structural study. *Journal of Food Engineering*, 235, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.04.015>
- Akbari, M., Razavi, S. H., & Kieliszek, M. (2021). Recent advances in microbial transglutaminase biosynthesis and its application in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 110, 458–469. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.036>
- Akhtar, S., Khalid, N., Ahmed, I., Shahzad, A., & Suleria, H. A. R. (2014a). Physicochemical characteristics, functional properties, and nutritional benefits of peanut oil: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(12), 1562–1575. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.644353>
- Akhtar, S., Khalid, N., Ahmed, I., Shahzad, A., & Suleria, H. A. R. (2014b). Physicochemical characteristics, functional properties, and nutritional benefits of peanut oil: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(12), 1562–1575. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.644353>
- Amirdivani, S., Khorshidian, N., Fidelis, M., Granato, D., Koushki, M. R., Mohammadi, M., Khoshtinat, K., & Mortazavian, A. M. (2018). Effects of transglutaminase on health properties of food products. *Current Opinion in Food Science*, 22, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.008>
- Badui Dergal, S. (2006). Química de los Alimentos. In *Química de los alimentos* (Cuarta edi). PEARSON EDUCACIÓN.
- Ballesteros, L. F., Ramirez, M. J., Orrego, C. E., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2017). Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. *Food Chemistry*, 237, 623–631. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.142>
- Castellanos-Santiago, E., & Yahia, E. M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5758–5764. <https://doi.org/10.1021/jf800362t>

- Cervantes-Arista, C., Roman-Guerrero, A., Oidor-Chan, V. H., Díaz de León-Sánchez, F., Álvarez-Ramírez, E. L., Pelayo-Zaldívar, C., Sierra-Palacios, E. del C., & Mendoza Espinoza, J. A. (2020). Chemical characterization, antioxidant capacity, and anti-hyperglycemic effect of *Stenocereus stellatus* fruits from the arid Mixteca Baja region of Mexico. *Food Chemistry*, 328(February), 127076. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127076>
- Davidson, M. W., & Abramowitz, M. (2012). Optical microscopy. *Polymer Science: A Comprehensive Reference, 10 Volume Set, 2*, 465–478. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00035-2>
- Davis, J. P., & Dean, L. L. (2016). Peanut Composition, Flavor and Nutrition. In *Peanuts: Genetics, Processing, and Utilization*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-038-2.00011-3>
- de Farias, Y. B., & Zapata Noreña, C. P. (2019). Reverse encapsulation using double controlled gelification for the production of spheres with liquid light soy sauce-core. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 16(October 2018), 100137. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2019.100137>
- DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL, D. (2020). Huertos de pitaya registrados de Oaxaca para exportación a los Estados Unidos de América con Tratamiento de Irradiación. In *SADER* (Issue 10, p. 2020).
- Dong, Z. J., Xia, S. Q., Hua, S., Hayat, K., Zhang, X. M., & Xu, S. Y. (2008). Optimization of cross-linking parameters during production of transglutaminase-hardened spherical multinuclear microcapsules by complex coacervation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63(1), 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.11.007>
- Fan, R., Sun, Q., Zeng, J., & Zhang, X. (2020). Contribution of anthocyanin pathways to fruit flesh coloration in pitayas. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02566-2>
- García-Cruz, L., Dueñas, M., Santos-Buelgas, C., Valle-Guadarrama, S., & Salinas-Moreno, Y. (2017). Betalains and phenolic compounds profiling and antioxidant capacity of pitaya (*Stenocereus* spp.) fruit from two species (*S. pruinosus* and *S. stellatus*). *Food Chemistry*, 234, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.174>
- García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Salinas-Moreno, Y., & Joaquín-Cruz, E. (2013). Physical, chemical, and antioxidant activity characterization of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(4), 403–410. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0391-8>

- García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Salinas-Moreno, Y., & Luna-Morales, C. del C. (2016). Postharvest quality, soluble phenols, betalains content, and antioxidant activity of *Stenocereus pruinosus* and *Stenocereus stellatus* fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.07.004>
- Gharanjig, H., Gharanjig, K., Farzi, G., Hosseinneshad, M., & Jafari, S. M. (2020). Novel complex coacervates based on Zedo gum, cress seed gum and gelatin for loading of natural anthocyanins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 3349–3360. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.218>
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). Betalain stability and degradation. Structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science*, 71(4), 41–50. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00022.x>
- Hernández-Valencia, C. G., Román-Guerrero, A., Aguilar-Santamaría, Á., Cira, L., & Shirai, K. (2019). Cross-linking chitosan into hydroxypropylmethylcellulose for the preparation of Neem oil coating for postharvest storage of pitaya (*Stenocereus pruinosus*). *Molecules*, 24(2). <https://doi.org/10.3390/molecules24020219>
- Ho, M. L., Leu, S. Z., Hsieh, J. F., & Jiang, S. T. (2000). Technical approach to simplify the purification method and characterization of microbial transglutaminase produced from *Streptovorticillium ladakanum*. *Journal of Food Science*, 65(1), 76–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb15959.x>
- Hu, H., Yao, X., Qin, Y., Yong, H., & Liu, J. (2020). Development of multifunctional food packaging by incorporating betalains from vegetable amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) into quaternary ammonium chitosan/fish gelatin blend films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 675–684. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.103>
- John Fox and Sanford Weisberg (2019). An {R} Companion to Applied Regression, Third Edition. Thousand Oaks CA: Sage. URL: <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>
- Julia Martín, Eugenia Marta Kuskoski, M. J. N. and A. G. A. A. (2017). Antioxidant capacity of anthocyanin pigments. In *Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments* (p. 13). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/67718> Abstract
- Kassambara A (2023). `_rstatix`: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests\_. R package versión 0.7.2, <https://CRAN.R-project.org/package=rstatix>.

- Kuraishi, C., Nakagoshi, H., Tanno, H., & Tanaka, H. (2000). Application of transglutaminase for food processing. In N. Nishinari (Ed.), *Hydrocolloids-Part 2* (pp. 281–285). Elsevier Science B. V. <https://doi.org/10.1016/b978-044450178-3/50096-2>
- Liu, K., Liu, Y., & Chen, F. (2019). Effect of storage temperature on lipid oxidation and changes in nutrient contents in peanuts. *Food Science and Nutrition*, 7(7), 2280–2290. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1069>
- Mair, P., & Wilcox, R. R. (2020). Robust Statistical Methods in R Using the WRS2
- Mæhre, H. K., Dalheim, L., Edvinsen, G. K., Elvevoll, E. O., & Jensen, I. J. (2018). Protein determination method matters. *Foods*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/foods7010005>
- Marconi, O., Floridi, S., & Montanari, L. (2007). Organic acids profile in tomato juice by HPLC with UV detection. *Journal of Food Quality*, 30(2), 253–266. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2007.00119.x>
- Martínez-Gómez, J. G. (2021). Bioaccesibilidad de microencapsulados de extractos de *Haematococcus pluvialis* ricos en astaxantina. Tesis de Maestría en Ciencias: Universidad Tecnológica de la Mixteca.
- Martínez-González, J. C. (2010). *Principales cultivares de pitaya* (p. 20). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Mendanha, D. V., Molina-Ortiz, S. E., Favaro-Trindade, C. S., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E. S., & Thomazini, M. (2009). Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International*, 42(8), 1099–1104. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.007>
- Mihalcea, L., Turturică, M., Barbu, V., Ioniță, E., Pătrașcu, L., Cotârleț, M., Dumitrașcu, L., Aprodu, I., Râpeanu, G., & Stănciuc, N. (2018). Transglutaminase mediated microencapsulation of sea buckthorn supercritical CO<sub>2</sub> extract in whey protein isolate and valorization in highly value-added food products. *Food Chemistry*, 262(April), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.067>
- Otálora, M. C., Carriazo, J. G., Iturriaga, L., Nazareno, M. A., & Osorio, C. (2015). Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. *Food Chemistry*, 187, 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.090>

- Paipetis, S. A. (2010). Emulsion Science and Technology. In *History of Mechanism and Machine Science* (Vol. 9). [https://doi.org/10.1007/978-90-481-2514-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-90-481-2514-2_8)
- Paredes-López, O. D.-V. F. (2002). Natural colorants for food and nutraceutical uses. In *CRC PRESS*.
- Parizad, P. A., Capraro, J., Scarafoni, A., Bonomi, F., Blandino, M., Marengo, M., Giordano, D., Carpen, A., & Iametti, S. (2019). The Bio-functional properties of pigmented cereals may involve synergies among different bioactive species. *Plant Foods for Human Nutrition*, *74*(1), 128–134. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-0715-4>
- Rahimi, P., Mesbah-Namin, S. A., Ostadrahimi, A., Abedimanesh, S., Separham, A., & Asghary Jafarabadi, M. (2019). Effects of betalains on atherogenic risk factors in patients with atherosclerotic cardiovascular disease. *Food and Function*, *10*(12), 8286–8297. <https://doi.org/10.1039/c9fo02020a>
- Rahman, M., Uddin, M., Islam, Md. A., & Mazumder, Md. A. (2018). Isolation of protein from defatted peanut meal and characterize their nutritional profile. *Chemistry Research Journal*, *3*(2), 187–196.
- Ravichandran, K., Palaniraj, R., Saw, N. M. M. T., Gabr, A. M. M., Ahmed, A. R., Knorr, D., & Smetanska, I. (2014). Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extract. *Journal of Food Science and Technology*, *51*(9), 2216–2221. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0728-6>
- Rocha-Selmi, G. A., Bozza, F. T., Thomazini, M., Bolini, H. M. A., & Fávaro-Trindade, C. S. (2013). Microencapsulation of aspartame by double emulsion followed by complex coacervation to provide protection and prolong sweetness. *Food Chemistry*, *139*(1–4), 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.114>
- Rodríguez-Sánchez, J. A., Cruz y Victoria, M. T., & Barragán-Huerta, B. E. (2017). Betaxanthins and antioxidant capacity in *Stenocereus pruinosus*: Stability and use in food. *Food Research International*, *91*, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.023>
- Shahidi, F., & Peng, H. (2018). Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Journal of Food Bioactives*, *4*, 11–68. <https://doi.org/10.31665/jfb.2018.4162>
- Shiroodi, S. G., & Lo, Y. M. (2015). The effect of pH on the rheology of mixed gels containing whey protein isolate and xanthan-curdlan hydrogel. *Journal of Dairy Research*, *82*(4), 506–512. <https://doi.org/10.1017/S0022029915000370>

- Silverstein, R. M., & Webster, F. X. (1996). *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (6 th). Courier/Westford.
- Sobel, R., Versic, R., & Gaonkar, A. G. (2014). Introduction to microencapsulation and controlled delivery in foods. *Microencapsulation in the Food Industry*, 3–12. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-404568-2.00001-7>
- Solymosi, K., Latruffe, N., Morant-Manceau, A., & Schoefs, B. (2015). Food colour additives of natural origin. In *Colour Additives for Foods and Beverages* (pp. 4–34). <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-011-8.00001-5>
- Stauffer, C. E. (1999). *Emulsifiers*. Eagan Press Handbook Series.
- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 15(1), 19–38. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.07.004>
- Stintzing, F. C., Conrad, J., Klaiber, I., Beifuss, U., & Carle, R. (2004). Structural investigations on betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy. *Phytochemistry*, 65(4), 415–422. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.029>
- Stintzing, F. C., Kugler, F., Carle, R., & Conrad, J. (2006). First <sup>13</sup>C-NMR assignments of betaxanthins. *Helvetica Chimica Acta*, 89(5), 1008–1016. <https://doi.org/10.1002/hlca.200690077>
- Szabo, K., Emőke Teleky, B., Ranga, F., Simon, E., Lelia Pop, O., Babalau-Fuss, V., Kapsalis, N., & Cristian Vodnar, D. (2021). Bioaccessibility of microencapsulated carotenoids, recovered from tomato processing industrial by-products, using in vitro digestion model. *LWT*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112285>
- Tang, C. H., Ten, Z., Wang, X. S., & Yang, X. Q. (2006). Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8945–8950. <https://doi.org/10.1021/jf0619176>
- Tharwat, F. T. (2006). *Applied Surfactants. Principles and Applications*. John Wiley & Sons.
- Tian, H., Xiang, D., & Li, C. (2021). Tea polyphenols encapsulated in w/o/w emulsions with xanthan gumlocust bean gum mixture: Evaluation of their stability and protection. *International Journal of Biological Macromolecules*, 175, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.161>

- Timilsena, Y. P., Akanbi, T. O., Khalid, N., Adhikari, B., & Barrow, C. J. (2019). Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, *121*, 1276–1286. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.144>
- Timoneda, A., Feng, T., Sheehan, H., Walker-Hale, N., Pucker, B., Lopez-Nieves, S., Guo, R., & Brockington, S. (2019). The evolution of betalain biosynthesis in *Caryophyllales*. *New Phytologist*, *224*(1), 71–85. <https://doi.org/10.1111/nph.15980>
- Tziolas, N., Ordoudi, S. A., Tavlaridis, A., Karyotis, K., Zalidis, G., & Mourtzinou, I. (2021). Rapid assessment of anthocyanins content of onion waste through visible-near-short-wave and mid-infrared spectroscopy combined with machine learning techniques. *Sustainability (Switzerland)*, *13*(12). <https://doi.org/10.3390/su13126588>
- Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., Van De Kamp, E., Rompelberg, C. J. M., & Sips, A. J. A. M. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, *43*(1), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.08.007>
- Wang, B., Akanbi, T., Agyei, D., Holland, B. J., & Barrow, C. J. (2018). Coacervation Technique as an Encapsulation and Delivery Tool for Hydrophobic Biofunctional Compounds. In A. Mihai-Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Handbook of Food Bioengineering* (Issue April, pp. 236–261). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811448-3/00007-3>
- Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczuk, A., Oniszczuk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., & Matwijczuk, A. (2020). Influence of *in vitro* digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols—a non-systematic review. *Nutrients*, *12*(5). <https://doi.org/10.3390/nu12051401>
- Xiaolan L., Zhi-Hong Z., Jiaqi Q., Wenjuan Q., Man-Sheng W., Xianli G., Cunsheng Z., Charles S. B., & Xianghui Q. (2022). Improvement of betalains stability extracted from red dragon fruit peel by ultrasound-assisted microencapsulation with maltodextrin. *Ultrasonics sonochemistry*, *82*(2022). <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105897>
- Yokoyama, K., Nio, N., & Kikuchi, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *64*(4), 447–454. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1539-5>
- Yu, J., Ahmedna, M., & Goktepe, I. (2007). Peanut protein concentrate: Production and functional properties as affected by processing. *Food Chemistry*, *103*(1), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.012>

Zayas, J. F. (2006). Solubility of Proteins. In *Functionality of Proteins in Food* (pp. 6–75). Springer-Verlag.

Zheng, K., Wu, L., He, Z., Yang, B., & Yang, Y. (2017). Measurement of the total protein in serum by biuret method with uncertainty evaluation. *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation*, 112, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2017.08.013>



## Capítulo 8. Apéndices

### Apéndice A. Datos obtenidos de la determinación de las características morfológicas de pitaya

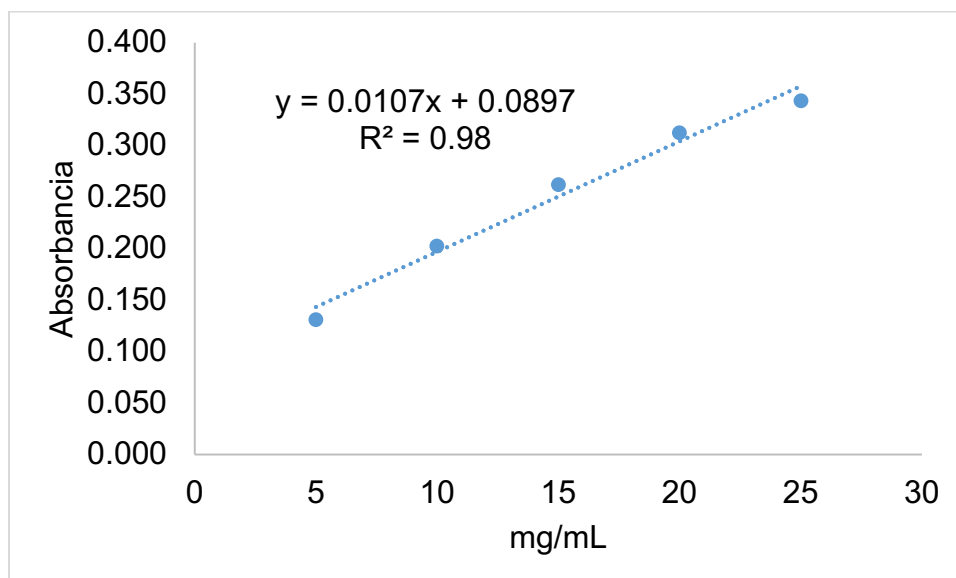
Muestra	Peso (g)	D.e. (mm)	D. p. (mm)	Índice de forma
1	166	61.8	81.2	0.76
2	206	64.1	97.4	0.66
3	108	52.7	79.5	0.66
4	154	61.3	81.6	0.75
5	170	63.2	81.8	0.77
6	109	56.1	70.1	0.80
7	162	61.7	83.1	0.74
8	161	62.6	76.8	0.82
9	324	75.7	111.2	0.68
10	115	53	75.1	0.71
11	214	66.3	94.4	0.70
12	198	69	81.5	0.85
13	190	62.9	94.3	0.67
14	99	54.8	65.4	0.84
15	213	72.6	80.8	0.90
16	130	55.5	82.7	0.67
17	104	50.4	70.8	0.71
18	141	59.9	78.8	0.76
19	166	63.3	73.9	0.86
20	144	63.5	72.1	0.88
21	174	61.2	91.8	0.67
22	192	63.1	93.9	0.67
23	134	56.6	77	0.74
24	185	62.2	86.8	0.72
25	163	62	72	0.86
26	159	59.8	84.2	0.71
<b>Promedio</b>	165	61.4	82.2	0.75
<b>Desv. Std</b>	47	5.8	10.2	0.08

**Apéndice B. Datos obtenidos de la estandarización del proceso de obtención de proteína y aceite de cacahuete**

<b>Prueba</b>	<b>Cacahuete (g)</b>	<b>Cacahuete desgrasado</b>	<b>Manteca recuperada</b>	<b>Masa no recuperada</b>	<b>% de extracción</b>
<b>1</b>	100.0240	40.7481	43.1255	16.1504	43.1152
<b>2</b>	100.0004	41.6752	43.3869	14.9383	43.3867
<b>3</b>	100.0552	40.8542	42.7069	16.4941	42.6833
<b>Media</b>		41.0925	43.0731	15.8609	43.0617
<b>Desv. Std</b>		0.5074	0.3430	0.8173	0.3547
<b>C.V.</b>		1.2%	0.8%	5.2%	0.8%

<b>Prueba</b>	<b>(g) harina</b>	<b>Peso recuperado</b>	<b>% de extracción</b>
<b>1</b>	2.5028	0.0598	2.3893
<b>2</b>	2.5004	0.0852	3.4075
<b>3</b>	2.5001	0.1177	4.7078
<b>Promedio</b>		0.0876	3.5015
<b>Desv. Std</b>		0.0290	1.1621
<b>C.V.</b>		33%	33%

**Apéndice C. Curva de calibración obtenida para la cuantificación de proteína por el método de Biuret**

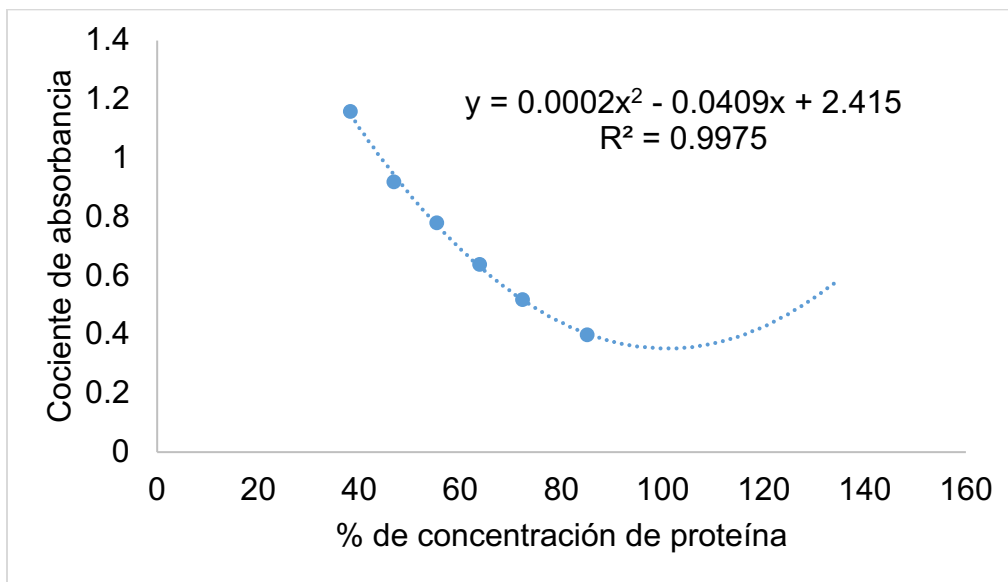


<b>Muestra</b>	<b>% de concentración (Biuret)</b>
HCPD	39.64%
HCD	49.39%
APC	84.08%
<b>ALBÚMINA 86%</b>	<b>92.19%</b>



## 9. Anexos

### Anexo A. Curva de calibración para cuantificación de proteína mediante FT-MIR-ATR (Martínez-Gómez, 2021)



## Anexo B. Comprobante de evaluación antiplagio de la tesis

Fecha de evaluación: 28 de febrero del 2023

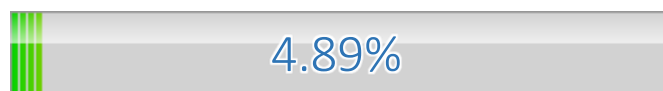
### Plagiarism Scan Result Report

#### Scanned Text

Input File	Tesis de Juan Carlos Barragán
Author	n/a
Scan Date	2023-03-01
Project	n/a
Remarks	n/a

#### Result Overview

Percentage of Copied Words / Total Words



Overview of Matching Phrases



Copied/Total	Words:	966/19771
Suspicious	Sources:	34
Accepted	Sources:	0
Excluded	Sources:	0

#### Legend and Explanations

Original Text	Text without any identified relevant online or library sources.
<u>Suspicious source</u>	Text containing identified matches in online or library sources. The text might have been paraphrased.
<u>Accepted source</u>	Text containing identified matches in online or library sources. The text might have been paraphrased.

#### Searched Sources and Settings

Maximum phrase distance	125	Searched in online sources	Yes
Minimum characters per phrase	50	Searched in library sources	Yes
Minimum characters per phrase	15	Minimal Similarity	40%