

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

**Encapsulación de Betalaínas en una Matriz de Gluteninas Aplicadas Sobre
una Película de Ácido Poliláctico Modificada y su Evaluación Como un
Sensor de pH en Alimentos**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta:

M.C. Daniela Denisse Castro Enríquez

APROBACIÓN

Por medio de la presente me permito informar a usted que he revisado y hecho las correcciones necesarias al trabajo de tesis presentado por: **Daniela Denisse Castro Enríquez** y el cual se intitula **Encapsulación de Betalaínas en una Matriz de Gluteninas Aplicadas Sobre una Película de Ácido Poliláctico Modificada y su Evaluación Como un Sensor de pH en Alimentos**, por lo que me permito dar mi **VOTO APROBATORIO** al respecto, para que se proceda a la impresión de la tesis.

Dr. Francisco Rodríguez Félix

Director de Tesis

Dra. Beatriz Montaña Leyva

Secretario

Dra. Carmen Lizette Del Toro Sánchez

Sinodal de Tesis

Dr. Josué Elías Juárez Onofre

Sinodal de Tesis

Dra. Elizabeth Carvajal Millán

Sinodal de Tesis

DERECHOS DE AUTOR

Hermosillo, Sonora a mayo de 2020

Asunto: Cesión de derechos

UNIVERSIDAD DE SONORA P R E S E N T E.

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada **Encapsulación de Betalaínas en una Matriz de Gluteninas Aplicadas Sobre una Película de Ácido Poliláctico Modificada y su Evaluación Como un Sensor de pH en Alimentos**, en los sucesivos LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de **DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

A T E N T A M E N T E



LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA

Daniela Denisse Castro Enríquez

RESUMEN

La OMS estima que cada año se enferman en el mundo 600 millones de personas por ingerir alimentos contaminados y que 420 mil mueren por la misma causa. Es por ello, que en los últimos años las investigaciones se han centrado en el desarrollo de empaques inteligentes para ayudar a contrarrestar estos efectos. Los sensores son un tipo de empaques inteligentes, que pueden detectar cambios de temperatura, humedad, oxígeno, dióxido de carbono y pH. Los sensores de pH se realizan con colorantes sintéticos que dañan al medio ambiente. Una alternativa a estos colorantes es el uso de pigmentos sensibles a cambios de pH como las betalaínas. Sin embargo, este pigmento es inestable a factores ambientales por lo que, las betalaínas requieren ser encapsuladas en nanopartículas a base de gluteninas por la técnica de electroaspersión coaxial. Con base a lo anterior, el objetivo fue estudiar la encapsulación de betalaínas en nanopartículas de gluteninas aplicadas sobre una película de PLA modificada y evaluar su aplicación como un sensor de pH en alimentos. En este estudio se optimizó la extracción de betalaínas a partir de la pulpa de pitaya (*Stenocereus thurberi*) usando la metodología de superficie de respuesta. Las variables con mayor efecto fue la temperatura y tiempo de sonicación. Se obtuvo un máximo de extracción de 2.6 ± 0.08 mg/g de betalaínas a una temperatura de 57 °C, relación de solvente de 34 mL y tiempo de sonicación de 27 minutos, partiendo de 2 g de pulpa. El extracto fue purificado por ultrafiltración y los compuestos obtenidos se identificaron por UPLC-DAD-MS, además, se determinó fenoles totales por Folin y capacidad antioxidante por ABTS y DPPH. Donde presentaron diferencias significativas entre el extracto ultrafiltrado (E/U) y sin ultrafiltrar (E/SU) en la cantidad de fenoles totales y capacidad antioxidante entre ambos radicales. Presentando mayor capacidad antioxidante y contenido fenólico el E/U. Además, en los cromatogramas se apreció una notable disminución

de compuestos fenólicos en el E/U y la identificación del ácido gálico y resorcinol; compuestos que no se habían reportado en frutos del género *Stenocereus spp.* La encapsulación de betalaínas en nanopartículas por electroaspersión coaxial presentó una eficiencia de encapsulación del $79\% \pm 0.155$. La presencia de betalaínas en el núcleo de la partícula fue confirmada por TEM y LSCM. Las nanopartículas con betalaínas presentaron un aumento en la estabilidad térmica observada por TGA, así como, por FT-IR una posible interacción física entre la matriz y las betalaínas. La modificación del PLA se realizó con polietilenglicol diglicidil éter (PEG-DE₅₀₀) al 3 % (p/v), mejorando sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas comparado con la película de PLA. Al agregar las nanopartículas con betalaínas a las películas, la Tg aumentó a 54.53 °C, así como su estabilidad térmica, las propiedades mecánicas se observaron levemente modificadas, sin embargo, los valores de ductilidad y módulo de Young fueron mucho menores a los observados para la película de PLA. Las películas de PLA modificadas y adicionadas con nanopartículas fueron aplicadas en filetes de caballa (*Scomber scombrus*) por 7 días a 4 °C. Los análisis de calidad a los filetes arrojaron principalmente una elevada peroxidación de ácidos grasos, evidenciando una nula capacidad antioxidante, sin embargo, en el análisis microbiológico se observó un efecto inhibitorio de bacterias, especialmente las gram positivas. Por lo tanto, la conclusión general de este trabajo de tesis fue que la encapsulación de betalaínas en nanopartículas a base de gluteninas aplicadas en una película de PLA modificada no logró cambiar de color con respecto al pH en contacto con el filete de caballa (*Scomber scombrus*) durante el periodo de almacenamiento sin embargo, la película presentó un efecto inhibitorio en bacterias, principalmente en gram positivas por lo cual, estas películas podrían funcionar como empaques bioactivos en alimentos.

CONTENIDO

APROBACIÓN	ii
DERECHOS DE AUTOR	iii
RESUMEN	iv
CONTENIDO	vi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABLAS	xv
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
Ácido Poliláctico (PLA)	5
Síntesis y propiedades generales del PLA	6
Propiedades físicas y químicas	8
Aplicaciones del PLA	8
Empaques de alimentos	9
Plastificación del PLA y sus propiedades mecánicas	10
Empaques activos e inteligentes en alimentos	10
Empaques activos	11
Absorbentes de humedad	11
Empaques antimicrobianos.....	12
Empaques antioxidantes	13
<i>Dispositivos antioxidantes independientes.</i>	13
<i>Materiales de empaquetamiento antioxidante.</i>	14
Empaques inteligentes	14
Indicadores o sensores.....	14
Betalainas: Descripción general y propiedades	17
Propiedades de las betalainas en los alimentos	19
Propiedades biológicas de las betalainas	20
Estabilidad de las Betalainas	21
Métodos de extracción de betalainas	23

Estabilización de betalainas.....	24
Encapsulación de betalainas.....	27
Efecto de la de matriz y la tecnología de encapsulación en la estabilidad de las betalainas..	29
Gluten de trigo.....	31
Gliadinas	31
Gluteninas	32
Electroaspersión coaxial	33
Componentes y fundamento.....	33
JUSTIFICACIÓN	35
HIPÓTESIS	35
OBJETIVOS.....	35
Objetivo general	35
Objetivos específicos	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
Materiales.....	36
Materia prima.....	36
Reactivos	36
Métodos	36
Diagrama general	36
Etapa 1.....	38
Caracterización física y química de la pitaya (<i>Stenocereus thurberi</i>)	38
Determinación del diámetro del fruto	38
Azúcares totales	38
Métodos de la AOAC (1996).....	39
<i>Humedad (AOAC 925.10)</i>	39
<i>Acidez (AOAC 935.57)</i>	39
<i>pH (AOAC 981.12)</i>	39
Color	40
Optimización de la extracción de betalainas.....	40
Cuantificación de betalainas	40
Diseño de experimentos	41

Preparación del extracto ultrafiltrado y sin ultrafiltrar de la pitaya (<i>Stenocereus thurberi</i>)	44
Identificación de fitoquímicos presentes en la pulpa de pitaya por UPLC-DAD-MS	44
Capacidad antioxidante	45
Capacidad antirradical utilizando el ensayo DPPH'	45
Capacidad antirradical utilizando el ensayo ABTS ⁺	45
Fenoles totales	47
Determinación del cambio de color de betalaínas a diferentes pH	47
Extracción de gluteninas a partir del gluten	47
Obtención de la fracción soluble de gluteninas	48
Síntesis de partículas de gluteninas por electroaspersión	48
Evaluación del solvente	48
Caracterización de las soluciones	49
<i>Concentración.</i>	49
<i>Densidad.</i>	49
<i>Viscosidad.</i>	49
Parámetros de electroaspersión	49
Síntesis de partículas por electroaspersión coaxial	50
Eficiencia de encapsulación	50
Índice de polidispersidad (IPD)	51
Estabilidad de betalaínas encapsuladas	51
Caracterización del material obtenido	51
Microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés)	51
Microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés)	52
Microscopía confocal de barrido laser (LSCM, por sus siglas en inglés)	52
Análisis termogravimétricos (TGA por sus siglas en inglés)	52
Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés)	52
Comportamiento en simulantes alimentarios de betalaínas encapsuladas	53
Elucidación del tipo y mecanismo de transporte	53
Etapas 2	56
Elaboración de película de PLA modificada utilizando la técnica de evaporación de solventes	56

Obtención de las películas de PLA modificada y la adición de partículas núcleo-coraza de betalaínas	56
Pruebas mecánicas	56
Técnicas de caracterización de películas de PLA con partículas núcleo/coraza de betalaínas	57
Microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés)	57
Calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés).....	57
Análisis termogravimétricos (TGA por sus siglas en inglés)	57
Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés).....	58
Etapa 3	58
Aplicación de películas de PLA con partículas núcleo/coraza de betalaínas en filete de caballa (<i>Scomber scombrus</i>)	58
Análisis químicos	59
Extracto Bligh and Dyer (B & D)	59
Extracto de ácido tricloroacético (TCA).....	59
Cuantificación lipídica	60
Índice de peróxidos	60
Formación de compuestos fluorescentes	60
Determinación de ácidos grasos libres.....	61
Índice de trimetilamina por el método del picrato (i-TMA).....	61
Índice del ácido tiobarbitúrico (i-TBA)	62
Análisis microbiológicos	62
Diseño experimental y análisis estadístico	63
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
ETAPA 1	64
Caracterización fisicoquímica de la pitaya (<i>Stenocereus thurberi</i>) y síntesis de partículas núcleo/coraza de betalaínas	64
Caracterización física y química de la pitaya (<i>Stenocereus thurberi</i>)	65
Optimización por metodología de superficie de respuesta	66
Efecto de las variables del proceso	70
Efecto de la temperatura	72
Efecto del tiempo de sonicación	74

Efecto de la relación de solvente	76
Determinación y validación de las condiciones óptimas	76
Efecto de la ultrafiltración del extracto de pitaya (<i>Stenocereus thurberi</i>)	79
Contenido fitoquímico	79
Capacidad antirradical ABTS ^{•+} y DPPH [•]	82
Identificación de fitoquímicos presentes en la pulpa de pitaya por UPLC-DAD-MS.....	85
Análisis de correlación entre fitoquímicos y capacidad antioxidante.....	91
Efecto del pH en el cambio de color de betalainas	93
Síntesis y caracterización de partículas de FSG por electroaspersión	96
Solvente.....	96
Concentración	98
Morfología.....	100
Voltaje	102
Velocidad de flujo.....	102
Síntesis de partículas por electroaspersión coaxial	104
Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	106
Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	108
Microscopia confocal de barrido laser (LSCM)	110
Eficiencia de encapsulación	111
Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).....	113
Análisis termogravimétrico (TGA).....	116
Estabilidad de color de betalainas encapsuladas en ausencia y presencia de luz.....	118
Cinéticas de liberación de betalainas en simulantes alimentarios	120
Elucidación del tipo y mecanismo de transporte	122
ETAPA 2	124
Desarrollo y caracterización de películas de PLA modificadas con y sin partículas núcleo-coraza de betalainas por el método de casting.....	124
Desarrollo de películas de PLA modificada	125
Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	127
Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).....	129
Análisis termogravimétrico (TGA).....	131

Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	133
Pruebas mecánicas de las películas.....	135
ETAPA 3	137
Evaluación de películas de PLA modificadas con y sin partículas núcleo-coraza de betalaínas sobre las propiedades químicas y microbiológicas de filetes de caballa (<i>Scomber scombrus</i>) .	137
Aplicación de películas PLA modificadas con y sin partículas núcleo-coraza de betalaínas	138
Evaluación de la pérdida de la calidad por análisis químico de los filetes de caballa (<i>Scomber scombrus</i>).....	140
Evaluación de la pérdida de la calidad por análisis microbiológico de los filetes de caballa (<i>Scomber scombrus</i>)	143
CONCLUSIONES	146
RECOMENDACIONES	147
REFERENCIAS	148
ANEXOS 1	177
ANEXOS 2	184

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del PLA. Fuente: Ahmed et al. 2011	7
Figura 2. Diagrama esquemático de la ruta para la obtención de betacianinas y betaxantinas .	18
Figura 3. Factores fisicoquímicos, solos y en combinación, que proporcionan inestabilidad a las betalaínas.	22
Figura 4. Esquema del sistema núcleo-coraza con ejemplos.....	28
Figura 5. Componentes básicos de electroaspersión coaxial.....	34
Figura 6. Diagrama general dividido en etapas.	37
Figura 7. Proceso de ultrafiltración para la obtención del extracto ultrafiltrado.	46
Figura 8. Caracterización física y química de la pitaya (<i>Stenocereus thurberi</i>).	68
Figura 9. Gráfico residual (a) y gráfico de normalidad Q-Q (b) para la extracción de betalaínas de pulpa de pitaya (<i>Stenocereus thurberi</i>).	71
Figura 10. Gráfico de superficie de respuesta que muestra la interacción entre la temperatura y el tiempo de sonicación (a) y su influencia sobre la célula vegetal en la extracción de betalaínas de la pitaya (<i>Stenocereus thurberi</i>) (b).	73
Figura 11. Gráfico de superficie de respuesta que muestra la interacción entre el tiempo de sonicación y la relación de solvente (a) y su influencia sobre la célula vegetal en la extracción de betalaínas de la pitaya (<i>Stenocereus thurberi</i>) (b).....	75
Figura 12. Gráfico de superficie de respuesta que muestra la interacción entre la temperatura y la relación de solvente (a) y su influencia sobre la célula vegetal en la extracción de betalaínas de la pitaya (<i>Stenocereus thurberi</i>) (b).	78
Figura 13. Capacidad antirradical $ABTS^{\cdot+}$ y $DPPH^{\cdot}$ del extracto sin ultrafiltrar (E/SU) y extracto ultrafiltrado (E/U).....	84
Figura 14. Cromatogramas de UPLC de los compuestos fenólicos presentes en extracto sin ultrafiltrar (a) y ultrafiltrado (b) a 280 nm, [eje y = intensidad (unidad de absorbancia, AU); eje x = tiempo de retención (min)]. Picos: 1, ácido ferúlico; 2, ácido gálico; 3, resorcinol y 4, catequina.....	90
Figura 15. Esquema del proceso de ultrafiltración que representa las principales moléculas presentes en el extracto de pitaya (<i>Stenocereus thurberi</i>) antes y después del proceso.	90

Figura 16. Efecto del pH sobre el cambio de color de betalaínas de la pitaya (<i>Stenocereus thurberi</i>).....	94
Figura 17. Esquema de los sitios propensos que afectan la estabilidad de betalaínas por efecto del pH.	95
Figura 18. Porcentaje de solubilidad de ácido acético y etanol al 70 % y 80 %	97
Figura 19. Esquema del efecto de la concentración, velocidad de flujo y voltaje en la morfología de partículas de FSG.	101
Figura 20. Efecto del voltaje sobre el tamaño de partículas de la FSG.....	103
Figura 21. Efecto de la velocidad de flujo sobre el tamaño de partículas de la FSG.	103
Figura 22. Micrografías de SEM de partículas núcleo-coraza de betalaínas encapsuladas por la técnica de electrospray coaxial con sus histogramas de dispersión. En el eje y = son las concentraciones de betalaínas utilizadas y en el eje X = las distancias utilizadas en la técnica de electrospray coaxial desde la punta de la aguja hasta la placa colectora. Todas las micrografías presentadas son vistas a 5000 X.....	107
Figura 23. Micrografías de SEM de la FSG vista a 300 X (a), partículas núcleo-coraza sin betalaínas vista a 5000 X con histograma de dispersión (b) y partículas núcleo-coraza con betalaínas vista a 5000 X con histograma de dispersión (c).	109
Figura 24. Micrografías de TEM de partículas núcleo-coraza sin betalaínas (a) y partículas núcleo-coraza con betalaínas (b, c).	109
Figura 25. Observaciones del microscopio confocal de barrido laser de partículas núcleo-coraza sin rodamina B (a) y partículas núcleo-coraza con rodamina B en el núcleo como en la coraza (b).....	112
Figura 26. Representación gráfica de la formación de partículas núcleo-coraza.	112
Figura 27. Espectros de FT-IR de la fracción soluble de gluteninas (FSG), partículas de FSG (P-FSG), partículas núcleo-coraza con betalaínas (P-NC-B) y betalaínas.....	115
Figura 28. Termogramas de TGA (a) y la derivada del peso (b) de la fracción soluble de gluteninas (FSG), partículas de FSG (P-FSG), partículas núcleo-coraza con betalaínas (P-NC-B) y betalaínas	117
Figura 29. Gráficas de la estabilidad de color de betalaínas encapsuladas en ausencia de luz (coaxial AL), presencia de luz (coaxial PL) y partículas de betalaínas no encapsuladas en	

ausencia de luz (convencional AL) como en presencia de luz (convencional PL) bajo condiciones de almacenamiento durante 30 días.	119
Figura 30. Comportamiento de la liberación de betalaínas encapsuladas en simulantes alimentarios.	121
Figura 31. Micrografías de SEM: (a) superficie de la película de PLA, (b) superficie de la película de PLA con PEG-DE, (c) superficie de la película de PLA-PEG-DE con partículas núcleo-coraza de betalaínas, (d) corte transversal de la película de PLA con PEG-DE y (e) corte transversal de la película de PLA-PEG-DE con partículas núcleo-coraza de betalaínas, vistas a 2000X y 200X.	128
Figura 32. Espectros de FT-IR de la película de PLA (P-PLA), solvente de PEG-DE (S-PEG-DE), película de PLA con PEG-DE (P-PEG-DE) y película de PLA modificada con PEG-DE y partículas núcleo-coraza de betalaínas (P-PNC-B).....	130
Figura 33. Termogramas de TGA (a) y la derivada del peso (b) de la película de PLA (P-PLA), película modificada con PEG-DE (P-PEG-DE), película de PLA con partículas núcleo-coraza de betalaínas (P-PNC-B).....	132
Figura 34. Fotografías de las películas modificadas con y sin partículas núcleo-coraza de betalaínas aplicadas en trozos de filetes de caballa (<i>Scomber scombrus</i>) almacenadas a 4 °C por 7 días en ausencia de luz.....	139
Figura 35. Gráficas del análisis químico de filetes de caballa (<i>Scomber scombrus</i>) almacenadas a 4 °C por 7 días: a) porcentaje de lípidos (% lípidos), b) índice de peróxidos (i-peróxidos), c) fluorescencia acuosa, d) fluorescencia orgánica, e) ácidos grasos libres (AGL), f) índice de ácido tiobarbitúrico (i-TBA) y g) índice de trimetilamina (i-TMA).	142

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los métodos de extracción convencionales y no convencionales.	25
Tabla 2. Métodos de estabilización de betalaínas: ventajas y desventajas	26
Tabla 4. Variables independientes y niveles utilizados en el diseño central compuesto.....	42
Tabla 5. Matriz de diseño experimental con resultados.	42
Tabla 6. Indicadores del mecanismo de liberación en base al valor de n.....	55
Tabla 7. ANOVA de MSR para la extracción de betalaínas de pulpa de pitaya (<i>Stenocereus thurberi</i>).	69
Tabla 8. Valores predichos y experimentales de las respuestas en condiciones óptimas obtenidos a partir de 2 g de pulpa de pitaya (<i>Stenocereus thurberi</i>).	78
Tabla 9. Contenido fitoquímico del extracto sin ultrafiltrar (E/SU) y ultrafiltrado (E/U) de pitaya (<i>Stenocereus thurberi</i>).	81
Tabla 10. Valores necesarios para inhibir el 50 % del radical DPPH [·] y ABTS ^{·+} del extracto sin ultrafiltrar (E/SU) y ultrafiltrado (E/U).	87
Tabla 11. Identificación de posibles fitoquímicos presentes en la pulpa de pitaya (<i>Stenocereus thurberi</i>) del E/SU y E/U.	88
Tabla 12. Valores de coeficientes de correlación entre la capacidad antioxidante (ABTS, DPPH) y el contenido de fitoquímicos del extracto sin ultrafiltrar (E/SU) y ultrafiltrado (E/U) de pitaya.	92
Tabla 13. Propiedades fisicoquímicas de soluciones de FSG.	99
Tabla 14. Condiciones de electrospray coaxial para la obtención de partículas núcleo-coraza a partir de gluteninas de trigo (Glut) y betalaínas (Bet).	105
Tabla 15. Número de onda de la banda amida I asignadas a la estructura secundaria de la proteína en cada una de las muestras analizadas por FT-IR.	115
Tabla 16. Datos obtenidos a partir de la ley de la potencia.	123
Tabla 17. Condiciones para la obtención de películas de PLA modificada con diferentes plastificantes por casting.	126

Tabla 18. Propiedades térmicas de las películas de PLA modificada y con la adición de partículas núcleo-coraza de betalainas.....	134
Tabla 19. Propiedades mecánicas de las películas de PLA modificada y con la adición de partículas núcleo-coraza de betalainas	136
Tabla 20. Evaluación de la actividad microbiana en filetes de caballa refrigerado y envuelto con diferentes condiciones de película.....	145

INTRODUCCIÓN

El crecimiento microbiano en los alimentos es uno de los principales factores que contribuye a las pérdidas en el mundo. Los microorganismos por efecto de su desarrollo pueden producir metabolitos secundarios ocasionando mal olor, cambios de textura y pH en los alimentos disminuyendo su vida útil y aumentando el riesgo de enfermedades transmitidas (Puligundla *et al.*, 2012). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), estima que alrededor de 1300 millones de toneladas de alimentos se pierden anualmente, valorados en más de 750 mil millones de dólares. Esta organización menciona que, con esa cantidad de dinero, se podría fácilmente alimentar a los más de 842 millones de personas que sufren hambre en el mundo.

En las últimas décadas, la comunidad científica y la industria alimentaria han mostrado interés en desarrollar medidas de seguridad alimentarias innovadoras (Cavallo *et al.*, 2014). Una de las más conocidas, es la denominada fecha de caducidad de los alimentos, misma que la industria estima considerando las condiciones de distribución y almacenamiento a la que el producto será exhibido. Sin embargo, con frecuencia los alimentos están expuestos al abuso de condiciones ambientales como temperatura, humedad, oxígeno y luz, entre otros, convirtiéndola en una predicción poco segura. Una posible alternativa a esta problemática es el uso de biosensores, con los cuales se podrá monitorear el estado de los alimentos, y así establecer si está llegando al término de su vida útil, lo que permite disminuir la cantidad de alimento que se desecha anualmente (Silvestre *et al.*, 2011; Gutiérrez *et al.*, 2016).

Un sensor es un dispositivo inteligente capaz de detectar metabolitos diana. Son capaces de indicar la frescura de los alimentos, ya que pueden detectar la formación de productos de degradación. El sensor está compuesto principalmente por dos unidades: un receptor, que reconoce un analito y un transductor que convierte las señales en una respuesta cuantitativa o cualitativa (Realini *et al.*, 2014). Existen diversos tipos de sensores, algunos que detectan dióxido de carbono (CO₂), oxígeno (O₂), temperatura ó pH en base a un cambio de color. En los últimos años, los sensores de pH han sido de los más estudiados y desarrollados, debido a su

rápida determinación, además que no requieren de instrumentación analítica costosa (Silvestre *et al.*, 2011; Yoshida *et al.*, 2014). Sin embargo, en muchos de los casos el proceso de obtención es tardado, laborioso, costoso y se utilizan colorantes poco benéficos al medio ambiente (Mills *et al.*, 2009; Puligundla *et al.*, 2012; Emin *et al.*, 2016). Un colorante que podría sustituir a los utilizados actualmente son las betalaínas.

Las betalaínas son pigmentos nitrogenados, solubles en agua y se sintetizan en dos grupos estructurales: betacianinas (proporcionan coloración rojo-violeta) y betaxantinas (coloración amarillo-naranja), en ambos grupos se encuentra presente el ácido betalámico como unidad estructural, siendo la naturaleza del residuo adicional el que determina la clasificación del pigmento (Gandía *et al.*, 2013; Cejudo *et al.*, 2014).

Una gran fuente de betalaínas son las de la pitaya del cactus (*Stenocereus thurberi*). El género *Stenocereus* es un cactus columnar nativo del continente americano, pertenece a la familia *Cactaceae* el cual, crece en zonas áridas y semiáridas, con algunas especies endémicas en el noroeste de México como *Stenocereus thurberi* (Elobeidy, 2004). Este cactus produce frutos dulces llamados pitayas, que tienen forma esférica u ovoide con espinas, y su pulpa es carnosa con semillas comestibles. La pulpa puede presentar diferentes colores, como naranja, amarillo, rojo y púrpura, lo que sugiere un alto contenido de betalaínas. Las betalaínas presentan características que son interesantes para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética como actividad antioxidante, antimicrobiana, anticancerígeno y antiinflamatorio; además, su alta capacidad tintórea (Stintzing y Carle., 2007; Cejudo *et al.*, 2014). Actualmente la principal aplicación de betalaínas es como colorante natural en alimentos, industrialmente es conocido como E-162 y la principal fuente de extracción, aprobada, es la remolacha ó betabel (Robert *et al.*, 2015).

A pesar de las propiedades interesantes que presentan, no se ha podido potencializar su uso, ni aprovechar al máximo sus beneficios, debido, a su fácil degradación a factores ambientales como pH, actividad de agua, luz, oxígeno y temperatura; siendo estos últimos factores indeseables para el desarrollo de un sensor de pH a partir de betalaínas (Anna *et al.*, 2013). Por tal motivo, la estabilidad de betalaínas podría mejorarse con tecnologías de encapsulación a

partir de matrices que reaccionen a cambios de pH, pero que a su vez presenten estabilidad a la temperatura, luz y oxígeno con el propósito de no mostrar falsos positivos.

Una de las técnicas actualmente utilizada para la encapsulación de compuestos es la electroaspersión coaxial. Con esta técnica se pueden producir sistemas núcleo-coraza presentando múltiples ventajas con respecto a otras técnicas como son: secado por pulverización, emulsión, nanoprecipitación y electroaspersión convencional, entre otras (Cárdenas *et al.*, 2004; Galloway *et al.*, 2008). Lo anterior es porque se producen partículas con una alta eficiencia de encapsulación y no requiere de un proceso de separación para la eliminación de productos no deseables. Convirtiéndola en una técnica apta para producir sistemas núcleo-coraza (Gómez *et al.*, 2012). Con este tipo de sistemas, las betalaínas pueden ser incorporadas en el núcleo protegidas por una matriz más estable.

En la actualidad se han utilizado diversas matrices para encapsular las betalaínas, y una de las más reportadas hasta el momento ha sido la maltodextrina. Sin embargo, a pesar de las combinaciones con otros biopolímeros sigue presentando desventajas como alta higroscopicidad y sabor característico (Saenz *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2015). Anteriormente, nuestro grupo de trabajo desarrollo y caracterizó microesferas de gluteninas de bajo peso molecular, con aplicación como sistema de liberación controlada de urea. Las micropartículas presentaron insolubilidad en agua, estabilidad térmica mayor a 100 °C y solubilidad a pH extremos (ácidos ó alcalinos). Por lo que, las gluteninas de bajo peso molecular podrían ayudar a mantener la estabilidad requerida por las betalaínas formando la coraza que las proteja de factores externos indeseables (Castro Enríquez *et al.*, 2015).

En la elaboración del sensor se requiere de un soporte sólido que contenga a las betalaínas encapsuladas, y que sea adecuado para estar en contacto con los alimentos. El ácido poliláctico (PLA) es un biopolímero sintetizado químicamente a partir del ácido láctico obtenido por fermentación de fuentes renovables como el maíz, remolacha, trigo y otros productos con almidón o azúcares (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2016). Está clasificado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) y por la Comisión Europea como un material GRAS (generalmente reconocido como seguro) para su

uso en contacto con alimentos (Ruíz-Cabello *et al.*, 2015; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2016; Mistriotis *et al.*, 2016; Wen *et al.*, 2016). Por estas razones, el PLA podría ser un excelente material para la producción de un sensor que esté en contacto con el alimento, no obstante, es demasiado rígido y quebradizo para la aplicación en este tipo de sistemas. Una alternativa, es la adición de plastificantes que reduzcan las fuerzas intermoleculares y aumenten la movilidad de las cadenas poliméricas del PLA, mejorando así su flexibilidad (Marcos *et al.*, 2014; Herrera *et al.*, 2016). Por lo que, en el presente trabajo de tesis, se propone la encapsulación de un colorante natural como las betalainas, para el desarrollo de un sensor que detecte cambios de pH en los alimentos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Hoy en día uno de los principales problemas que preocupa a nivel mundial es la pérdida de alimentos. Debido a que afecta a la seguridad alimentaria, la calidad e inocuidad, al desarrollo económico y al medio ambiente. Además, conlleva al desperdicio de recursos utilizados en la producción, como tierra, agua, energía e insumos. También al producir alimentos que no van a consumirse crea emisiones innecesarias de CO₂ (FAO, 2012). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), estima que un tercio de los alimentos producidos para el consumo humano se pierde a nivel mundial, lo que equivale a 1300 millones de toneladas por año. Debido a esta problemática, la misma organización ha lanzado una iniciativa a nivel mundial conocida como “SAVE FOOD” la cual tiene por objetivo evitar las pérdidas de alimentos. Por lo que, la seguridad alimentaria es una prioridad mundial y uno de los principales objetivos de la legislación alimentaria actual.

La pérdida de alimentos a causa del crecimiento microbiano produce cambios fisicoquímicos en los alimentos y la disminución de la vida útil (Puligundla *et al.*, 2012). Incluso, es una de las principales fuentes de enfermedades transmitidas por los alimentos (Ghaani *et al.*, 2016). Es por ello, que la comunidad científica está en la búsqueda de nuevas tecnologías que ayuden a contrarrestar esta problemática. Una de las formas que actualmente se está investigando es el desarrollo de empaques activos e inteligentes con el objetivo de extender la vida útil de los alimentos, permitiendo la reducción de su desperdicio. Actualmente se utilizan diversos polímeros naturales y sintéticos para el desarrollo de empaques de alimentos, sin embargo, debido a cuestiones ambientales se prefiere el uso de polímeros biodegradables como el ácido poliláctico.

Ácido Poliláctico (PLA)

Los biopolímeros en los últimos años han atraído gran atención para el reemplazo de los polímeros sintéticos los cuales están hechos a base de petróleo. El ácido poliláctico (PLA) o también llamado como poliláctida (Figura 1) es un poliéster alifático biodegradable que se produce a partir de la fermentación de recursos renovables como polisacáridos o azúcares

extraídos del maíz, desechos de la caña, remolacha azucarera, papa, entre otros., lo que permite que el PLA sea biodegradado en compostaje por los microorganismos (Vink y Davies, 2015).

Síntesis y propiedades generales del PLA

El monómero del PLA es el ácido láctico, que se produce por la fermentación de azúcares. El ácido láctico tiene dos formas ópticamente activas ácido L- láctico y ácido D-láctico debido a un átomo de carbono asimétrico. El PLA se puede obtener mediante policondensación o por polimerización por apertura de anillo a partir de lactida (diéster cíclico del ácido láctico). A partir de la polimerización con lactida son posibles tres formas: la LL-lactida hecha de dos L-lactatos, la DD-lactida de dos D-lactatos y la DL o meso-lactida la cual está hecha a partir de una combinación de una L y D-lactato (Saeidlou *et al.*, 2012). Por lo que, el PLA puede existir en tres formas estereoquímicas: poli (L-láctido) (PLLA), poli (DL-láctido) (PDLLA) y poli (D-láctido) (PDLA). La síntesis de PLA se divide principalmente en polimerización química y biológica (Tokiwa y Jarerat, 2004). Las formas de polimerización del PLA más utilizadas son la polimerización directa y la polimerización por apertura de anillo mencionada anteriormente (Saeidlou *et al.*, 2012). Sin embargo, en la polimerización directa el rendimiento es menor.

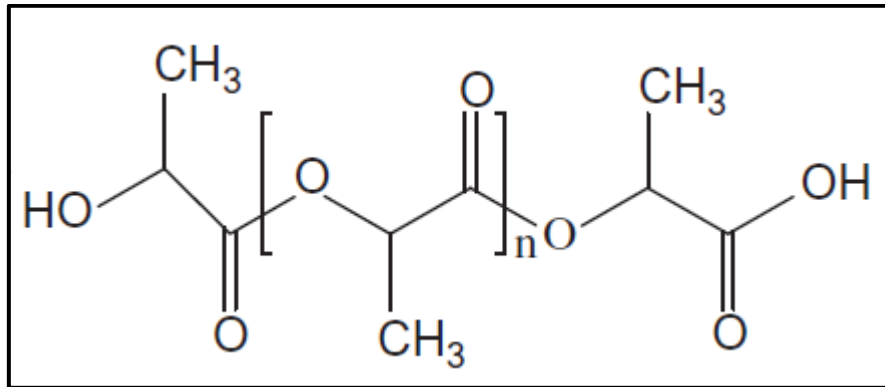


Figura 1. Estructura química del PLA. Fuente: Ahmed *et al.* 2011

Propiedades físicas y químicas

Entre las diversas poliláctidas que se pueden obtener, las poliláctidas ópticamente puras son poli (L-lactida) (PLLA) y la poli (D-lactida) (PDLA), los cuales difieren en sus velocidades de degradación, propiedades físicas y mecánicas. El PLLA tiene un punto de fusión de 170-183 °C y una temperatura de transición vítrea de 55-65 °C, mientras que PDLA tiene una Tg de 59 °C (Ahmed *et al.*, 2009). La densidad del PLLA y PDLA es de 1.25-1.29 y 1.27 g/cc respectivamente. El PLLA es cristalino, por lo que tienen una estructura más ordenada y compacta y, por lo tanto, con un módulo de Young alto, bajo porcentaje de elongación y esto le proporciona un mayor tiempo de vida útil, mientras que el PLDA es totalmente amorfo. Las propiedades mecánicas dependen principalmente del peso molecular, cristalinidad, método de producción y de las condiciones de procesamiento. La resistencia a la flexión del PLLA aumenta de 64 a 106 MPa al aumentar el peso molecular de 23 a 67 kDa, pero la resistencia a la tensión se mantiene a 59 MPa (Perego *et al.*, 1996). El PDLA cuando el peso molecular se incrementa de 47.5 a 114 kDa la resistencia a la tensión y flexión aumenta 49-53 MPa y 84-88 MPa respectivamente (Tsuji, 2002). Como ya se observó anteriormente las propiedades del PLA varían dependiendo de la relación y la distribución de los dos isómeros y el peso molecular del polímero. El comportamiento de cristalización del PLA depende del historial térmico, la cantidad y el tipo de aditivos, la distribución de la secuencia de sus isómeros, además, la cristalización depende de la pureza óptica (Marariu y Dubois, 2016). Esta propiedad es importante ya que puede influir fuertemente en las propiedades físicas del polímero (Perego *et al.*, 1996). El PLLA tiene una cristalinidad de alrededor del 37 %, una temperatura de fusión entre 173-178 °C y un módulo de elasticidad entre 2.7 a 16 GPa.

Aplicaciones del PLA

Existen diferentes razones como económicas, de salud y seguridad por lo cual los productos plásticos biodegradables se están estableciendo como alternativas viables para diversas aplicaciones. Algunos de estos se encuentran en el área de medicina, textil, higiene y agricultura, así como en empaques de alimentos.

Empaques de alimentos

La preocupación a nivel mundial del uso de plásticos basados en petroquímicos como el polietilentereftalato (PET), cloruro de polivinilo (PVC), polietileno (PE), poliestireno (PS) y poliamida (PA) ha generado interés en los materiales ecológicos o biodegradables para el desarrollo y utilización en empaques para alimentos (Urayama *et al.*, 2003). Los envases biodegradables o ecológicos deben de cumplir requisitos básicos para ser candidatos ideales para los alimentos, que incluyen propiedades de barrera, propiedades ópticas, resistencia, propiedades químicas, resistencia a la temperatura y sobre todo siguen la seguridad alimentaria.

El PLA ha ganado atención en la última década como material de envasado de alimentos por que puede obtenerse fácilmente a partir de recursos renovables, su producción consume dióxido de carbono, puede ser reciclado, compostado y sus propiedades físicas y mecánicas pueden adaptarse dependiendo del tipo de alimento (Siracusa *et al.*, 2008; Haugaard *et al.*, 2002). El PLA ha sido aprobado para estar en contacto con los alimentos por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés). Debido a esto, el PLA se está usando actualmente para el envasado de alimentos específicamente de corta vida útil, como son los envases para beber, envoltorios de ensaladas y blíster (Plackett *et al.*, 2006), por lo tanto, el PLA se está tomando como un material de envasado de alimentos “verde”. El PLA presenta ventajas por su carácter ecológico, biocompatible, procesable y económico; mientras que sus desventajas son bajo porcentaje de elongación, fragilidad e hidrofobicidad (Rasal *et al.*, 2010), sin embargo, estas ventajas y desventajas son muy relativas ya que van a depender principalmente de su aplicación. Actualmente, existen numerosos estudios sobre la modificación del PLA utilizando plastificantes o la adición de nanomateriales con el objetivo de modificar las propiedades del PLA como su rigidez.

Plastificación del PLA y sus propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas del PLA se han estudiado ampliamente. Los parámetros mecánicos del PLA indican que es un material quebradizo con una resistencia a la tensión de 32 MPa, un alto módulo de Young de 2.3 GPa y un bajo porcentaje de elongación de 5% (Auras *et al.*, 2005). Los valores de resistencia a la tensión para el PLA son similares a los que presenta en PS bajo las mismas condiciones, pero inferiores a los del PET (Ahmed *et al.*, 2009). La temperatura de fusión (Tf) y la Tg del PLA son significativamente más bajas que el PET y PS lo que mejora la capacidad de sellado y procesamiento térmicos del PLA. Debido a que el PLA es rígido y quebradizo con baja capacidad de deformación plástica es necesaria su plastificación para producir películas más flexibles (Bhardwaj y Mohanty, 2007). Algunos autores han estudiado la adición de diferentes tipos de plastificantes principalmente el polietilenglicol (PEG), propilenglicol (PP) entre otros a diferentes pesos moleculares, sobre sus propiedades mecánicas y térmicas. Todos ellos coinciden en que se observa una disminución de la Tg, Tf, así como de su cristalinidad a menos peso molecular del plastificante utilizado y a menos concentración de este. Además, que se mejora la capacidad de deformación plástica, disminuyendo el módulo Young y el esfuerzo a la tensión (Auras *et al.*, 2005; Ljungberg y wesslen, 2002; Pillin *et al.*, 2006; Kulinski *et al.*, 2006). Debido a las características antes mencionadas del PLA, en los últimos años se han desarrollado empaques a base de PLA con características antioxidantes, antimicrobianas y como indicadores de frescura en alimentos (Van Aardt *et al.*, 2007; Jin y Zhang, 2008; Turalija *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017; Radusin *et al.*, 2019; Iglesias *et al.*, 2019; Khalil *et al.*, 2018). Estos empaques se conocen como empaques activos e inteligentes los cuales son una promesa para reducir la pérdida de alimentos.

Empaques activos e inteligentes en alimentos

El empaquetado es uno de los principales procesos para preservar la calidad de los alimentos para su transporte, almacenamiento y uso final. Disminuye el deterioro de la calidad y hace que la distribución y el marketing sean más eficientes. El empaquetado tiene cuatro funciones que

son básicas: protección, comunicación, conveniencia y contención (Han, 2005). La entrega segura y la preservación de los alimentos empaquetados antes del consumo son los principales objetivos en toda la cadena de suministro de alimentos. Sin embargo, la pérdida de la calidad de los alimentos ocurre durante la distribución y almacenamiento debido a la degradación biológica, química y física (Han, 2014). Recientemente dos conceptos han contribuido en gran medida a lograr conocimientos avanzados sobre el empaquetamiento para alimentos más seguros y saludables: Empaque activo y empaque inteligente.

Empaques activos

El empaque activo es una de las tecnologías innovadoras que se ha introducido en respuesta a los cambios en las demandas del consumidor y las tendencias del mercado (Vermeiren *et al.*, 1999). Los empaques activos se basan en la incorporación de ciertos componentes al empaque que pueden liberar o absorber sustancias del alimento envasado o del medio ambiente para prolongar la vida útil y mantener la calidad, la seguridad y las características sensoriales del alimento (Camo *et al.*, 2008). Dentro de los principales empaques activos se encuentran los absorbentes de humedad, antimicrobiano y los empaques antioxidantes.

Absorbentes de humedad

El exceso de agua desarrollado dentro del empaque producido naturalmente por los alimentos promueve el crecimiento microbiano, lo que da como resultado pérdidas de calidad y reducción de la vida útil. Una forma de controlar el exceso de agua en el empaque de alimentos es usar absorbentes de humedad (Ozdemir *et al.*, 2004). Los sistemas de absorción de humedad más comunes consisten en polímeros absorbentes que se encuentran entre dos capas de un polímero microporoso. Este material se utiliza como almohadillas absorbentes que se encuentran típicamente en productos como carnes y pescados frescos (Kerry *et al.*, 2006).

Empaques antimicrobianos

El crecimiento microbiano acelera los cambios en el aroma, color y textura de los alimentos, lo que reduce la vida útil y aumenta el riesgo de enfermedades transmitidas por los alimentos. El desarrollo de empaques antimicrobianos presenta un enfoque prometedor para controlar activamente el crecimiento de microorganismos principalmente en alimentos cárnicos como la carne roja, pescado y pollo ya que proporcionan nutrientes excelentes para el crecimiento de microorganismos, por lo tanto, se debe prestar atención para minimizar la proliferación bacteriana para entregar productos sanos y seguros al consumidor (Kerry, 2014). Uno de los principales microorganismos deteriorantes son *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* y *Escherichia coli* las cuales, son motivo de gran preocupación ya que provocan deterioro de la calidad y problemas de seguridad alimentaria (Jayasena y Jo, 2013). El objetivo del uso de empaques activos con capacidad antimicrobiana son prolongar la vida útil y garantizar la seguridad alimentaria. Existen cuatro categorías básicas de empaques antimicrobianos (Coma, 2008): 1) Incorporación de sustancias antimicrobianas en un sobre, bolsa o almohadilla dentro del empaque. Estos pueden producirse mediante la generación de compuestos antimicrobianos in situ con posterior liberación (Ontoni *et al.*, 2016). 2) Incorporación directa de los antimicrobianos en la película del empaque. Esto se puede lograr mediante técnica de elaboración de películas con tratamiento térmico o sin tratamiento térmico, sin embargo, el tratamiento térmico produce pérdidas de compuesto bioactivo en comparación con métodos no térmicos como electrohilado, evaporación de solventes (Sung *et al.*, 2013). Los antimicrobianos se liberarán gradualmente desde el empaque hasta la superficie del alimento para inhibir el crecimiento de microorganismos. 3) Recubrimiento de envases con una matriz que actúa como transportador de agentes antimicrobianos para que los agentes se puedan liberar en la superficie de los alimentos mediante evaporación a partir de sustancias volátiles o migración a los alimentos mediante difusión. Esta matriz puede ser una película de plástico como el ácido poliláctico (PLA) o cualquier otro material inocuo para alimentos, como cera o polisacáridos que incorporan antimicrobianos y están directamente recubiertos en el alimento. 4) Uso de polímeros que son intrínsecamente antimicrobianos. Dos ejemplos de estos polímeros utilizados en el envasado de alimentos y recubrimientos son quitosano y poli-L-lisina. Las aminas cargadas de los polímeros interactúan

con cargas negativas en la membrana celular de los microorganismos que causan la fuga de constituyentes intracelulares y luego se produce la muerte celular (Goldberg *et al.*, 1990).

Se han probado diversos agentes antimicrobianos como etanol, dióxido de carbono, iones de plata, dióxido de cloro, antibióticos, bactericidas, ácidos orgánicos, aceites esenciales y especias con el fin de inhibir el crecimiento de microorganismos en los alimentos (Lian y Yue, 2013). También se han utilizado extractos de plantas, péptidos y nisina como agentes antimicrobianos (Arvanitoyannis y Stratakos, 2012). Los puntos clave que se deben considerar en la aplicación de empaques activos antimicrobianos son las sustancias antimicrobianas, impacto mínimo en las propiedades visuales y sensoriales del producto empaquetado. Por ejemplo, aunque los aceites esenciales son prometedores por su efecto antimicrobiano, los efectos organolépticos negativos debido a su intenso aroma limitan su aplicación (Tornuka *et al.*, 2015). Las nuevas tecnologías como la encapsulación podrían ayudar a mejorar la calidad sensorial en la utilización de aceites.

Empaques antioxidantes

Los altos niveles de oxígeno en el empaquetado de alimentos pueden facilitar la oxidación de lípidos, desarrollo de olores, sabores extraños, cambios de color y pérdidas nutricionales. La oxidación de los lípidos no solo da como resultado el desarrollo de rancidez, sino también la formación de aldehídos tóxicos y la pérdida de la calidad nutricional debido a la degradación de ácidos grasos poliinsaturados (Gómez-Estaca *et al.*, 2014). Por lo tanto, el control de los niveles de oxígeno en el empaquetado es importante para limitar la velocidad de dichas reacciones de deterioro. Los sistemas de empaquetamiento antioxidantes se pueden clasificar en dos grupos: 1) dispositivos antioxidantes independientes y 2) materiales de empaquetamiento antioxidantes (Gómez-Estaca *et al.*, 2014).

Dispositivos antioxidantes independientes. – Estos pueden ser saquitos, almohadillas o etiquetas que contienen eliminadores de oxígeno. Los cuales, se separan del alimento y se agregan al empaque convencional. El polvo de hierro y óxido ferroso son los eliminadores de oxígeno más

comunes a un que también se ha utilizado ácido ascórbico, sulfitos, catecoles, ligandos y enzimas como la glucosa oxidasa (Brody *et al.*, 2008).

Materiales de empaquetamiento antioxidante. – El agente activo se incorpora en las paredes de la película del empaque liberando compuestos antioxidantes a los alimentos. El procedimiento de fabricación se selecciona teniendo en cuenta el tipo de polímero y las características de los agentes antioxidantes. Si la actividad antioxidante del material se basa en un proceso de migración al alimento, los compuestos antioxidantes liberados deben permitirse como aditivos alimentarios y cumplir con las regulaciones apropiadas en términos de su concentración máxima permisible (Gómez-Estaca *et al.*, 2014). Los antioxidantes naturales más comunes son los tocoferoles, aceites esenciales y los extractos vegetales como el romero, orégano y el té verde (Yang *et al.*, 2016).

Empaques inteligentes

La comisión europea los define como materiales y artículos inteligentes en contacto con alimentos como aquellos materiales y artículos que supervisan el estado de los alimentos empaquetados o el entorno que los rodea (Comisión de las comunidades europeas, 2004). Otra definición que proponen Yam *et al.* 2005, es que son un sistema de empaque que es capaz de llevar a cabo funciones inteligentes (detección, registro, comunicación) para facilitar la toma de decisiones para extender la vida útil, mejorar la seguridad, calidad, proporcionar información y advertir sobre posibles problemas. Por lo tanto, se puede decir que un empaque inteligente es aquel que monitorea la condición de la calidad, seguridad de un producto alimenticio y puede proporcionar una advertencia temprana al consumidor o fabricante de alimentos. Los términos de empaque inteligente y activo no son mutuamente excluyentes, ya que hay algunos sistemas de envasado que pueden clasificarse como ambos (Yam *et al.*, 2005).

Indicadores o sensores

Los indicadores informan sobre un cambio producido en un producto o su entorno mediante cambios visuales y un sensor es un dispositivo capaz de detectar, registrar y transmitir

información relacionada con la formación de productos de degradación de los alimentos con gran precisión (Yam *et al.*, 2005). Existen diferentes tipos de indicadores y sensores que pueden detectar diferentes analitos identificados por cambios visuales de color. Ejemplo, **1) indicador de temperatura:** la temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que determinan la conservación de alimentos, ya que las variaciones de temperatura durante la vida útil de los alimentos pueden comprometer la seguridad y la vida útil de los productos alimenticios perecederos como los alimentos basados en pescado, pollo y carnes. Estos son herramientas efectivas diseñadas para el monitoreo continuo del historial de la temperatura de productos refrigerados y congelados a lo largo de la cadena (Lee y Rahman, 2014). Los indicadores de temperatura ofrecen un cambio visualmente de color cuando el alimento ha estado a temperaturas fuera de su rango ideal de almacenamiento y este proceso se acelera al aumentar la temperatura (Galan y Su, 2008). Estos indicadores permiten el monitoreo continuo de las condiciones de almacenamiento. Por lo tanto, pueden informar sobre la interrupción de la cadena de frío y pueden usarse como indicadores indirectos de la vida útil y algunos de ellos se basan en procesos físicos, químicos, enzimáticos o biológicos (Kerry *et al.*, 2006). **2) indicadores de integridad:** Estos son los indicadores de tiempo que brindan información sobre cuánto tiempo lleva abierto un producto. La etiqueta se activa al momento del consumo, cuando el sello se rompe, dispara un temporizador y experimenta cambio de color con el tiempo (Timestrip, 2012). Otros indicadores de integridad están los de gas, estos funcionan como indicadores que brindan información sobre la integridad del empaque en toda la cadena de distribución y entre los diversos indicadores de gas están los de oxígeno que son uno de los más estudiados específicamente en aplicación para carnes (Yam *et al.*, 2005). **3) indicadores y sensores de frescura:** Los indicadores de frescura indican la calidad del alimento empaquetado al reaccionar a los cambios que tienen lugar en el producto alimenticio como resultado del crecimiento microbiano o el metabolismo, brindando información directa sobre la calidad del producto (Smolander, 2008). Los cambios químicos que ocurren en productos como carne, pollo y pescado durante el almacenamiento son indicadores de la frescura (Arvanitoyannis y Stratakos, 2012). Los sistemas inteligentes de envasado para controlar la frescura de los alimentos se encuentran como indicadores de frescura basados en una detección indirecta de metabolitos a través de indicadores de color o basados en la detección directa de metabolitos diana utilizando sensores. Los sensores son sistemas inteligentes capaces de detectar metabolitos

diana que pueden incorporarse al empaque. Son capaces de controlar la frescura de los alimentos de una manera más específica que los indicadores de frescura, ya que pueden detectar la formación de productos de degradación y pueden diseñarse de acuerdo con el tipo de alimento (Wang *et al.*, 2006).

Una variedad de indicadores y sensores de frescura capaces de monitorear los cambios químicos que ocurren durante la vida útil de los alimentos se han presentado en la literatura científica. La mayoría de los conceptos se basan en un cambio de color de la etiqueta debido a la presencia de metabolitos derivados del crecimiento microbiano (Smolander, 2008). Entre ellos encontramos los basados en cambios de pH que se correlacionan con la producción de algunos metabolitos específicos como la producción de aminas biogénicas, producción de trimetilamina que se pueden correlacionar entre si con cambios de pH (Yoshida *et al.*, 2014). Pacquit *et al.* 2007, desarrollaron un indicador colorimétrico basado en un colorante capaz de identificar aminas volátiles como indicador del deterioro en pescados. El indicador se preparó atrapando dentro de una matriz de polímero un colorante sensible al pH que respondía a través de cambios de color visibles a la formación de aminas volátiles y la respuesta también se correlacionó con el conteo viable total y el crecimiento de *Pseudomonas spp.* Utilizando el mismo principio, otros autores diseñaron una variedad de indicadores de frescura para la carne de pescado y aves basándose en el aumento del pH (Kuswandi *et al.*, 2012; Kuswandi *et al.*, 2014). Pospiskova *et al.* 2012, desarrollaron un sensor para la detección de aminas biogénicas, que son compuestos básicos de nitrógeno formados principalmente por la descarboxilación de aminoácidos o por aminación y transaminación de aldehídos y cetonas generados por el metabolismo microbiano.

Como se mencionó anteriormente la mayoría de los indicadores y sensores de frescura se basan por un cambio de color visible. Los más utilizados para el envasado de carnes son los colorantes de pH que cambian de color como el azul de bromotimol, azul de xilenol, púrpura de bromocresol, verde de bromocresol, rojo de cresol, rojo de metilo, rojo de fenol y alizarina (Horan, 2000). En su mayoría son colorantes sintéticos que son poco benéficos para el medio ambiente, por lo que se propone el desarrollo de estos sistemas, pero con pigmentos naturales tales como las betalainas.

Betalainas: Descripción general y propiedades

Las betalainas son pigmentos vacuolares hidrófilos que se acumulan en las hojas, raíces, tallos, frutos, flores, brácteas, pecíolos y semillas de plantas del orden Caryophyllales. La única excepción a este orden son las familias Caryophyllaceae y Molluginaceae, aquí el color se debe a las antocianinas (Gandía y García 2013). Las betalainas en la década de 1950 fueron denominadas antocianinas nitrogenadas; no fue sino hasta años más tarde que se proporcionó evidencia de que se trataba de un conjunto de pigmentos diferentes de los de las antocianinas (Piantelli et al. 1964^a; Miller et al. 1968; Impellizzeri y Piattelli, 1972). Fue entonces cuando Mabry y Dreiding en 1968 acuñaron el término "betalainas".

Las betalainas se sintetizan naturalmente a partir del aminoácido tirosina en dos grupos estructurales principales: betacianinas y betaxantinas, el ácido betalámico es su precursor biosintético. Las betacianinas exhiben un color rojo violeta con una longitud de onda máxima de absorción (λ_{\max}) de 541 ± 9 nm, y su estructura básica consiste en la condensación de ácido betalámico con el ciclo DihidrOxyPhenylAlanine (DOPA). Además, las betaxantinas muestran un color amarillo anaranjado con una λ_{\max} de 471.5 ± 13.5 nm y su estructura consiste en la conjugación de ácido betalámico con aminoácidos o aminas (Figura 2) (Strack *et al.* 2003; Khan *et al.* 2015). Hasta la fecha, se han identificado alrededor de 70 betalainas en la naturaleza, que comprenden aproximadamente 50 betacianinas y 20 betaxantinas. Se pueden encontrar en frutas y semillas como la remolacha (*Beta vulgaris*), amaranto (*Amaranthus spp.*), tuna (*Opuntia spp.*), pitaya (*Stenocereus spp.*), entre otros (Cai *et al.* 2005; Stintzing *et al.* 2007).

Las investigaciones sobre betalainas han sido pocas, en comparación con las antocianinas, debido a su presencia limitada en la naturaleza. Sin embargo, el estudio de las betalainas ha aumentado en los últimos 15 años, generando más conocimiento sobre su biosíntesis, estructuras y propiedades. La importancia de la investigación sobre betalainas reside principalmente en sus propiedades, como la solubilidad en agua, la intensidad del color y sus propiedades antioxidantes, antibacterianas y anticancerígenas (Stintzing y Carle 2007; Cejudo *et al.* 2014). Por lo tanto, los investigadores en las áreas de medicina y alimentación han mostrado interés en estudiar las betalainas y su posible uso.

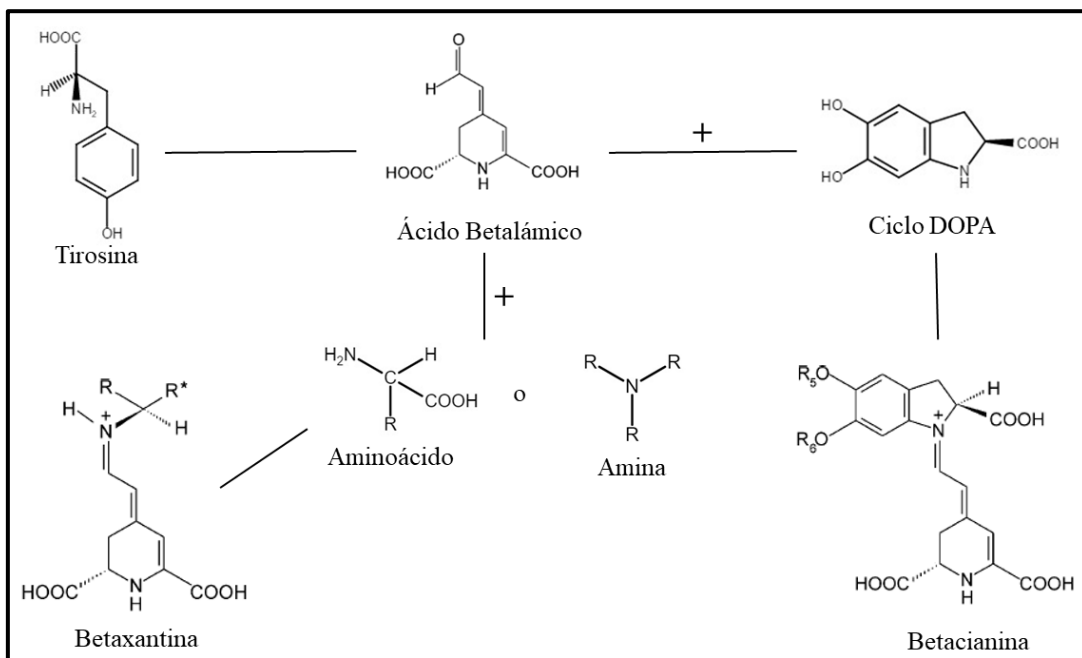


Figura 2. Diagrama esquemático de la ruta para la obtención de betacianinas y betaxantinas

Propiedades de las betalaínas en los alimentos

En la actualidad, con el avance del estudio de las betalaínas, sus posibles aplicaciones se han diversificado. Una de las principales aplicaciones es su uso como colorantes naturales. El uso de colorantes naturales en los alimentos ha crecido, debido a la alternativa que representa al uso de colorantes artificiales, que presentan efectos nocivos para la salud. Las betalaínas son los colorantes naturales más utilizados en los alimentos (Obón *et al.* 2009). La principal fuente de betalaínas son las remolachas rojas; sin embargo, la desventaja de usar betalaínas extraídas de la remolacha roja es el olor a tierra debido a la geosmina y las pirazinas, que son inevitables cuando se aplican en alimentos a altas concentraciones (Stintzing *et al.* 2000). Por lo tanto, se necesitan nuevas fuentes de betalaínas para su aplicación en los alimentos. Algunas fuentes de betalaínas, han sido de gran interés para los científicos de alimentos desde un punto de vista tecnológico y nutricional, incluyen las frutas de amaranto y cactus, que revelan un gran potencial para el empleo como colorantes naturales (Cai *et al.* 2003; Moßhammer *et al.* 2005; Robert *et al.* 2015).

Otra contribución importante de las betalaínas ha sido el desarrollo del envasado de alimentos con polímeros naturales. Estos proporcionan propiedades al envasado de alimentos, como el color, la capacidad antioxidante, la estabilidad en términos de fotodegradación y una mayor flexibilidad (Akhtar *et al.* 2012; Gutiérrez *et al.* 2015). Las betalaínas, además de usarse como colorantes, pueden favorecer las propiedades fisicoquímicas del envasado de alimentos y proporcionar un valor añadido. La relevancia de las betalaínas en los alimentos y sus propiedades ha aumentado el interés de los científicos por seguir buscando formas de incorporarlos a los alimentos y promover la salud humana (Choo.2017).

Propiedades biológicas de las betalaínas

Las betalaínas presentan propiedades benéficas para la salud, principalmente por su actividad antioxidante, antimicrobiano y anticancerígena (Vulic *et al.*2013; Gandía Herrero *et al.*2016; Khan 2016; Belhadj *et al.*2017; Miguel 2018; Yong *et al.*2018). Las betalaínas muestran una fuerte actividad antioxidante, hasta 7 veces mayor que la vitamina C, que es un antioxidante natural muy eficaz y hasta 3-4 veces mayor que el ácido isoascórbico o la catequina (Cai *et al.* 2003). La actividad antioxidante de las betalaínas se ha estudiado a partir de diversas fuentes, como frutas, hojas, flores y semillas. Sin embargo, no todas las fuentes de betalaínas presentan la misma actividad antioxidante debido al número y la posición de los grupos hidroxilo e imino, además de la glicosilación de agliconas en la estructura de las betalaínas (Cai *et al.* 2003).

Las betalaínas debido a su efecto activo contra los radicales libres pueden prevenir la aparición de cáncer. La literatura ha informado su efecto antiproliferativo sobre el carcinoma de colon humano, mostrando que las betalaínas pueden detener e inhibir eficientemente el ciclo celular de las células cancerosas (Serra *et al.* 2013). Además, se han probado en células de cáncer de ovario, células inmortalizadas de epitelio cervical y células de cáncer de cuello uterino, presentando un efecto inhibitorio significativo del 40-60% (Zou *et al.* 2005). Otra propiedad menos estudiada es el efecto antimicrobiano de las betalaínas. Se ha informado que las betalaínas exhiben propiedades antipalúdicas, siendo capaces de quelar los cationes interiores esenciales y bloquear el transporte de parásitos intracelulares (Hilou *et al.* 2006). Además, las betalaínas han mostrado efectos inhibitorios contra bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium*, entre otras, además de bacterias Gram positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes* (Canadanovic *et al.* 2011; Tenore *et al.* 2011; Tenore *et al.* 2011; Tenore *et al.* 2011; Tenore *et al.* 2012). Aunque se sabe que las betalaínas muestran efectos antimicrobianos, la literatura ha informado muy poco sobre su mecanismo de inhibición, por lo tanto, puede ser un tema de oportunidad para futuras investigaciones. A pesar de las interesantes propiedades alimenticias y médicas que exhiben las betalaínas, una de las principales limitaciones que impiden su uso

potencial ha sido su inestabilidad. Por lo tanto, en los últimos años, varios estudios han buscado formas de estabilizarlos y aumentar sus aplicaciones comerciales.

Estabilidad de las Betalaínas

Existen varios factores que afectan la estabilidad de las betalaínas y deben considerarse para garantizar sus propiedades. La estabilidad de las betalaínas está influenciada por factores físicos como temperatura, luz, oxígeno, alta actividad de agua, así como por cambios de pH < 3 o > 7 (Stintzing y Carli 2007; Cejudo *et al.* 2014). Estos factores que comprometen la estabilidad de las betalaínas por sí solos, no influyen en gran medida en su degradación, excepto por la actividad de agua, que es un factor importante debido a las reacciones hidrolíticas. Se ha demostrado que la temperatura, el oxígeno, la luz y el pH actúan en sinergia, favoreciendo una mayor degradación de las betalaínas (Figura 3) (Azeredo 2009; Reshmi *et al.* 2012). Además, se ha observado que la estructura también es importante en la estabilidad. Por ejemplo, los grupos estructurales de betacianinas y betaxantinas muestran diferentes estabilidades. Las betacianinas exhiben mayor estabilidad a la temperatura, pH ácido y son menos propensas a la oxidación que las betaxantinas, pero las betaxantinas muestran una mayor estabilidad a pH 7 y a las enzimas hidrolíticas. La mayor estabilidad de las betacianinas respecto a las betaxantinas puede deberse al hecho de que algunas de ellas tienen una estructura glucosilada, que tiene un alto potencial de reducción de la oxidación (Herbach *et al.* 2006; Azeredo 2009).

Debido a la fácil degradación de las betalaínas, el objetivo del estudio en los últimos años se ha basado en encontrar formas de estabilizarlas para aumentar sus aplicaciones comerciales y aprovechar sus beneficios. La literatura ha informado del uso de aditivos, como antioxidantes, agentes quelantes y la encapsulación, este último representa un método prometedor para la estabilización de las betalaínas.

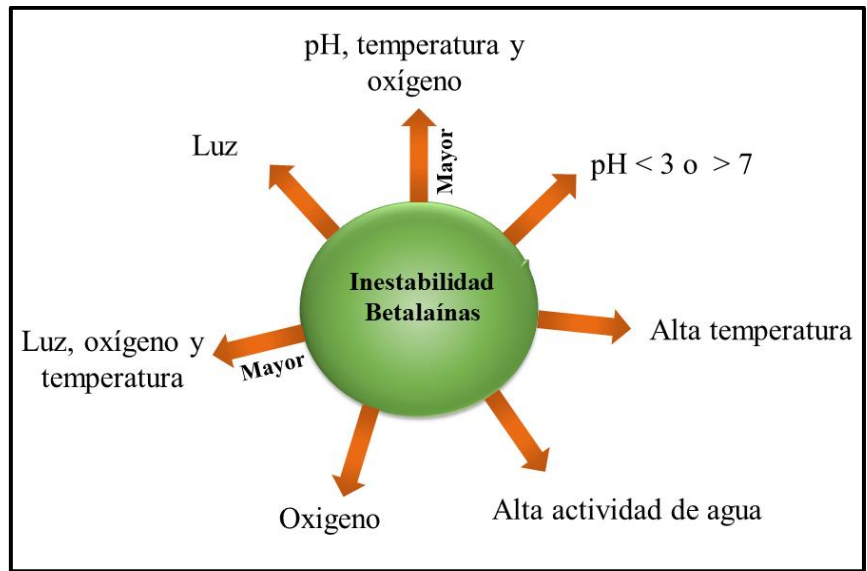


Figura 3. Factores fisicoquímicos, solos y en combinación, que proporcionan inestabilidad a las betalainas.

Métodos de extracción de betalaínas

La extracción de betalaínas es el primer paso para su estudio, por lo tanto, es un paso importante y crucial en el resultado final. En la extracción de betalaínas, se han utilizado métodos convencionales y no convencionales (Barba *et al.* 2017). Los métodos convencionales son aquellos que usan solventes con y sin tratamiento térmico, tales como maceración, hidrodestilación y Soxhlet, mientras que los métodos no convencionales son tecnologías modernas y ecológicas con bajo consumo de energía, algunas de estas técnicas prometedoras son la extracción asistida por ultrasonido, microondas, extracción asistida, extracción asistida de fluido supercrítico, extracción asistida por campo eléctrico pulsado y extracción de líquidos a presión (Azmir *et al.* 2013; Soquetta *et al.* 2018). Los métodos convencionales han sido los más utilizados en la extracción de betalaínas porque son métodos simples y no requieren equipos sofisticados, sin embargo, el tiempo de extracción es muy largo con bajos rendimientos, además el uso de altas temperaturas puede degradar las betalaínas (Tiwari y Cullen 2013; Celli y Brooks 2017). Por lo que, en los últimos años, los procesos de extracción de betalaínas se han optimizado utilizando métodos no convencionales. Laqui *et al.* 2018, optimizó la extracción de betalaínas de la cáscara de quinua por el método de ultrasonido y lo comparó con el método de maceración, donde obtuvieron por ultrasonido un rendimiento de 96.477 mg de betacianinas / 100 g de muestra fresca (FS) en 9.2 s, así también se obtuvieron un rendimiento de 201.01 mg de betaxantinas / 100 g de FS en 40 s, mientras que en la extracción por maceración, se necesitaron 30 minutos a temperatura ambiente para alcanzar rendimientos similares, lo que demuestra que el método no convencional fue mejor para la extracción de betalaínas. Kouba *et al.* 2016, evaluaron el potencial de los tratamientos anteriores con ultrasonidos y campo eléctrico pulsado para mejorar la extracción de betalaínas de la corteza y la pulpa de la tuna, realizaron una extracción acuosa. Los resultados mostraron que los tratamientos utilizados mejoraron significativamente la extracción de betalaínas, concluyendo que el campo eléctrico pulsado induce la permeabilidad de la pared celular sin desintegrar el tejido celular, lo que facilita la recuperación de compuestos intracelulares. Roriz *et al.* 2017, optimizaron la extracción de betacianinas de *Gomphrena globose L.* mediante extracción asistida por microondas y ultrasonido, donde informaron un mayor rendimiento de extracción mediante ultrasonido con 46.9 ± 4.8 mg / g, validando que el método de ultrasonido es más adecuado para obtener

betacianinas de *Gomphrena Globose L.* Thirugnanasambandham y Sivakumar (2017) optimizaron la extracción de betalaínas de la corteza de la fruta del dragón por el método de microondas obteniendo 9 mg / L de betalaínas en 8 minutos a 35 ° C, concluyen que el proceso de microondas muestra gran efectividad en la extracción de betalaínas.

Algunas de las ventajas y desventajas de los métodos de extracción se pueden ver en la Tabla 1, donde la principal desventaja presentada por el método convencional con respecto a no convencional es el tiempo, la temperatura y el uso de solventes. Sin embargo, en base a lo anterior, podemos mencionar que, aunque los métodos convencionales pueden tener limitaciones en la extracción de betalaínas, son métodos que se pueden combinar con métodos no convencionales para mejorar el proceso de extracción sin afectar las propiedades naturales de las betalaínas.

Estabilización de betalaínas

Una de las diferentes formas de estabilizar a las betalaínas es con el uso de compuestos antioxidantes, especialmente el ácido ascórbico y el ácido isoascórbico. Estos antioxidantes han demostrado efectos beneficiosos en extractos crudos de betalaínas, como en betalaínas purificadas (Khan y Giridhar 2014). El ácido isoascórbico ha exhibido un mayor potencial para estabilizar las betalaínas que el ácido ascórbico, debido a su mayor potencial redox (Azeredo 2009). Sin embargo, se requieren más estudios sobre las cantidades óptimas de ácido ascórbico o ácido isoascórbico para la estabilización de betalaínas, ya que existen discrepancias. Los agentes quelantes también han demostrado un efecto estabilizador sobre las betalaínas. Estos actúan neutralizando parcialmente el centro electrofílico (N cargado positivamente) presente en la estructura de las betalaínas. El ácido cítrico y el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) son agentes quelantes que se han utilizado para mejorar la estabilidad de las betalaínas, evitando su oxidación y aumentando su vida útil (Herbach *et al.* 2006). Sin embargo, el uso de ácido cítrico en altas concentraciones puede afectar las características sensoriales en los alimentos. En la Tabla 2, se pueden ver otros métodos de estabilización de betalaínas menos estudiados y con una gran oportunidad para desarrollar nuevas investigaciones.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los métodos de extracción convencionales y no convencionales.

Método	Ventajas	Desventajas
Convencional		
Maceración	Método simple y bajo costo	Tiempo de extracción, bajos rendimientos y uso de solventes orgánicos
Soxhlet	Método simple	Alto consumo de energía y uso de solventes orgánicos
Hidrodestilación	No se requieren solventes orgánicos	Altas temperaturas, alto consumo de energía y excesivo tiempo de extracción
No conventional		
Fluidos supercríticos	La extracción es rápida, selectiva y no requiere limpieza adicional.	Cambios de temperatura y equipos especializados
Líquido presurizado	Extracción rápida y consumo reducido de solventes	Altas temperaturas y presiones
Ultrasonido asistido	Bajo tiempo de extracción, bajo consumo de energía y altos rendimientos	Uso de solventes orgánicos
Microondas asistida	Se puede hacer con o sin la adición de solventes	Equipo especializado
Campo eléctrico pulsado	Bajo tiempo de extracción y altos rendimientos	Uso de solventes y consumo de energía

Tabla 2. Métodos de estabilización de betalaínas: ventajas y desventajas

Método	Observación	Ventajas y desventajas	Referencias
Formación compleja (matrices inorgánicas como γ -alúmina)	Estabilizar el pigmento por más de veinte meses.	Alta estabilidad / baja solubilidad y posible formación de agregados.	Pérez-Ramírez <i>et al.</i> 2015; Lima <i>et al.</i> 2009; Molina <i>et al.</i> 2014
Copigmentación (metales, fenoles, alcaloides y ácidos orgánicos)	Promueve la retención del color por hasta 6 meses a 5 ° C	Aumenta la intensidad y la estabilidad del color / Baja estabilidad en pigmentos purificados	Khan <i>et al.</i> 2015; Khan and Giridhar 2014; Trouillas <i>et al.</i> 2016

Otro de los principales métodos para estabilizar las betalaínas es la encapsulación. La encapsulación ha sido objeto de investigación en los últimos años para estabilizar, mejorar la biodisponibilidad y facilitar la administración de betalaínas (Khan 2016). Una de las razones más importantes para el uso de la encapsulación en betalaínas es proporcionar una mayor estabilidad durante el procesamiento y aumentar el tiempo de vida útil de estos productos (Nedovic *et al.* 2011). Las betalaínas encapsuladas pueden presentar una estabilidad de almacenamiento de hasta 6 meses, esta estabilidad no podría obtenerse con otros métodos (Gandía *et al.* 2013). Esto se debe a la matriz que los protege de los factores fisicoquímicos que aceleran su degradación. Otra de las ventajas de la encapsulación de betalaínas es que estas últimas se pueden agregar a sustancias líquidas o sólidas sin lograr su degradación (Ravichandran *et al.* 2014; Pitalúa *et al.* 2010). Por lo tanto, la estabilidad de las betalaínas derivadas de la encapsulación comprende uno de los objetivos más importantes en su estudio actual. Sin embargo, el efecto de las diferentes técnicas de encapsulación y tipos de matriz, también pueden ser factores importantes para determinar una mayor o menor estabilidad de betalaínas.

Encapsulación de betalaínas

La encapsulación es un método para atrapar materiales sólidos, líquidos y gaseosos en pequeñas cápsulas que pueden ser de tamaño nanométrico o micrométrico (Fang y Bhandari 2010). El contenido de la cápsula se aísla del medio ambiente y este puede liberarse a velocidades controladas durante períodos de tiempo prolongados mediante la acción del pH, enzimas, temperatura, entre otros (Augustin *et al.* 2008; Gouin 2004). Este método es de interés para el sector farmacéutico con respecto a la liberación de medicamentos y vacunas. También es de interés para la industria alimentaria con respecto a la adición de ingredientes funcionales como antioxidantes, antimicrobianos y para controlar el sabor, la textura y el color (Champagne y Fustier 2007; Vincekovic *et al.* 2017). La encapsulación se basa en la protección de compuestos sensibles a factores externos, cubriéndolos con una matriz más estable como polisacáridos, lípidos y proteínas. Estos sistemas también llamados núcleo-coraza se forman a partir del compuesto protector denominado núcleo y una cubierta o matriz que cubre el compuesto (Figura 4) (Janiszewska 2014).

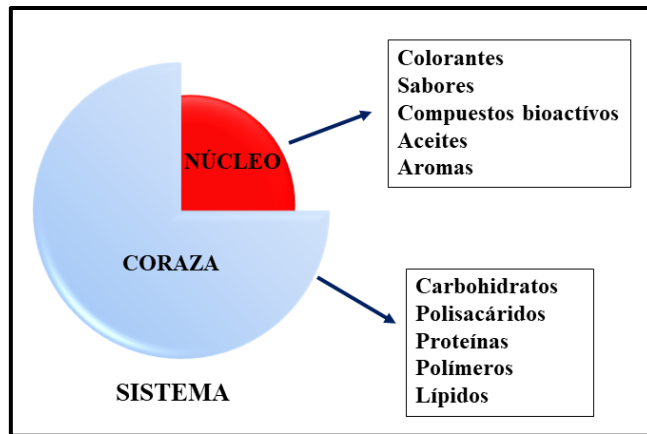


Figura 4. Esquema del sistema núcleo-coraza con ejemplos

La encapsulación se usa actualmente para estabilizar las betalaínas. En la literatura, se han informado varias tecnologías de encapsulación y diferentes matrices se han utilizado en la encapsulación de betalaínas. Sin embargo, en la literatura, no existe un trabajo de revisión que analice en conjunto el efecto de las matrices y las tecnologías de encapsulación en la estabilidad de las betalaínas.

Efecto de la de matriz y la tecnología de encapsulación en la estabilidad de las betalaínas

Hay varios factores que pueden contribuir a la degradación de las betalaínas en una forma encapsulada. Los factores principales incluyen el tipo de matriz, la tecnología de encapsulación y la porosidad de la matriz. Esto se debe a que están principalmente expuestos a factores fisicoquímicos, principalmente oxígeno, que puede ingresar fácilmente a la matriz y afectar a las betalaínas (Serris y Biliaderis 2001). La matriz es una barrera física que con frecuencia también se denomina recubrimiento, cápsula, membrana o barrera (Fang y Bhandari 2010). Estos pueden estar compuestos de carbohidratos, polisacáridos, lípidos, proteínas y polímeros sintéticos, o tal vez incluso estén combinados, mejorando sus propiedades de barrera. La selección de la matriz es muy importante, ya que de ella dependerá la aplicación final del compuesto encapsulado y un resultado eficiente (Chranioti *et al.* 2015). Actualmente, se han empleado varias matrices para encapsular betalaínas principalmente polisacáridos en combinación con proteínas. Las razones de esto pueden deberse a su capacidad para proteger las betalaínas de la oxidación y la alta solubilidad de la mayoría de los polisacáridos (Gandía *et al.* 2013; Robert *et al.* 2015; Chranioti *et al.* 2015; Otálora *et al.* 2016).

Castro-Muñoz *et al.* 2015, encapsularon el jugo de la tuna utilizando una matriz de gelatina, maltodextrina y una combinación de gelatina / maltodextrina por secado por pulverización. Los autores informaron una alta higroscopicidad en la matriz cuando contenía maltodextrina ya que maltodextrina tiene una alta capacidad para absorber agua de 72-83 g / 100 g. Ellos observaron que con la encapsulación de las betalaínas la estabilidad térmica de las partículas aumento a más de 200 °C. Los autores concluyeron que las partículas pueden usarse en compuestos

alimenticios. Robert *et al.* 2015, encapsularon betalaínas utilizando proteínas de soja combinadas con maltodextrina o inulina, observando una menor degradación de los compuestos betalactámicos cuando la matriz comprendía una combinación de proteína-polisacárido. La matriz de maltodextrina-proteína fue aquella con menor degradación de betalactámicos en comparación con la proteína-inulina. Existen diferencias en la estabilidad de la betalaínas con respecto al tipo de polisacárido, los autores atribuyeron esto a las diferencias estructurales entre ambos polisacáridos. Do Carmo *et al.* 2018, también coinciden con los resultados mencionados anteriormente. Tumbas *et al.* 2016, encapsularon betalaínas de orujo de remolacha utilizando proteína de soja y observaron que la estabilidad de las betalaínas se redujo solamente un 24 % después de 3 meses de almacenamiento a 25 °C. A pesar de que la mayoría de las investigaciones sobre la encapsulación de betalaínas se basa en la utilización de polisacáridos podemos observar que con el uso de proteínas mejora la estabilidad.

En la literatura, se han reportado diferentes tecnologías de encapsulación de betalaína, tales como secado por aspersion, liofilización, gelificación iónica y emulsiones (Vergara *et al.* 2014; Kaimainen *et al.* 2015; Chranioti *et al.* 2015; Otálora *et al.* 2016). La tecnología más utilizada para la encapsulación de betalaínas es el secado por pulverización, debido a su bajo costo, procesamiento simple y su rápida obtención de betalaínas encapsuladas. Sin embargo, la principal desventaja del secado por pulverización es que la matriz tiene que ser soluble en solventes que puedan evaporarse fácilmente con la temperatura y debido al uso de altas temperaturas, algunos compuestos bioactivos pueden degradarse. Ravichandran *et al.* 2014, estudiaron el efecto de diferentes matrices en la encapsulación de betalaínas mediante secado por atomización y liofilización. Estos autores concluyeron que, con la técnica de liofilización, se obtuvo una mayor eficiencia de carga y estabilización de las betalaínas que con la atomización. Además, mencionaron que la goma guar se puede emplear para encapsular betalaínas con la técnica de liofilización, pero que esto no es adecuado para el secado por pulverización. Hay otros autores que también mostraron las limitaciones de la técnica de secado por pulverización (Gandía *et al.* 2013). Estos autores encapsularon betalaínas en una matriz de maltodextrina y quitosano, revelando problemas para el procesamiento de quitosano en esta técnica debido a su viscosidad y baja solubilidad.

Con base a lo mencionando anteriormente se decidió encapsular a las betalaínas para aumentar su estabilización a partir de una matriz a base de proteína. Las proteínas de origen vegetal parecen ofrecer posibilidades interesantes, debido a las características que presentan; biodegradabilidad, bajo costo, disponibilidad, grupos funcionales donde pueden interaccionar con sustancias de interés, biocompatibilidad, entre otras; siendo las proteínas del gluten específicamente las gluteninas prometedores biomateriales.

Gluten de trigo

El gluten de trigo es interesante como materia prima para el desarrollo de nuevos biomateriales ya que es un material renovable, biodegradable, disponible en grandes cantidades y a bajo costo (Chevillard *et al.*, 2011). El gluten de trigo se compone principalmente de proteínas entre un 75-85 % y el resto son minerales, lípidos y almidón. Las principales proteínas del gluten de trigo son gliadinas y gluteninas con una proporción de aproximadamente 1:1 (Majzoobi *et al.*, 2012). Debido a que las propiedades fisicoquímicas de las gluteninas y gliadinas son diferentes, es posible aislarlas del gluten y encontrar aplicaciones apropiadas para cualquiera de estas proteínas.

Gliadinas

Las gliadinas son proteínas monoméricas con pesos moleculares que oscilan entre 28,000 y 55,000 Da, estas carecen de puentes disulfuro intermoleculares y son fácilmente solubles en soluciones de alcohol diluido (He *et al.*, 2013; Lagrain *et al.*, 2010). Se clasifican en tres fracciones principalmente según su movilidad electroforética en α - β , γ y ω (Zhang *et al.*, 2007).

Gluteninas

Las gluteninas de trigo son proteínas poliméricas de alto peso molecular, se encuentran entre las proteínas más grandes de la naturaleza, por lo cual, gran parte de la proteína es insoluble en solventes comunes (Gamboa *et al.*, 2007). Las gluteninas se pueden separar en dos grupos, en subunidades de bajo peso molecular (BPM) y de alto peso molecular (APM), la composición de alto peso molecular en la proteína es del 20% y 80% para las de bajo peso molecular (Gamboa *et al.*, 2007).

La fracción de alto peso molecular presenta pesos moleculares entre 65 y 90 kDa mientras que la fracción de bajo peso presenta valores entre 30 y 45 kDa. A su vez la fracción de BPM se clasifica en D, B y C en base a su movilidad electroforética, presentando tres subgrupos típicos reconocidos, es decir, BPM-s, BPM-m y BPM-i, de acuerdo con su primer aminoácido (serina, metionina e isoleucina, respectivamente). Por otra parte, la fracción de APM presenta dos subfracciones una de mayor peso denominada como X (con peso molecular de 83,000 a 88,000 Da) e Y de bajo peso (67,000 a 74,000), conformando de esta manera una estructura compleja para las gluteninas (Delecour *et al.*, 2012). Los principales aminoácidos que la constituyen son prolina y glutamina. Presentan entre sus cadenas enlaces disulfuro tanto intermoleculares como intramoleculares y son prácticamente solubles en soluciones ácidas diluidas (Garg *et al.*, 2011; Woerdeman *et al.*, 2005).

Hoy en día, se han propuesto muchos procedimientos de encapsulación de compuestos activos. La encapsulación se refiere a una tecnología en la que los compuestos activos están completamente envueltos y cubiertos por una matriz polimérica. Lo opuesto a esta tecnología es la inmovilización siendo originalmente una tecnología diferente en la que el compuesto activo está cubierto, pero no necesariamente envuelto por la matriz. Algunos compuestos activos pueden estar expuestos en la superficie, característica que no está permitida en los procedimientos de encapsulación. Algunas técnicas de inmovilización son secado por pulverización, emulsión, precipitación, entre otras. La consecuencia del uso de estas técnicas es que pueden interferir con la vida útil del compuesto activo y la eficiencia, además, que la matriz

no será suficiente para proteger al compuesto activo del ambiente (Vos *et al.*, 2009). Por tal motivo, una de las técnicas que permiten encapsular y ha logrado atraer la atención por ser un método práctico para producir cápsulas de tamaño nano y micrométrico es la técnica de electroaspersión coaxial.

Electroaspersión coaxial

La técnica de electroaspersión coaxial es una de las más aptas para producir estructuras núcleo-coraza, debido a las múltiples ventajas que presenta con respecto a otras técnicas, ya que proporciona partículas con una alta eficiencia de encapsulación y no requiere un proceso de separación para la eliminación de partículas a partir de disolventes, como sucede con varias técnicas de encapsulación (Gómez *et al.*, 2012).

Componentes y fundamento

La técnica se compone de varios dispositivos básicos principales (Figura 5): (1) una bomba de infusión a jeringa, encargada de suministrar un flujo constante de la solución polimérica, (2) una jeringa, la cual es la encargada de contener la solución polimérica, (3) una aguja metálica o capilar, (4) una fuente de alto voltaje y (5) un colector metálico conectado a tierra para, recoger el material obtenido (Xie *et al.*, 2014).

La electroaspersión emplea fuerzas electrostáticas generadas por una fuente de alto voltaje que compiten con la tensión superficial de la gota. A medida que aumenta la tensión, el líquido que fluye hacia fuera del capilar forma un menisco que se alarga, formando un cono (cono de Taylor), que es deformado rompiéndose en pequeñas gotas iniciales. Posteriormente, el disolvente se evapora de la superficie de las gotas durante su vuelo, disminuyendo el tamaño de la gota y aumentando su densidad de carga eléctrica. Esto conduce a una acumulación de fuerzas de repulsión dentro de cada gota que favorece la disipación y la ruptura de las gotas en otras más pequeñas de tamaño micro o nanométrico. Este proceso se mantiene hasta que las gotas alcanzan el colector y disipan su carga eléctrica (Cao *et al.*, 2014).

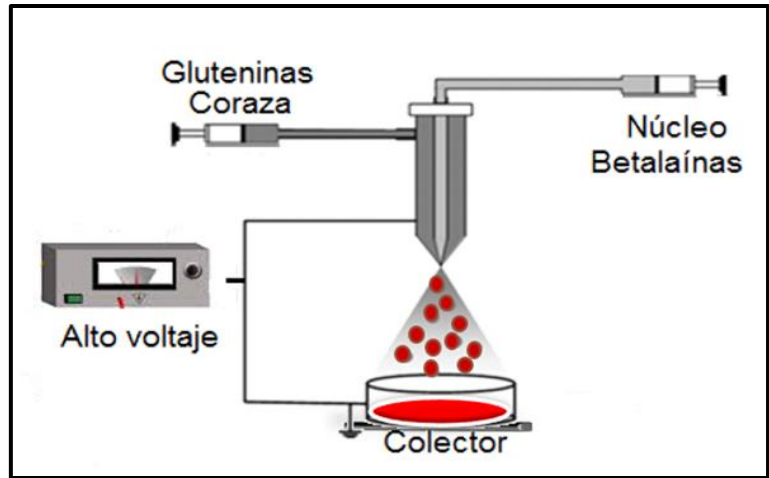


Figura 5. Componentes básicos de electroaspersión coaxial.

JUSTIFICACIÓN

La gran cantidad de alimentos que son deteriorados a causa del crecimiento microbiano origina intoxicaciones en seres vivos, así como grandes pérdidas de alimentos y económicas en todo el mundo. La implementación de dispositivos que ayuden a monitorear e indicar el estado de los alimentos puede contribuir a la disminución de más de 600 millones de intoxicaciones por el consumo de alimentos en mal estado.

HIPÓTESIS

La encapsulación de betalaínas en una matriz de gluteninas aplicadas sobre una película de PLA modificada funcionará como un sensor de pH en alimentos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la encapsulación de betalaínas en una matriz de gluteninas aplicadas sobre una película de PLA modificada y evaluar su aplicación como un sensor de pH en alimentos.

Objetivos específicos

- I. Optimizar la extracción de betalaínas de la pulpa de pitaya del cactus (*Stenocereos thurberi*) y encapsularlas en una matriz de gluteninas.
- II. Determinar la cinética de liberación de betalaínas *in vitro* y definir la velocidad y mecanismo de transporte mediante un modelo matemático.
- III. Obtener una película de ácido poliláctico modificada con polietilenglicol-diglicidil éter, con/sin betalaínas encapsuladas y evaluarla fisicoquímica y mecánicamente.
- IV. Evaluar la efectividad de betalaínas en la película como sensor de pH en un modelo de filete de caballa (*Scomber scombrus*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Materia prima

Las pitayas (*Stenocereus thurberi*) se recolectaron aleatoriamente en los meses de junio-julio de 2016 en el municipio de Carbó, ubicado al oeste del estado de Sonora entre las coordenadas geográficas 29 ° 41 'de latitud norte y 110 ° 57' de longitud oeste.

Reactivos

Los reactivos fueron los siguientes, gluten de trigo comercial (Roquette), PLA amorfo 4060 D (NatureWorks, EU), polietilenglicol diglicidil éter de PM: 500 Da (Sigma-aldrich, EU), ácido acético (J.T. Baker, EU), etanol (Meyer, MX), metanol (Meyer, MX), acetonitrilo (Sigma-aldrich, EU), acetona (Sigma-aldrich, EU), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Sigma-aldrich, EU), 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (Sigma-aldrich, CA), Folin-Ciocalteu (Sigma-aldrich, EU), Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-aldrich, EU), Rodamina b para fluorescencia (Sigma-aldrich, MX).

Métodos

Diagrama general

La metodología se dividió en tres etapas como se muestra en la Figura 6. La etapa 1 comprende la extracción, encapsulación y la cinética de liberación de betalaínas, la etapa 2 abarca la obtención de la película de PLA modificada y la obtención del sensor, y en la etapa 3 se engloba los ensayos del biosensor *in vitro* utilizando como modelo filete de caballa (*Scomber scombrus*).

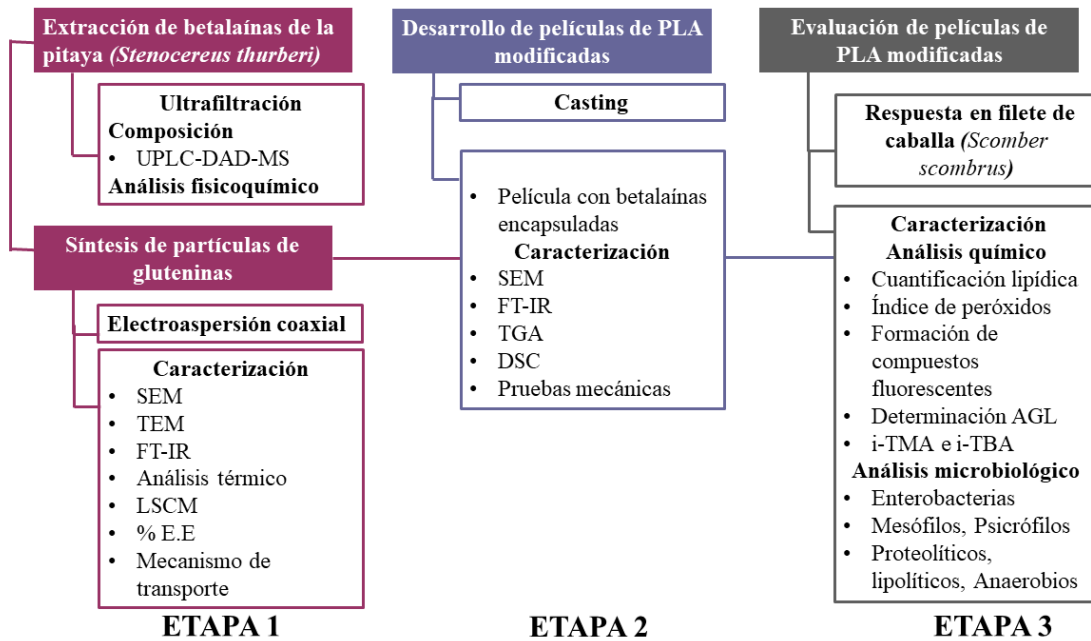


Figura 6. Diagrama general dividido en etapas.

Etapa 1

Caracterización física y química de la pitaya (*Stenocereus thurberi*)

Con el objetivo de conocer las características físicas y químicas se midió el diámetro ecuatorial y polar del fruto, azúcares totales, acidez, pH, humedad y color según la metodología siguiente.

Determinación del diámetro del fruto

Se midió el diámetro ecuatorial y polar de la pitaya roja utilizando un Vernier (Extol, EU)

Azúcares totales

El método de azúcares totales por antrona consiste en la hidrólisis de los polisacáridos a monosacáridos por acción del ácido sulfúrico (H_2SO_4) del reactivo de antrona los cuales, se deshidratan formando furfural o hidroximetilfurfural. Estos productos pueden condensarse con antrona generando complejos coloreados. El cambio de coloración puede entonces determinarse por espectrofotometría a una determinada longitud de onda. La concentración de los azúcares totales se determina haciendo una interpolación en la curva patrón del azúcar utilizado, graficando la absorbancia en función de la concentración. Siguiendo la metodología modificada de Laurentin y Edwards (2003), se preparó el reactivo de antrona, disolviendo 200 mg de antrona en 100 mL de H_2SO_4 al 95% y se almacenó en un frasco ámbar a 4 °C. Posteriormente, se mezcló 1 mL de muestra con 4 mL de reactivo antrona, se mezclaron bien y se colocaron en un baño maría a 100 °C por 8 min e inmediatamente se detuvo la reacción con baño de agua y hielo. Posteriormente, se dejaron en reposo por 15 min, y se determinó su absorbancia a 630 nm. El mismo tratamiento se realizó para el blanco con agua destilada. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Métodos de la AOAC (1996)

Humedad (AOAC 925.10). - Primeramente, se lavaron 3 platillos de aluminio y se metieron a una estufa por 1 h a 130 °C, después se sacaron y se metieron a un desecador para peso constante. Se pesaron 2 g de pulpa de pitaya roja sin semillas en los 3 platillos de aluminio, las muestras se homogenizaron uniformemente en todo el platillo y se colocaron en la estufa a 130 °C por 1 h. Transcurrido el tiempo, los platillos se coloraron en un desecador hasta que alcanzaron la temperatura ambiente y fueron pesados para calcular el porcentaje de humedad siguiendo la formula

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{Peso de la muestra húmeda} - \text{peso de la muestra seca}}{\text{Peso de la muestra húmeda}} \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Acidez (AOAC 935.57). - Se pesó 1 g de pulpa sin semillas y se adicionó 30 mL de agua mili-Q, la solución se agitó vigorosamente. Posteriormente, la muestra se tituló a pH 8.2 usando una solución de NaOH 0.1 N, y un potenciómetro (Hanna, HI 2550). Los resultados se expresaron como % de ácido cítrico con base a la siguiente ecuación.

$$\% \text{ \acute{a}c. C\acute{it}rico} = \frac{(N \times V \times \text{mEq. \acute{a}c.c\acute{it}rico})}{P} \times 100 \quad \text{Ec.2}$$

Donde: N es la concentración de NaOH, V es el volumen de NaOH utilizado en la titulación, mEq son los miliequivalentes de \acute{a}c. C\acute{it}rico y P es el peso de la muestra.

pH (AOAC 981.12). - La determinación de pH se realizó pesando 1 g de pulpa de pitaya sin semillas y se le añadió 10 mL de agua mili-Q. La muestra se agitó vigorosamente y el pH fue medido utilizando un potenciómetro (Hanna, HI 2550).

Color

El color de la pitaya (fruta) se determinó usando un colorímetro MiniScan XE (Hunterlab, Miniscan XE plus, EU). El color se expresó según los parámetros de escala CIELAB (L^* , a^* y b^*), donde L^* (luminosidad, blanco-negro), a^* (-a = verde, +a = rojo) y b^* (-b = azul, +b = amarillo). El ángulo de tono (H^*) y el croma (C^*) se calcularon de acuerdo con las Ec. 3 y 4. Los valores de ángulo de tono varían de 0° (color rojo puro), 90° (color amarillo puro), 180° (color verde puro) a 270° (color azul puro) (García Lucas et al., 2016). Las muestras se realizaron por triplicado.

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad \text{Ec. 3}$$

$$H^* = \arctan \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad \text{Ec.4}$$

Optimización de la extracción de betalaínas

Para la optimización, las betalaínas fueron extraídas variando la temperatura, el tiempo de sonicación y la relación de solvente. Para ello se pesaron 2 g de pulpa sin semillas y se maceraron en agua destilada, la mezcla fue sonicada (Branson, M3800H, MX) y agitada por 20 minutos en un agitador horizontal (VWR, EU) a 25°C en la oscuridad. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada (Eppendorf, 5804 R, DE) a 5000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue almacenado en viales color ámbar para cuantificar a las betalaínas.

Cuantificación de betalaínas

La cuantificación de betalaínas se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 538 nm para betacianinas y 483 nm para betaxantinas, usando un espectrofotómetro UV-Vis (Varian, Cary 50, AU). La cantidad de betalaínas fue calculada con la siguiente ecuación.

$$\left[B \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) \right] = \frac{A \times FD \times PM \times V}{\epsilon \times P \times L} \quad \text{Ec.5}$$

Donde: **[B]** significa la concentración de betalaínas, **A** es la absorbancia de la muestra, **FD** es el factor de dilución, **PM** es el peso molecular (betanina 550 g/mol) (indicaxantina 308 g/mol), **V** es el volumen, ϵ es el coeficiente de extinción molar, para betanina es 60, 000 mol/L cm y para indicaxantina 48, 000 mol/L cm, **P** es el peso de la muestra y **L** es la longitud de la celda.

Diseño de experimentos

El diseño central compuesto (DCC) fue utilizado para evaluar las condiciones óptimas para la extracción de betalaínas. El análisis estadístico fue realizado en un paquete estadístico JMP 10.0. Las variables independientes fueron: temperatura (°C), relación de solvente (mL) y tiempo de sonicación (min), con tres niveles cada una (-1, 0, +1), datos que se pueden observar en la Tabla 3. La variable respuesta fue la concentración de betalaínas, para ello se realizaron 28 experimentos (Tabla 4). La relación entre las variables independientes y la respuesta se expresaron mediante una ecuación matemática polinomial de segundo orden y la forma generalizada fue de la siguiente manera.

$$y = \alpha_0 + \sum \alpha_i x_i + \sum \alpha_{ii} x_i^2 + \sum \alpha_{ij} x_i x_j + e \quad \text{Ec.6}$$

Donde: $\alpha_i, \alpha_{ii}, y \alpha_{ij}$ son coeficientes de efecto lineal, cuadrático y de interacción respectivamente.

Posteriormente, se desarrollaron gráficas de superficie de respuesta 3D, con el fin de estudiar el efecto interactivo de las variables independientes sobre la respuesta. La validación del modelo desarrollado fue mediante un análisis de varianza (ANOVA). Finalmente, la optimización se empleó para optimizar las variables del proceso y así, obtener la mayor concentración de betalaínas a partir de la pulpa de la pitaya roja.

Tabla 3. Variables independientes y niveles utilizados en el diseño central compuesto.

Variable independiente	Factores		Niveles	
	X	-1	0	+1
Temperatura (°C)	X ₁	25	40	60
Relación de solvente (mL)	X ₂	20	30	40
Tiempo de sonicación (min)	X ₃	10	20	30

Tabla 4. Matriz de diseño experimental con resultados.

Corridas	Variables			Concentración de betalainas (mg/g)	
	Temperatura (°C)	Relación solvente/soluto (mL)	Tiempo de sonicación (min)	Experimental	Predicción
1	25	20	10	1.9423	1.9598
2	25	40	10	1.3614	1.6675
3	25	20	30	1.5794	1.6478
4	25	40	30	1.0137	1.3114
5	60	40	10	2.0844	2.1010
6	60	20	30	2.3130	2.5557
7	60	40	30	2.8621	2.7040
8	25	30	20	1.8549	1.8763
9	60	30	20	2.5210	2.5470
10	40	30	10	2.0915	2.3775
11	40	30	30	2.7750	2.5230
12	40	20	20	2.5672	2.5786
13	40	40	20	2.7239	2.5066
14	40	30	20	2.8903	2.6113

15	40	30	20	2.9606	2.6113
16	25	20	10	1.9943	1.9598
17	25	20	30	1.6671	1.6478
18	25	40	30	1.2652	1.3114
19	60	20	10	1.9050	1.9086
20	60	40	10	2.2365	2.1010
21	60	20	30	2.7835	2.5557
22	60	40	30	2.5987	2.7040
23	40	30	10	2.0293	2.3775
24	40	30	30	2.6263	2.5230
25	40	20	20	2.2236	2.5786
26	40	40	20	2.3765	2.5066
27	40	30	20	2.4595	2.6113
28	40	30	20	2.6929	2.6113

Preparación del extracto ultrafiltrado y sin ultrafiltrar de la pitaya (*Stenocereus thurberi*)

Una vez optimizada la extracción de betalaínas fueron ultrafiltradas. El extracto sin ultrafiltrar (E/SU) se obtuvo pesando 2 g de pulpa de pitaya sin semillas y fue macerada en 34 mL de agua destilada. La mezcla se sónico en un baño sonicador (Branson, M3800H, MX) por 27 minutos y se agitó durante 20 minutos en un agitador horizontal (VWR, EU) en la oscuridad. Posteriormente se centrifugó (Eppendorf, 5804, DE) a 5000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante obtenido se liofilizó y se almacenó en viales color ámbar a -20 °C para su posterior análisis. Siguiendo la metodología anterior, el extracto ultrafiltrado (E/U) se obtuvo por ultrafiltración usando membranas (Millipore, EU) con un tamaño de poro de 1 kDa a una presión de gas nitrógeno de 50 psi. El extracto obtenido se liofilizó y se almacenó en viales de color ámbar para su posterior análisis. La Figura 7 muestra el proceso de ultrafiltración desarrollado para obtener el E/U.

Identificación de fitoquímicos presentes en la pulpa de pitaya por UPLC-DAD-MS

Con el objetivo de conocer la eficiencia de la ultrafiltración y los fitoquímicos presentes en la pulpa de la pitaya roja se utilizó Cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC, por sus siglas en inglés) (Waters, ACQUITY LC, SG) equipado con un detector de diodos acoplado a un espectrómetro de masas. Para el análisis de las muestras, se utilizó una columna C18 de 1.7 µm (2.1 x 50 mm) (ACQUITY, UPLC, BEH). Los gradientes utilizados fueron ácido acético al 0.1 % en agua desionizada (A), metano (B) y acetonitrilo (C). Se aplicó un gradiente isocrático de 90 % (A), 5 % (B) y 5 % (C) durante 5 minutos, seguido de 78 % (A), 11 % (B) y 11 % (C) por 5 minutos, 1 minuto de 36 % (A), 31 % (B) y 31 % (C) y al final se usó un gradiente de 90 % (A), 5 % (B) y 5 % (C) por 2 minutos. La velocidad de flujo fue de 0.3 mL/min, la columna y la temperatura de las muestras se mantuvieron a 35 °C y 20 °C. El volumen de inyección de la muestra fue de 5 µL, y la absorbancia utilizada fue de 280 nm.

La ionización por electroaspersión (ESI por sus siglas en inglés) fue operada en modo de ion positivo y negativo. Los espectros de masas se obtuvieron en un rango de 100-750 m/z, el voltaje capilar fue de 3.00 kV y un voltaje de cono de 30 V. Los parámetros ESI-MS fueron una

temperatura de desolvatación de 400 °C y un flujo de gas de 650 L/h. La identificación de los compuestos se basó en estándares, valores de m/z y artículos científicos.

Capacidad antioxidante

Capacidad antirradical utilizando el ensayo DPPH[·]

La estabilización del radical DPPH[·] (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) se realizó con base al método propuesto por Molyneux, (2004). Se mezclaron 200 µL de radical a una concentración de 0.03 mg/mL de metanol con 20 µL de muestra y se dejó reposar durante 30 min en la oscuridad. La absorbancia se midió a 515 nm en un lector de microplaca (Thermo scientific, Multiskan go, FI).

Capacidad antirradical utilizando el ensayo ABTS^{·+}

La estabilización del radical ABTS^{·+} (ácido 2,2'-azino-bis-3etilbenzotiazolin-6-sulfónico) se determinó usando el método de Re *et al.*, (1999). Se añadieron 270 µL de la solución del radical el cual se encontraba a una concentración de 0.043 mg/mL de etanol y se mezclaron con 20 µL de muestra, se dejó reposar durante 30 min en la oscuridad. La absorbancia se midió a 734 nm en un lector de microplaca (Thermo scientific, Multiskan go, FI). Los resultados se expresaron para ambos radicales en mM ET/g y en % de inhibición de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{A_{\text{inicial}} - (A_{\text{muestra}} - A_{\text{Bco muestra}})}{A_{\text{inicial}}} \times 100 \quad \text{Ec.7}$$

Dónde: **A inicial** es el Rtvo + H₂O, **A muestra** es Rtvo + muestra, **A Bco muestra** es H₂O + muestra.

Con el fin de determinar el IC₅₀, el cual indica la concentración a la que se tiene 50% de reducción del radical (ABTS, DPPH), se prepararon diferentes concentraciones de los extractos y se les midió el porcentaje de radical reducido. Los datos obtenidos se graficaron con respecto a la concentración y se calculó la concentración a la cual se alcanzó el 50% de reducción del radical, mediante una regresión logarítmica. Al valor de concentración obtenido se le consideró como IC₅₀ en mg/mL.

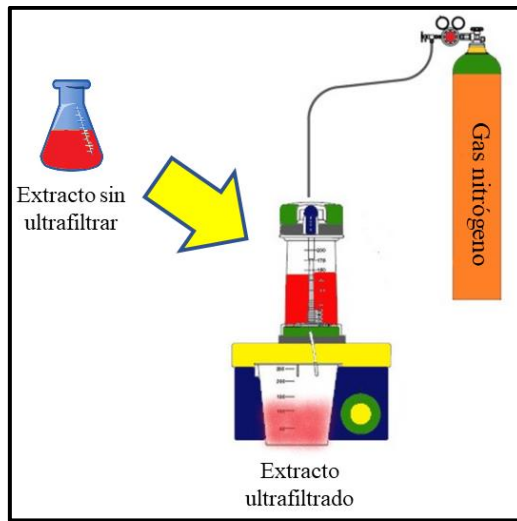


Figura 7. Proceso de ultrafiltración para la obtención del extracto ultrafiltrado.

Fenoles totales

La determinación de fenoles totales se llevó a cabo con el método de Folin-Ciocalteu (FC), mediante el método de Prior *et al.* 2005. Se mezclaron 10 µL de muestra con 25 µL de FC 1N y se dejaron reposar durante 5 minutos. Después, se añadieron 25 µL de Na₂CO₃ al 20 % y 140 µL de agua destilada. Se dejó reposar durante 30 minutos y se determinó la absorbancia a 760 nm. Los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg EAG/g).

Determinación del cambio de color de betalaínas a diferentes pH

Para la determinación de color se realizaron soluciones de betalaínas a una concentración de 0.3 % p/v y se ajustaron a diferentes pH (1-14) con hidróxido de sodio 1N y ácido clorhídrico 1N. Todas las soluciones se evaluaron según los parámetros de color L* (luminosidad, blanco-negro), a* (-a = verde, +a = rojo) y b* (-b = azul, +b = amarillo), en la escala de Hunter usando un colorímetro CIE LAB (Hunterlab, Miniscan XE plus, EU) El cambio de color (ΔE^*) se determinó según la siguiente ecuación.

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2} \quad \text{Ec. 8}$$

Donde: **L₀**, **a₀**, y **b₀** son parámetros de color iniciales y **L**, **a**, y **b** son los parámetros de color finales. Para ver si había diferencias significativas del cambio de color con respecto al pH se realizó un análisis de varianza, utilizando la prueba de Tukey (p<0.05).

Extracción de gluteninas a partir del gluten

El gluten se fraccionó inicialmente en gliadinas y gluteninas según el método descrito por Castro-Enríquez *et al.* (2015). En 1600 mL de etanol al 70 % (v/v) se colocaron 100 g de gluten en polvo, se agitó por 12 h a temperatura ambiente y se centrifugó a 5000 g por 15 min a 25 °C. El precipitado (gluteninas), se lavó con agua destilada para eliminar el etanol remanente, se congeló y liofilizó para ser molido en un mortero.

Obtención de la fracción soluble de gluteninas

Las gluteninas obtenidas anteriormente se le dio un tratamiento a base de reactivos desnaturalizantes para fraccionarlas y obtener la fracción soluble. Para lo cual, se utilizó la metodología descrita por Castro-Enríquez *et al.* (2015). Primeramente, se realizó una solución de 100 mL de urea (8 M) y 50 mL de ácido acético al 70 % (p/v), a la que se adiciono 20 g de gluteninas, 4 g de sulfito de sodio (Na_2SO_3) y 6 g de dodecilsulfato sódico (SDS, por sus siglas en inglés). La solución se agitó magnéticamente a 40 °C por 24 h y después se centrifugo a 8000 g por 20 min. El sobrenadante se purifico por diálisis durante 24 h utilizando membranas de celulosa con un tamaño de poro de 14,000 Da. Pasado el tiempo, la solución dializada se congeló a -20 °C y se liofilizó en un liofilizador (Labconco Free Zone) para ser molida en un mortero.

Síntesis de partículas de gluteninas por electroaspersión

Evaluación del solvente

Primeramente, se evaluó el mejor solvente y concentración de solvente para disolver a FSG. Para ello, se realizaron cuatro soluciones al 12 % (p/v), utilizando como solventes etanol y ácido acético al 70 % y 80 %, bajo agitación magnética por 12 h. A las soluciones se les determinó el porcentaje de solubilidad según el método propuesto por Shukry *et al.* (2008), donde se añadieron 10 mL de la solución a un tubo y se centrifugaron a 5000 g por 20 minutos. El precipitado se congeló y liofilizó. Para la obtención de partículas, todas las soluciones fueron llevadas al equipo de electroaspersión donde las condiciones fueron las siguientes: velocidad de flujo de 0.8 mL/h, distancia de la aguja a la placa colectora de 15 cm, voltaje aplicado 17 kV y la posición del equipo (vertical, horizontal). Las partículas fueron recolectadas en una placa de aluminio.

Caracterización de las soluciones

Concentración. - Las soluciones de FSG a concentraciones de 1%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10% y 12% (p/v) se realizaron bajo agitación magnética por 12 h. Posteriormente, se determinó la densidad y viscosidad de cada una de las soluciones.

Densidad. - La densidad se calculó usando un picnómetro, con la siguiente ecuación:

$$\rho\left(\frac{\text{g}}{\text{cm}^3}\right) = \frac{\text{M3}-\text{M1}}{\text{M2}-\text{M1}} \mathbf{1} \quad \text{Ec. 9}$$

Donde: **M1** es el peso del picnómetro, **M2** es el peso del picnómetro con agua y **M3** es el peso del picnómetro con la muestra.

Viscosidad. - A las soluciones antes mencionadas, se les analizó la viscosidad utilizando un reómetro Anton Par modelo MCR 102 con una geometría de cilindros concéntricos. Las condiciones fueron a una velocidad de corte constante de 5 s⁻¹.

Parámetros de electrodispersión

Con el objetivo de estudiar el efecto de la concentración (1%-12%), voltaje (15kV-20kV) y la velocidad de flujo (0.5 mL/h-1mL/h) sobre el tamaño de las partículas y su morfología, se realizó un diseño factorial de 7 x 3 x 3. Las variables independientes fueron la concentración de FSG con siete niveles (1%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10% y 12% p/v), voltaje aplicado con tres niveles (15, 17 y 20 kV) y la velocidad de flujo con tres niveles (0.5, 0.8 y 1.0 mL/h). Las soluciones se transfirieron a una jeringa de plástico con una aguja de 0.8 mm de diámetro. Se utilizó una bomba para jeringa (Scientific, KD, EE. UU.) para regular el flujo de la solución y una fuente de energía de alto voltaje (Spellman, CZE 1000R, EE. UU.). Se utilizó una placa de aluminio para la recolección de las partículas.

Síntesis de partículas por electroaspersión coaxial

La técnica de electroaspersión coaxial se llevó a cabo utilizando la FSG como la solución externa (coraza), y una solución de betalaínas como la interna (núcleo). Las soluciones se transfirieron individualmente en jeringas de 5 mL, cada jeringa fue colocada en diferentes bombas para jeringas (Scientific, KD, EE. UU.). La aguja se formó de dos agujas concéntricas con los siguientes diámetros: la aguja que formó la coraza tenía un diámetro interno de 0.84 mm y la del núcleo un diámetro externo de 0.56 mm e interno de 0.30 mm, respectivamente. Las betalaínas fueron disueltas en etanol 70 % a concentraciones de 1, 5 y 10 % (p/v) y la velocidad de flujo se fijó de 0.1-1 mL h⁻¹. Con la finalidad de obtener un chorro estable en la salida, el voltaje se varió de 5-20 kV dependiendo de las propiedades de la solución y las velocidades de flujo. Las partículas se recolectaron en una placa de aluminio conectada a tierra a una distancia de 5-20 cm de la aguja (Zamani-Maedeh *et al.*, 2014).

Eficiencia de encapsulación

Para determinar la cantidad de betalaínas encapsuladas por electroaspersión coaxial, se utilizó la metodología propuesta por Aceituno-Medina *et al.* (2015). Primeramente, se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de betalaínas. Consecutivamente, se pesaron 3 mg de partículas núcleo-coraza de betalaínas y se vertieron en 5 mL de ácido acético al 70 % (v/v) bajo agitación por 10 minutos a 300 rpm. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 g por 10 minutos a 20 °C, el precipitado fue resuspendido siguiendo la metodología anteriormente mencionada. Al sobrenadante obtenido se le midió la absorbancia mediante un espectrofotómetro UV-Vis (Perkin-Elmer, Lambda 20) en un intervalo de 600 a 400 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

$$\% \text{ EE} = \frac{\text{conc.de betalaínas encapsuladas}}{\text{conc.inicial de betalaínas de la formulación}} \times 100$$

Ec. 10

Índice de polidispersidad (IPD)

El índice de polidispersidad es una indicación de calidad con respecto a la distribución de tamaño de las partículas y se evaluó mediante el conteo de 100 partículas utilizando el software Image J para obtener el tamaño promedio y la desviación estándar. Siguiendo la ecuación a continuación se determinó el IPD.

$$\text{IPD} = \frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Tamaño promedio}} \quad \text{Ec. 11}$$

Estabilidad de betalaínas encapsuladas

Para evaluar la estabilidad de las betalaínas encapsuladas, las partículas se dividieron en dos lotes. Donde ambos fueron expuestos a una temperatura de 4 °C, humedad relativa de 43 % por 30 días. La diferencia entre ambos lotes fue que uno de ellos se colocó en presencia de luz y el otro lote en ausencia de luz. Todas las muestras se les midió el color durante todo el periodo de la prueba. Las muestras se analizaron por triplicado.

Caracterización del material obtenido

El material polimérico obtenido con la técnica de electroaspersión coaxial fue caracterizado de acuerdo con las siguientes técnicas:

Microscopia electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés)

Para evaluar las características de superficie, morfológicas, tamaño y porosidad del material obtenido, se realizaron observaciones en un microscopio electrónico de barrido (marca JEOL, modelo 5410LV) operado a 15 kV. Para evaluar el diámetro promedio de las partículas se contaron mínimo 100 partículas en diferentes cuadrantes de la imagen, esto se llevó a cabo con ayuda de un software llamado Image J.

Microscopia electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés)

Con el objetivo de corroborar la obtención de partículas núcleo-coraza se utilizó un microscopio electrónico de transmisión (JEOL, JEM 2010 f), utilizando un voltaje operativo de 200 V y un filamento de emisión de campo.

Microscopia confocal de barrido laser (LSCM, por sus siglas en inglés)

Para observar la distribución de las betalaínas en la matriz de gluteninas, se utilizó un microscopio confocal de barrido laser de marca Zeiss (modelo LSM 800). Para ello, se tiñó el núcleo como la coraza con rodamina B al 0.02 % (p/v) en cada solución según el caso. La medición se realizó a una excitación de 658 nm y emisión de 683 para rodamina B, utilizando la lente del objetivo de 63X. El análisis de las imágenes se realizó con el software ZEN 2.6.

Análisis termogravimétricos (TGA por sus siglas en inglés)

Con el fin de determinar la estabilidad y degradación con respecto a la temperatura, el material se caracterizó utilizando un equipo Perkin Elmer, modelo Pyris 1. Se pesaron aproximadamente 4 mg de muestra y se calentaron hasta 700 °C a una velocidad de calentamiento y enfriamiento de 10 °C min⁻¹, bajo un flujo de 20 mL min⁻¹ de gas nitrógeno con un cambio de gas aire al llegar a los 600 °C.

Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés)

Este estudio se utilizó para determinar la presencia de betalaínas en las partículas y posibles interacciones entre la matriz, así como también conocer si quedan residuos de los solventes utilizados en la extracción de gluteninas. Para la obtención de los espectros se utilizó un equipo Perkin Elmer GX. El número de scans fue de 16, en un intervalo del infrarrojo de 4000 a 500 cm⁻¹.

Comportamiento en simulantes alimentarios de betalaínas encapsuladas

Para evaluar el comportamiento de las betalaínas encapsuladas se utilizaron dos medios dispersantes, etanol 10 % y ácido acético 3 % (v/v), los cuales son considerados simulantes alimentarios de acuerdo con el reglamento de la comisión 10/2011 de la unión europea. Siguiendo el método modificado de Atay et al. (2018), se pesaron 13 mg de partículas y se colocaron en bolsitas de diálisis de celulosa con un tamaño de poro de 14,000 Da. Las bolsitas de diálisis con las partículas se sumergieron en 100 mL de cada solución simulante de alimento en agitación suave a 25 °C y se recolectaron 2 mL de muestra a diferentes tiempos. Las muestras fueron leídas frente a blanco a una longitud de onda de 538 nm y 483 nm en un equipo UV-Vis (Perkin-Elmer, Modelo Lambda 20). Previamente se realizó una curva de calibración para cada solución. Las muestras fueron recolectadas hasta que la concentración en el seno de la solución permaneció constante. Todos los experimentos se llevarán a cabo por triplicado.

Elucidación del tipo y mecanismo de transporte

Con el objetivo de conocer la velocidad y mecanismo de transporte de las betalaínas al medio líquido, los datos obtenidos de los estudios cinéticos fueron modelados para la ecuación de la ley de la potencia (Ec. 3). Cabe mencionar que este modelo es ajustable a una liberación menor al 60% y para morfologías esféricas, por lo tanto,

$$\frac{M_t}{M_{inf}} = Kt^n \quad \text{Ec. 11}$$

- I. Donde: M_t y M_{inf} es la cantidad de sustancia que se libera en el tiempo t , y en un tiempo infinito.
- II. K es una constante relacionada con las características estructurales y geométricas de la matriz polimérica.
- III. n es el exponente de liberación, indicativo del mecanismo de liberación del agente activo.

En la Tabla 5 se muestran los indicadores de valores de n ; donde n es el exponente difusional que depende del mecanismo de liberación del activo y de la forma del dispositivo, bajo prueba (Andreani *et al.*, 2009).

Tabla 5. Indicadores del mecanismo de liberación en base al valor de n.

Valores de n	Descripción
n= 0.43	Representa un mecanismo de liberación por difusión de Fick
n= 0.85	Cinética de liberación de orden cero (transporte caso II)
n= 0.43 - 0.85	Indicativos de superposición de los dos fenómenos (transporte anómalo)
n< 0.43	Difusión parcial a través del hinchamiento de la matriz y poros hidrofílicos
n>0.85	Indica caso II, relacionado con mecanismos de difusión, relajación de cadenas e hinchamiento

Etapa 2

Elaboración de película de PLA modificada utilizando la técnica de evaporación de solventes

El PLA 4060 D, fue recibido en pellets por lo cual, se molió en un molino de cuchillas (Thomas-Wiley, modelo 4, U.S.A) utilizando dos tipos de mallas de 2 mm y 1 mm. Una vez obtenido el PLA molido con la malla de 1 mm y siguiendo las metodologías modificadas de Yuniarto *et al.* (2014) y Zhu *et al.* (2018), las películas de PLA fueron elaboradas a partir de una solución de 10 % (p/v), 5 % (p/v) y 3 % (v/v) de polietilenglicol diglicidil éter (PEG-DE₅₀₀). Para ello se disolvieron 0.5 g de PLA en 10 mL de acetona y se puso en agitación por 30 min. Posteriormente, a la solución se le adicionó el PEG-DE₅₀₀ y se puso en agitación por 30 min y se vertió en moldes de 10 cm de diámetro por 5 cm de alto. Los moldes se colocaron en una estufa de vacío a 50 °C por 12 h, para el secado de las películas. Una vez obtenidas las películas se les midió el espesor en 10 puntos al azar usando un micrómetro.

Obtención de las películas de PLA modificada y la adición de partículas núcleo-coraza de betalaínas

Siguiendo la metodología modificada de Liu-Fei *et al.* 2015, a la solución formadora de película anteriormente mencionada se les adicionó 0.5 % (p/v) de partículas y se puso en agitación por 30 min. Posteriormente, la solución fue vertida en los moldes y secada en una estufa de vacío a 50 °C por 12 h para la evaporación del solvente y las películas fueron desprendidas de las placas para su caracterización y aplicación en el filete de caballa.

Pruebas mecánicas

Las películas obtenidas por evaporación de solventes con y sin partículas, se cortaron en probetas de geometría estándar para pruebas mecánicas. Las pruebas se llevaron a cabo en una máquina universal de pruebas mecánicas de marca UNITED (modelo SSTM-5KN) por medio de un ensayo de tensión. Se siguió el estándar configurado en el equipo 107-ASTM D1708 para pruebas de microtensión de plásticos, con una velocidad de desplazamiento de 10 mm min⁻¹. Se

realizaron 10 repeticiones de cada tipo de película. Se evaluó el módulo de Young, el esfuerzo a la tensión y el porcentaje de deformación a la fractura (Burrola *et al.*, 2014).

Técnicas de caracterización de películas de PLA con partículas núcleo/coraza de betalaínas

Microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés)

Para evaluar las características superficiales, morfológicas, tamaño y porosidad del material obtenido, se realizaron observaciones en un microscopio electrónico de barrido (marca JEOL, modelo 5410LV) operado a 15 kV.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés)

Con el objetivo de estudiar el cambio en la temperatura de transición vítrea (T_g) de las películas con PEG-DE y partículas. El material fue caracterizado con un equipo (Perkin Elmer, modelo 8500). Se pesaron aproximadamente 10 mg de muestra, a las cuales se les realizó dos rampas de calentamiento y una de enfriamiento de 20 °C a 100 °C y de 20 °C a 150 °C; con el objetivo de borrar el historial térmico de la muestra. Las pruebas se realizaron bajo un flujo de 20 mL/min de gas nitrógeno.

Análisis termogravimétricos (TGA por sus siglas en inglés)

Con el fin de determinar la estabilidad y degradación con respecto a la temperatura, el material se caracterizó utilizando un equipo Perkin Elmer, modelo Pyris 1. Se pesaron aproximadamente 4 mg de muestra y se calentaron hasta 700 °C a una velocidad de calentamiento y enfriamiento de 10 °C min⁻¹, bajo un flujo de 20 mL min⁻¹ de gas nitrógeno con un cambio de gas aire al llegar a los 600 °C.

Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés)

Este estudio se utilizó para determinar la presencia de betalaínas en las partículas y posibles interacciones entre la matriz, así como también conocer si quedan residuos de los solventes utilizados en la extracción de gluteninas. Para la obtención de los espectros se utilizó un equipo Perkin Elmer GX. El número de scans fue de 16, en un intervalo del infrarrojo de 4000 a 500 cm⁻¹.

Etapa 3

Aplicación de películas de PLA con partículas núcleo/coraza de betalaínas en filete de caballa (*Scomber scombrus*)

El pescado fresco (*Scomber scombrus*) fue capturado cerca de la costa atlántica gallega (noroeste de España) y transportado al laboratorio. Este proceso duro 10 h y los peces se mantuvieron en hielo. La longitud y el peso de los especímenes oscilaron entre 15-21 cm y entre 158-304 g, respectivamente.

A su llegada al laboratorio, se separaron tres muestras de peces individuales para ser analizados como material inicial (día 0). Todos los especímenes fueron diseccionados asépticamente para extraerles el músculo. Del músculo obtenido, se pesaron alrededor de 7.5 g para ser colocados en las películas de PLA con partículas núcleo/coraza (M1) y películas de PLA (M0) que fueron utilizadas como control, posteriormente todas las muestras fueron termoselladas. Las muestras fueron almacenadas durante siete días a 4 °C, el muestreo y análisis se realizó el día 4 y 7. En cada momento del muestreo se tomaron 15 muestras de cada tratamiento para su análisis y se dividieron en tres grupos que se estudiaron de forma independiente (n=3). Los análisis realizados fueron químicos y microbiológicos.

Análisis químicos

Extracto Bligh and Dyer (B & D)

Para realizar el extracto se pesaron en un tubo de ensayo 4 g de músculo y se le adicionaron 8 mL de metanol y 4 mL de diclorometano. Posteriormente, utilizando un ultra turrax se homogenizo la muestra a 800 rpm por 30 segundos, se centrifugó a 3250 rpm por 10 minutos a 4 °C. Una vez centrifugada la muestra se separó la fase acuosa de la fase orgánica y se colocaron en recipientes por separado. El remanente de la muestra se le dio un segundo lavado añadiendo 4 mL de metanol, 4 mL de diclorometano y 2 mL de agua destilada esta muestra se homogenizo por 20 segundos y se centrifugo nuevamente. La fase acuosa se descartó y la fase orgánica se mezcló con la extracción orgánica anterior. Consecutivamente, a la fase orgánica se le añadió sulfato sódico anhidrido (Na_2SO_4) en polvo, se homogenizó, se filtró y se realizó lavados con diclorometano de 2 mL por 3 veces. Una vez obtenido dicho extracto se guardó en tubos de 25 mL con tapón de rosca, bajo congelación, para posteriores usos.

Extracto de ácido tricloroacético (TCA)

En la obtención del extracto de TCA se pesaron 10 g de músculo de pescado y se agregaron 30 mL de TCA al 5% en vasos de precipitado, todos los vasos se mantuvieron en hielo. Posteriormente, se homogenizó la muestra en un ultra turrax por 45 segundos y se enfriaron en un congelador de -20 °C por 15 minutos. Pasado el tiempo las muestras fueron filtradas en papel filtro y se lavó el vaso utilizado con ácido tricloroacético frío hasta aforar a volumen de 50 mL. Los extractos obtenidos se guardaron en recipientes de rosca y colocados en un congelador de -20 °C hasta su posterior uso.

Cuantificación lipídica

En la cuantificación lipídica, primeramente, se pesaron y tararon cápsulas de aluminio y se colocaron en una placa con temperatura. Posteriormente se añadieron 500 μL del extracto B & D y se retiraron de la temperatura hasta la evaporación completa del diclorometano (CH_2Cl_2). Una vez evaporado el diclorometano las cápsulas fueron colocadas dentro de un desecador hasta su enfriamiento para ser pesadas. Los resultados fueron expresados en g de lípidos por Kg de músculo.

Índice de peróxidos

El índice de peróxidos fue obtenido agregando 1000 μL del extracto B & D a tubos de ensayo y se pusieron a evaporar con N_2 . Posteriormente, se le agregaron a los tubos, 200 μL de hexano, 5 mL de etanol al 96 %, 100 μL de tiocianato amónico (NH_4SCN) al 30 %. Los tubos se agitaron en un vortex y se les agregó 100 μL de cloruro de hierro (II) (FeCl_2). Todas las muestras fueron medidas frente a blanco a los 3 minutos a 500 nm. Los resultados se expresaron como miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de lípidos (meq O / Kg lípidos). Para la obtención de estos resultados previamente se realizó una curva de calibración.

Formación de compuestos fluorescentes

La determinación de compuestos fluorescentes es un método muy utilizado para evaluar la oxidación para ello se siguió la metodología descrita por Aubourg, 1999. La formación de compuestos fluorescentes se determinó mediante mediciones a 393/463 y 327/415 nm. La fluorescencia relativa se calculó de la siguiente manera: $\text{FR} = F/F_{\text{est}}$, donde F es la fluorescencia medida en cada excitación/emisión máxima y F_{est} es la intensidad de fluorescencia de una solución de sulfato de quinina ($1\mu\text{g mL}^{-1}$ en 0.05 M de ácido sulfúrico (H_2SO_4)) en la longitud de onda correspondiente. La relación de la fluorescencia (RF) se calculó como la relación entre los dos valores.

$$RF = \frac{FR_{\frac{393}{463}nm}}{FR_{\frac{327}{415}nm}} \quad \text{Ec. 12}$$

El valor de RF se determinó usando la fase acuosa y orgánica que resultó de la extracción de lípidos del músculo de pescado (B & D).

Determinación de ácidos grasos libres

El contenido de ácidos grasos libres (AGL) se determinó en el extracto lipídico del músculo de pescado siguiendo el método de Lowry y Tinsley, 1976 basado en la formación de complejos con acetato cúprico-piridina. Para ello, se agregaron 5 mL del extracto B & D en tubos con tapa, el diclorometano fue evaporado con N₂ y posteriormente se agregó 5 mL de tolueno y 1 mL de acetato cúprico al 5 % estabilizado a pH 6 con piridina, los tubos se agitaron en un vortex por 45 segundos y se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos. La absorbancia fue medida a 715 nm frente a blanco. Para la curva de calibración se utilizó el ácido oleico. Los resultados se expresaron como g de oleico/100 mg de lípidos.

Índice de trimetilamina por el método del picrato (i-TMA)

Los valores de trimetilamina se determinaron utilizando el método colorimétrico de picrato, descrito por Tozawa *et al*, 1971. Para ello, se utilizó 1.5 mL del extracto de TCA y 1 mL de TCA 5% (m/v) hasta obtener un volumen final de 2.5 mL, los cuales fueron añadidos a tubos de 25 mL con tapa de rosca, además, se le agregó 0.5 mL de formaldehído al 10 % (v/v), 5 mL de tolueno y 1.5 mL de hidróxido de potasio (KOH) al 25 % (m/v). Posteriormente, las muestras se agitaron suavemente por 5 segundos y se colocaron en baño maría a 30 °C por 5 minutos, pasado el tiempo se agitaron suavemente por 5 segundos y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos a 25 °C. La fase toluénica (fase superior) se separó de la fase acuosa (fase inferior) y 2 mL de la fase toluénica se mezclaron con 2 mL de ác. pícrico, la muestra se mezcló con agitación fuerte por 5 segundos y se midió si absorbancia a 410 nm. Los valores se obtuvieron con ayuda

de una curva de calibración, realizada previamente. Los resultados se expresaron como mg de nitrógeno de trimetilamina por 100 g de músculo (mg N TMA/100g músculo).

Índice del ácido tiobarbitúrico (i-TBA)

El i-TBA se determinó de acuerdo con Vyncke, 1970. Para ello, entre 1-5 mL del extracto de TCA fue utilizado y colocado en tubos con tapa de rosca a los cuales se les añadió 5 mL de solución de TBA. Posteriormente, se taparon los tubos y se introdujeron en un baño con ebullición suave durante 40 minutos, una vez finalizado el tiempo de reacción, los tubos se sacaron del baño y se colocaron en una charola con agua fría, los tubos se agitaron suavemente y se destaparon para dejar escapar el gas producido. Finalmente, el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico se midió espectrofotométricamente a 532 nm y se calculó a partir de una curva de calibración realizada previamente utilizando 1,1,3,3-tetraetoxipropano o también conocido como malondialdehído. Los resultados se expresaron como mg de malondialdehído por Kg de músculo (mg MDA/Kg músculo).

Análisis microbiológicos

Porciones de 10 g de músculo de pescado extraídas asépticamente se mezclaron con 90 mL de agua peptona al 0.1 % y se homogeneizaron en bolsas estériles Stomacher. En todos los casos se realizaron diluciones seriadas de los extractos microbianos.

Los aerobios totales se determinaron en agar por recuento en placa (ARP) después de la incubación a 30 °C durante 48 h. Los anaerobios se investigaron de la misma manera, excepto que se colocó un kit de atmósfera anaeróbica, junto con las placas, dentro del frasco de anaerobiosis. Los psicrotrofos se determinaron en ARP, después de la incubación a 7-8 °C durante 7 días. Los microorganismos que exhibieron fenotipos proteolíticos o lipolítico fueron investigados en agar caseína o agar tributirina, respectivamente, después de la incubación a 30 °C durante 48 h. En todos los casos, los resultados se expresaron como log CFU/g músculo. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software InfoStat (versión 5.0, SAS Institute Inc., USA), con un nivel de significancia de $P=0.05$. Las medias entre grupos homogéneos fueron separadas usando la prueba de comparación de medias de Tukey, con un intervalo de confianza del 95%. Los datos fueron expresados como el valor medio de tres repeticiones más el error estándar. También se utilizó estadística descriptiva.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ETAPA 1

Caracterización fisicoquímica de la pitaya (*Stenocereus thurberi*) y síntesis de partículas núcleo/coraza de betalainas

Caracterización física y química de la pitaya (*Stenocereus thurberi*)

Con el objetivo de conocer nuestra materia prima en estudio, se realizó una caracterización física y química de la pitaya (*Stenocereus thurberi*) ya que es una especie poco conocida y no existen estudios sobre su fruto. En la Figura 8 se muestran las características físicas y químicas de la pitaya roja del género y especie *Stenocereus thurberi*. Donde los atributos morfológicos del fruto muestran una forma casi esférica con diámetros polares y longitudinales mayores que los reportados para *S. pruinosus*, *S. stellatus* y *S. griseus*, sin embargo, *S. thurberi* presentó menor peso comparada con todas las anteriores que oscilan entre 171.15 g a 91.26 g. Las diferencias de peso se deben a la alta tasa de transpiración de la fruta y las diferencias entre las especies se debe al número de areolas, ya que las espinas presentes en las areolas ayudan a reducir la pérdida de agua (García Cruz *et al.*, 2016). La transpiración es una de las causas de las pérdidas poscosecha de este fruto y se tipifica como un fenómeno de transporte de agua desde el interior del fruto hasta el exterior, a través de estructuras vegetales como la epidermis (Maguire *et al.*, 2001). En cuanto a sus atributos químicos la cantidad de azúcares totales fue similar a lo reportado para *S. pruinosus* (57.1-66.7 mg/g), *S. stellatus* (60.7-68.6 mg/g) y *S. griseus* (76.0-103.0 mg/g) (García Cruz *et al.*, 2016; Yáñez López *et al.*, 2005), sugiriendo que dicho contenido podría ser un rasgo característico del género *Stenocereus* (Yáñez López *et al.*, 2005).

Por otra parte, el valor de la acidez titulable de la pitaya roja (*S. thurberi*) fue bajo (0.22%) y similar a lo reportado para *S. pruinosus* (0.17%) y *S. griseus* (0.18%), mientras que en *S. stellatus* se reportan valores de 0.60%, que son mayores comparado con las especies anteriores. En forma consistente el resultado del pH fue alto, similar a lo reportado para *S. pruinosus* (5.70), mientras que para *S. stellatus* se reportan valores de 4.19 (García Cruz *et al.*, 2016), lo que sugiere que la pitaya *S. thurberi* es más dulce que la pitaya *S. stellatus*.

En cuanto a los atributos de color de la pitaya roja *S. thurberi* se obtuvieron valores de 29.45° para el ángulo de tono, 36.29 para croma y 17.19% para luminosidad. Comparando estos resultados con lo reportado por García Cruz *et al.*, (2013) para la pulpa roja de *S. pruinosus* (L*=19.4, H*=19.8° y C*=24.7), presentó un tono magenta, mientras que los valores obtenidos para

S. thurberi, presentó un tono rojo-naranja con menor luminosidad que la pulpa de *S. pruinosus*. El color de la fruta de pitaya se deriva de la presencia de betalaínas (Stintzing y Carle, 2004) por lo cual, el color es un indicador de la proporción entre los dos diferentes grupos (betacianinas y betaxantinas) por lo tanto, se puede suponer que la pulpa de *S. pruinosus* presenta mayor contenido de betacianinas que betaxantinas, mientras que en la pulpa de *S. thurberi* la proporción podría ser muy similar entre ambos grupos.

Para lograr la máxima extracción de betalaínas de la pulpa de la pitaya *S. thurberi* se realizó un análisis de optimización utilizando el método de superficie de respuesta el cual, se discute a continuación.

Optimización por metodología de superficie de respuesta

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA por sus siglas en inglés) (Tabla 6) muestran el efecto del modelo y la relación lineal, interactiva y cuadrática entre los efectos de las variables independientes en su variable dependiente. Se observa que el modelo de la metodología de superficie de respuesta (MSR) fue significativo para la respuesta (concentración de betalaínas). El valor de F (15.869) indicó que la falta de ajuste no fue significativa, lo que implica que el modelo se ajusta a los datos. La temperatura (A) fue la que contribuyó más significativamente ($p < 0.05$) de forma lineal, interactiva y cuadrática en la extracción de betalaínas de la pulpa de pitaya (*Stenocereus thurberi*). Este comportamiento también ha sido observado por otros autores en la extracción de betalaínas (Thirugnanasambandham y Sivakumar, 2017; Ferreres *et al.*, 2017). En este estudio, la variable con la menor influencia en la extracción de betalaínas fue la relación de disolvente (C) con un valor de p (0.4265). El coeficiente de determinación (R^2) también es otro parámetro importante a tener en cuenta, se considera que los valores de R^2 superiores a 0.90 indican una fuerte dependencia de la variable de estudio del cambio de variables independientes (Maran *et al.*, 2013). El valor de R^2 calculado fue de 0.89, lo que indica que el modelo polinomial es un buen predictor de la respuesta y que solo el 0.11 % no puede ser explicado por el modelo. Otros autores han informado coeficientes de determinación más bajos que los obtenidos. Muñiz *et al.* 2013 extrajeron compuestos fenólicos de las hojas de laurel por extracción asistida por ultrasonido, variando la relación sólido / líquido, el tiempo de sonicación

y la concentración de etanol, obteniendo un R^2 de 0.79. Ellos sugirieron tener un alto coeficiente de determinación.

En general, es importante confirmar el modelo ajustado para garantizar que proporcione una aproximación suficiente a los valores reales. La Figura 9 (a) muestra un gráfico de residuos que verifica el supuesto de homocedasticidad e independencia. Lo que indica que los datos se ajustan a una normal. Si bien la gráfica Q-Q se muestra en la Figura 9 (b), podemos observar que los cuantiles de la muestra se ajustan estrechamente al cuantil normal, lo que se interpreta como la validez del supuesto de normalidad. Como corroboración, se realizó la prueba de Shapiro-Wilks, donde el valor de $p = 0.1964$ para un alfa de 0.05, lo que indica que los datos siguen una distribución normal. Por lo tanto, estos resultados implican la confirmación de que el modelo utilizado en este proceso de extracción pudo detectar las condiciones del proceso para la extracción de betalaínas a partir de la pitaya (*Stenocereus thurberi*).

Características	Pitaya roja
Morfología	
Peso de la pitaya (g)	64.97 ± 8.11
Diámetro ecuatorial (cm)	7.95 ± 0.54
Diámetro polar (cm)	8.16 ± 0.27
Color	
Luminosidad (L*) (%)	17.79 ± 0.37
Rojo/verde (a*)	31.61 ± 0.55
Amarillo/azul (b*)	17.85 ± 0.44
Ángulo de tono (H*) (°)	29.45 ± 0.38
Croma (C*)	36.29 ± 0.70
Caracterización química	
Acidez valorable (% ác. cítrico)	0.22 ± 0.01
pH	5.46 ± 0.10
Humedad (%)	86.41 ± 0.13
Azúcares	
Totales (antrona) (mg/g)	68 ± 1.35

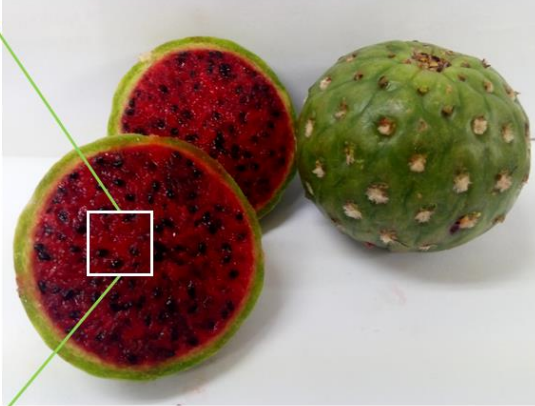


Figura 8. Caracterización física y química de la pitaya (*Stenocereus thurberi*).

Tabla 6. ANOVA de MSR para la extracción de betalaínas de pulpa de pitaya (*Stenocereus thurberi*).

	Coefficiente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-p prob > F
Modelo	2.657	6.548	9	0.727	15.869	<0.0001*
(A)Temperatura	0.390	2.270	1		49.525	<0.0001*
(B) Tiempo de sonicación	0.134	0.311	1		6.794	0.0179*
(C)R. solvente/soluto	-0.042	0.030	1		0.661	0.4265
AB	0.231	0.697	1		15.219	0.0010*
AC	0.197	0.525	1		11.456	0.0033*
BC	-0.003	0.0001	1		0.002	0.9598
A ²	-0.377	0.530	1		11.572	0.0032*
B ²	-0.230	0.233	1		5.084	0.0368*
C ²	-0.138	0.084	1		1.832	0.1926
Lack of fit		0.347	5	0.069	1.891	
Error puro		0.477	13	0.036		
Error total		0.825	18		0.164	
R ²	0.89					
R ² ajustado	0.83					

* Parámetros significativos del modelo ($p < 0.05$); GL: grados de libertad.

Efecto de las variables del proceso

El proceso de extracción de betalaínas a partir de la pulpa de la pitaya roja se llevó a cabo a diferentes temperaturas, tiempo de sonicación y relación solvente/soluto; con el objetivo de conocer el ambiente óptimo de extracción de betalaínas. Para comprender mejor las interacciones entre las variables sobre la extracción de betalaínas, se realizaron gráficos de superficie de respuesta 3D. Las gráficas muestran la influencia de dos variables mientras que la tercera variable se mantiene constante (Figura 10-12).

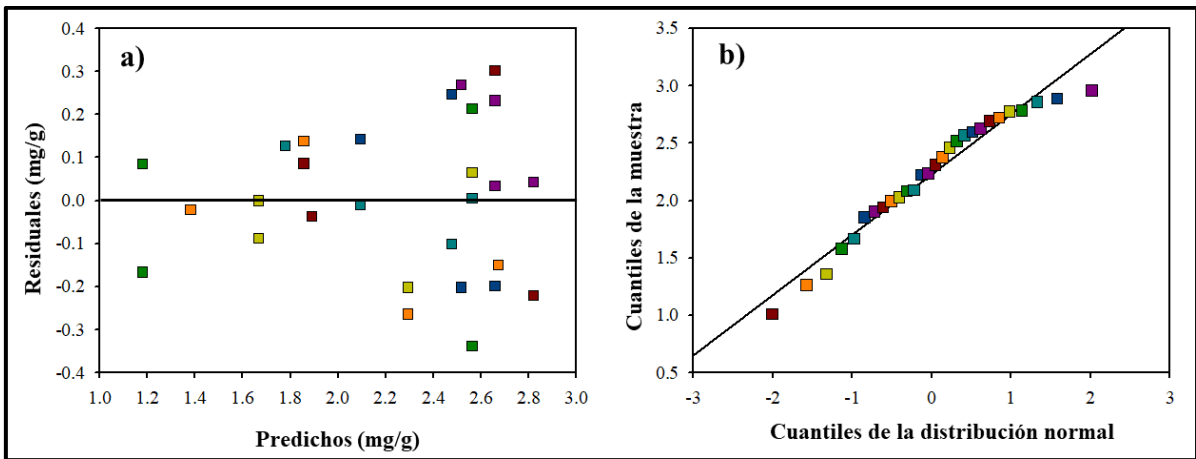


Figura 9. Gráfico residual (a) y gráfico de normalidad Q-Q (b) para la extracción de betalainas de pulpa de pitaya (*Stenocereus thurberi*).

Efecto de la temperatura

Las Figuras 10 y 12 muestran la interacción entre la temperatura, el tiempo de sonicación y la relación de solvente en la extracción de betalaínas. Donde se observa que la concentración de betalaínas aumenta con la temperatura. Este efecto ya ha sido reportado por varios autores como Prakas Maran *et al.* 2013, donde extrajeron betalaínas de tuna (*Opuntia ficus-indica*) por maceración y observaron que el rendimiento aumentaba con el aumento de la temperatura. Este efecto también fue observado por Thirugnanasambandham y Sivakumar, 2017, quienes estudiaron el efecto de la temperatura en la extracción de betalaínas de la cáscara de la fruta del dragón (*Hylocereus polyrhizus*) observando un efecto significativo en la extracción de betalaínas. Bengardino *et al.* 2019 optimizó la extracción de compuestos bioactivos como las betalaínas de las hojas de remolacha, descubrieron que la temperatura era una de las variables que más influyeron en la extracción de compuestos bioactivos. Con estos estudios, se sugiere que la temperatura es una de las variables a considerar para aumentar la extracción de betalaínas independientemente del tipo de fuente o matriz (hojas, cáscaras, pulpa de fruta, etc.) donde se pueden encontrar estos compuestos. Este resultado puede explicarse por el hecho de que el aumento de la temperatura provoca el ablandamiento del tejido vegetal, alterando las interacciones entre compuestos bioactivos, proteínas y carbohidratos, lo que conduce a una mayor extracción (Figura 10b) (Swamy *et al.*, 2014; Manikandan, 2012). Sin embargo, el aumento de la temperatura (superior a 57 ° C) mostró un aumento insignificante en la extracción de betalaínas de la pulpa de pitaya. Esto puede deberse a que a altas temperaturas las betalaínas reducen su estabilidad al pasar a otras estructuras moleculares (Laqui *et al.*, 2018).

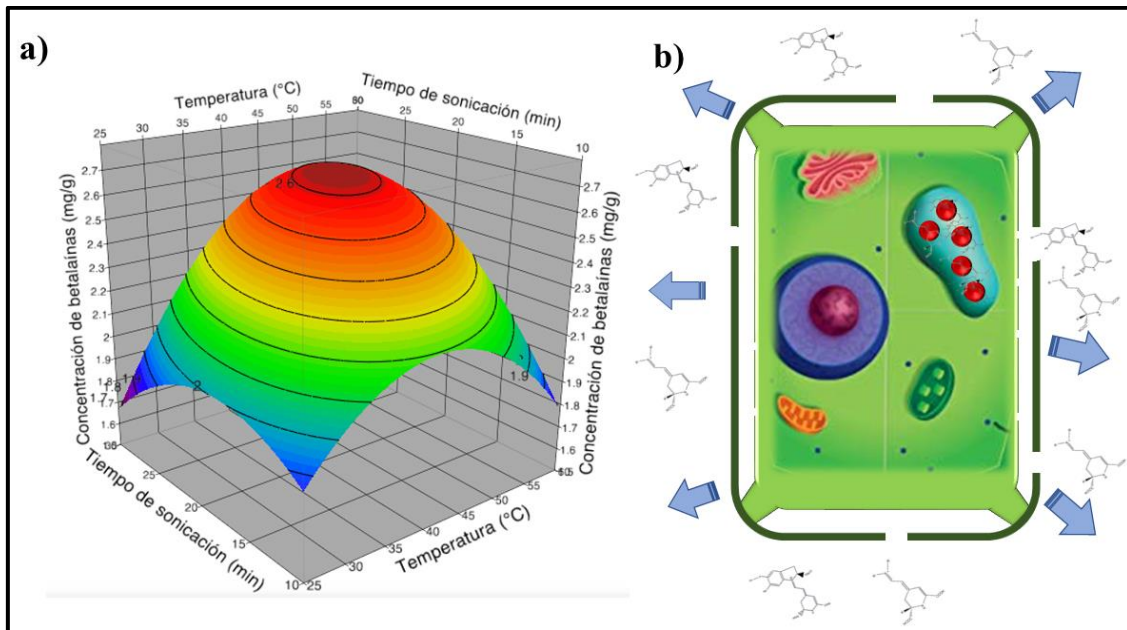


Figura 10. Gráfico de superficie de respuesta que muestra la interacción entre la temperatura y el tiempo de sonicación (a) y su influencia sobre la célula vegetal en la extracción de betalainas de la pitaya (*Stenocereus thurberi*) (b).

Efecto del tiempo de sonicación

Las Figuras 11 y 12 muestran la interacción entre el tiempo de sonicación, la relación de solvente y la temperatura sobre el contenido de betalaínas. Donde podemos ver que cuanto mayor sea el tiempo de sonicación aumenta la concentración de betalaínas. Este resultado Laqui *et al.* (2018) también lo informaron, extrajeron betalaínas de la cáscara de quinua mediante ultrasonido, observando que cuanto más largo era el tiempo de sonicación, obtenían un mayor contenido de betalaínas. Maran, J. P. y Priya, B. (2016) extrajeron betalaínas de tallos de remolacha mediante sonicación y observaron un aumento constante con respecto al aumento de la temperatura. Esto se debe a que a medida que la onda ultrasónica pasa a través del medio líquido, se genera una onda que colisiona con la pared celular causando el agrandamiento de los poros o la ruptura de la pared, permitiendo una mayor difusividad, mejorando el rendimiento de extracción de betalaínas (Figura 11b) (Quan *et al.*, 2009). Sin embargo, a medida que aumenta el tiempo de sonicación, la concentración de betalaínas de la pulpa de pitaya disminuyó (Figura 11a). Este comportamiento está relacionado con la degradación estructural de las betalaínas por las especies reactivas de oxígeno generadas al aumento en el tiempo de sonicación, lo que reduce el rendimiento de extracción. (Roriz, Barros *et al.*, 2017).

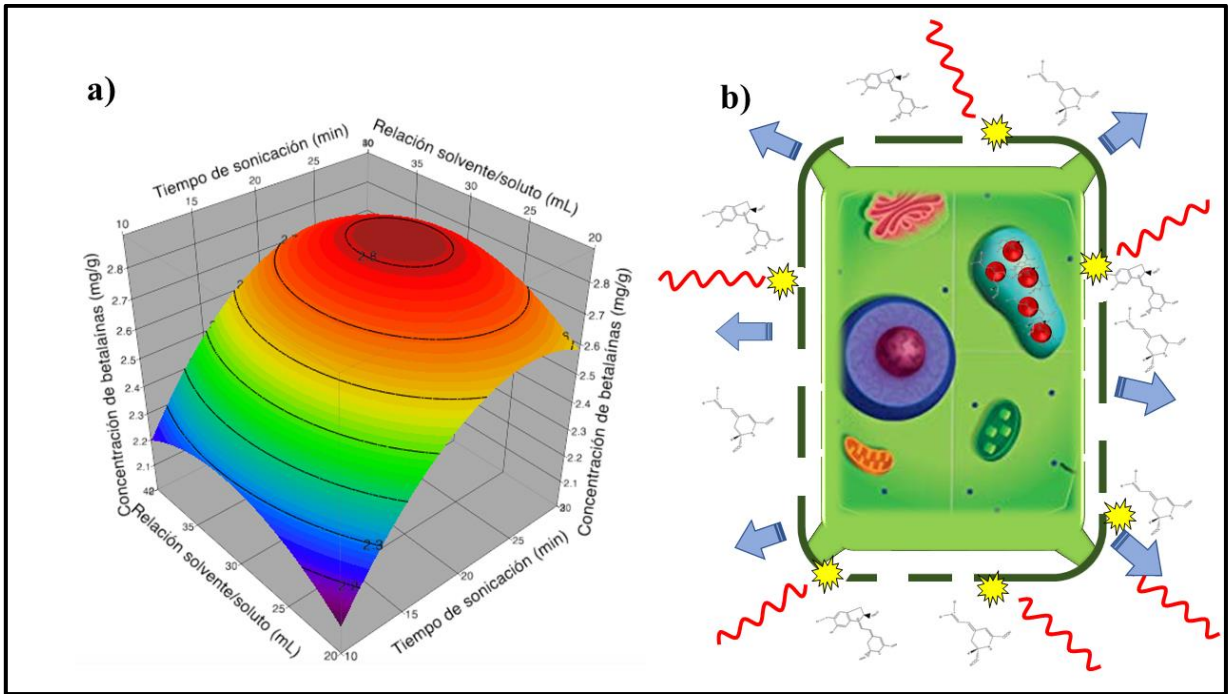


Figura 11. Gráfico de superficie de respuesta que muestra la interacción entre el tiempo de sonicación y la relación de solvente (a) y su influencia sobre la célula vegetal en la extracción de betalainas de la pitaya (*Stenocereus thurberi*) (b).

Efecto de la relación de solvente

Las Figuras 10 y 12 muestran el efecto de la relación del solvente entre la temperatura y el tiempo de sonicación sobre el contenido de betalaínas. Donde se observa que con el aumento del agua favorece la extracción de betalaínas. Este resultado coincide con el obtenido por Roriz *et al.* 2017, quienes extrajeron betalaínas de la parte floral de *Gomphrena globosa L.* usando agua como solvente, mencionando que el rendimiento de las betalaínas aumentó con una mayor cantidad de agua. Esto se debe a que las betalaínas son moléculas polares que tienen una mayor afinidad con el agua, lo que aumenta el rendimiento. Este comportamiento también se ha observado en moléculas como los fenoles. Quiles-Carrillo *et al.* 2019 estudiaron el efecto de la concentración de etanol en la extracción de compuestos fenólicos, observaron que, al disminuir la concentración de etanol, el rendimiento de estos compuestos aumentó. Por lo que, la composición del solvente es uno de los factores más importantes en un proceso de extracción, ya que es crucial para la solubilidad de los compuestos (Zhao *et al.*, 2018). El agua es un solvente que puede facilitar la extracción de compuestos al difundirse en la célula de la planta causando su hinchazón, lo cual es favorable al aumentar el área de contacto superficial entre la matriz y el solvente (Figura 12b) (Hayat *et al.*, 2009).

Determinación y validación de las condiciones óptimas

De acuerdo con los resultados obtenidos por el DCC, se obtuvo el nivel óptimo de cada una de las variables estudiadas. Las condiciones para obtener el contenido máximo de betalaínas de la pulpa de pitaya indican una temperatura de extracción de 57 °C, un tiempo de sonicación de 27 min y una relación de disolvente de 34 mL (Tabla 7). Todas estas condiciones indicaron una extracción de betalaínas de 2.8 mg/g con un valor de deseabilidad de 0.917. Para validar este conjunto de condiciones, se llevaron a cabo experimentos para comparar los resultados experimentales con los valores predichos. La eficiencia de extracción de las betalaínas de la pulpa de pitaya en las condiciones anteriores fue de 2.6 ± 0.08 mg/g (N = 3). Por lo tanto, los resultados obtenidos por los experimentos comparados con los predichos indican la idoneidad del modelo desarrollado (Maran *et al.*, 2013).

Una vez realizada la optimización para la extracción de las betalaínas, el extracto obtenido se hizo pasar por un proceso de ultrafiltración con el objetivo de separar a las betalaínas del resto de moléculas del extracto y se evaluó el efecto de este sobre varios parámetros que se discuten a continuación.

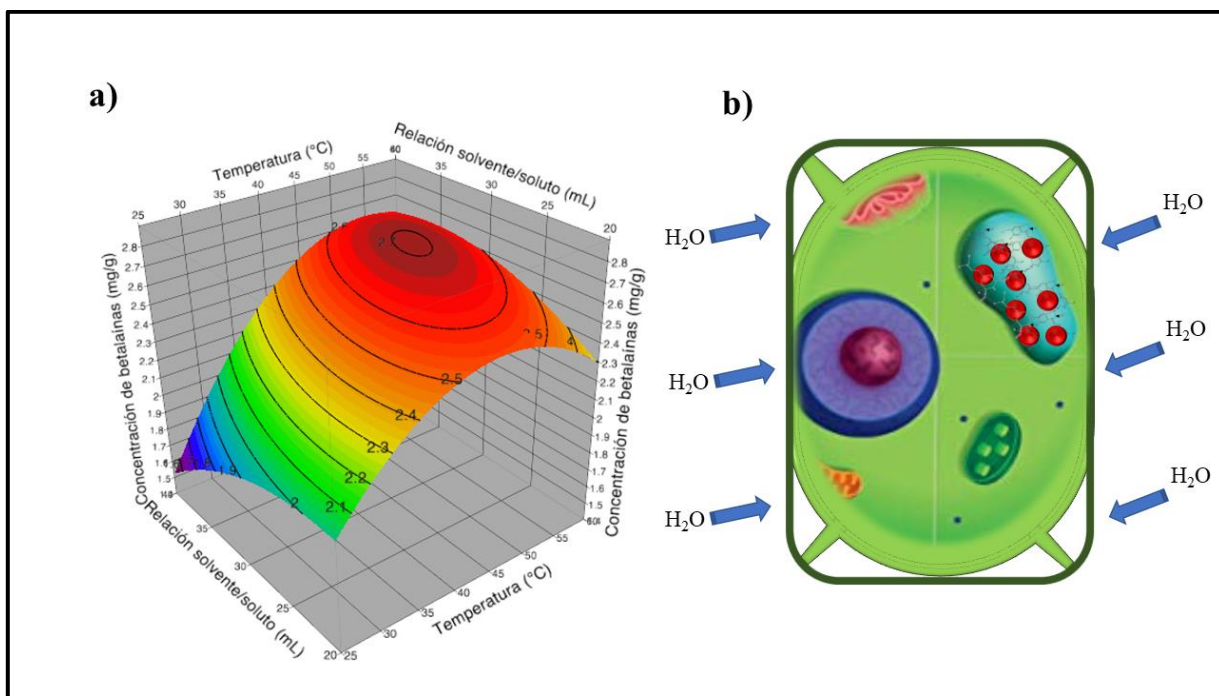


Figura 12. Gráfico de superficie de respuesta que muestra la interacción entre la temperatura y la relación de solvente (a) y su influencia sobre la célula vegetal en la extracción de betalainas de la pitaya (*Stenocereus thurberi*) (b).

Tabla 7. Valores predichos y experimentales de las respuestas en condiciones óptimas obtenidos a partir de 2 g de pulpa de pitaya (*Stenocereus thurberi*).

Niveles óptimos del proceso	Valores predichos	Valores experimentales ^a
	Betalainas (mg/g)	Betalainas (mg/g)
Temperatura (°C) = 57	2.8	2.6 ± 0.08
Relación de solvente (mL) = 34		
Tiempo de sonicación (min) = 27		

^a Media ± desviación estándar de determinaciones por triplicado de los experimentos

Efecto de la ultrafiltración del extracto de pitaya (*Stenocereus thurberi*)

Contenido fitoquímico

En la Tabla 8 se muestra el contenido de fenoles totales y betalaínas del extracto sin ultrafiltrar (E/SU) y del extracto ultrafiltrado (E/U) de pitaya. El contenido encontrado de fenoles totales para el E/SU fue similar a lo reportado para los frutos de otras cactáceas como el garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) con valores de 7.4 a 10.02 mg EAG/g (Herrera *et al.*, 2011) y xoconostle cuaresmeño (*Opuntia matudae*) con 8.5 mg EAG/g (Guzmán *et al.*, 2010). Sin embargo, para otros géneros y especies de cactus como *O. stricta*, *O. undulara* y *O. ficus indica* se han reportado valores inferiores de 1.64 a 2.18 mg EAG/g (Fernández *et al.*, 2010; Castellar *et al.*, 2012). García Cruz *et al.* (2016), informaron el contenido de fenoles totales de la pulpa de pitaya *S. pruinosus* y *S. stellatus* de color rojo, naranja y blanco con valores de 0.35-0.707 mg EAG/g mencionando que la variedad roja fue la que presentó el valor más alto. Mientras que en la pulpa de pitaya *S. griseus* fue de 1.66 mg EAG/g (García Cruz *et al.*, 2013). Como podemos observar el contenido de fenoles puede ser variable entre los frutos de cactáceas incluso del mismo género, presentando mayor contenido la pulpa de pitaya (*S. thurberi*) estudiada por nosotros. Sin embargo, estos datos podrían estar sobreestimados, porque el método colorimétrico utilizado en su determinación no es específico para fenoles y otros compuestos como los azúcares y la vitamina C también pueden reducir el reactivo de Folin-Ciocalteu (George *et al.*, 2005). Lo cual, puede confirmarse con los valores de azúcares totales mencionados anteriormente y la acidez titulable. Por otra parte, el contenido de fenoles totales fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) entre los extractos, con 13.89 ± 0.751 y 20.70 ± 0.813 mg EAG/g en E/SU y E/U, respectivamente. Este resultado concuerda con lo reportado por Vergara *et al.* 2014, donde ellos evaluaron fisicoquímicamente el extracto ultrafiltrado y sin ultrafiltrar de la tuna (*O. ficus indica*) encontrando diferencias significativas en la cuantificación de fenoles en ambos extractos. La ultrafiltración es un método de separación y concentración de compuestos y se ha visto que en extractos de frutas de cactáceas se ven reducidos compuestos como polisacáridos, proteínas y azúcares por lo cual, este resultado puede ser debido a la mayor

disponibilidad de grupos que pueden reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu contribuyendo con una mayor cuantificación de fenoles (Castro Muñoz *et al.*, 2014; Vergara *et al.*, 2014).

El contenido de betacianinas y betaxantinas encontrado (Tabla 8) fue mayor comparado con la tuna (*O. ficus indica*) donde para betacianinas oscila entre 0.07 a 0.254 mg/g y betaxantinas 0.12 a 0.88 mg/g (Moussa Ayoub *et al.*, 2011; Vergara *et al.*, 2014). En especies como *S. pruinosus* y *S. stellatus* se han reportado valores de betalaínas de 0.535 mg/g y 0.707 mg/g respectivamente (García Cruz *et al.*, 2016). Pérez *et al.* 2016 analizaron el contenido de betalaínas en pitayas de *Stenocereus stellatus* y lo compararon con 32 muestras de otras frutas de cactus para clasificar las frutas de cactus como fuentes pobres, buenas y excelentes de betalaínas. Ellos calcularon tres intervalos de confianza para el contenido total de betalaínas, considerado como bajo (inferior a 1208 µg/g), medio (2935–3288 µg/g) y alto (4488–9248 µg/g). Considerando esta clasificación, el contenido de betalaínas en la pulpa de pitaya *Stenocereus thurberi* se define como una buena fuente de betalaínas.

El betabel (*Beta vulgaris*) presenta un contenido de betalaínas de 39.76 mg/g, muy por encima a los valores obtenidos (Georgiev *et al.*, 2010). Sin embargo, las frutas de pitaya pueden presentar mayores concentraciones de betalaínas que otras frutas de cactus. Por otra parte, el contenido de betalaínas no mostró diferencias significativas entre ambos extractos. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Castro Muñoz *et al.* 2014 y Vergara *et al.* 2014, ellos evaluaron las características fisicoquímicas del extracto ultrafiltrado de la tuna (*O. ficus indica*) donde no encontraron diferencias significativas en el contenido de betalaínas. Aunque numéricamente se observa un ligero aumento en el E/U, lo cual es debido a la disminución de la turbidez ocasionada por la presencia de polisacáridos ocasionando un aumento en la intensidad del color (Castro Muñoz *et al.*, 2014).

Tabla 8. Contenido fitoquímico del extracto sin ultrafiltrar (E/SU) y ultrafiltrado (E/U) de pitaya (*Stenocereus thurberi*).

Fitoquímicos	E/SU	E/U
Fenoles totales (mg EAG/g)	13.89 ± 0.751 ^a	20.70 ± 0.813 ^b
Betalainas totales (mg/g)	2.11 ± 0.230 ^a	2.54 ± 0.358 ^a

* Letras diferentes significan diferencias significativas ($p < 0.05$); el peso de la muestra de partida fue de 2 g de pulpa.

Capacidad antirradical ABTS^{•+} y DPPH[•]

En la Figura 13 se muestra la capacidad antioxidante del E/SU y E/U por dos métodos DPPH y ABTS expresados en % de inhibición y mM ET/g de muestra seca. Podemos observar que ambos extractos mostraron una gran capacidad antioxidante, comparando estos resultados con otras frutas de cactáceas. García *et al.* 2016 evaluaron por ABTS la capacidad antioxidante de la pulpa de pitaya (*S. pruinosus* y *S. stellatus*) de diferentes colores: rojo (Spr, Ssr), naranja (Spn) y blanco (Ssb), respectivamente. Ellos reportaron que las pitayas rojas para ambas especies tenían la mayor capacidad antioxidante con valores para Spr 4.91 ± 0.20 mM ET/Kg y Ssr 6.68 ± 0.72 mM ET/Kg de muestras secas. Otro de los frutos de cactus que ha sido evaluado por ABTS es la tuna (*Opuntia ficus-indica*), que muestra una capacidad antioxidante en un rango de 0.0337–0.0856 mM ET/g de muestras frescas (Zafra *et al.*, 2013; Butera *et al.*, 2002). En la pitaya roja (*Hylocereus polyrhizus*) también se determinó la capacidad antioxidante con el radical DPPH, obteniéndose un valor de 0.001664 mM ET/g (Tenore *et al.*, 2012). Estos resultados pueden deberse a la presencia de compuestos fenólicos y betalaínas capaces de reducir los radicales DPPH y ABTS. La identificación de fitoquímicos del género *Stenocereus spp* de dos especies *S. pruinosus* y *S. stellatus* ha sido reportada en la literatura. García *et al.* 2017 informaron que los perfiles y las concentraciones de betalaínas y compuestos fenólicos en los frutos de las dos especies de *Stenocereus* estudiadas, variaban según el color de la pulpa y entre las especies. Además, en las variedades rojas, las betalaínas estaban presentes en niveles mucho más altos que los compuestos fenólicos. Las betalaínas son moléculas con una alta capacidad antioxidante comparable al galato de epicatequina, capaces de donar electrones y protones debido a la presencia de un 5-O-glucosil catecol y 1,7-diazaheptametino (Nakashima y Bastos, 2019). Sin embargo, no todas las betalaínas tienen la misma capacidad antioxidante, y esto dependerá de la fuente y la posición de los grupos hidroxilo/imino y la glicosilación de la aglicona en la estructura de las betalaínas (Cai *et al.*, 2003).

Por otro lado, la capacidad antioxidante fue significativamente diferente entre los extractos y en ambos radicales. Estos resultados son consistentes con los reportados por Castro-Muñoz *et al.* 2015 donde los valores de la capacidad antioxidante se ven favorecidos por la ultrafiltración del extracto de tuna (*Opuntia ficus-indica*), ellos obtuvieron valores del extracto sin filtrar de 11.48

μM ET/g y ultrafiltrado de 15.09 μM ET/g. En la literatura, se ha reportado que los extractos purificados aumentan sus propiedades funcionales. Tenore *et al.* 2014 evaluaron los extractos completos y purificados de pithaya (*Hylocereus polyrhizus*) en microorganismos y encontraron que de acuerdo con los valores de la concentración mínima inhibitoria (MIC), los extractos purificados de pulpa y cáscara ejercieron un amplio espectro antimicrobiano al inhibir el crecimiento de todas las bacterias, mientras que los extractos enteros revelaron una actividad muy baja o totalmente inactiva. Por lo tanto, los resultados obtenidos podrían deberse a que en el E/SU puede contener compuestos que podrían actuar como prooxidantes evitando la reducción de radicales libres y la ultrafiltración haya favorecido el permeado y la concentración de compuestos altamente antioxidantes ya que se ha visto que con el método de ultrafiltración puede haber una retención de compuestos en la membrana de hasta el 50% (Cassano *et al.*, 2010; Pap *et al.*, 2012; Yilmaz *et al.*, 2018).

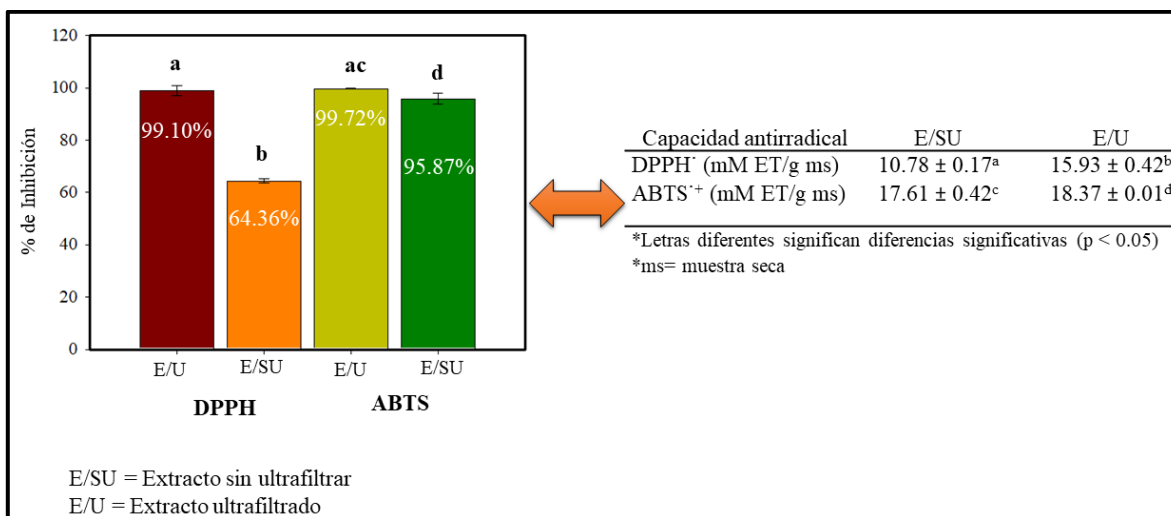


Figura 13. Capacidad antirradical ABTS^{•+} y DPPH[•] del extracto sin ultrafiltrar (E/SU) y extracto ultrafiltrado (E/U).

La Tabla 9 muestra los valores de la concentración a la que se tiene el 50% de la reducción de radicales ABTS y DPPH. Podemos observar que el E/U fue el que presentó valores significativamente más bajos de IC₅₀ con respecto al E/SU. Luo *et al.* 2014 informaron valores de IC₅₀ en el radical DPPH de 0.83 mg/ml para la cáscara de pitahaya de *Hylocereus polyrhizus*. Sin embargo, los valores obtenidos en el radical ABTS para el E/U son similares a los obtenidos para el ácido ascórbico, potente antioxidante con una IC₅₀ de 1.81 mg/ml (Fathordoobady *et al.*, 2016). La diferencia significativa entre los radicales ABTS y DPPH en ambos extractos puede deberse al hecho de que el mecanismo de inhibición utilizado por ambos extractos es por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) predominando la inhibición del radical ABTS. Sin embargo, esto puede deberse a varios factores, como la solubilidad, la energía de disociación del enlace, el potencial de ionización, la estructura antioxidante y el disolvente (Liang *et al.*, 2014).

Identificación de fitoquímicos presentes en la pulpa de pitaya por UPLC-DAD-MS

La pulpa de pitaya *Stenocereus thurberi* fue analizada con el objetivo de conocer los fitoquímicos presentes y la eficiencia del proceso de ultrafiltración. Para ello, se analizaron dos extractos, el extracto sin ultrafiltrar (E/SU) y el extracto ultrafiltrado (E/U). La Tabla 10 muestra los resultados del análisis de MS con los posibles compuestos que están presentes en las muestras. Podemos observar que en el E/SU hubo una mayor presencia de compuestos fenólicos como el ácido ferúlico, el ácido cafeico, el ácido p-coumárico y la quercetina con tiempos de retención de 0.43, 2.45, 4.19 y 9.23 min, respectivamente (Figura 14a). La presencia de estos compuestos fenólicos también ha sido reportada por García *et al.* 2017 en la pulpa pitaya de *Stenocereus stellatus* y *Stenocereus pruinosus*. Sin embargo, en el E/U hay una disminución en los compuestos fenólicos (Figura 14b), principalmente aquellos que tienen el mayor tiempo de retención, como el ácido cafeico, rutina, quercetina e isorhamnetina, por mencionar algunos. Este resultado puede estar relacionado con el factor de recuperación del proceso de ultrafiltración donde se obtuvo el 50 % ± 0.066. Algunos investigadores han estudiado el efecto de la ultrafiltración; Pap *et al.* 2012 estudiaron el efecto de la ultrafiltración en el contenido de antocianinas y flavonoides en el jugo de grosella negra, los autores mencionan que el proceso

de ultrafiltración tuvo un efecto significativo en la disminución del 50 % de estos compuestos en comparación con el jugo inicial. Cassano *et al.* 2009 también observaron la disminución de compuestos fenólicos en el jugo de la mandarina, así como la disminución de flavonoides en el jugo de tuna (Cassano *et al.*, 2010). Esta disminución se debe principalmente al tamaño de los poros de la membrana de ultrafiltración, aunque no es la única razón, sino también al fenómeno del ensuciamiento de la membrana, como el bloqueo de los poros y la formación de capas compuestas, que promueven la retención de compuestos en la membrana (Yilmaz *et al.*, 2018).

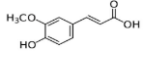

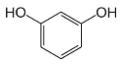
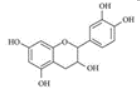
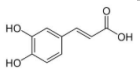
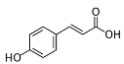
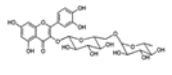
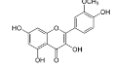
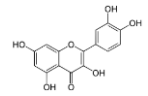
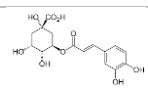
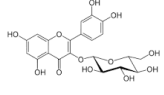
En la Figura 15, el proceso de ultrafiltración se esquematiza, donde se puede observar que el E/U tiene una disminución en las moléculas. Sin embargo, a pesar de la disminución de los compuestos fenólicos debido a la ultrafiltración, el E/U mostró una mayor capacidad antioxidante en ambos radicales. Esto indica que en los extractos purificados se pueden favorecer las propiedades funcionales, debido a la concentración, y que muchos compuestos pueden actuar de forma antagónica o sinérgica (Tenore *et al.*, 2014; Mercado *et al.*, 2020).

Tabla 9. Valores necesarios para inhibir el 50 % del radical DPPH[·] y ABTS^{·+} del extracto sin ultrafiltrar (E/SU) y ultrafiltrado (E/U).

IC ₅₀ (mg/mL)		E/SU	E/U
		DPPH [·]	8.9 ^a
	ABTS ^{·+}	3.0 ^b	1.8 ^d

* Letras diferentes significan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Tabla 10. Identificación de posibles fitoquímicos presentes en la pulpa de pitaya (*Stenocereus thurberi*) del E/SU y E/U.

	Estructura química	FM	MM	m/z (M + H) ⁺	m/z (M - H) ⁻	E/SU (TR)	E/U (TR)
Compuestos fenólicos							
Ác. ferúlico		C ₁₀ H ₁₀ O ₄	381	382	380	0.43	0.45
Ác. gálico		C ₇ H ₆ O ₅	170	171	169	0.56	0.56
Resorcinol		C ₆ H ₆ O ₂	110	111	N.D.	1.15	1.15
Catequina		C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290	291	289	1.21	1.25
Ác. cafeico		C ₉ H ₈ O ₄	180	181	N.D.	2.45	N.D.
Ác. p-coumárico		C ₉ H ₈ O ₃	164	165	163	4.19	4.19
Rutina		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610	611	609	6.52	N.D.
Isorhamnetina		C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316	317	N.D.	8.14	N.D.
Quercetina		C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302	303	N.D.	9.23	N.D.
Ác. Cafeoilquinico		C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354	N.D.	353	11.31	N.D.
Quercetina glucosilada		C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464	465	N.D.	11.90	N.D.

N.D = No detectado; TR = tiempo de retención; FM = fórmula molecular; MM = Masa molecular; m/z = masa/carga.

En ambos extractos estudiados de pulpa de pitaya (*Stenocereus thurberi*), se identificó la presencia de ácido gálico y resorcinol a 0.56 min y 1.15 min, respectivamente (Tabla 10 y Figura 13a, b). Es de nuestro conocimiento que tales compuestos no han sido reportados en el género de *Stenocereus spp.* Está claro que hay pocos estudios sobre las especies de este género y sus frutos. Por lo tanto, este hallazgo podría proporcionar un valor agregado a la pitaya *Stenocereus thurberi*, ya que el ácido gálico tiene propiedades como antimutagénico, antimicótico y es un potente antioxidante aún más efectivo que el ácido ascórbico (Yen *et al.*, 2002; Yilmaz *et al.*, 2004). Del mismo modo, el resorcinol es un compuesto fenólico ampliamente utilizado en cosméticos, medicamentos y como antioxidante (Yin *et al.*, 2011).

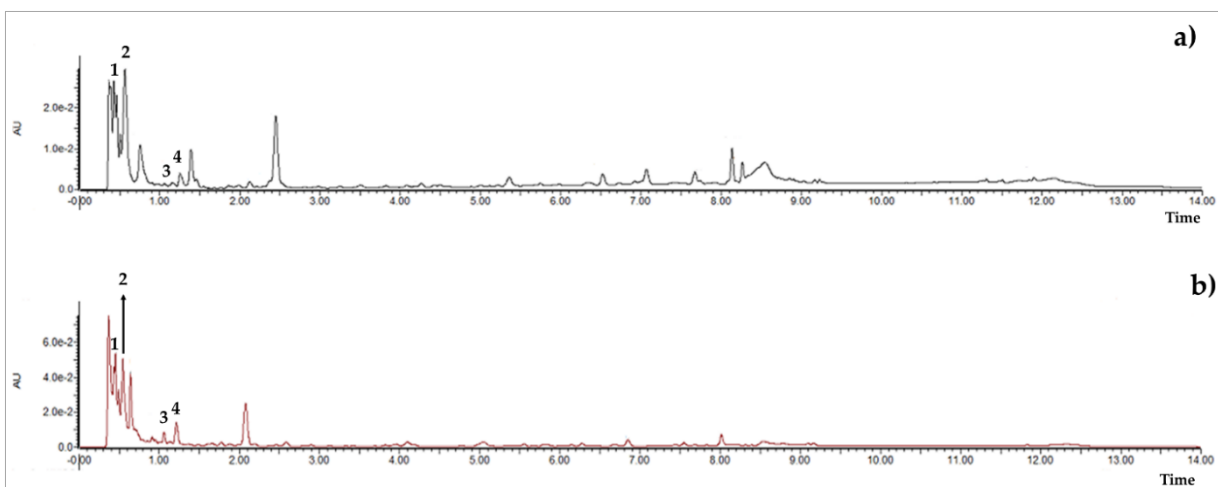


Figura 14. Cromatogramas de UPLC de los compuestos fenólicos presentes en extracto sin ultrafiltrar (a) y ultrafiltrado (b) a 280 nm, [eje y = intensidad (unidad de absorbancia, AU); eje x = tiempo de retención (min)]. Picos: 1, ácido ferúlico; 2, ácido gálico; 3, resorcinol y 4, catequina.

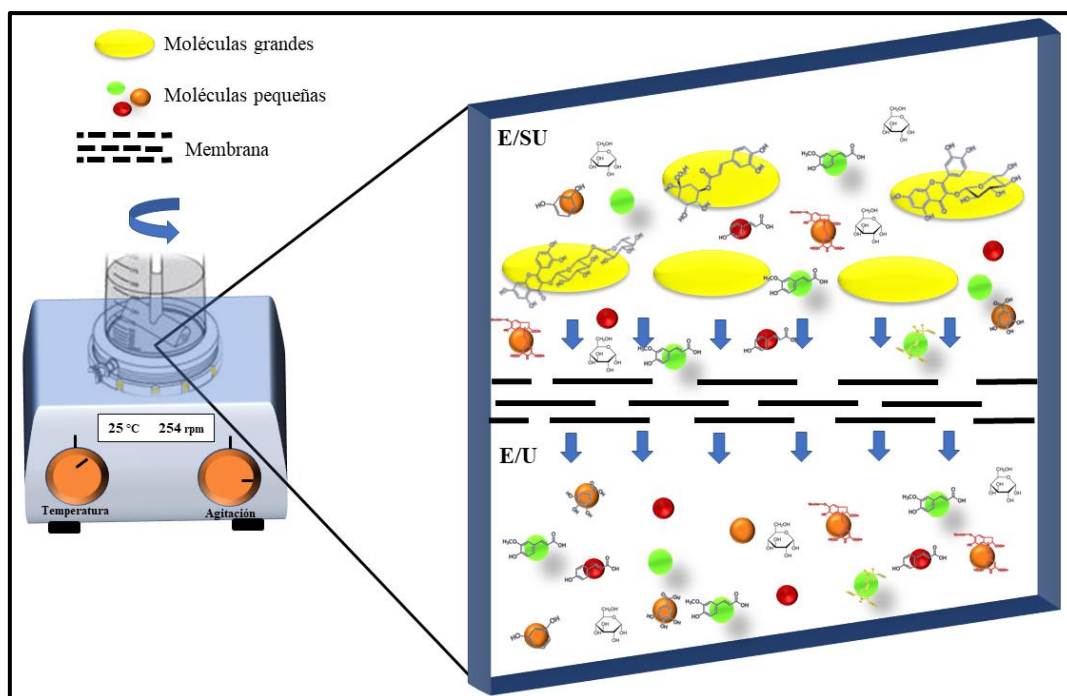


Figura 15. Esquema del proceso de ultrafiltración que representa las principales moléculas presentes en el extracto de pitaya (*Stenocereus thurberi*) antes y después del proceso.

Análisis de correlación entre fitoquímicos y capacidad antioxidante

En la Tabla 11 podemos observar los valores de coeficientes de correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fitoquímicos de la pitaya (*Stenocereus thurberi*). Donde los coeficientes de correlación entre la capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales fueron positivos y altamente significativos ($p \leq 0.01$) para el radical DPPH y significativos ($p < 0.05$) para el radical ABTS en ambas muestras. Esta observación concuerda con el trabajo de Dehbi *et al.* (2013) con respecto a la correlación del contenido de fenoles totales con la capacidad antioxidante en jugos de nueve cultivares de tuna (*Opuntia ficus-indica*). La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se atribuye a sus propiedades redox, que les permiten actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, inhibidores de oxígeno y también quelación de metales (Abdel Hameed *et al.*, 2014).

Los coeficientes de correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de betacianinas y betaxantinas fueron mayores de 0.90 ($r > 0.90$) en todos los casos. El contenido de betacianinas y betaxantinas de la pitaya se correlaciono positivamente con la capacidad antioxidante y fue altamente significativo ($p \leq 0.01$) para ambos radicales y muestras respectivamente. Se ha reportado que la actividad antioxidante de betalaínas está relacionada con su estructura química, ya que la capacidad antioxidante aumenta con el número de grupos hidroxilo y grupos imino y disminuye con una mayor glucosilación en la molécula (Miguel, 2018). Sin embargo, de acuerdo con Gandía Herrero, Escribano y García Carmona, (2009), la actividad antioxidante de las betalaínas, en particular de las betaxantinas, no está relacionada con la presencia de grupos hidroxilo o aromaticidad de la estructura. Según los mismos autores, existe una “actividad intrínseca” de las betaxantinas que podría estar asociada con el sistema de resonancia que esta soportado por los dos átomos de nitrógeno y ser general para todas las betalaínas. No obstante, la presencia de grupos hidroxilo en betaxantinas aumenta su capacidad antioxidante (Gandía Herrero *et al.*, 2009). Por lo tanto, estos datos sugieren que los compuestos fenólicos como las betacianinas y betaxantinas presentes en la pulpa de pitaya (*Stenocereus thurberi*) contribuyen significativamente en la capacidad antioxidante.

Tabla 11. Valores de coeficientes de correlación entre la capacidad antioxidante (ABTS, DPPH) y el contenido de fitoquímicos del extracto sin ultrafiltrar (E/SU) y ultrafiltrado (E/U) de pitaya.

Fitoquímicos		Coeficientes de correlación (r)			
		E/SU		E/U	
		*ABTS	*DPPH	*ABTS	*DPPH
Fenoles		0.983	0.997	0.922	0.988
Betalaínas	Betacianinas	0.982	0.992	0.902	0.997
	Betaxantinas	0.991	0.994	0.941	0.991

*Todos los datos fueron significativos ($p < 0.05$)

Efecto del pH en el cambio de color de betalaínas

Con el objetivo de evaluar el efecto del extracto ultrafiltrado sobre el cambio de color en presencia de diferentes pH, en la Figura 16 se muestra la gráfica del cambio de color (ΔE) con respecto al pH. Se observa que a valores extremos de acidez y alcalinidad existen diferencias significativas en el cambio de color. Sin embargo, podemos observar que no se muestran cambios significativos en un rango de pH de 4-7. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, en donde se menciona que las betalaínas son estables a un rango de pH de 4-7 (Stintzing *et al.*, 2004).

Las betalaínas durante su degradación pueden experimentar cambios en su estructura como la ruptura del enlace aldimina, deshidrogenación, desglucosilación y descarboxilación (Stintzing *et al.*, 2007; Manchali *et al.*, 2013; Khan, 2016). El pH es el factor principal que afecta la estabilidad del color en betalaínas, aunque presentan una estabilidad al pH que oscila entre 4-7 (Figura 15), las condiciones de pH más allá de esta gama inducen fácilmente su degradación (Manchali *et al.*, 2013). En pH ácido las betalaínas experimentan cambios en su estructura debido a la deshidrogenación de los carbonos, C2 y C15 dando una coloración amarilla, a esta estructura también se le conoce como neobetanina (Reshmi, Aravindhan & Suganyadavi, 2012; Gengatharan, Dykes & Choo, 2017). Además de este cambio estructural a pH ácido, pueden experimentar descarboxilación de los carbonos C2, C15 y C17, siendo la descarboxilación del C17 la que origina un cambio de color (naranja-rojo) mientras que la descarboxilación del C2 y C15 presentan color rojo (Gengatharan, Dykes & Choo, 2017). Otro de los cambios estructurales que pueden sufrir las betalaínas a pH ácido es la desglucosilación presentando un cambio de color de violeta-rojo. Por otra parte, en condiciones alcalinas las betalaínas se ven afectadas por la hidrólisis del enlace aldimina (Herbach, Stintzing & Carlie, (2006), originando la separación del ácido betalámico (color amarillo) y el ciclo-DOPA (incoloro) (Figura 17).

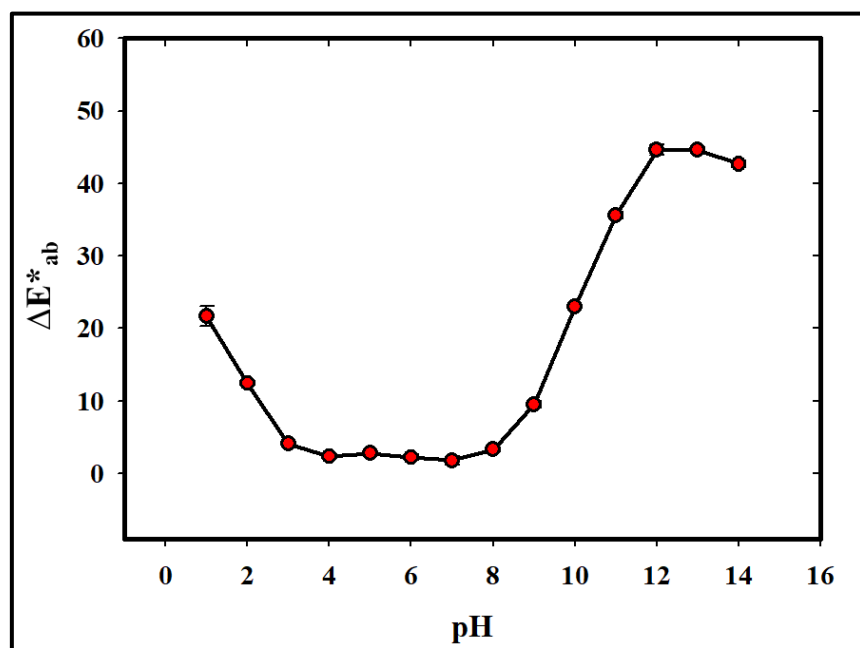


Figura 16. Efecto del pH sobre el cambio de color de betalaínas de la pitaya (*Stenocereus thurberi*)

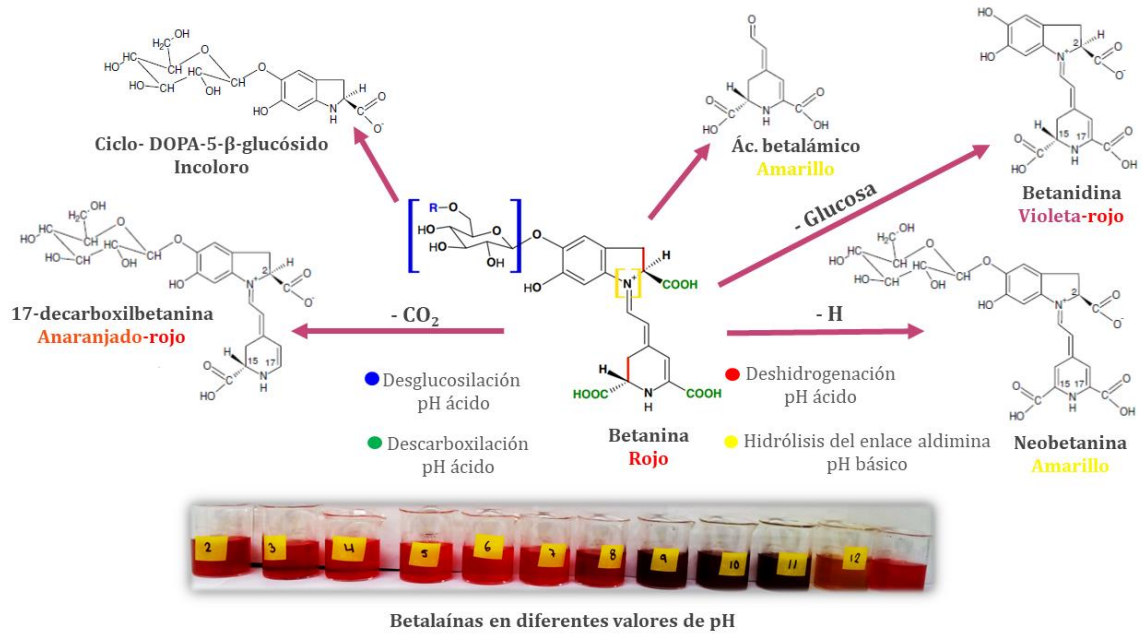


Figura 17. Esquema de los sitios propensos que afectan la estabilidad de betalainas por efecto del pH.

Síntesis y caracterización de partículas de FSG por electroaspersión

En la síntesis de partículas a partir de la fracción soluble de gluteninas (FSG) se estudiaron diferentes parámetros con el objetivo de encontrar las condiciones idóneas para obtener partículas con la mejor morfología.

Solvente

Para la síntesis de partículas a partir de la fracción soluble de gluteninas (FSG), se evaluaron dos tipos de solventes el ácido acético (70%, 80% v/v) y etanol (70%, 80% v/v). Mostrando diferencias significativas entre ellos, siendo el ácido acético al 80% v/v el que presentó mayor porcentaje de solubilidad (Figura 18). En la literatura, se ha reportado que el ácido acético diluido es un buen disolvente para las gluteninas (Pitkanen *et al.*, 2012; Wieser, 2007; Majzoobi *et al.*, 2012). Pero también, se menciona que la fracción de bajo peso molecular de las gluteninas se puede disolver en etanol diluido (Lambourn *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2004). La diferencia de solubilidades es debido al bajo momento dipolar que presentan las gluteninas por lo que, solventes que presentan una constante dieléctrica elevada como el etanol y agua, no son solventes adecuados para disolver a las gluteninas (Singh *et al.*, 2013).

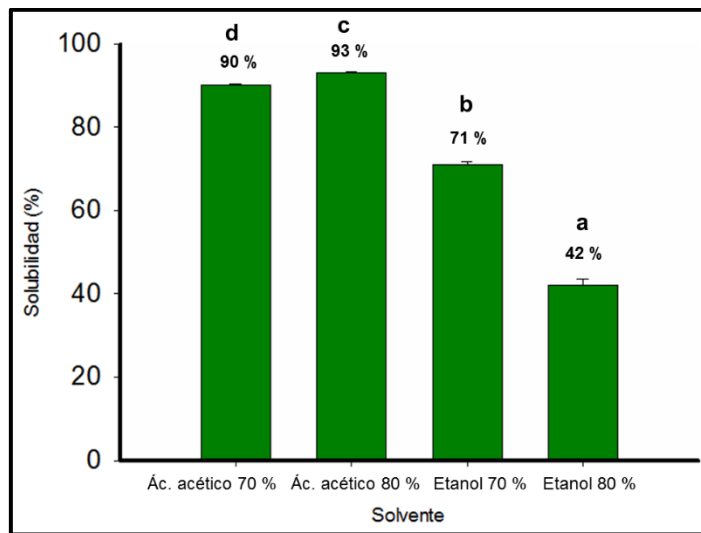


Figura 18. Porcentaje de solubilidad de ácido acético y etanol al 70 % y 80 %
*Letras diferentes significan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Concentración

Usando el ácido acético (80% v/v) se prepararon soluciones de la fracción soluble de gluteninas (FSG) a diversas concentraciones (1%-12% p/v) con el objetivo de estudiar el efecto de las propiedades fisicoquímicas de las soluciones sobre las características de las partículas obtenidas por electroaspersión. En la Tabla 12 se muestran las propiedades fisicoquímicas de las soluciones sobre el tamaño de las partículas de FSG, donde podemos observar que a medida que aumenta la concentración de FSG también aumenta la viscosidad y la densidad de la solución, mostrando el mayor valor de viscosidad (0.9492 ± 0.055 Pa.s) para la concentración del 12% p/v, obteniendo partículas de gran tamaño (1.030 ± 0.086 μm). El aumento del tamaño de partículas con una mayor concentración de polímero ya se ha reportado (Gómez Estaca *et al.*, 2012). Esto es debido a la mayor masa del polímero en las gotas generadas durante el proceso de electroaspersión y la viscosidad de la solución ya que la viscosidad juega un papel muy importante durante la aspersión del líquido, y por lo tanto influye en el tamaño de las gotas (Hao *et al.*, 2014). La menor concentración y viscosidad a la que se lograron obtener partículas de FSG fue para la concentración del 6 % (p/v) (0.1794 ± 0.005 Pa.s), obteniendo un diámetro de partícula significativamente menor (0.812 ± 0.209 μm) que el resto de las concentraciones electroaspradas. Las soluciones de menor concentración de 1 %, 2 % y 4 % (p/v) no se lograron electroasprar, arrojando solo gotas a la placa colectora. Gómez Estaca *et al.* 2012 realizaron partículas de zeína a distintas concentraciones por la técnica de electroaspersión, donde ellos mencionan que con concentraciones bajas (2% y 4% p/v) no hay suficientes entrecruzamientos intermoleculares entre las cadenas del polímero como para permitir que las cadenas se agreguen en partículas.

Tabla 12. Propiedades fisicoquímicas de soluciones de FSG.

Concentración (%)	Viscosidad (Pa.s)	Densidad (g/cm ³)	Tamaño de partícula (μm)
1	0.0041±0.000	1.067±0.001	NA
2	0.0067±0.000	1.072±0.000	NA
4	0.0341±0.000	1.077±0.001	NA
6	0.1794±0.005	1.082±0.001	0.812±0.209 ^a
8	0.3569±0.017	1.085±0.001	0.877±0.205 ^b
10	0.8668±0.035	1.089±0.001	1.151±0.179 ^c
12	0.9492±0.055	1.093±0.001	1.030±0.086 ^d

*Letras diferentes significan diferencias significativas (p< 0.05)

NA= no aplica, ya que no se obtuvieron partículas

Morfología

Los cambios en la morfología de las partículas de FSG con el aumento de la concentración se muestran en la Figura 19, se observa que cuando la concentración es baja, es decir del 6 % (p/v), las partículas son planas, alargadas y colapsadas. Sin embargo, con el aumento de la concentración no solo dio lugar a un aumento en el tamaño de las partículas, sino que también a un cambio en su morfología. La concentración del 8 % (p/v) muestra partículas colapsadas en forma de hojuela con tamaños de partículas entre 0.159 μm a 2.968 μm , mientras que para las concentraciones de 10 % y 12 % (p/v) se muestran partículas colapsadas, pero en menor cantidad que en las del 8 % (p/v) y con cavidades en diferentes ángulos de las partículas, los diámetros fueron entre 0.206-2.697 μm y 0.301-2.888 μm respectivamente. Gómez Estaca *et al.* 2012 estudiaron el efecto de las variables de electrospersión en la obtención de nanopartículas de zeina, donde también obtuvieron partículas colapsadas en forma de hojuelas y con cavidades en diversos ángulos de las partículas a concentraciones mayores del 10 %. Zaeim *et al.* 2018 también obtuvieron partículas de goma arábica con cavidades. Estas formas se pueden atribuir a la evaporación incompleta del solvente debido a la distribución no homogénea de las cadenas del polímero (separación de fases) en las gotitas formadas a partir de electrospersión, lo cual, genera regiones ricas en solvente y ricas en polímero creando cavidades en la superficie de las partículas al secarse (Hao *et al.*, 2014; Zaeim *et al.*, 2018). Gómez Estaca *et al.* 2012 atribuyen este efecto al aumento en el tamaño de las gotas junto con una rápida evaporación del solvente. La volatilidad del solvente está relacionada con su temperatura de ebullición, por lo que, solventes con altas temperaturas de ebullición se vaporizan con menos facilidad que los solventes con bajas temperaturas de ebullición. Esto afecta la morfología de las partículas por la rápida evaporación del solvente, debido a que hay menos tiempo disponible para que las cadenas de polímero se contraigan y reorganicen (Bock, Dargaville & Woodruff, 2012). Derivado de esto se puede decir que los parámetros que más influyen en la morfología de las partículas es la naturaleza del polímero (solubilidad, peso molecular, concentración) y el solvente (presión de vapor, miscibilidad). En base a las morfologías observadas y a la cantidad de partículas obtenidas (datos no mostrados) se decidió elegir la solución del 12 % (p/v) para posteriores análisis.

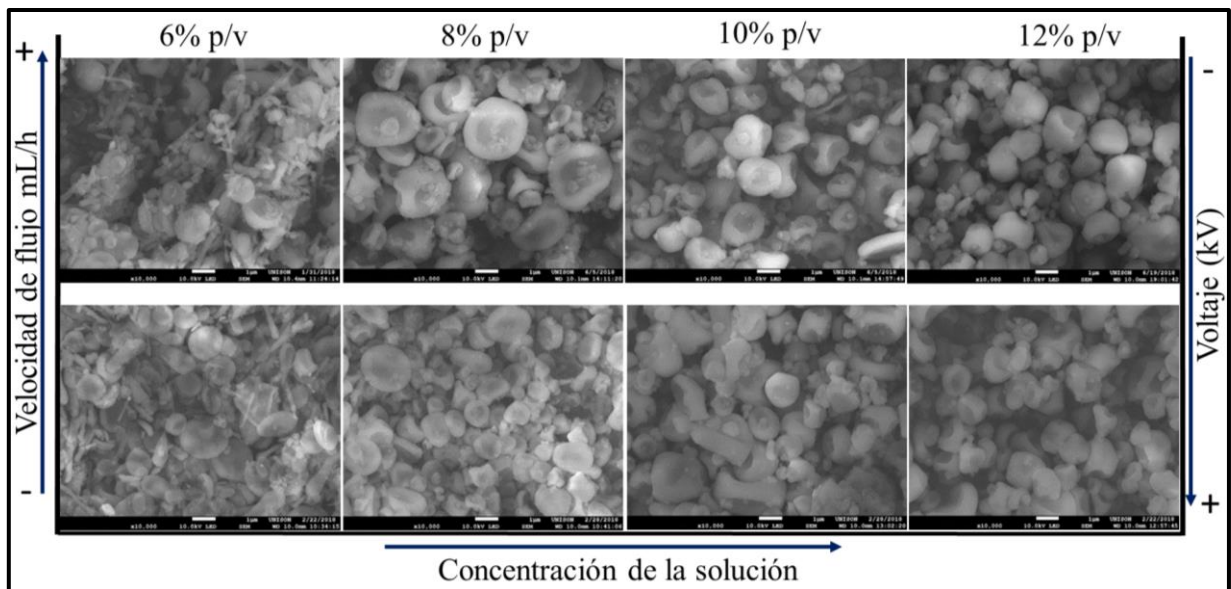


Figura 19. Esquema del efecto de la concentración, velocidad de flujo y voltaje en la morfología de partículas de FSG.

Voltaje

En la Figura 20 se muestra el efecto del voltaje aplicado en el tamaño y morfología de las partículas. Se observa que a mayor voltaje disminuye el tamaño de partícula, sin embargo, el voltaje de 15 kV y 17 kV con tamaño promedio de partículas de 1.130 μm y 1.126 μm respectivamente, no mostraron diferencias significativas en el tamaño, pero si se observaron diferencias significativas aplicando un voltaje de 20 kV. En cuanto a la morfología no hubo cambios considerables entre el voltaje de 15 kV y 17 kV. Sin embargo, al aumentar el voltaje a 20 kV se observaron mayor número de pequeñas partículas formadas a partir de gotitas satélite. Esto es debido al alto voltaje aplicado que conduce a que la gota que sale de la punta de la aguja alcance el límite de Rayleigh rápidamente provocando que gotas satélites se expulsen junto con las gotitas primarias (Bhushani *et al.*, 2017).

Velocidad de flujo

La velocidad de flujo es un parámetro importante en el proceso de electroaspersión, ya que afecta directamente el tamaño de las partículas (Gómez Estaca *et al.*, 2012). En el presente estudio, el efecto de la velocidad de flujo en el tamaño de las partículas se evaluó a un voltaje de 17 kV con una concentración del 12% variando las velocidades de flujo de 0.5, 0.8 y 1 mL/h. Como se puede observar en la Figura 21, el tamaño de las partículas aumento con las velocidades de flujo más altas de la solución de FSG. Se observaron diámetros de partículas de 0.936 μm para la velocidad de flujo de 0.5 mL/h y 1.128 μm para la velocidad de flujo de 1 mL/h. También muestra la morfología de las partículas donde se observa que conforme aumenta la velocidad de flujo existen mayor número de pequeñas partículas, por lo que las partículas de flujo de 0.5 mL/h fueron las que mejor apariencia y monodispersidad presentaron. Este comportamiento es debido a que velocidades más altas pueden desencadenar la formación de gotitas secundarias originando polidispersidad al tamaño de las partículas (Bock, Dargaville & Woodruff, 2012). Una vez conocidas las condiciones para la obtención de partículas a partir de la FSG para la formación de la coraza, se continuo con la síntesis de partículas núcleo-coraza para la encapsulación de betalaínas, lo cual se discute a continuación.

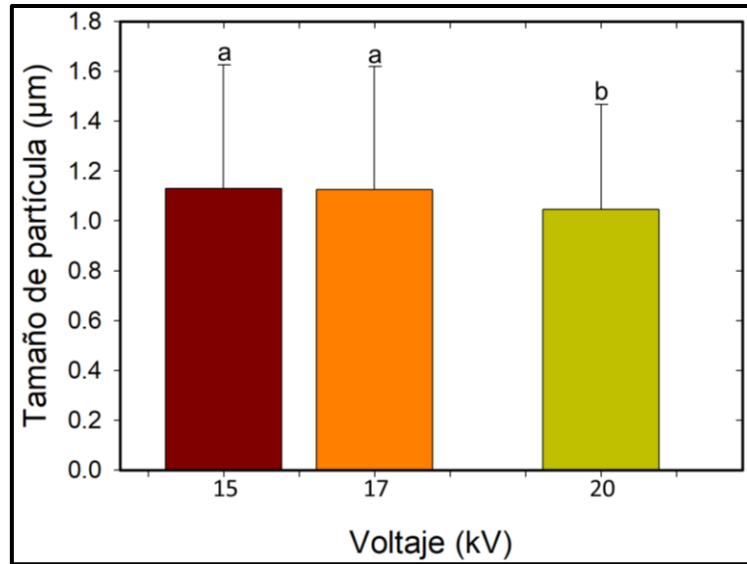


Figura 20. Efecto del voltaje sobre el tamaño de partículas de la FSG.
 *Las variables constantes fueron la concentración: 12% y velocidad de flujo: 1 mL/h

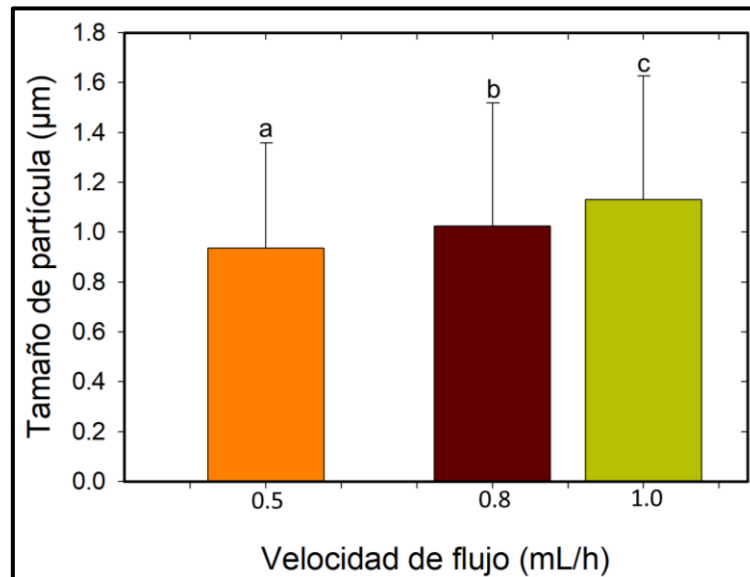


Figura 21. Efecto de la velocidad de flujo sobre el tamaño de partículas de la FSG.
 *Las variables constantes fueron la concentración: 12% y el voltaje: 17 kV.

Síntesis de partículas por electroaspersión coaxial

En la Tabla 13 se muestran algunas de las condiciones utilizadas para la obtención de partículas núcleo-coraza por la técnica de electroaspersión coaxial, donde podemos observar las diferentes concentraciones de betalaínas como de la proteína que fueron usadas hasta lograr la obtención de polvos. De todas las combinaciones realizadas la que presentó mejores características macroscópicas fue la combinación del 7 % (p/v) de gluteninas con la concentración de betalaínas de 1-10 % (p/v) para la solución formadora del núcleo. Las condiciones del equipo utilizadas fueron las siguientes: voltaje de 20 kV, flujo interno de 0.05 mL/h, flujo externo de 0.1 mL/h, variando la distancia entre la punta de aguja y la placa colectora. En la literatura, se ha reportado que para obtener partículas núcleo-coraza por la técnica de electroaspersión coaxial se requiere ciertas características como: la velocidad de flujo del líquido de la coraza debe ser mayor que la velocidad de flujo del líquido del núcleo, la viscosidad de ambos líquidos debe ser similar y la tensión superficial del líquido del núcleo debe ser mayor que la del líquido que forma la coraza (Jaworek *et al.*, 2018).

Una vez que se obtuvieron las mejores características macroscópicas se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido para observar las características microscópicas de los polvos obtenidos.

Tabla 13. Condiciones de electrospray coaxial para la obtención de partículas núcleo-coraza a partir de gluteninas de trigo (Glut) y betalaínas (Bet).

Soluciones		Voltaje (kV)	Flujo (mL/h)		Distancia (cm)	Características
Coraza	Núcleo		FE	FI		
	Bet 1-10 % (p/v) Et-OH 70 % (v/v)	20	0.5-0.05	0.1-0.05	15	Solo gotas
	Bet/Glut 5 %:5 % (p/v)	20	0.5-0.1	0.1-0.05	15	Obtención de polvo con gotas
Glut 12 % (p/v) / ác. acético 80 % (v/v)			0.5	0.3		Polvo/ gotas
			0.3	0.1		Polvo/gotas
	Bet/Glut 5 %:7 % (p/v)	20	0.1	0.1	15	Polvo/gotas
			0.1	0.08		Polvo/gotas
				0.1	0.05	
	Bet/Glut 1-10 %:7 % (p/v)	20	0.1	0.05	5-20	Obtención de polvo

*FE = flujo externo que forma la coraza, FI = flujo interno que forma el núcleo

Microscopia electrónica de barrido (SEM)

En la Figura 22 se muestran las micrografías de las partículas núcleo-coraza obtenidas por electroaspersión coaxial a concentraciones de betalaínas de 1 % - 10 % (p/v) y a una distancia de 5 cm -20 cm respectivamente. Podemos observar que conforme aumenta la distancia la morfología cambia y el diámetro de las partículas aumenta. Esto es debido a que al aumentar la distancia el campo eléctrico disminuye generando gotas más grandes, originando partículas de mayor diámetro y morfologías amorfas (Morais *et al.*, 2020). En la literatura se ha reportado resultados similares como lo investigado por Faramarzi *et al.* 2016, ellos realizaron partículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (APLG), donde los autores mencionan que a medida que aumentaron la distancia mayor a 20 cm las partículas mostraban una morfología no uniforme. Moghaddam *et al.* 2015, reportaron la obtención de partículas núcleo-coraza de n- nonadecano y alginato por electroaspersión coaxial. Ellos mencionan que la variación en la distancia entre la punta y la placa colectora tiene una influencia directa en la fuerza del campo eléctrico y el tiempo de vuelo del polímero hacia la placa colectora, encontrando que la disminución de la distancia de 20 cm a 5 cm llevó a disminuir el diámetro de las partículas y con una mejor morfología esférica y lisa. Los autores lo atribuyen a que debido a la reducción de la distancia la intensidad del campo eléctrico se incrementa, lo que conduce a la disminución del diámetro de las gotitas, por lo tanto, la obtención de un diámetro menor en las partículas. Otro de los efectos que podemos observar es que al aumentar la concentración de betalaínas de 1% a 10 % (p/v) el tamaño de partícula aumenta ligeramente de 700 a 800 nm aproximadamente, esto puede ser debido al aumento de la concentración causando un mayor número de moléculas dentro de las partículas de 10 % (Moghaddam *et al.*, 2015). Una vez que se observaron las características morfológicas en base a la distancia y concentración de betalaínas se decidió elegir para posteriores análisis las partículas obtenidas a partir de una distancia de 5 cm y una concentración de betalaínas del 10 % (p/v).

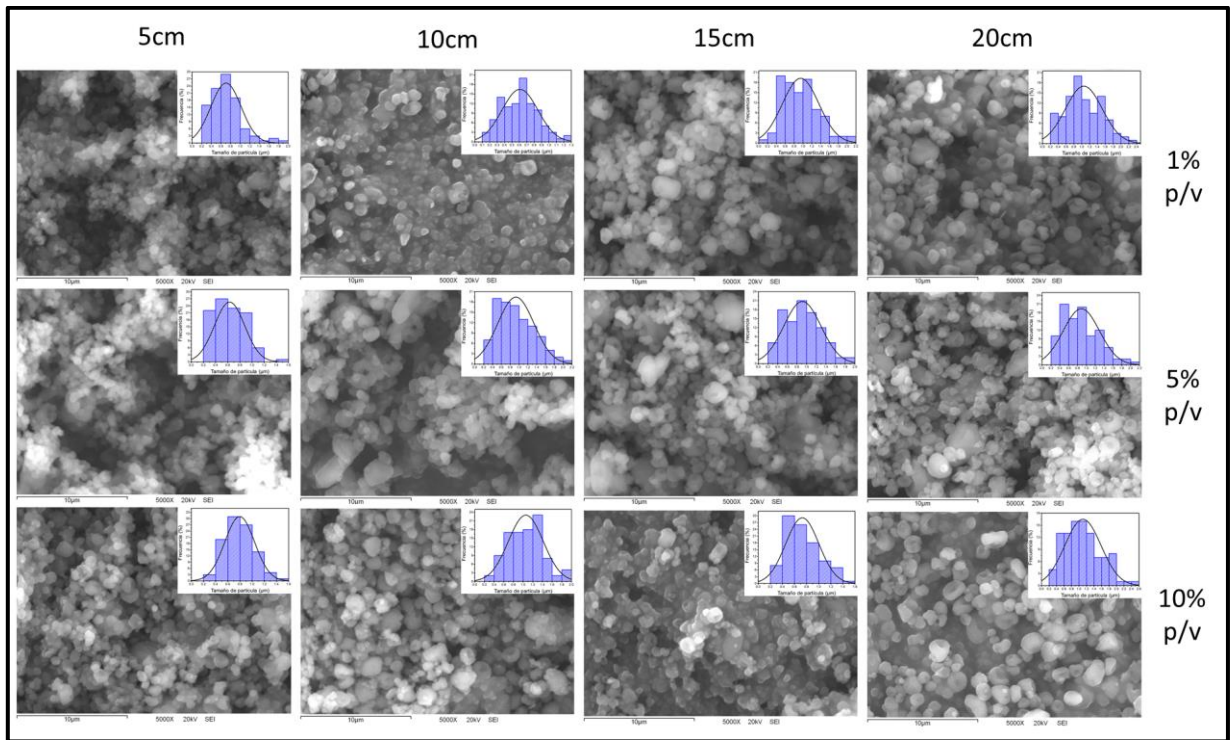


Figura 22. Micrografías de SEM de partículas núcleo-coraza de betalainas encapsuladas por la técnica de electrospray coaxial con sus histogramas de dispersión. En el eje y = son las concentraciones de betalainas utilizadas y en el eje X = las distancias utilizadas en la técnica de electrospray coaxial desde la punta de la aguja hasta la placa colectora. Todas las micrografías presentadas son vistas a 5000 X.

En la Figura 23 se muestran las micrografías correspondientes a la FSG y las partículas núcleo-coraza con y sin betalaínas. Donde podemos observar que la FSG (a) se observan hojuelas amorfas de distintos tamaños aproximadamente de 20 μm a 80 μm , a partir de este material se obtuvieron las partículas. En la figura 23 b y c se muestran las micrografías correspondientes a las partículas núcleo-coraza sin y con betalaínas encapsuladas, en donde el aumento en el tamaño de las partículas es evidente, las partículas sin betalaínas encapsuladas muestran un diámetro promedio de 632 ± 0.209 nm con un índice de polidispersidad de 0.331 mientras que las partículas con betalaínas presentan un diámetro de 0.794 ± 0.244 nm con un índice de polidispersidad de 0.307. Danaei *et al.* 2018 mencionan en su investigación que índices de polidispersidad menores de 0.05 indican una alta monodispersidad e índices de polidispersidad mayores de 0.7 indican una distribución muy amplia. Por lo tanto, podemos concluir que el tamaño de las partículas núcleo-coraza obtenidas, presentan un índice de polidispersidad medio.

Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Con el objetivo de conocer la distribución de las betalaínas en las partículas núcleo-coraza se analizaron por TEM. En la Figura 24 se muestran las micrografías de TEM de las partículas núcleo-coraza sin y con betalaínas. En la Figura 24 (a) se observa la partícula núcleo-coraza sin betalaínas donde el núcleo (línea roja) se ve expandido casi en toda la partícula comparado con las partículas núcleo-coraza con betalaínas, donde el núcleo se observa completamente delimitado de la coraza, así como partículas que no están cargadas (Figura 24 b y c). En la literatura se ha reportado que en la elaboración de partículas núcleo-coraza se requiere que los dos líquidos utilizados sean inmiscibles entre si ya que permite un control preciso sobre la geometría de las partículas (Chen *et al.*, 2019, Morais *et al.*, 2020).

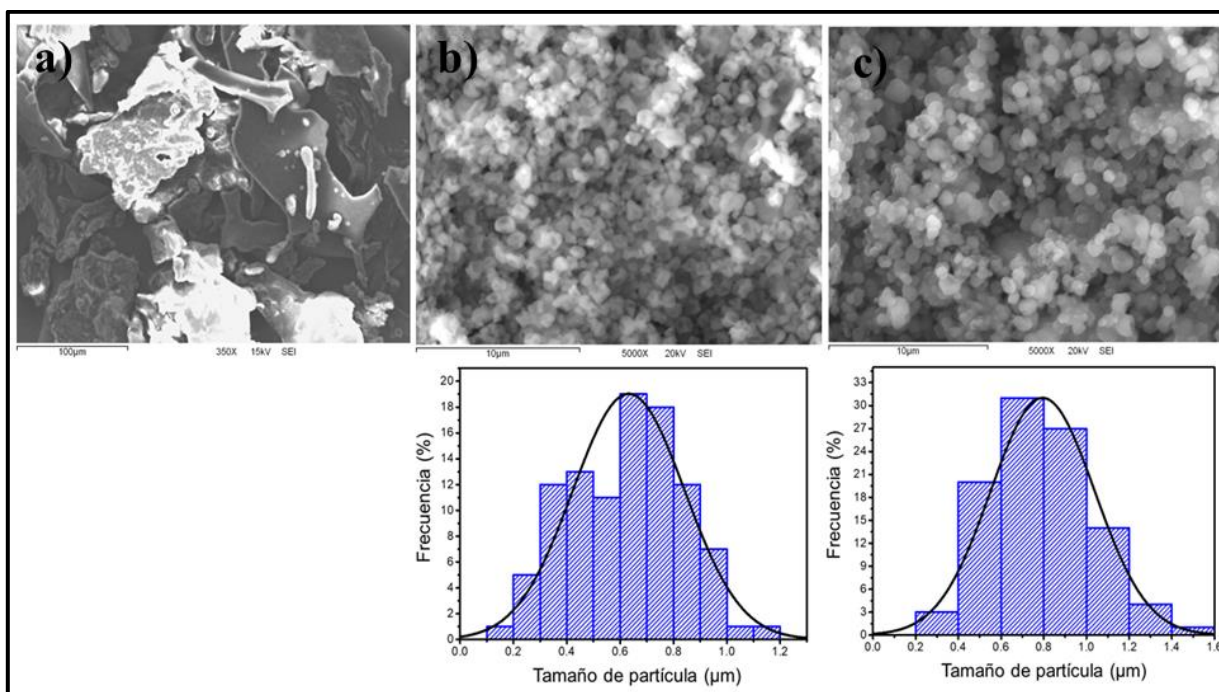


Figura 23. Micrográficas de SEM de la FSG vista a 300 X (a), partículas núcleo-coraza sin betalaínas vista a 5000 X con histograma de dispersión (b) y partículas núcleo-coraza con betalaínas vista a 5000 X con histograma de dispersión (c).

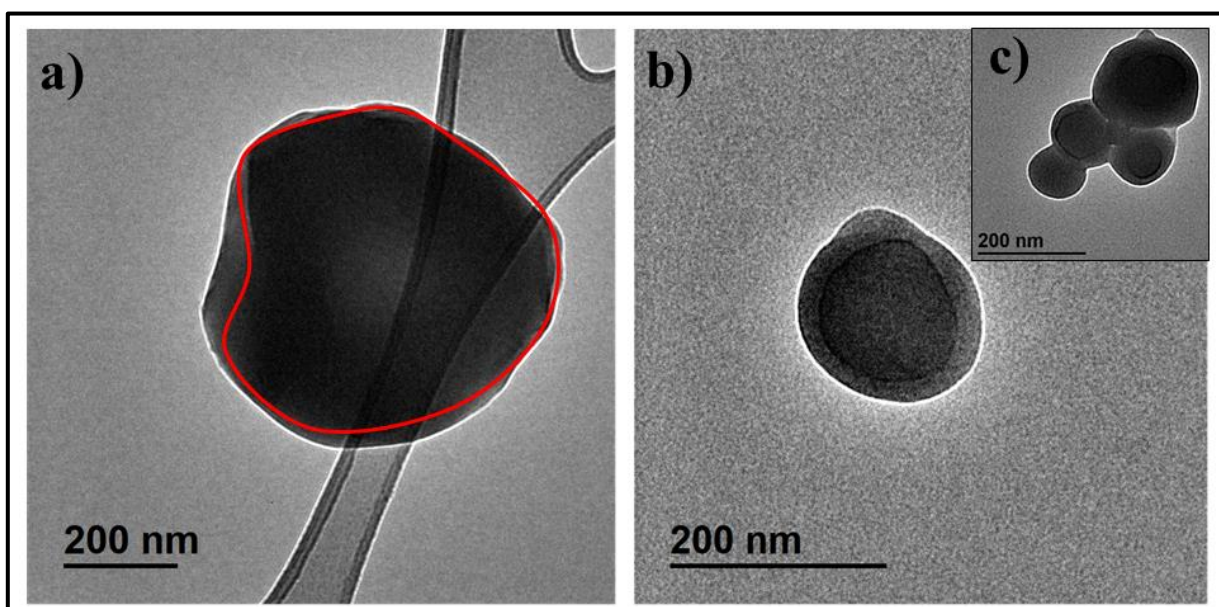


Figura 24. Micrográficas de TEM de partículas núcleo-coraza sin betalaínas (a) y partículas núcleo-coraza con betalaínas (b, c).

Microscopia confocal de barrido laser (LSCM)

Para confirmar lo observado por TEM se realizó microscopia confocal a las partículas. En la Figura 25 (a) se aprecian a las partículas núcleo-coraza sin rodamina B donde podemos observar que las partículas por sí solas presentan fluorescencia en el color de canal del verde a una longitud de onda de emisión de 519 nm. Esta autofluorescencia se debe mayoritariamente a las gluteninas esto debido a la emisión de los aminoácidos aromáticos presentes en la proteína (Bonilla *et al.*, 2019). La estructura núcleo-coraza de las partículas se confirmó nuevamente con LSCM como se muestra en la Figura 25 (b). Para ello, se llevó a cabo una excitación simultánea a una longitud de onda de emisión de 519 nm y 683 nm la cual, reveló una coloración amarilla en el núcleo y en la coraza anaranjada. La posición de las diferentes coloraciones refleja la ubicación de las moléculas, lo que demuestra y confirma la estructura núcleo-coraza de las betalainas encapsuladas.

Esta estructura tan bien delimitada que forman las partículas núcleo-coraza se debe principalmente a las características que presentan las gluteninas. Las gluteninas son proteínas que están compuestas mayoritariamente por los aminoácidos glutamina y prolina, su estructura secundaria presenta tanto α -hélice como giros- β (Kumar *et al.*, 2017; Delcour *et al.*, 2012). Sin embargo, las gluteninas al estar en contacto con solventes polares (agua, etanol, ác. acético) pueden formar enlaces de hidrógeno intramoleculares formando laminas- β esto debido a que el inverso de la estructura de giros- β presenta residuos de glutamina, aminoácido polar que forma enlaces de hidrógeno (Guerrieri y Cavaletto, 2018).

Con base a lo anterior podemos tratar de deducir como es que las gluteninas pueden formar estas estructuras con las betalainas. En la Figura 26 se puede observar la representación de la obtención de partículas donde al momento de entrar en contacto las dos soluciones en la punta de la aguja, las gluteninas interactúan con su parte hidrofílica con las betalainas debido al carácter hidrofílico de las mismas, provocando que las láminas- β de la proteína se englobe formando un anillo toroidal encerrando a las betalainas en el centro y los aminoácidos apolares como la prolina se encuentren en la parte externa de la molécula. Esta parte externa que es hidrofóbica a su vez interacciona con la parte hidrofóbica de la proteína que forma la coraza

haciendo que la proteína se englobe formando las partículas núcleo-coraza mostrando en la parte externa de toda la partícula sus aminoácidos polares.

Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación de betalaínas fue del 79 % \pm 0.155, en la literatura se han reportado valores cercanos a los obtenidos. Amjadi *et al.* 2019 reportaron la encapsulación de betanina en lecitina formando nanoliposomas por el método de hidratación-sonicación obteniendo una eficiencia de encapsulación del 80 %. Sin embargo, otros autores han reportado valores por debajo de los obtenidos como lo reportado por Calvo *et al.* 2018. Ellos encapsularon betalaínas en alginato con sacarosa y dextrano por la técnica de gelación ionotrópica y, reportaron una eficiencia de encapsulación del 15-60 % valores dependientes de la formulación de la coraza. Castro-Muñoz *et al.* 2015 reportaron la encapsulación de betalaínas en gelatina con maltodextrina por secado por pulverización obteniendo una eficiencia de encapsulación del 18-57 %. Estos resultados son indicativos que la encapsulación de betalaínas por electroaspersión coaxial puede ser una técnica adecuada para producir partículas núcleo-coraza que contengan betalaínas.

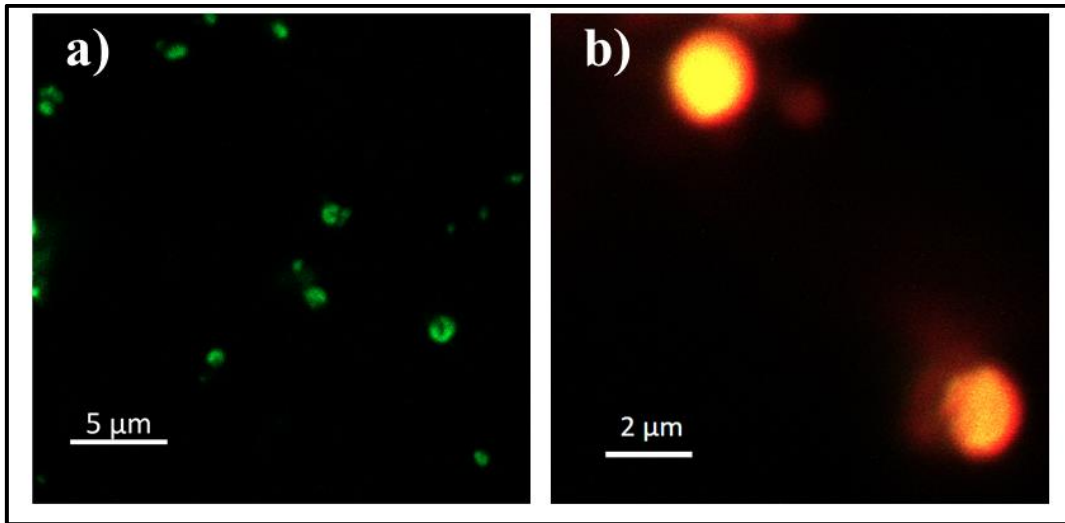


Figura 25. Observaciones del microscopio confocal de barrido laser de partículas núcleo-coraza sin rodamina B (a) y partículas núcleo-coraza con rodamina B en el núcleo como en la coraza (b).

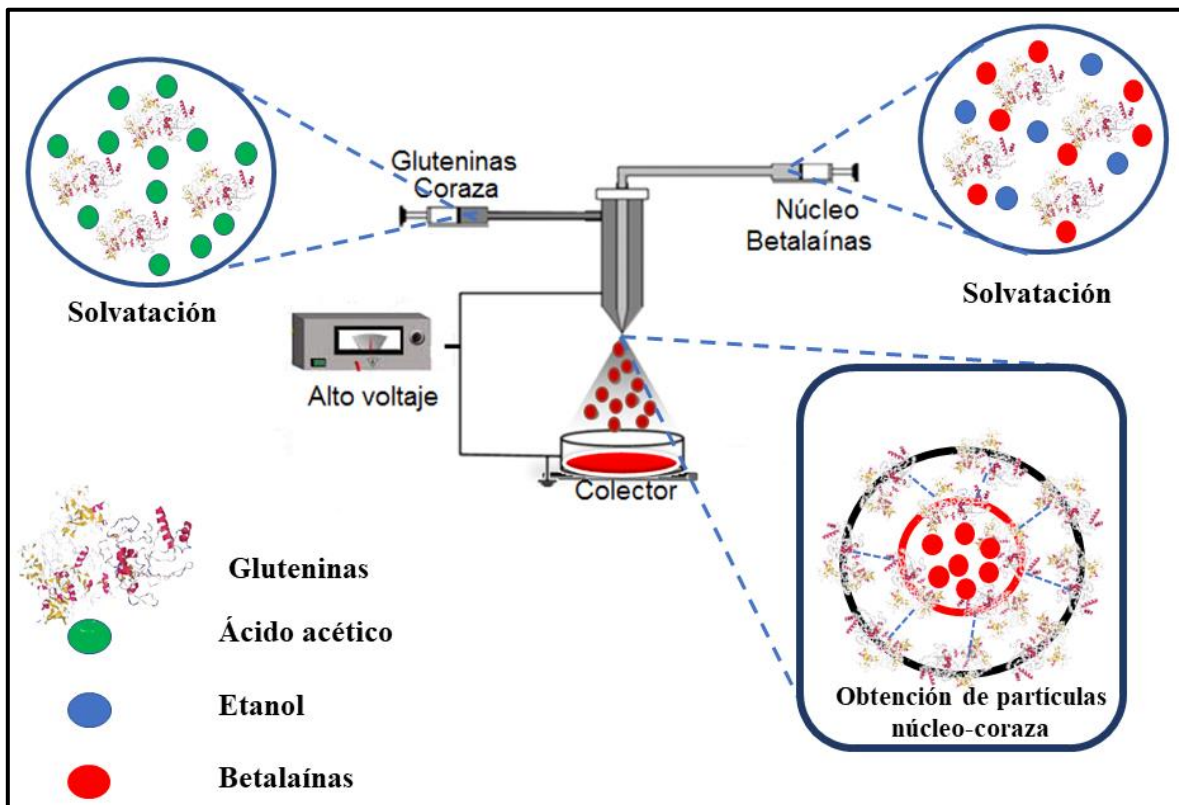


Figura 26. Representación gráfica de la formación de partículas núcleo-coraza.

Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Para estudiar posibles interacciones de las betalaínas con la FSG y posibles cambios conformacionales de la FSG se utilizó FT-IR. En la Figura 27 se aprecian los espectros de FT-IR de la proteína como de las partículas sin y con betalaínas, así como también de las betalaínas puras. En el espectro correspondiente a la fracción soluble de gluteninas (FSG) podemos observar las principales bandas características de las proteínas resaltando la banda correspondiente a la vibración por tensión del enlace N-H mostrada a los 3278 cm^{-1} . Otras bandas importantes es la amida I que corresponde al estiramiento vibratorio del grupo C=O, y la banda amida II, que está relacionada con la vibración por flexión del enlace N-H. Estas últimas bandas se relacionan con la estructura secundaria de las proteínas (Castro-Enríquez *et al.*, 2019).

Al comparar los espectros de la FSG y las partículas de la FSG (P-FSG), se observa un desplazamiento de banda en la amida I ($1639\text{-}1642\text{ cm}^{-1}$) y amida II ($1523\text{-}1536\text{ cm}^{-1}$) a una longitud de onda mayor. Además, de este desplazamiento podemos observar un cambio en la forma de la banda de amida I. Estos cambios están relacionados principalmente con la estructura secundaria de las proteínas los cuales, son indicativos de un cambio conformacional de la proteína que paso de tener presencia de α -hélice a presentar una mayor presencia de estructuras de tipo láminas- β (Li *et al.*, 2016; Barth, 2007; Kong y Yu, 2007). En la tabla 14 se muestran los porcentajes correspondientes a la estructura secundaria de la FSG, P-FSG y P-NC-B obtenidos a partir de las deconvolución de la banda amida I (gráficos mostrados en anexos). Donde podemos observar que al obtener las partículas por electroaspersión coaxial se modifica la estructura secundaria aumentando el porcentaje de láminas- β lo cual corrobora los corrimientos de bandas y el modelo de encapsulación propuesto anteriormente.

En el espectro de las partículas núcleo-coraza con betalaínas (P-NC-B) se puede observar un corrimiento en la banda amida I a menor número de onda de 1642 cm^{-1} a 1632 cm^{-1} comparado con las P-FSG. Este desplazamiento puede ser atribuido a posibles interacciones físicas entre las proteínas y las betalaínas por vías puentes de hidrógeno (Barth, 2007). Además, se observó corrimientos de las bandas amida II de 1536 cm^{-1} a 1544 cm^{-1} correspondiente a la vibración de

flexión del enlace N-H y la banda amida III mostró deformación de la banda con corrimientos hacia menor número de onda (1406 cm^{-1}) correspondiente a la vibración por estiramiento del enlace C-N, así como la presencia de una banda a 711 cm^{-1} correspondiente al enlace C-S. Esto puede ser indicativo de interacciones de tipo covalentes entre los compuestos fenólicos observados (Tabla 10) y las proteínas. Algunos autores han reportado que los compuestos fenólicos pueden interactuar con las proteínas de forma no covalente como covalente, además, que pueden conducir a cambios en la estructura secundaria y terciaria de las proteínas (Ozidal *et al.*, 2013). Esto último explica el aumento considerable de hojas- β en las partículas núcleo-coraza de betalaínas en comparación con el resto de las muestras. También se observó una banda intensa alrededor de los 1000 cm^{-1} correspondiente a la vibración del anillo aromático presente en la estructura de betalaínas o probablemente relacionada con la vibración de tensión del enlace C-O- (Oliveira *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2017).

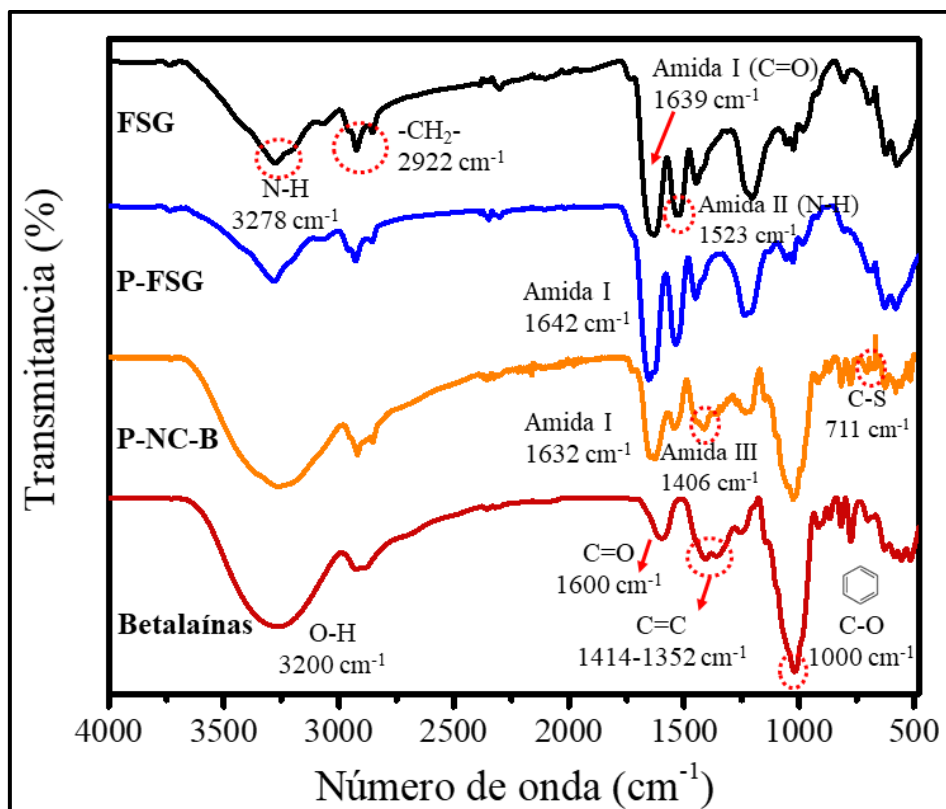


Figura 27. Espectros de FT-IR de la fracción soluble de gluteninas (FSG), partículas de FSG (P-FSG), partículas núcleo-coraza con betalainas (P-NC-B) y betalainas

Tabla 14. Número de onda de la banda amida I asignadas a la estructura secundaria de la proteína en cada una de las muestras analizadas por FT-IR

Muestras	Estructura secundaria							
	Hélice- α		Random		Hojas- β		Vueltas- β	
	Número de onda (cm ⁻¹)	Porcentaje (%)	Número de onda (cm ⁻¹)	Porcentaje (%)	Número de onda (cm ⁻¹)	Porcentaje (%)	Número de onda (cm ⁻¹)	Porcentaje (%)
FSG	1656	3	1648	22	1625	33	1672	41
P-FSG	1656	2	1648	1	1630	56	1669	39
P-NC-B	1656	4	1648	10	1625	70	1667	13

*Las frecuencias correspondientes a cada estructura secundaria están basadas en datos experimentales disponibles en la literatura (Carbonaro y Nucara, 2010; Kong y Yu, 2007).

Análisis termogravimétrico (TGA)

En la Figura 28 se observa la estabilidad térmica de la FSG, betalaínas y las partículas sin y con betalaínas. Todas las muestras excepto las betalaínas revelaron una pérdida de peso de aproximadamente el 5 % antes de los 100 °C (Figura 28 a) el cual es atribuida a la humedad. En la Figura 28 (b) podemos observar las derivadas de las pérdidas de peso de las muestras en donde las betalaínas muestran una primera pérdida empezando alrededor de los 100 °C llegando a su pico máximo a los 140 °C esta pérdida de peso de aproximadamente 2 % se debe a la descomposición de las betalaínas por deshidroxilación y separación del ácido betalámico del resto de la molécula (Otálora *et al*, 2015). Presentando un pico máximo de degradación a los 196 °C con una pérdida de peso mayor al 50 % quedando un remanente de alrededor del 20 % posiblemente debido a los minerales presentes en el extracto. En la derivada correspondiente a las P-NC-B podemos observar que no se mostró la pérdida de betalaínas antes de los 200 °C si no que las partículas presentaron una segunda degradación a los 226 °C con una pérdida de peso del 25 % volviéndose más estables térmicamente ya que las P-FSG presentan una segunda degradación antes de los 200 °C con una pérdida de peso del 10 %. Esta segunda pérdida de peso de las P-NC-B es debido a la degradación de las betalaínas y a la descomposición de los aminoácidos (Dhandayuthapani *et al.*, 2012). Una tercera pérdida es observada a los 350 °C presentando mayor estabilidad térmica comparada con las P-FSG, dicha estabilidad podría estar relacionada con las interacciones entre la proteína, compuestos fenólicos y betalaínas discutidas anteriormente en FT-IR (Yang *et al.*, 2016). Este comportamiento concuerda con lo reportado por Ojha *et al.* 2012 los autores estudiaron las características de unión del ácido ferúlico con la albúmina de suero bovino utilizando técnicas de fluorescencia, dicroísmo circular y calorimetría de titulación isotérmica. Encontrando que la unión entre la proteína y el ácido ferúlico aumentó la estabilidad térmica de la proteína. Por lo tanto, la encapsulación de betalaínas no solo ayuda a promover su estabilidad térmica, sino que además los compuestos presentes en el núcleo de las partículas ayudan al aumento de la estabilidad térmica de la proteína.

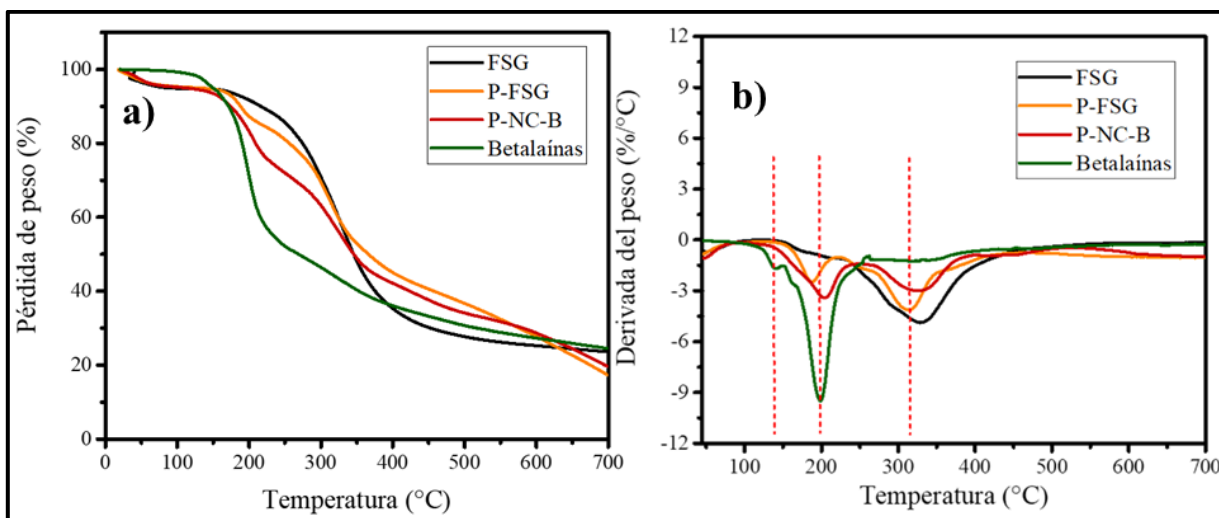


Figura 28. Termogramas de TGA (a) y la derivada del peso (b) de la fracción soluble de gluteninas (FSG), partículas de FSG (P-FSG), partículas núcleo-coraza con betalaínas (P-NC-B) y betalaínas

Estabilidad de color de betalaínas encapsuladas en ausencia y presencia de luz

En la Figura 29 podemos observar la estabilidad de betalaínas en las partículas elaboradas a partir de la forma coaxial y de forma convencional por electroaspersión bajo condiciones de almacenamiento a 4 °C a una humedad relativa de 43 % por 30 días. Para cada uno de los tratamientos se evaluó el ΔE^* donde podemos apreciar que las partículas elaboradas de forma convencional presentaron valores más altos de ΔE^* (10) tanto en ausencia como en presencia de luz sin embargo, en las partículas elaboradas de forma coaxial presentaron valores de ΔE^* (2) en ausencia de luz y en presencia de luz el valor de ΔE^* (3). En la literatura se menciona que valores de ΔE^* mayores a 3 se puede percibir visualmente un cambio de color (Rodríguez *et al.*, 2017). En base a lo anterior podemos decir que las betalaínas encapsuladas de manera coaxial fueron las que mostraron una mayor estabilidad en presencia o ausencia de luz durante su almacenamiento y esto es debido a que en las partículas convencionales las betalaínas se encuentran dispersas en toda la partícula por lo cual es mayormente susceptible a que factores externos puedan afectar la integridad del pigmento. La variación que se observa en los valores de ΔE^* de las partículas convencionales puede deberse a la posible aparición de algunas reacciones reversibles debido a la degradación de las betalaínas en la que estos pigmentos se pueden regenerar continuamente y después de un tiempo las reacciones pueden volverse irreversibles y producir cambios de color amarillentos en los polvos (Herbach *et al.*, 2006). Otros autores han reportado que, con el uso de agentes encapsulantes como maltodextrina, goma arábica, proteína de soya, inulina entre otras, aumenta la estabilidad de betalaínas frente a factores ambientales comparado con el extracto puro (Carmo *et al.*, 2018; Moser *et al.*, 2017). Con los resultados obtenidos se demuestra la importancia de usar agentes encapsulantes como la FSG que ayudan a proporcionar mayor estabilidad a las betalaínas, además, que con el uso de la forma coaxial para desarrollar partículas núcleo-coraza de betalaínas aumenta a un más su estabilidad comparada con la forma convencional para desarrollar partículas.

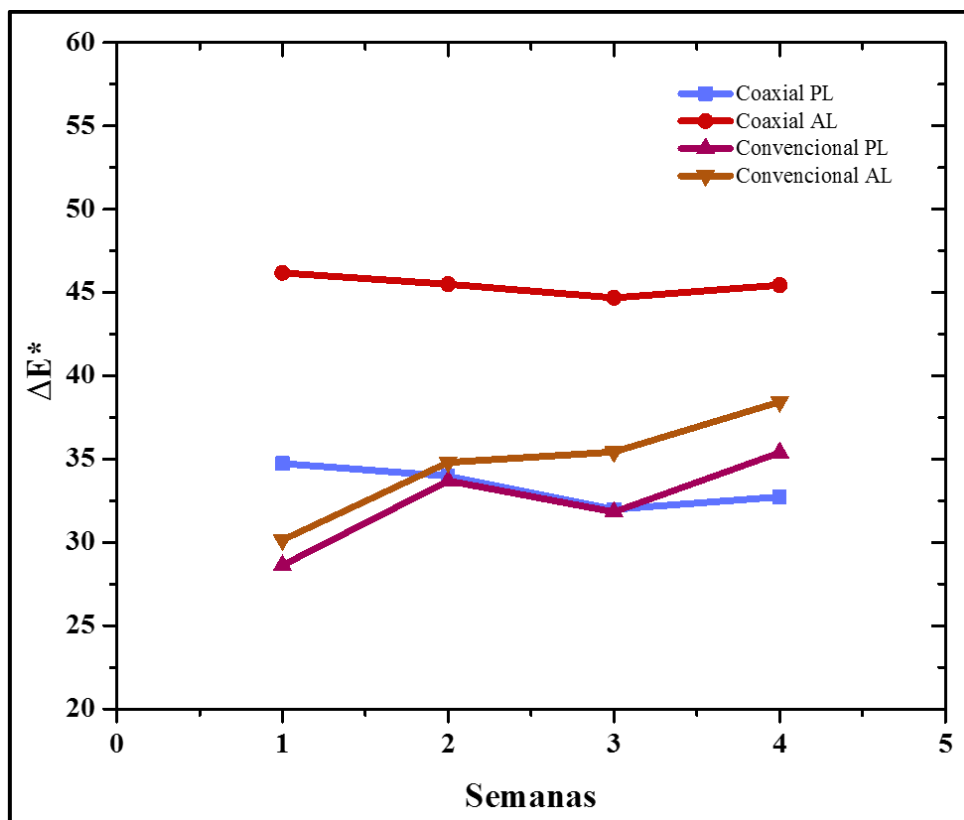


Figura 29. Gráficas de la estabilidad de color de betalaínas encapsuladas en ausencia de luz (coaxial AL), presencia de luz (coaxial PL) y partículas de betalaínas no encapsuladas en ausencia de luz (convencional AL) como en presencia de luz (convencional PL) bajo condiciones de almacenamiento durante 30 días.

Cinéticas de liberación de betalaínas en simulantes alimentarios

En la Figura 30 se muestra la liberación *in vitro* de betalaínas encapsuladas en etanol al 10 % como en ácido acético al 3 % utilizados como simulantes alimentarios. Durante los primeros minutos de la liberación (Figura 30 b) podemos observar una liberación rápida que normalmente está relacionada con la presencia de moléculas cercanas a la superficie que se liberan rápidamente cuando la matriz se hincha en contacto con el medio de liberación, seguido de una liberación sostenida debido a que los compuestos se difunden a través de la matriz (Zarchi *et al.*, 2015; Gulfam *et al.*, 2012). Sin embargo, se observaron ligeras diferencias en la liberación de betalaínas por efecto de las propiedades del simulador de alimentos. La liberación fue mayor en el simulador de alimentos ácidos, llegando a una liberación del 99 % a los 1440 min. Mientras que en etanol al 10 %, se observó una disminución en el porcentaje de liberación de betalaínas con respecto al tiempo llegando a una liberación del 99 % en 2880 min. Este comportamiento puede atribuirse a la mayor solubilidad de la matriz en condiciones ácidas permitiendo liberar más rápido a las betalaínas en comparación con el etanol. Otros autores han obtenido resultados similares como los reportados por Atay *et al.* 2018, donde ellos realizaron partículas con gelatina/quitosano como agentes encapsulantes de antocianinas por la técnica de electroaspersión, reportando una mayor liberación de antocianinas en el medio ácido que en el etanólico. Por otra parte, los autores reportaron una liberación de antocianinas en menos tiempo comparado con lo obtenido por nosotros, donde alrededor del 50 % de las antocianinas encapsuladas se liberaron en 20 min en el medio ácido, mientras que en el etanol fue del 25 % en 20 min. En un trabajo previo nosotros reportamos la obtención de partículas de FSG como agente encapsulante de urea por electroaspersión, y estudiamos la liberación de urea a diferentes pH llegando a una liberación del 99 % de la urea en 700 min aproximadamente. Por lo tanto, la liberación de betalaínas en mayor tiempo puede ser debido a la estructura núcleo-coraza ocasionando que las moléculas de betalaínas se difundan en el medio de una manera más lenta comparada con las partículas obtenidas por electroaspersión convencional.

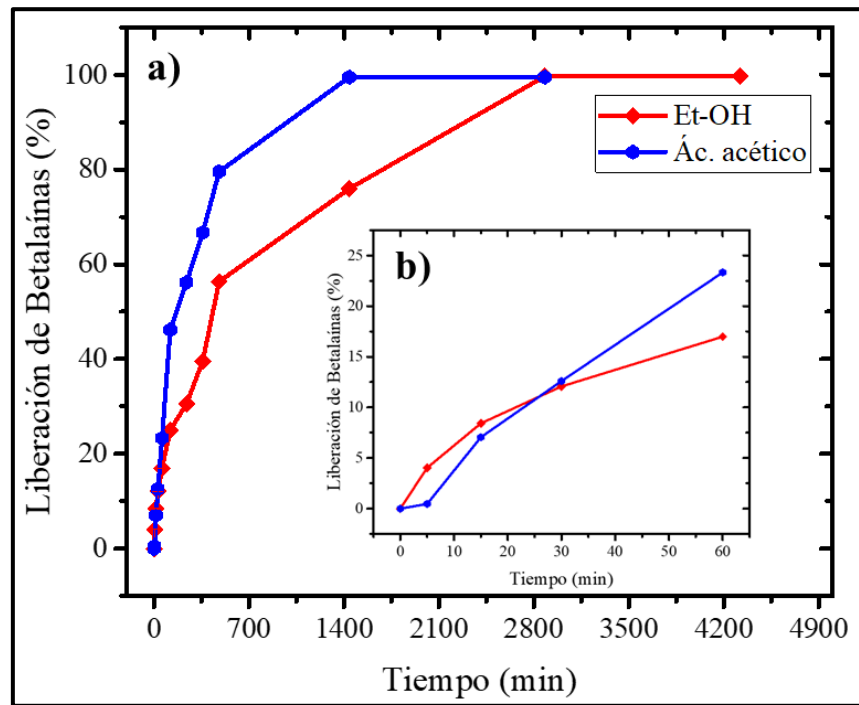


Figura 30. Comportamiento de la liberación de betalaínas encapsuladas en simulantes alimentarios.

Elucidación del tipo y mecanismo de transporte

La Tabla 15 enumera los valores obtenidos para k y n del modelo de la ley de la potencia. El valor de k en el ácido acético como simulante alimentario fue mayor con respecto al etanol y la constante cinética k está relacionada con la velocidad de liberación por lo que los valores obtenidos para cada simulante alimentario coinciden con el comportamiento cinético de las betalaínas, como ya se discutió anteriormente. Los tipos de mecanismos que están involucrados en la liberación de betalaínas incluyeron el transporte anómalo o no fickiana para el etanol lo cual significa que el mecanismo de liberación no sigue la ley de Fick. Mientras que en medio ácido el mecanismo que sigue la liberación es de tipo II lo que indica que la liberación de betalaínas se logra mediante la difusión, relajación de las cadenas e hinchazón de la matriz (Guzmán *et al.*, 2013). Con base a los valores de R^2 todos los datos se ajustaron al modelo.

Tabla 15. Datos obtenidos a partir de la ley de la potencia.

Simulante alimentario	R^2	k	n	Mecanismo
Etanol 10 %	0.9910	0.4184	0.6168	Transporte anómalo
Ác. acético 3%	0.9979	0.5136	0.9020	Transporte caso II

ETAPA 2

Desarrollo y caracterización de películas de PLA modificadas con y sin partículas núcleo-coraza de betalaínas por el método de casting

Desarrollo de películas de PLA modificada

El PLA es un polímero frágil y rígido, por lo cual el uso de plastificantes para mejorar su procesabilidad, flexibilidad y ductilidad son ampliamente utilizados (Baiardo et al., 2003). Con el objetivo de mejorar las características del PLA se incorporaron diferentes plastificantes a las soluciones de PLA como ácido cítrico, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol diglicileter de 500 Da y polietilenglicol de 1450 Da. En la Tabla 16 se muestran las diferentes condiciones empleadas para la obtención de películas de PLA modificada, utilizando dos tipos de PLA el 4043 D y 4060 D respectivamente. De todas las condiciones usadas para la obtención de películas a partir del PLA 4043 D, con base a las observaciones macroscópicas fue utilizando el plastificante PEG-DE₅₀₀ a una concentración de 0.3 % (p/v). El ácido cítrico con ninguna concentración se observaron películas homogéneas y transparentes. Por lo tanto, se decidió utilizar el PLA 4060 D el cual es un tipo de PLA de baja cristalinidad, los plastificantes que se decidieron manejar fue ácido cítrico y PEG-DE₅₀₀ a diferentes concentraciones donde la mejor apariencia macroscópica de las películas fue a una concentración de ácido cítrico al 5 % (p/v) y de PEG-DE₅₀₀ al 3 % (p/v). Como podemos observar (Tabla 16) al utilizar el PLA de baja cristalinidad se pudo obtener películas con mejor apariencia macroscópica utilizando mayores concentraciones de plastificante comparado con el PLA 4043 D que es un tipo de PLA semicristalino. Este comportamiento es debido a que el PLA amorfo puede interactuar mejor con las moléculas al ser más fácil de disolverse en solventes comunes como acetona (Persson, 2018). Con base a lo anterior se decidió trabajar con las películas de PLA con PEG-DE₅₀₀ al 3 % (p/v) para la adición de partículas núcleo-coraza de betalaínas y realizar posteriores análisis.

Tabla 16. Condiciones para la obtención de películas de PLA modificada con diferentes plastificantes por casting.

Conc. PLA (p/v)	Conc. plastificantes (p/v)	Plastificantes				
		Ác. Cítrico	Glicerol	PPG	PEG ₁₄₅₀	PEG-DE ₅₀₀
Observaciones						
5 % 4043 D	0.3 %		Opaca	Opaca	Opaca/transparente	Opaca/transparente
	0.5 %	Separación de fase	Separación de fase	Separación de fase	Separación de fase/opaca	Separación de fase
	1 %	Separación de fase	Separación de fase	Separación de fase	Separación de fase/rígida	
	5 %	Separación de fase	Separación de fase	Separación de fase	Separación de fase	
	10 %	Presencia de agujeros en películas	Separación de fase	Separación de fase	Presencia de agujeros en películas	
	1 %	Rígida/transparente				Lisa
5 % 4060 D	3 %					Lisa/transparente
	5 %	Transparente/opaca				Lisa/opaca
	10 %	Opaca-blanco				Lisa/opaca

*PPG= Polipropilenglicol; PEG= Polietilenglicol; PEG-DE= polietilenglicol diglicil éter

Microscopia electrónica de barrido (SEM)

En la Figura 31 se muestran las micrografías de SEM de las películas de PLA, PLA-PEG-DE y PLA-PEG-DE con partículas núcleo-coraza de betalaínas. En la Figura 31 a se muestra la superficie de la película de PLA, observando una superficie lisa, sin aparentes grietas, sin embargo, en la Figura 31 b se observa la superficie de la película de PLA modificada con PEG-DE mostrando pequeñas rugosidades esto debido al plastificante añadido. En el corte transversal de dicha película (Figura 31 d) no se aprecian diferentes fases entre el PLA y el plastificante, lo que indica una aparente miscibilidad. Este comportamiento ya ha sido reportado por Tipachan *et al.* 2017, donde ellos reportaron la plastificación de películas de PLA con polietilenglicol (PEG). En la Figura 31 c se observa la parte superficial de la película de PLA-PEG-DE con partículas, donde se muestra una superficie rugosa debido a la presencia del PEG-DE. También, se observa la presencia de las partículas núcleo-coraza de betalaínas distribuidas homogéneamente en toda la superficie de la película, lo cual se puede corroborar en el corte transversal de la película (Figura 31 e) donde se aprecia la distribución de las partículas sin presencia de grietas, por lo que esta morfología es positiva ya que podrían no verse afectadas severamente las propiedades mecánicas.

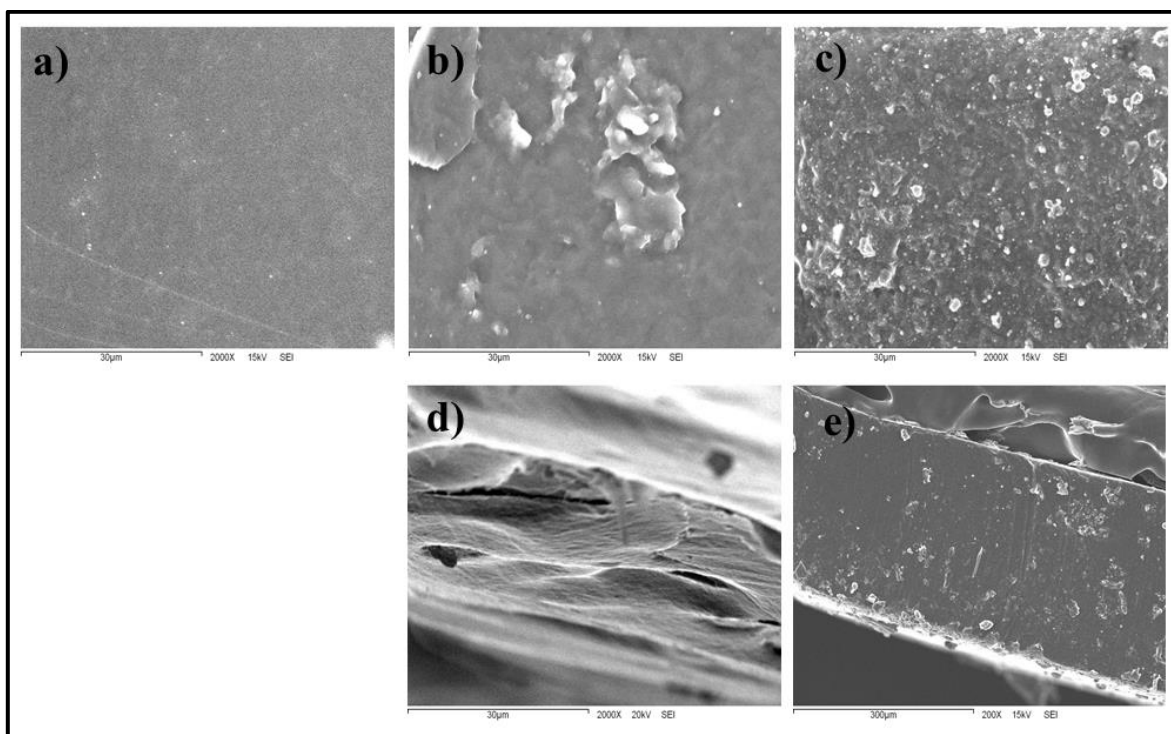


Figura 31. Micrografías de SEM: (a) superficie de la película de PLA, (b) superficie de la película de PLA con PEG-DE, (c) superficie de la película de PLA-PEG-DE con partículas núcleo-coraza de betalaínas, (d) corte transversal de la película de PLA con PEG-DE y (e) corte transversal de la película de PLA-PEG-DE con partículas núcleo-coraza de betalaínas, vistas a 2000X y 200X.

Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Los cambios químicos también se observaron por espectroscopía FT-IR (Figura 32). Donde en la película de PLA se observan las bandas características del PLA que corresponden a la absorción de la banda de estiramiento asimétrico y simétrico del C-H a 2990 y 2940 cm^{-1} , la vibración por estiramiento del grupo CH_3 que se encuentra a 1453 cm^{-1} , la vibración por estiramiento del enlace C=O se observa a 1746 cm^{-1} y las bandas de estiramiento del C-O en -CH-O- y -O-C=O del PLA aparecen a 1179 cm^{-1} y a 1077 cm^{-1} respectivamente. En el caso de la película de PLA con PEG-DE se observa una banda característica del PEG-DE a 2874 cm^{-1} correspondiente al estiramiento vibracional del enlace C-H. Podemos observar que esta banda se desplazó hacia números de onda mayores comparado con el espectro de solvente de PEG-DE, este corrimiento se atribuye a la posible interacción entre los grupos reactivos del PLA y el PEG-DE demostrando que la estructura del PLA fue modificada por el PEG-DE, este comportamiento coincide con lo reportado por varios autores (Choi *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2019). El espectro de la película de PLA-PEG-DE con partículas núcleo-coraza de betalainas mostró un corrimiento de la banda del grupo C=O de 1746 cm^{-1} a 1752 cm^{-1} lo que podría atribuirse a la interacción de las partículas y la película de PLA. Además, se observa una nueva banda a los 1644 cm^{-1} la cual es atribuida a la presencia de la FSG, banda característica de las proteínas (Glassford *et al.*, 2013).

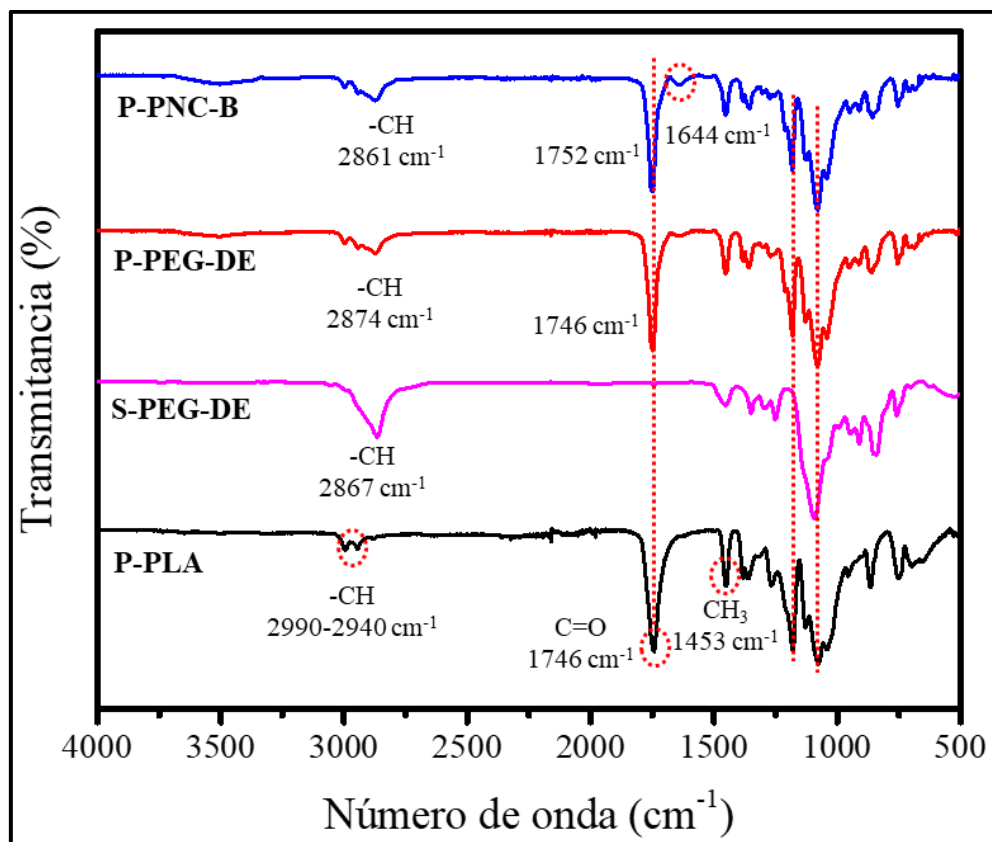


Figura 32. Espectros de FT-IR de la película de PLA (P-PLA), solvente de PEG-DE (S-PEG-DE), película de PLA con PEG-DE (P-PEG-DE) y película de PLA modificada con PEG-DE y partículas núcleo-coraza de betalaínas (P-PNC-B).

Análisis termogravimétrico (TGA)

En la Figura 33 se muestran los termogramas y derivadas de las películas de PLA con PEG-DE y partículas núcleo-coraza de betalaínas. Donde podemos observar que en todos los casos las muestras se degradan por completo a los 400-600 °C respectivamente (Figura 33 a). La película de PLA muestra una única caída, presentando una estabilidad térmica a los 359 °C aproximadamente, mientras que la película de PLA modificada con PEG-DE muestra una evidente disminución de la estabilidad térmica presentada a los 233 °C comparada con la película de PLA. Dicha disminución se debe a una evidente modificación estructural del PLA por el PEG-DE debido a la plastificación del PLA (Li *et al.*, 2018). En la película de PLA-PEG-DE adicionada con partículas núcleo-coraza de betalaínas la estabilidad térmica aumento, presentando una única caída a los 338 °C. Este comportamiento también ha sido observado por otros autores Chieng et al. 2014, quienes realizaron películas de PLA con PEG y adicionaron nanopelets de grafeno. Ellos observaron que al añadir los nanopelets aumentaba la estabilidad térmica de la película de PLA con PEG atribuyendo dicha estabilidad a los nanocompuestos añadidos.

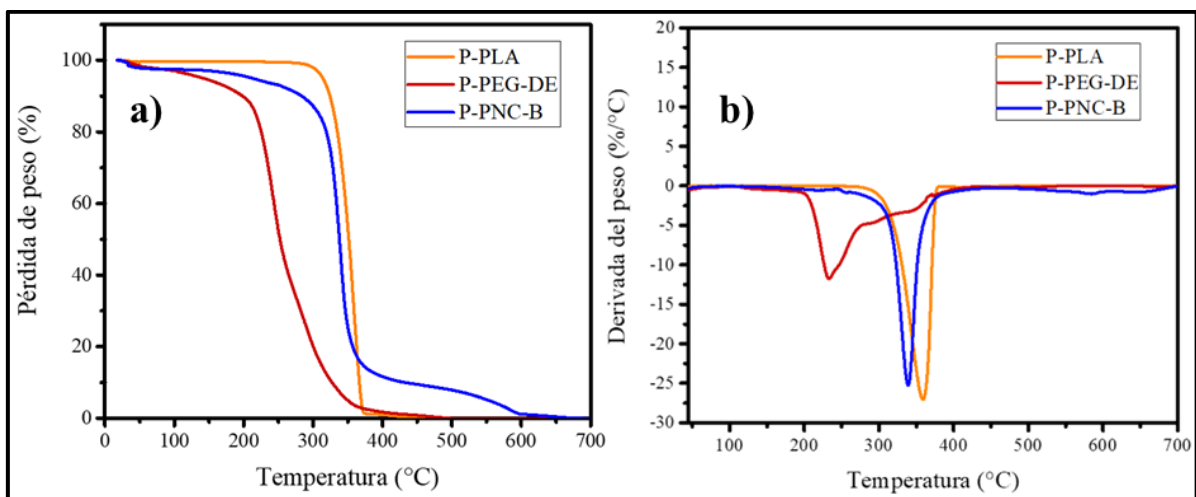


Figura 33. Termogramas de TGA (a) y la derivada del peso (b) de la película de PLA (P-PLA), película modificada con PEG-DE (P-PEG-DE), película de PLA con partículas núcleo-coraza de betalaínas (P-PNC-B)

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los datos de las propiedades térmicas de la película de PLA, película de PLA-PEG-DE y película PLA-PEG-DE con partículas núcleo-coraza de betalaínas se describen en la Tabla 17. Donde podemos observar que la película de PLA presentó un valor de Tg de 60.62 °C y con la adición de PEG-DE disminuyó considerablemente a 48.13 °C. Este comportamiento se debe al efecto de plastificación del PLA, como ya se ha reportado en otros trabajos el PEG de bajo peso molecular es uno de los plastificantes más adecuados debido, a su buena miscibilidad con el PLA (Hassouna *et al.*, 2011). La temperatura de cristalinidad (Tc) también disminuyó de 84.78 °C a 82.05 °C cuando se añadió PEG-DE. La disminución de la Tg y la Tc en la película de PLA-PEG-DE indica la compatibilidad del PEG-DE con el PLA, debido a la separación de las cadenas del PLA. Esta separación contribuye al aumento del volumen libre entre las cadenas mejorando la movilidad de las mismas (Choi *et al.*, 2013). En la película con partículas núcleo-coraza de betalaínas se observó un aumento de la Tg y Tc, en comparación con la película con PEG-DE, pero no mayor a la presentada por la película de PLA. Otros autores han reportado resultados similares. Ozkoc y Kemaloglu, 2009, realizaron películas de PLA plastificadas con PEG y arcilla y observaron que, al incorporar la arcilla la Tg aumentó 4°C. Este comportamiento lo atribuyeron a una restricción de la movilidad de las cadenas como consecuencia de la unión o adsorción en la superficie de la arcilla. Por lo tanto, podemos concluir que las partículas núcleo-coraza de betalaínas debido a la posible interacción con la película, como ya se observó por FT-IR anteriormente, dificulta el movimiento de las cadenas provocando un aumento en la Tg así como las demás transiciones mostradas en la Tabla 17. Para confirmar este comportamiento se realizaron pruebas mecánicas a las películas obtenidas ya que las transiciones mencionadas se relacionan estrechamente con su comportamiento mecánico.

Tabla 17. Propiedades térmicas de las películas de PLA modificada y con la adición de partículas núcleo-coraza de betalainas.

Materiales	Tg (°C)	Tc (°C)	Tf (°C)
P-PLA	60.62	84.78	151.75
P-PEG-DE	48.13	82.05	110.01
P-PNC-B	54.53	84.14	132.69

*P-PLA: película de PLA; P-PEG-DE: película de PLA modificada con PEG-DE; P-PNC-B: película de PLA/PEG-DE; Tg: temperatura de transición vítrea; Tc: temperatura de cristalinidad; Tf: temperatura de fusión.

Pruebas mecánicas de las películas

Los valores específicos de las características que incluyen módulo de elasticidad, resistencia a la tensión y elongación al rompimiento se resumen en la Tabla 18. La película de PLA presentó un alto módulo de elasticidad de 699.225 MPa y un bajo porcentaje de elongación, sin embargo, cuando la película fue plastificada con PEG-DE, el módulo de elasticidad disminuyó significativamente a 26.673 MPa y el porcentaje de elongación aumento a 218.939 MPa. Este comportamiento indica el mejoramiento de su ductilidad debido a la plastificación del PLA como se ha discutido anteriormente confirmando así la plastificación del PLA por el PEG-DE. En la película con partículas núcleo-coraza de betalaínas se observó un ligero aumento del módulo de elasticidad (30.664 MPa), y una disminución significativa del porcentaje de elongación (160.374 %), lo cual nos indica que las partículas si bien, no afectan en gran medida al aumento en la rigidez del material, si tienen un efecto en la disminución de la ductilidad. Este comportamiento puede deberse a la restricción del deslizamiento de las cadenas del polímero como consecuencia de la presencia e interacción entre las partículas y la matriz disminuyendo el porcentaje de elongación lo que promueve la ruptura del material. (Ozkoc y Kemalonglu, 2009; Fortunati *et al.*, 2012).

Tabla 18. Propiedades mecánicas de las películas de PLA modificada y con la adición de partículas núcleo-coraza de betalaínas

Películas	Módulo de elasticidad (MPa)	Resistencia a la tensión (MPa)	Elongación al rompimiento (%)
PLA	699.225 ± 73.404 ^a	29.420 ± 6.893 ^a	5.605 ± 2.186 ^a
PEG-DE	26.673 ± 3.186 ^b	6.520 ± 2.539 ^b	218.939 ± 97.700 ^b
PNC-B	30.664 ± 9.160 ^b	3.178 ± 0.604 ^b	160.374 ± 62.001 ^c

*Letras diferentes entre misma columna significan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

ETAPA 3

Evaluación de películas de PLA modificadas con y sin partículas núcleo-coraza de betalainas sobre las propiedades químicas y microbiológicas de filetes de caballa (*Scomber scombrus*)

Aplicación de películas PLA modificadas con y sin partículas núcleo-coraza de betalaínas

En la Figura 34 se muestran las fotografías de las películas de PLA modificadas con y sin partículas, aplicadas en trozos de filetes de caballa (*Scomber scombrus*), almacenadas a 4 °C por 7 días. Se puede observar que las películas con partículas núcleo-coraza de betalaínas muestran coloración comparadas con las películas de PLA-PEG-DE sin partículas. A pesar de que se esperaba un cambio de color en las películas con partículas conforme avanzara el tiempo de almacenamiento, no se observó un cambio visual durante los 7 días. Este comportamiento puede ser debido a la interacción entre las betalaínas y la matriz que las encapsula (interacciones discutidas anteriormente por FT-IR) proporcionando una mayor estabilidad a las betalaínas en presencia de luz y temperatura, efecto comprobado y discutido en análisis anteriores. Rodríguez *et al.* 2017, estudiaron la estabilidad de las betalaínas en dulces tipo gomitas a base de gelatina, así como en el jugo de pitaya bajo diferentes condiciones de almacenamiento, observando que la estabilidad de betalaínas se veía disminuida en el medio líquido que en el sólido donde el color inicial predominó por más días. Los autores concluyen que la mayor estabilidad en el medio sólido puede ser debido a que las interacciones con las proteínas de la gelatina pueden proteger a los pigmentos de procesos como hidrólisis, oxidación entre otros. Además, cabe mencionar que en nuestro estudio las partículas están dispersas en la película de PLA lo que de cierta forma brinda una barrera extra a las betalaínas.

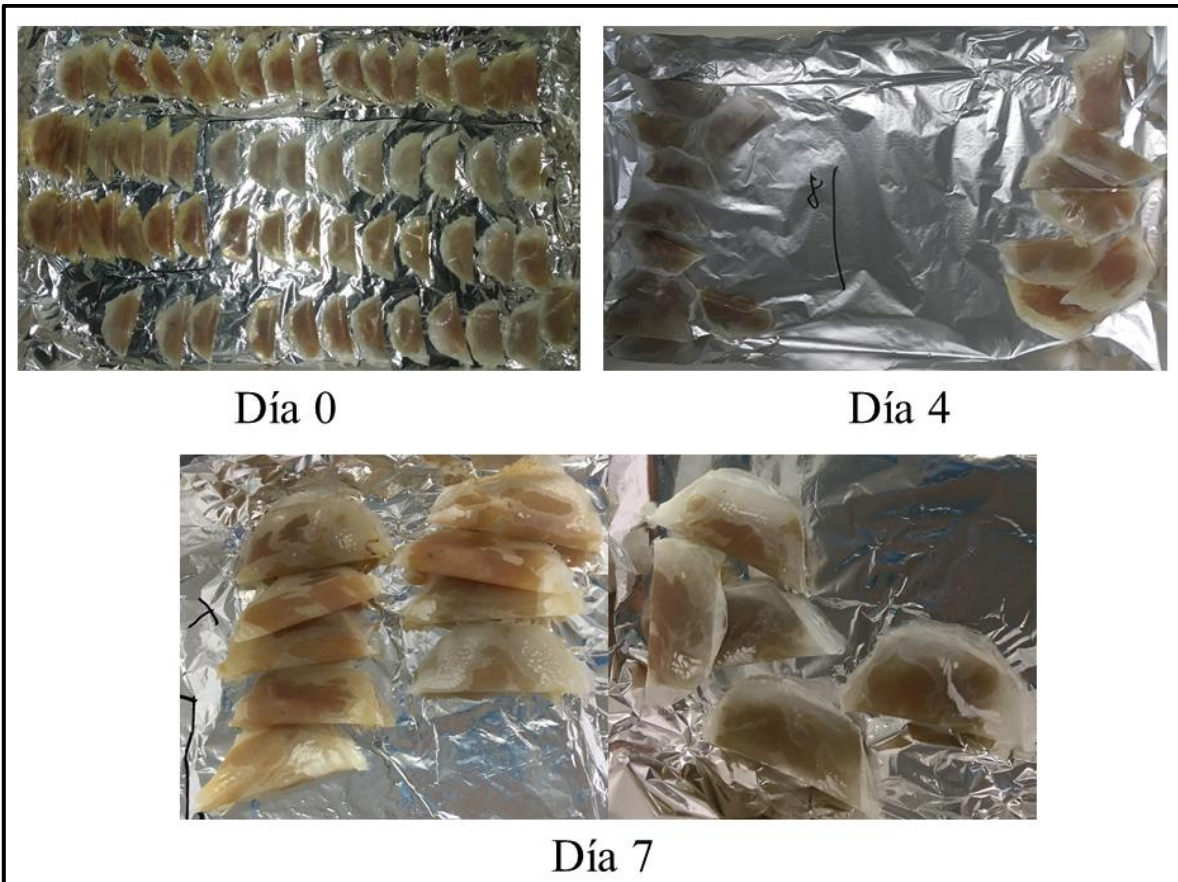


Figura 34. Fotografías de las películas modificadas con y sin partículas núcleo-coraza de betalainas aplicadas en trozos de filetes de caballa (*Scomber scombrus*) almacenadas a 4 °C por 7 días en ausencia de luz.

Evaluación de la pérdida de la calidad por análisis químico de los filetes de caballa (*Scomber scombrus*)

En la Figura 35 se observan el conjunto de gráficas de los resultados de los análisis químicos realizados a los filetes de caballa (*Scomber scombrus*) durante el periodo de almacenamiento. Podemos observar que en la mayoría de los casos no se encontraron diferencias significativas con el control, probablemente debido a que las betalaínas encapsuladas presentes en las películas de PLA-PEG-DE migraron hacia el filete, provocando interferencia en ciertas determinaciones que son colorimétricas pudiendo estar los valores sobreestimados. Sin embargo, podemos observar que a pesar de que se obtuvieron valores crecientes de i-TMA (Figura 35 g) a medida que avanzaba el tiempo de refrigeración, no se obtuvieron valores por encima del límite legal de 120.0 mg Kg⁻¹ (Directiva del consejo europeo, 1991). Otros autores han reportado valores muy por encima de los obtenidos como lo reportado por García-Soto *et al.* 2015. Ellos realizaron películas de PLA / ácido ascórbico / extracto de alga y las aplicaron sobre filetes de pescado conocido como el gallo (*Lepidorhombus whiffiagonis*) los cuales fueron almacenados a 4 °C por 4, 7 y 11 días. Los resultados mostraron valores de i-TMA en el día 7 de 23.4 mg Kg⁻¹ de músculo, siendo el día 11 donde se sobrepasó el valor límite permitido. Otros autores han propuesto valores de rechazo de < 5 mg N / 100 g (Jouki *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2010), valores que están por encima de los obtenidos en el presente trabajo. Este efecto sobre la inhibición de la formación de i-TMA podría atribuirse a los compuestos presentes en las películas con partículas tales como betalaínas y compuestos fenólicos.

El contenido de ácidos grasos libres (AGL) en las muestras no presentaron diferencias significativas durante el tiempo de almacenamiento (Figura 35 e). La actividad enzimática endógena, como la actividad microbiana, se han señalado como responsables de la formación de AGL durante el almacenamiento en refrigeración del pescado (Campos *et al.*, 2012; Sikorski y Kolakoski, 2000). La actividad enzimática endógena debe ser predominante antes del final de la fase de retraso microbiano; después de ese tiempo, la actividad microbiana debería ganar importancia y ser principalmente responsable del desarrollo de la hidrólisis lipídica. Por lo tanto, los resultados obtenidos demuestran un efecto inhibitorio de la hidrólisis lipídica por la presencia

de las betalaínas, resultado que podemos corroborar con el análisis microbiológico específicamente en el desarrollo del recuento lipolítico (Tabla 19).

Se observó una formación marcada y progresiva en los valores de i-peróxidos en todas las muestras durante el tiempo de almacenamiento (Figura 35 b); así como en la fluorescencia y en el i-TBA (Figura 35 c,d,f). Estos tres parámetros se relacionan entre sí con la oxidación lipídica, y es sabido que una de las principales causas de deterioro de los alimentos es la oxidación lipídica. Esta última afecta a los ácidos grasos, principalmente a los poliinsaturados, los cuales son altamente inestables y reaccionan fácilmente con el oxígeno, produciendo cambios importantes en alimentos con contenido lipídico como en su aroma, color, sabor, textura y valor nutritivo (Damodaran *et al.*, 2008). Los resultados en este estudio muestran una nula inhibición antioxidante de las películas con partículas núcleo-coraza de betalaínas hacia el filete de pescado. Esto puede ser debido a la interacción entre la proteína, compuestos fenólicos y betalaínas mostrada por FT-IR y corroborada por TGA, ya que se ha reportado que dichas interacciones afectan la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos de forma negativa. Por lo general las proteínas disminuyen la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos por su afinidad de unión (Ozidal *et al.*, 2013). Li *et al.* 2020 encontraron resultados similares a los obtenidos por nosotros. Los autores estudiaron el mecanismo de unión y capacidad antioxidante del complejo de β -caseína y ácidos fenólicos, observando que la presencia de β -caseína disminuyó la capacidad antioxidante *in vitro* de los ácidos fenólicos, especialmente del ácido gálico, compuesto que se encuentra presente en nuestro extracto.

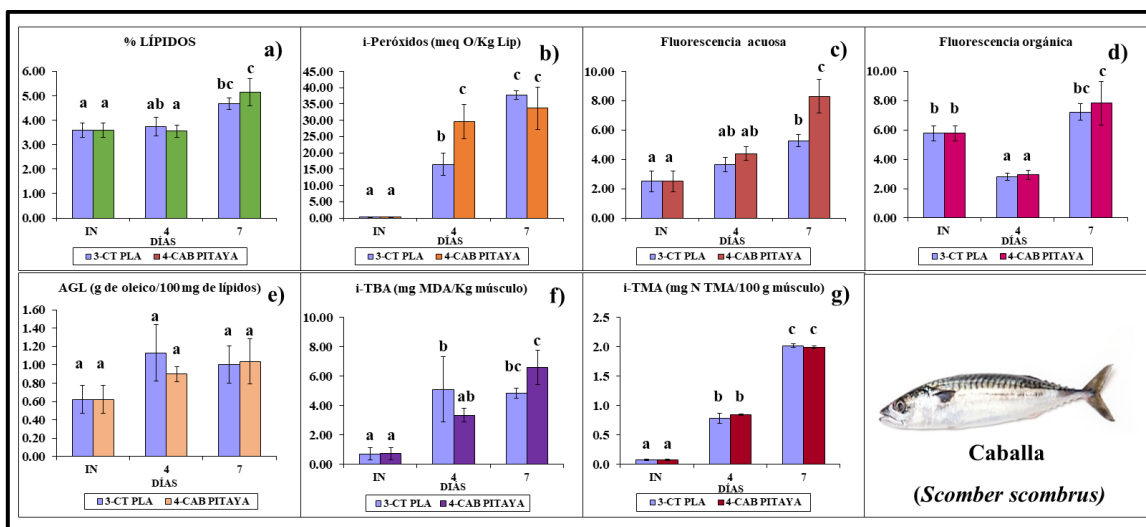


Figura 35. Gráficas del análisis químico de filetes de caballa (*Scomber scombrus*) almacenadas a 4 °C por 7 días: a) porcentaje de lípidos (% lípidos), b) índice de peróxidos (i-peróxidos), c) fluorescencia acuosa, d) fluorescencia orgánica, e) ácidos grasos libres (AGL), f) índice de ácido tiobarbitúrico (i-TBA) y g) índice de trimetilamina (i-TMA).

*Letras diferentes significan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), IN = iniciales (día 0); 3-CT PLA = película de PLA-PEG-DE sin partículas; 4-CAB PITAYA = película de PLA-PEG-DE con partículas núcleo-coraza de betalainas.

Evaluación de la pérdida de la calidad por análisis microbiológico de los filetes de caballa (*Scomber scombrus*)

En la Tabla 19 se muestran los valores obtenidos para el desarrollo de los microorganismos estudiados. En la evolución de los mesófilos aeróbicos se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con el control. El día 4 presentó una disminución significativa en su desarrollo en comparación con el día cero, mientras que el día 7 presentó un aumento sin diferencias significativas con respecto al día cero sin embargo, los valores obtenidos en el día 7 pueden considerarse aceptables desde el punto de vista de seguridad ya que están por debajo de 6 unidades. Dentro de este grupo en su mayoría son gram positivas que pertenecen a los géneros de *Streptococcus*, *Bacillus*, *Listeria* y *Corynebacterium*. El recuento de psicrófilos reveló un aumento significativo hasta el día 7 con respecto al día cero. La comparación entre las películas mostró valores promedio más altos para la película control por lo que, se obtuvo un efecto inhibitorio en la película con partículas en el día 4 de almacenamiento. Dicho grupo está compuesto principalmente por bacterias gram negativas que pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium* (García-Soto *et al.*, 2015). En la evaluación del recuento de lipolíticos no se presentaron diferencias significativas en la película con partículas durante el almacenamiento con respecto al día cero; esto concuerda con lo observado anteriormente en el contenido de AGL, mostrando un efecto inhibitorio en esta clase de microorganismos. La comparación entre los promedios de las películas no muestra diferencias significativas, sin embargo, las películas controles numéricamente mostraron un mayor desarrollo de microorganismos. En cuanto al recuento de los anaerobios no se mostró un efecto significativo durante el periodo de almacenamiento, observando un efecto de inhibición notable de las películas con partículas que contienen betalaínas con respecto a los controles donde el recuento promedio es mayor.

Esta inhibición de la actividad microbiana puede estar implicada como resultado de la presencia de betalaínas y compuestos fenólicos presentes en las películas con partículas. Se ha informado que las betalaínas exhiben efectos antimicrobianos, pero sus efectos dependen de la dosis y de la fuente (Choo, 2017). El orujo de remolacha que contiene gran cantidad de betalaínas y

compuestos fenólicos se ha observado que tiene un efecto inhibitorio en bacterias gram negativo y gram positivo, sin embargo, las de mayor susceptibilidad son las gram positivas (Vulic *et al.*, 2013). La pulpa de pitahaya roja también se ha observado que ejerce un amplio espectro antimicrobiano al inhibir bacterias gram positivas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia faecalis*) y negativas (*Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa*) (Yong *et al.*, 2017). En base a los resultados obtenidos observamos mayor efecto inhibitorio en los mesófilos, que en su mayoría son bacterias de tipo gram positivas. Este resultado también ha sido reportado por otros autores como Tenore *et al.* 2012, quienes informaron que se necesitó de una concentración baja de betalaínas extraídas de la pitahaya roja para actuar contra las bacterias gram positivas. Esto podría deberse a que las bacterias gram negativas tienen una membrana externa adicional que sirve como barrera selectiva de permeación. Otros autores informaron que las bacterias gram positivas son más susceptibles a las betalaínas de la remolacha (Canadanovic *et al.*, 2011; Saani y Lawrence, 2016). Por lo tanto, las propiedades hidrofílicas de las betalaínas pueden inhibir el crecimiento bacteriano al dañar la membrana celular o inhibir la síntesis de proteínas (Yong *et al.*, 2018).

Tabla 19. Evaluación de la actividad microbiana en filetes de caballa refrigerado y envuelto con diferentes condiciones de película

Microorganismos (log UFC/ g músculo)	Películas	Tiempo de almacenamiento (días)		
		0	4	7
Mesófilos	CT PLA	3.60 (0.44) ^b	3.42 (0.10) ^b	4.44 (0.46) ^c
	CAB PITAYA	3.60 (0.44) ^b	2.40 (0.17) ^a	3.55 (0.41) ^b
Psicrófilos	CT PLA	2.75 (0.26) ^a	3.75 (0.32) ^b	4.46 (0.48) ^b
	CAB PITAYA	2.75 (0.26) ^a	3.56 (0.41) ^{ab}	4.35 (0.60) ^b
Proteolíticos	CT PLA	2.43 (0.38) ^a	4.44 (0.32) ^b	4.97 (0.61) ^b
	CAB PITAYA	2.43 (0.38) ^a	3.88 (0.60) ^b	4.84 (0.47) ^b
Lipolíticos	CT PLA	2.00 (0.00) ^a	3.33 (0.41) ^{ab}	3.98 (0.28) ^b
	CAB PITAYA	2.00 (0.00) ^a	3.21 (1.13) ^{ab}	3.53 (0.92) ^{ab}
Anaerobios	CT PLA	2.39 (0.35) ^a	3.35 (0.32) ^c	3.66 (0.25) ^{bc}
	CAB PITAYA	2.46 (0.40) ^a	2.90 (0.10) ^{ab}	3.36 (0.16) ^{bc}

*Letras diferentes significan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$); UFC = unidades formadoras de colonias

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación permiten concluir que la temperatura principalmente y el tiempo de sonicación ayudan a una mayor extracción de betalaínas a partir de la pulpa de pitaya (*Stenocereus thurberi*). Además, la ultrafiltración es un buen método de purificación que puede favorecer las propiedades bioactivas del extracto de pitaya.

La encapsulación de betalaínas en FSG por la técnica de electroaspersión coaxial fue realizada con éxito obteniendo partículas núcleo-coraza en las cuales se registró el establecimiento de interacciones químicas entre FSG, las betalaínas y los compuestos fenólicos presentes en el extracto. Las betalaínas encapsuladas presentaron mayor estabilidad a la exposición a la luz y a la alta temperatura; registrando, además, una liberación prolongada bajo condiciones alimentarias simuladas.

La modificación del PLA con el plastificante PEG-DE provocó la disminución de su estabilidad térmica, así como la disminución de sus temperaturas de transición (T_g , T_c y T_f). Se registraron, además, cambios en las propiedades mecánicas de la película ya que aumentó el porcentaje de elongación y disminuyó la rigidez de la misma. Al adicionar las partículas núcleo-coraza de betalaínas a la película éstas presentaron interacción con la película, ocasionando el aumento en la estabilidad térmica y en la T_g ; sin embargo, las propiedades mecánicas se mantuvieron similares a las películas sin partículas.

Las películas con partículas núcleo-coraza de betalaínas aplicadas en filetes de caballa no presentaron visualmente cambios de color durante el almacenamiento del alimento modelo. Tampoco se registró efectos antioxidantes de dichas películas en este sistema; sin embargo, el material si presentó efectos inhibitorios en bacterias, principalmente en las de tipo gram positivas. Estos resultados indican que estas películas podrían funcionar como empaques activos en alimentos.

RECOMENDACIONES

- Evaluar la estabilidad de betalaínas encapsuladas y no encapsuladas frente a temperatura, luz y pH utilizando diferentes matrices.
- Colocar a las betalaínas encapsuladas a diferentes concentraciones en la superficie de las películas de PLA modificadas mediante una reacción de funcionalización.
- Aplicar las películas con partículas en filetes de pescado magro y graso analizando fisicoquímica y microbiológicamente durante 14 días de almacenamiento a temperaturas de congelación y refrigeración.

REFERENCIAS

- Abdel-Hameed, E. S. S., Nagaty, M. A., Salman, M. S., & Bazaid, S. A. (2014). Phytochemicals, nutritional and antioxidant properties of two prickly pear cactus cultivars (*Opuntia ficus indica* Mill.) growing in Taif, KSA. *Food chemistry*, *160*, 31-38.
- Aguilar TS, Mamani NW, Espinoza SC, Basilio AJ, Condezo HL (2018) Microencapsulated betacyanin from colored organic quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*): optimization, physicochemical characterization and accelerated storage stability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *98*: 5873-5883
- Ahmed, J., Zhang, J. X., Song, Z., & Varshney, S. K. (2009). Thermal properties of polylactides. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *95*(3), 957-964.
- Ahmed, J., Varshney, S. K., Zhang, J. X., & Ramaswamy, H. S. (2009). Effect of high pressure treatment on thermal properties of polylactides. *Journal of food engineering*, *93*(3), 308-312.
- Ahmed, J., & Varshney, S. K. (2011). Polylactides—chemistry, properties and green packaging technology: a review. *International Journal of Food Properties*, *14*(1), 37-58.
- Akhtar MJ, Jacquot M, Jasniewski J, Jacquot C, Imran M, Jamshidian, Desobry S (2012) Antioxidant capacity and light-aging study of HPMC films functionalized with natural plant extract. *Carbohydrate polymers*, *89*:1150-1158
- Amjadi, S., Abbasi, M. M., Shokouhi, B., Ghorbani, M., & Hamishehkar, H. (2019). Enhancement of therapeutic efficacy of betanin for diabetes treatment by liposomal nanocarriers. *Journal of Functional Foods*, *59*, 119-128.
- Amjadi S, Ghorbani M, Hamishehkar H, Roufegarinejad L (2018) Improvement in the stability of betanin by liposomal nanocarriers: Its application in gummy candy as a food model. *Food chemistry*, *256*: 156-162
- Andreani, L., Cercená, R., Ramos, B. G., & Soldi, V. (2009). Development and characterization of wheat gluten microspheres for use in a controlled release system. *Materials Science and Engineering: C*, *29*(2), 524-531.
- Arvanitoyannis, I. S., & Stratakos, A. C. (2012). Application of modified atmosphere packaging and active/smart technologies to red meat and poultry: A review. *Food and Bioprocess Technology*, *5*(5), 1423–1446.

- Atay, E., Fabra, M. J., Martínez-Sanz, M., Gomez-Mascaraque, L. G., Altan, A., & Lopez-Rubio, A. (2018). Development and characterization of chitosan/gelatin electrosprayed microparticles as food grade delivery vehicles for anthocyanin extracts. *Food hydrocolloids*, 77, 699-710.
- Atigo JLD, Bergamasco RDC, Madrona G S (2018) Effect of ph on the stability of red beet extract (*Beta vulgaris* l.) microcapsules produced by spray drying or freeze drying. *Food Science and Technology*, 38: 72-77
- Augustin MA, Hemar Y (2009) Nano-and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical society reviews* 38:902-912
- Auras, R. A., Singh, S. P., & Singh, J. J. (2005). Evaluation of oriented poly (lactide) polymers vs. existing PET and oriented PS for fresh food service containers. *Packaging Technology and Science: An International Journal*, 18(4), 207-216.
- Azeredo H (2009) Betalains: properties, sources, applications, and stability—a review. *International journal of food science & technology* 44:2365-2376
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman M M, Sharif K M, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117: 426-436
- AOAC. (1996). Official methods of analisis; Association of official analytical chemists. Washington, DC.
- Baiardo, M., Frisoni, G., Scandola, M., Rimelen, M., Lips, D., Ruffieux, K., & Wintermantel, E. (2003). Thermal and mechanical properties of plasticized poly (L-lactic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, 90(7), 1731-1738.
- Bhardwaj, R., & Mohanty, A. K. (2007). Modification of brittle polylactide by novel hyperbranched polymer-based nanostructures. *Biomacromolecules*, 8(8), 2476-2484.
- Baleizao, C., Nagl, S., Schaferling, M., Berberan-Santos, M. N., & Wolfbeis, O. S. (2008). Dual fluorescence sensor for trace oxygen and temperature with unmatched range and sensitivity. *Analytical Chemistry*, 80, 6449-6457.
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(9), 1073-1101.

- Barba FJ, Putnik P, Kovačević DB, Poojary M M, Roohinejad S, Lorenzo JM, Koubaa M (2017) Impact of conventional and non-conventional processing on prickly pear (*Opuntia* spp.) and their derived products: From preservation of beverages to valorization of by-products. *Trends in food science & technology*, 67: 260-270
- Belhadj Slimen, I, Najar T, Abderrabba M (2017) Chemical and antioxidant properties of betalains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65: 675-689
- Bock, N., Dargaville, T. R., & Woodruff, M. A. (2012). Electro spraying of polymers with therapeutic molecules: state of the art. *Progress in polymer science*, 37(11), 1510-1551.
- Bonilla, J. C., Bernal-Crespo, V., Schaber, J. A., Bhunia, A. K., & Kokini, J. L. (2019). Simultaneous immunofluorescent imaging of gliadins, low molecular weight glutenins, and high molecular weight glutenins in wheat flour dough with antibody-quantum dot complexes. *Food Research International*, 120, 776-783.
- Bhushani, J. A., Kurrey, N. K., & Anandharamakrishnan, C. (2017). Nanoencapsulation of green tea catechins by electro spraying technique and its effect on controlled release and in-vitro permeability. *Journal of Food Engineering*, 199, 82-92.
- Burrola, H., Rodríguez, D., del Castillo, T., Martínez, M., Madera, T., & Rodríguez, F. (2014). Preparación de películas extruidas de poli (ácido láctico) y quitosano, Hermosillo Sonora, México. *Universidad de Sonora*.
- Butera, D., Tesoriere, L., Di Gaudio, F., Bongiorno, A., Allegra, M., Pintaudi, A. M., ... & Livrea, M. A. (2002). Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(23), 6895-6901.
- Brody, A. L., Bugusu, B., Han, J. H., Sand, C. K., & McHugh, T. H. (2008). Innovative food packaging solutions. *Journal of food science*, 73(8), 107-116.
- Cai, Y., Sun, M., Wu, H., Huang, R., & Corke, H. (1998). Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6), 2063-2070.
- Cai Y, Sun M, Corke H (2003) Antioxidant activity of betalains from plants of the *Amaranthaceae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:2288-2294.
- Calvo, T. R. A., 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.

- Camo, J., Beltrán, J. A., & Roncalés, P. (2008). Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. *Meat Science*, *80*(4), 1086-1091.
- Čanadanović-Brunet, J. M., Savatović, S. S., Četković, G. S., Vulić, J. J., Djilas, S. M., Markov, S. L., & Cvetković, D. D. (2011). Antioxidant and antimicrobial activities of beet root pomace extracts. *Czech Journal of Food Sciences*, *29*(6), 575-585.
- Cao, L., Luo, J., Tu, K., Wang, L. Q., & Jiang, H. (2014). Generation of nano-sized core-shell particles using a coaxial tri-capillary electrospray-template removal method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *115*, 212-218.
- Carbonaro, M., & Nucara, A. (2010). Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region. *Amino acids*, *38*(3), 679-690.
- Cárdenas-Navarro, R., Sánchez-Yáñez, J. M., Farías-Rodríguez, R., & Peña-Cabriales, J. J. (2004). Los aportes de nitrógeno en la agricultura. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, *10*(2), 173-178.
- Carmo, E. L. D., Teodoro, R. A. R., Félix, P. H. C., Fernandes, R. V. D. B., Oliveira, É. R. D., Veiga, T. R. L. A., ... & Botrel, D. A. (2018). Stability of spray-dried beetroot extract using oligosaccharides and whey proteins. *Food chemistry*, *249*, 51-59.
- Cassano, A., Tasselli, F., Conidi, C., & Drioli, E. (2009). Ultrafiltration of Clementine mandarin juice by hollow fibre membranes. *Desalination*, *241*(1-3), 302-308.
- Cassano, A., Conidi, C., & Drioli, E. (2010). Physico-chemical parameters of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice clarified by microfiltration and ultrafiltration processes. *Desalination*, *250*(3), 1101-1104.
- Castellar, M. R., Solano, F., & Obón, J. M. (2012). Betacyanin and other antioxidants production during growth of *Opuntia stricta* (Haw.) fruits. *Plant foods for human nutrition*, *67*(4), 337-343.
- 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.
- Castro, E. D., Rodríguez, F., Castillo, M., Ramírez, B., Romero, J., & del Castillo, T. (2015). Preparación y caracterización de esferas de gluteninas por la técnica de electroaspersión

con aplicación como sistema de liberación prolongada de urea. Hermosillo Sonora, México. *Universidad de Sonora*.

Castro-Muñoz, R., Barragán-Huerta, B. E., & Yáñez-Fernández, J. (2015). Use of gelatin-maltodextrin composite as an encapsulation support for clarified juice from purple cactus pear (*Opuntia stricta*). *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 242-248.

Castro-Muñoz, R., Orozco-Álvarez, C., & Yáñez-Fernández, J. (2014). Analysis of clarification process of purple cactus pear (*Opuntia ficus indica*) juice by ultrafiltration *International journal of engineering & technology*, 3(9), 1462-1466.

Castro-Muñoz, R., Barragán-Huerta, B. E., & Yáñez-Fernández, J. (2015). Use of gelatin-maltodextrin composite as an encapsulation support for clarified juice from purple cactus pear (*Opuntia stricta*). *LWT-Food Science and technology*, 62(1), 242-248.

Cavallo, J. A., Strumia, M. C., & Gomez, C. G. (2014). Preparation of a milk spoilage indicator adsorbed to a modified polypropylene film as an attempt to build a smart packaging. *Journal of Food Engineering*, 136, 48-55.

Campos, C. A., Gliemmo, M. F., Aubourg, S. P., & Velázquez, J. B. (2012). Novel technologies for the preservation of chilled aquatic food products. In *Novel technologies in food science* (pp. 299-323). Springer, New York, NY.

Cejudo-Bastante, M. J., Chaalal, M., Louaileche, H., Parrado, J., & Heredia, F. J. (2014). Betalain profile, phenolic content, and color characterization of different parts and varieties of *Opuntia ficus-indica*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(33), 8491-8499.

Celli GB, Brooks MSL (2017) Impact of extraction and processing conditions on betalains and comparison of properties with anthocyanins—A current review. *Food Research International*, 100: 501-509

Commission regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. 2011. 10/2011/EC.

Champagne CP, Fustier P (2007) Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current opinion in biotechnology* 18:184-190

Chen, C., Liu, W., Jiang, P., & Hong, T. (2019). Coaxial electrohydrodynamic atomization for the production of drug-loaded micro/nanoparticles. *Micromachines*, 10(2), 125.

- Chevillard, A.; Angellier, H.; Guillard, V.; Gontard, N.; Gastaldi, E. (2012). Investigating the biodegradation pattern of an ecofriendly pesticide delivery system based on wheat gluten and organically modified montmorillonites. *Polymer Degradation and Stability*. 97, 2060-2068.
- Chieng, B. W., Ibrahim, N. A., Yunus, W. M. Z. W., & Hussein, M. Z. (2014). Poly (lactic acid)/poly (ethylene glycol) polymer nanocomposites: effects of graphene nanoplatelets. *Polymers*, 6(1), 93-104.
- Choi, K. M., Choi, M. C., Han, D. H., Park, T. S., & Ha, C. S. (2013). Plasticization of poly (lactic acid)(PLA) through chemical grafting of poly (ethylene glycol)(PEG) via in situ reactive blending. *European polymer journal*, 49(8), 2356-2364.
- Choo, W. S. (2017). Betalains: application in functional foods. *Bioact Food*, 1-28.
- Chong PH, Yusof YA, Aziz MG, Nazli NM, Chin NL, Muhammad SS (2014) Effects of Spray Drying Conditions of Microencapsulation of *Amaranthus gangeticus* Extract on Drying Behaviour. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 2:33-42
- Chranioti C, Nikoloudaki A, Tzia C (2015) Saffron and beetroot extracts encapsulated in maltodextrin, gum Arabic, modified starch and chitosan: Incorporation in a chewing gum system. *Carbohydrate polymers* 127:252-263
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., ... & Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57.
- Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2008). *Fennema química de los alimentos* (No. 664.07 F335f). Acribia,.
- Dehbi, F., Hasib, A., Bouaziz, M., Ouattmane, A., Elbatal, H., Jaouad, A., & Sayadi, S. (2013). Effect of phenolic compounds and betalain pigments on the antioxidant capacity of Moroccan prickly pear juices. *Nature & Technology*, (9), 2.
- Delcour, J. A., Joye, I. J., Pareyt, B., Wilderjans, E., Brijs, K., & Lagrain, B. (2012). Wheat gluten functionality as a quality determinant in cereal-based food products. *Annual review of food science and technology*, 3, 469-492.

- Delia SC, Chávez GM, Frank MLM, Araceli SGP, Irais AL, Franco AA (2019). Spray drying microencapsulation of betalain rich extracts from *Escontria chiotilla* and *Stenocereus queretaroensis* fruits using cactus mucilage. *Food chemistry*, 272: 715-722
- Díaz, P.; Dalla, M.; Vázquez, D.; Castro, M. (2005). Elementos del análisis cualitativo y cuantitativo en proteínas del gluten. *Agricultura técnica*. 66, 360-369.
- do Carmo EL, Teodoro RAR, Félix PHC, de Barros Fernandes RV, de Oliveira ÉR, Veiga TRLA, Borges SV, Botrel DA (2018). Stability of spray-dried beetroot extract using oligosaccharides and whey proteins. *Food chemistry*, 249: 51-59
- Domenek, S.; Brendel, L.; Morel, M. H.; Guilbert, S. (2004). Swelling behavior and structural characteristics of wheat gluten polypeptide films. *Biomacromolecules*. 5, 1002-1008.
- Dhandayuthapani, B., Varghese, S. H., Aswathy, R. G., Yoshida, Y., Maekawa, T., & Sakthikumar, D. (2012). Evaluation of antithrombogenicity and hydrophilicity on zein-SWCNT electrospun fibrous nanocomposite scaffolds. *International journal of biomaterials*, 2012.
- Djilas SM, Markov SL (2011) Antioxidant and antimicrobial activities of beet root pomace extracts. *Czech Journal of Food Sciences* 29:575-585
- Eisinaite V, Juraite D, Schroën K, Leskauskaite D (2016) Preparation of stable food-grade double emulsions with a hybrid premix membrane emulsification system. *Food chemistry*, 206: 59-66
- ELObeidy, A. A. (2004). Introducing and growing some fruiting columnar cacti in a new arid environment. *Journal of fruit and ornamental plant research*, 12, 127-136.
- Emin, M. A., Teumer, T., Schmitt, W., Rädle, M., & Schuchmann, H. P. (2016). Measurement of the true melt temperature in a twin-screw extrusion processing of starch based matrices via infrared sensor. *Journal of Food Engineering*, 170, 119-124.
- European Commission. (2004). Commission Regulation (EC) No 1935/2004 of 27 October 2004 on materials and articles intended to come into contact with food and repealing Directives 80/590/EEC and 89/109/EEC. *Official Journal of the European Union*, OJ L 338, 4-17.
- Esquivel, P. (2004). Los frutos de las cactáceas y su potencial como materia prima. *Agronomía mesoamericana*, 15(2), 215-219.

- Fan, S. H., Shen, J., Wu, H., Wang, K. Z., & Zhang, A. G. (2015). A highly selective turnon colorimetric and luminescence sensor based on a triphenylamine-appended ruthenium(II) dye for detecting mercury ion. *Chinese Chemical Letters*, 26, 580-584.
- Fang Z, Bhandari B (2010) Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology* 21:510-523
- Fathordoobady, F., Mirhosseini, H., Selamat, J., & Manap, M. Y. A. (2016). Effect of solvent type and ratio on betacyanins and antioxidant activity of extracts from *Hylocereus polyrhizus* flesh and peel by supercritical fluid extraction and solvent extraction. *Food chemistry*, 202, 70-80.
- Fernández-López, J. A., Almela, L., Obón, J. M., & Castellar, R. (2010). Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 253-259.
- Fernández LJA, Roca MJ, Angosto JM, Obón JM (2018) Betaxanthin-rich extract from cactus pear fruits as yellow water-soluble colorant with potential application in foods. *Plant foods for human nutrition*, 73: 146-153
- Fortunati, E., Armentano, I., Zhou, Q., Iannoni, A., Saino, E., Visai, L., ... & Kenny, J. M. (2012). Multifunctional bionanocomposite films of poly (lactic acid), cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, 87(2), 1596-1605.
- Ghaani, M., Cozzolino, C. A., Castelli, G., & Farris, S. (2016). An overview of the intelligent packaging technologies in the food sector. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 1-11.
- Ghanbarzadeh, B., Almasi, H., & Entezami, A. A. (2011). Improving the barrier and mechanical properties of corn starch-based edible films: Effect of citric acid and carboxymethyl cellulose. *Industrial Crops and products*, 33(1), 229-235.
- Galaffu N, Bortlik K, Michel M. (2015) An industry perspective on natural food colour stability. In *Colour additives for foods and beverages* (pp. 91-130). Woodhead Publishing
- Galagan, Y., & Su, W. F. (2008). Fodable ink for time–temperature control of food freshness: Novel new time–temperature indicator. *Food Research International*, 41(6), 653–657.

- Galloway, J. N., Townsend, A. R., Erisman, J. W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J. R., & Sutton, M. A. (2008). Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, *320*(5878), 889-892.
- Gamboa, W.; Mantilla, O.; Castillo, V. (2007). Producción de micro y nanofibras a partir de la técnica electrospinning para aplicaciones farmacológicas. *Fundación Cardiovascular de Colombia, Grupo de Bioingeniería*.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & García-Carmona, F. (2009). The role of phenolic hydroxy groups in the free radical scavenging activity of betalains. *Journal of natural products*, *72*(6), 1142-1146.
- Gandía-Herrero, F., Cabanes, J., Escribano, J., García-Carmona, F., & Jiménez-Atiénzar, M. (2013). Encapsulation of the most potent antioxidant betalains in edible matrixes as powders of different colors. *Journal of agricultural and food chemistry*, *61*(18), 4294-4302.
- Gandía-Herrero F, García-Carmona F (2013) Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends in plant science* 18:334-343
- Gandía-Herrero F, Escribano J, García-Carmona F. (2016) Biological activities of plant pigments betalains. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56: 937-945
- Gao, F., Zheng, D., Tanaka, H., Zhan, F., Yuan, X., Gao, F., et al. (2015). An electrochemical sensor for gallic acid based on Fe₂O₃/electro-reduced graphene oxide composite: estimation for the antioxidant capacity index of wines. *Materials Science and Engineering: C*, *57*, 279-287
- 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.
- García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Salinas-Moreno, Y., & del Carmen Luna-Morales, C. (2016). Postharvest quality, soluble phenols, betalains content, and antioxidant activity of *Stenocereus pruinosus* and *Stenocereus stellatus* fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *111*, 69-76.
- García-Cruz, L., 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.

- García-Lucas, K. A., Méndez-Lagunas, L. L., Rodríguez-Ramírez, J., Campanella, O. H., Patel, B. K., & Barriada-Bernal, L. G. (2017). Physical properties of spray dried *Stenocereus griseus* pitaya juice powder. *Journal of food process engineering*, 40(3), e12470.
- Garg, K.; Bowlin, G. L. (2011). Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Biomicrofluidics*. 5, 013403.
- García-Soto, B., Miranda, J. M., Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., Sendón, R., Rodríguez-Martínez, A. V., Barros-Velázquez, J., & Aubourg, S. P. (2015). Effect of biodegradable film (lyophilised alga *Fucus spiralis* and sorbic acid) on quality properties of refrigerated megrim (*L. epidorhombus whiffiagonis*). *International Journal of Food Science & Technology*, 50(8), 1891-1900.
- Gengatharan, A., Dykes, G. A., & Choo, W. S. (2017). The effect of pH treatment and refrigerated storage on natural colourant preparations (betacyanins) from red pitahaya and their potential application in yoghurt. *LWT-Food Science and Technology*, 80, 437-445.
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 53(5), 1370-1373.
- Georgiev, V. G., Weber, J., Kneschke, E. M., Denev, P. N., Bley, T., & Pavlov, A. I. (2010). Antioxidant activity and phenolic content of betalain extracts from intact plants and hairy root cultures of the red beetroot *Beta vulgaris* cv. Detroit dark red. *Plant foods for human nutrition*, 65(2), 105-111.
- Goldberg, S., Doyle, R., & Rosenberg, M. (1990). Mechanism of enhancement of microbial cell hydrophobicity by cationic polymers. *Journal of Bacteriology*, 172, 5650-5654.
- Gomez-Estaca, J., Balaguer, M. P., Gavara, R., & Hernandez-Munoz, P. (2012). Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 82-91.
- Gómez-Estaca, J., López-de-Dicastillo, C., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., & Gavara, R. (2014). Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 35(1), 42-51.
- Gómez, J.; Balagues, M.P.; Gavara, R.; Hernandez, P. (2012). Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and

- suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin. *Food Hydrocolloids*, 28, 82-91.
- Goulart, L. A., Cruz de Moraes, F., & Mascaro, L. H. (2016). Influence of the different carbon nanotubes on the development of electrochemical sensors for bisphenol A. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 768e773.
- Gouin S (2004) Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in food science & technology*, 15:330-347
- Guerrieri, N., & Cavaletto, M. (2018). Cereals proteins. In *Proteins in food processing* (pp. 223-244). Woodhead Publishing.
- Gulfam, M., Kim, J. E., Lee, J. M., Ku, B., Chung, B. H., & Chung, B. G. (2012). Anticancer drug-loaded gliadin nanoparticles induce apoptosis in breast cancer cells. *Langmuir*, 28(21), 8216-8223.
- Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., van Otterdijk, R., & Meybeck, A. (2011). FAO: Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo. *Alcance, Causas y Prevención*. In "SAVE FOOD.
- Gutiérrez, T. J., Guzmán, R., Jaramillo, C. M., & Famá, L. (2016). Effect of beet flour on films made from biological macromolecules: native and modified plantain flour. *International journal of biological macromolecules*, 82, 395-403.
- Guzmán, M. P., Lerma, Y. O., & Aristizábal, Y. B. (2013). Estudio comparativo de la liberación in vitro de metformina, a partir de dos productos multifuente de liberación inmediata, comercializados en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 42(2), 169-189.
- Guzmán-Maldonado, S. H., Herrera-Hernández, G., Hernández-López, D., Reynoso-Camacho, R., Guzmán-Tovar, A., Vaillant, F., & Brat, P. (2010). Physicochemical, nutritional and functional characteristics of two underutilised fruit cactus species (*Myrtillocactus*) produced in central Mexico. *Food chemistry*, 121(2), 381-386.
- Glassford, S. E., Byrne, B., & Kazarian, S. G. (2013). Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1834(12), 2849-2858.
- Han, J. H. (2005). New technologies in food packaging: overview. In J. H. Han (Ed.), *Innovations in food packaging* (p. 3). Amsterdam: Ed. Elsevier Academic Press.

- Han, J. H. (2014). A review of food packaging technologies and innovations. In *Innovations in food packaging* (pp. 3-12). Academic Press.
- Hao, S., Wang, Y., Wang, B., Deng, J., Zhu, L., & Cao, Y. (2014). Formulation of porous poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles by electrospray deposition method for controlled drug release. *Materials Science and Engineering: C*, *39*, 113-119.
- Hao, S.; Wang, Y.; Wang, B.; Deng, J.; Liu, X.; Liu, J. (2013). Rapid preparation of pH-sensitive polymeric nanoparticle with high loading capacity using electrospray for oral drug delivery. *Materials Science and Engineering*. *33*, 4562-4567.
- Hassouna, F., Raquez, J. M., Addiego, F., Dubois, P., Toniuzzo, V., & Ruch, D. (2011). New approach on the development of plasticized polylactide (PLA): Grafting of poly (ethylene glycol)(PEG) via reactive extrusion. *European Polymer Journal*, *47*(11), 2134-2144.
- Haugaard, V., Weber, C., Danielsen, B., & Bertelsen, G. (2002). Quality changes in orange juice packed in materials based on polylactate. *European Food Research and Technology*, *214*(5), 423-428.
- He, J., Penson, S., Powers, S. J., Hawes, C., Shewry, P. R., & Tosi, P. (2013). Spatial patterns of gluten protein and polymer distribution in wheat grain. *Journal of agricultural and food chemistry*, *61*(26), 6207-6215.
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2005). Identification of heat-induced degradation products from purified betanin, phylloactin and hylocerenin by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *19*(18), 2603-2616.
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). Betalain stability and degradation—structural and chromatic aspects. *Journal of food science*, *71*(4).
- Hernández-Muñoz, P., Villalobos, R., & Chiralt, A. (2004). Effect of cross-linking using aldehydes on properties of glutenin-rich films. *Food Hydrocolloids*, *18*(3), 403-411.
- Herrera-Hernández, M. G., Guevara-Lara, F., Reynoso-Camacho, R., & Guzmán-Maldonado, S. H. (2011). Effects of maturity stage and storage on cactus berry (*Myrtillocactus geometrizans*) phenolics, vitamin C, betalains and their antioxidant properties. *Food chemistry*, *129*(4), 1744-1750.

- Herrera, N., Salaberria, A. M., Mathew, A. P., & Oksman, K. (2016). Plasticized polylactic acid nanocomposite films with cellulose and chitin nanocrystals prepared using extrusion and compression molding with two cooling rates: effects on mechanical, thermal and optical properties. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 83, 89-97.
- Hilou A, Nacoulma OG, Guiguemde TR (2006) In vivo antimalarial activities of extracts from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhaavia erecta* L. in mice. *Journal of ethnopharmacology* 103:236-240.
- Horan, T. J. (2000). Method for determining deleterious bacterial growth in packaged food utilizing hydrophilic polymers, US Patent 6149952.
- Huber, C., Nguyen, T. A., Krause, C., Humele, H., & Stangelmayer, A. (2006). Oxygen ingress measurement into PET bottles using optical-chemical sensor technology. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 59, 5-15.
- Iglesias Montes, M. L., Luzi, F., Dominici, F., Torre, L., Cyras, V. P., Manfredi, L. B., & Puglia, D. (2019). Design and characterization of PLA bilayer films containing lignin and cellulose nanostructures in combination with umbelliferone as active ingredient. *Frontiers in Chemistry*, 7, 157.
- Impellizzeri G, Piattelli M (1972) Biosynthesis of indicaxanthin in *Opuntia ficus-indica* fruits. *Phytochemistry* 11: 2499-2502.
- Janiszewska E (2014) Microencapsulated beetroot juice as a potential source of betalain. *Powder Technology* 264:190-196
- Jaworek, A., Sobczyk, A. T., & Krupa, A. (2018). Electrospray application to powder production and surface coating. *Journal of Aerosol Science*, 125, 57-92.
- Jayasena, D. D., & Jo, C. (2013). Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 34, 96-108.
- Jin, T., & Zhang, H. (2008). Biodegradable polylactic acid polymer with nisin for use in antimicrobial food packaging. *Journal of Food Science*, 73(3), M127-M134.
- Jouki, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Koocheki, A., & Khazaei, N. (2014). Effect of quince seed mucilage edible films incorporated with oregano or thyme essential oil on shelf life extension of refrigerated rainbow trout fillets. *International journal of food microbiology*, 174, 88-97.
- Kaimainen M, Marze S, Järvenpää E, Anton M, Huopalahti R (2015) Encapsulation of betalain into w/o/w double emulsion and release during in vitro intestinal lipid digestion. *LWT-Food Science and Technology* 60:899-904

- Kerry, J. P., O'Grady, M. N., & Hogan, S. A. (2006). Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*, 74, 113–130.
- Kerry, J. P. (2014). New packaging technologies, materials and formats for fast-moving consumer products. In J. H. Han (Ed.), *Innovations in food packaging* (pp. 549–584) (2nd ed.). San Diego, USA: Academic Press
- Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 39(8), 549-559.
- Koubaa M, Barba FJ, Grimi N, Mhemdi H, Koubaa W, Boussetta N, Vorobiev E (2016) Recovery of colorants from red prickly pear peels and pulps enhanced by pulsed electric field and ultrasound. *Innovative food science & emerging technologies*, 37: 336-344
- Koubaier, H. B. H., Essaidi, I., Snoussi, A., Zgoulli, S., Chaabouni, M. M., Thonart, P., & Bouzouita, N. (2013). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation on the colorants of heated red beetroot extracts. *African Journal of Biotechnology*, 12(7).
- Kulinski, Z., Piorkowska, E., Gadzinowska, K., & Stasiak, M. (2006). Plasticization of poly (L-lactide) with poly (propylene glycol). *Biomacromolecules*, 7(7), 2128-2135.
- Kumar, S. N. A., Ritesh, S. K., Sharmila, G., & Muthukumaran, C. (2017). Extraction optimization and characterization of water soluble red purple pigment from floral bracts of *Bougainvillea glabra*. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S2145-S2150.
- Kumar SS, Giridhar P (2016) Stabilization of bioactive betalain pigment from fruits of *Basella rubra* L. through maltodextrin encapsulation. *Madridge J Food Tech*, 1: 66-70
- Kumar, J., Kumar, M., Pandey, R., & Chauhan, N. S. (2017). Physiopathology and management of gluten-induced celiac disease. *Journal of food science*, 82(2), 270-277.
- Kuswandi, B., Jayus, Oktaviana, R., Abdullah, A., & Heng, L. Y. (2014). A novel on-package sticker sensor based on methyl red for real-time monitoring of broiler chicken cut freshness. *Packaging Technology and Science*, 27(1), 69–81.
- Kuswandi, B., Jayus, Restyana, A., Abdullah, A., Heng, L. Y., & Ahmad, M. (2012). A novel colorimetric food package label for fish spoilage based on polyaniline film. *Food Control*, 25(1), 184–189.

- Kuswandi, B., Wicaksono, Y., Jayus, Abdullah, A., Heng, L., & Ahmad, M. (2011). Smart packaging: sensors for monitoring of food quality and safety. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 5, 137e146.
- Khalil, H. A., Banerjee, A., Saurabh, C. K., Tye, Y. Y., Suriani, A. B., Mohamed, A., ... & Paridah, M. T. (2018). Biodegradable films for fruits and vegetables packaging application: preparation and properties. *Food Engineering Reviews*, 10(3), 139-153.
- Khan, M. I. (2016). Stabilization of betalains: a review. *Food chemistry*, 197, 1280-1285.
- Khan MI, Giridhar P (2014) Enhanced chemical stability, chromatic properties and regeneration of betalains in *Rivina humilis* L. berry juice. *LWT-Food Science and Technology* 58:649-657
- Khan MI (2016) Plant betalains: Safety, antioxidant activity, clinical efficacy, and bioavailability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15: 316-330
- Khan MI, Harsha PS, Chauhan AS, Vijayendra SVN, Asha MR, Giridhar P (2015) Betalains rich *Rivina humilis* L. berry extract as natural colorant in product (fruit spread and RTS beverage) development. *Journal of food science and technology*, 52: 1808-1813
- Khan MI, Giridhar, P. (2015). Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *Phytochemistry* 117:267-295
- Lagrain, B., Goderis, B., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2010). Molecular basis of processing wheat gluten toward biobased materials. *Biomacromolecules*, 11(3), 533-541.
- Lambourne, J., Tosi, P., Marsh, J., Bhandari, D., Green, R., Frazier, R., & Shewry, P. R. (2010). Characterisation of an s-type low molecular weight glutenin subunit of wheat and its proline and glutamine-rich repetitive domain. *Journal of cereal science*, 51(1), 96-104.
- Laqui-Vilca C, Aguilar-Tuesta S, Mamani-Navarro W, Montano-Bustamante J, Condezo-Hoyos L (2018) Ultrasound-assisted optimal extraction and thermal stability of betalains from colored quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) hulls. *Industrial crops and products*, 111: 606-614
- Lee, K., & Ko, S. (2014). Proof-of-concept study of a whey protein isolate based carbon dioxide indicator to measure the shelf-life of packaged foods. *Food Science and Biotechnology*, 23, 115-120.
- Li, D., Jiang, Y., Lv, S., Liu, X., Gu, J., Chen, Q., & Zhang, Y. (2018). Preparation of plasticized poly (lactic acid) and its influence on the properties of composite materials. *PloS one*, 13(3).

- Li, S., Zhao, S., Hou, Y., Chen, G., Chen, Y., & Zhang, Z. (2019). Polylactic Acid (PLA) Modified by Polyethylene Glycol (PEG) for the Immobilization of Lipase. *Applied biochemistry and biotechnology*, 1-15.
- Li, T., Li, X., Dai, T., Hu, P., Niu, X., Liu, C., & Chen, J. (2020). Binding mechanism and antioxidant capacity of selected phenolic acid- β -casein complexes. *Food Research International*, 129, 108802.
- Li, W., Dobraszczyk, B. J., Dias, A., & Gil, A. M. (2006). Polymer conformation structure of wheat proteins and gluten subfractions revealed by ATR-FTIR. *Cereal chemistry*, 83(4), 407-410
- Li, W., Zhang, C., Chi, H., Li, L., Lan, T., Han, P., ... & Qin, Y. (2017). Development of antimicrobial packaging film made from poly (lactic acid) incorporating titanium dioxide and silver nanoparticles. *Molecules*, 22(7), 1170.
- Liang, N., & Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*, 19(11), 19180-19208.
- Lima E, Bosch P, Loera S, Ibarra IA, Laguna H, Lara V (2009) Non-toxic hybrid pigments: Sequestering betanidin chromophores on inorganic matrices. *Applied Clay Science*, 42: 478-482
- Liu, F., Antoniou, J., Li, Y., Yi, J., Yokoyama, W., Ma, J., & Zhong, F. (2015). Preparation of gelatin films incorporated with tea polyphenol nanoparticles for enhancing controlled-release antioxidant properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(15), 3987-3995.
- Lopez-Enriquez, R. L., Ocano-Higuera, V. M., Torres-Arreola, W., Ezquerro-Brauer, J. M., & Marquez-Rios, E. (2015). Chemical and functional characterization of sarcoplasmic proteins from giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle. *Journal of Chemistry*, 2015, 1-10.
- Lü, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(4), 840-860.
- Luo, H., Cai, Y., Peng, Z., Liu, T., & Yang, S. (2014). Chemical composition and in vitro evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of supercritical carbon dioxide extracts of pitaya (dragon fruit) peel. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 1.

- Ljungberg, N., & Wesslen, B. (2002). The effects of plasticizers on the dynamic mechanical and thermal properties of poly (lactic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, 86(5), 1227-1234.
- Llana-Ruiz-Cabello, M., Pichardo, S., Baños, A., Núñez, C., Bermúdez, J. M., Guillamón, E., & Cameán, A. M. (2015). Characterisation and evaluation of PLA films containing an extract of *Allium* spp. to be used in the packaging of ready-to-eat salads under controlled atmospheres. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1354-1361.
- Mabry TJ, Dreiding AS (1968) The betalains. Recent Advances in Phytochemistry. Appleton-Centry-Crofts, NY
- Majzoobi, M., Abedi, E., Farahnaky, A., & Aminlari, M. (2012). Functional properties of acetylated glutenin and gliadin at varying pH values. *Food Chemistry*, 133, 1402-1407.
- Maguire, K. M., Banks, N. H., & Opara, L. U. (2001). Factors affecting weight loss of apples. *Horticultural reviews*, 25, 197-234.
- Manchali, S., Murthy, K. N. C., Nagaraju, S., & Neelwarne, B. (2013). Stability of betalain pigments of red beet. In *Red beet biotechnology* (pp. 55-74). Springer, Boston, MA.
- Maran, J. P., & Manikandan, S. (2012). Response surface modeling and optimization of process parameters for aqueous extraction of pigments from prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit. *Dyes and Pigments*, 95(3), 465-472.
- Maran, J. P., Manikandan, S., & Mekala, V. (2013). Modeling and optimization of betalain extraction from *Opuntia ficus-indica* using Box–Behnken design with desirability function. *Industrial crops and products*, 49, 304-311.
- Maran, J. P., & Priya, B. (2016). Multivariate statistical analysis and optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigments from waste red beet stalks. *Journal of food science and technology*, 53(1), 792-799.
- Marcos, B., Sárraga, C., Castellari, M., Kappen, F., Schennink, G., & Arnau, J. (2014). Development of biodegradable films with antioxidant properties based on polyesters containing α -tocopherol and olive leaf extract for food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 1(2), 140-150.
- Mercado-Mercado, G., Laura, A., & Alvarez-Parrilla, E. (2020). Effect of pectin on the interactions among phenolic compounds determined by antioxidant capacity. *Journal of Molecular Structure*, 1199, 126967.

- Miguel, M. G. (2018). Betalains in Some Species of the Amaranthaceae Family: A Review. *Antioxidants*, 7(4), 53.
- Miller HE, Rösler H, Wohlpart A, Wyler H, Wilcox ME, Frohofer H et al (1968) Biogenese der Betalaine Biotransformation von Dopa und Tyrosin in den Betalaminsäureteil des Betanins. Vorläufige Mitteilung. *Helvetica chimica acta* 51:1470-1474.
- Mills, A., & Hazafy, D. (2009). Nanocrystalline SnO₂-based, UVB-activated, colourimetric oxygen indicator. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 136(2), 344-349.
- Mistriotis, A., Briassoulis, D., Giannoulis, A., & D'Aquino, S. (2016). Design of biodegradable bio-based equilibrium modified atmosphere packaging (EMAP) for fresh fruits and vegetables by using micro-perforated poly-lactic acid (PLA) films. *Postharvest Biology and technology*, 111, 380-389.
- Moßhammer MR, Stintzing FC, Carle R (2005) Colour studies on fruit juice blends from *Opuntia* and *Hylocereus* cacti and betalain-containing model solutions derived therefrom. *Food Research International* 38: 975-981
- Moghaddam, M. K., Mortazavi, S. M., & Khayamian, T. (2015). Preparation of calcium alginate microcapsules containing n-nonadecane by a melt coaxial electrospray method. *Journal of electrostatics*, 73, 56-64.
- Mohamed EE, Iwamoto S, Yamauchi R (2018) Optimization of betalain extraction from *Salicornia fruticosa* and its encapsulation. *Journal of agroalimentary processes and technologies*, 24: 1-8
- Molina G, Hernández-Martínez A, Cortez-Valadez M, García-Hernández F, Estevez M (2014) Effects of tetraethyl orthosilicate (TEOS) on the light and temperature stability of a pigment from *Beta vulgaris* and its potential food industry applications. *Molecules*, 19: 17985-18002
- Moussa-Ayoub, T. E., El-Samahy, S. K., Rohn, S., & Kroh, L. W. (2011). Flavonols, betacyanins content and antioxidant activity of cactus *Opuntia macrorhiza* fruits. *Food Research International*, 44(7), 2169-2174.
- Morais, A. Í., Vieira, E. G., Afewerki, S., Sousa, R. B., Honorio, L., Cambrussi, A. N., ... & Webster, T. J. (2020). Fabrication of Polymeric Microparticles by Electrospray: The Impact of Experimental Parameters. *Journal of Functional Biomaterials*, 11(1), 4.

- Moser, P., Telis, V. R. N., de Andrade Neves, N., García-Romero, E., Gómez-Alonso, S., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2017). Storage stability of phenolic compounds in powdered BRS Violeta grape juice microencapsulated with protein and maltodextrin blends. *Food Chemistry*, *214*, 308-318.
- Muñiz-Márquez, D. B., Martínez-Ávila, G. C., Wong-Paz, J. E., Belmares-Cerda, R., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2013). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics sonochemistry*, *20*(5), 1149-1154.
- Murariu, M., & Dubois, P. (2016). PLA composites: From production to properties. *Advanced drug delivery reviews*, *107*, 17-46.
- Nakashima, K. K., & Bastos, E. L. (2019). Rationale on the high radical scavenging capacity of betalains. *Antioxidants*, *8*(7), 222.
- Nedovic V, Kalusevic A, Manojlovic V, Levic S, Bugarski B (2011) An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* 1:1806-1815
- Neethirajan, S., Jayas, D. S., & Sadistap, S. (2009). Carbon dioxide (CO₂) sensors for the agri-food industry: A review. *Food and Bioprocess Technology*, *2*, 115e121
- Nina, N., Quispe, C., Jiménez-Aspee, F., Theoduloz, C., Feresín, G. E., Lima, B., & Schmeda-Hirschmann, G. (2015). Antibacterial activity, antioxidant effect and chemical composition of propolis from the Región del Maule, central Chile. *Molecules*, *20*(10), 18144-18167.
- Obón JM, Castellar MR, Alacid M, Fernández-López JA (2009) Production of a red–purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of Food Engineering* 90:471-479
- Ochoa-Velasco, C. E., & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2014). Postharvest quality of peeled prickly pear fruit treated with acetic acid and chitosan. *Postharvest biology and technology*, *92*, 139-145.
- Ojha, H., Mishra, K., Hassan, M. I., & Chaudhury, N. K. (2012). Spectroscopic and isothermal titration calorimetry studies of binding interaction of ferulic acid with bovine serum albumin. *Thermochimica acta*, *548*, 56-64.
- Oliveira, R. N., Mancini, M. C., Oliveira, F. C. S. D., Passos, T. M., Quilty, B., Thiré, R. M. D. S. M., & McGuinness, G. B. (2016). FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. *Matéria (Rio de Janeiro)*, *21*(3), 767-779.

- Otoni, C. G., Espitia, P. J. P., Avena-Bustillos, R. J., & McHugh, T. H. (2016). Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. *Food Research International*, 83, 60e73.
- Orozco VJ, Escobar RA, Buendía GL, García MC, Hernandez JC, Alvarez RJ (2019) Evaluation of the protection and release rate of bougainvillea (*Bougainvillea spectabilis*) extracts encapsulated in alginate beads. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 40: 1065-1074
- 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.
- Otálora MC, Carriazo JG, Iturriaga L, Osorio C, Nazareno MA (2016) Encapsulating betalains from *Opuntia ficus-indica* fruits by ionic gelation: Pigment chemical stability during storage of beads. *Food chemistry* 202:373-382
- Otálora MC, Carriazo JG, Osorio C, Nazareno MA (2018) Encapsulation of cactus (*Opuntia megacantha*) betaxanthins by ionic gelation and spray drying: A comparative study. *Food research international*, 111: 423-430
- Otálora MC, de Jesús Barbosa H, Perilla JE, Osorio C, Nazareno MA (2019) Encapsulated betalains (*Opuntia ficus-indica*) as natural colorants. Case study: Gummy candies. *LWT*, 103: 222-227.
- Ozidal, T., Capanoglu, E., & Altay, F. (2013). A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51(2), 954-970.
- Ozdemir, M., & Floros, J. D. (2004). Active food packaging technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(3), 185–193.
- Ozkoc, G., & Kemaloglu, S. (2009). Morphology, biodegradability, mechanical, and thermal properties of nanocomposite films based on PLA and plasticized PLA. *Journal of Applied Polymer Science*, 114(4), 2481-2487.
- Pagano APE, Khalid N, Kobayashi I, Nakajima M, Neves MA, Bastos EL (2018) Microencapsulation of betanin in monodisperse W/O/W emulsions. *Food research international*, 109: 489-496
- Pacheco, J. G., Castro, M., Machado, S., Barroso, M. F., Nouws, H. P. A., & Delerue-Matos, C. (2015). Molecularly imprinted electrochemical sensor for ochratoxin a detection in food samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 215, 107e112.

- Pap, N., Mahosenaho, M., Pongrácz, E., Mikkonen, H., Jaakkola, M., Virtanen, V., ... & Keiski, R. L. (2012). Effect of ultrafiltration on anthocyanin and flavonol content of black currant juice (*Ribes nigrum* L.). *Food and bioprocess technology*, 5(3), 921-928.
- Pacquit, A., Frisby, J., Diamond, D., Lau, K. T., Farrell, A., Quilty, B., & Diamond, D. (2007). Development of a smart packaging for the monitoring of fish spoilage. *Food Chemistry*, 102(2), 466–470.
- Patel, P. D., & Beveridge, C. (2003). In-line sensors for food process monitoring and control. In E. Tothill (Ed.), *Rapid and on-line instrumentation for food quality assurance* (p. 215). Cambridge: CRC Woodhead Publishing Limited.
- Perego, G., Cella, G. D., & Bastioli, C. (1996). Effect of molecular weight and crystallinity on poly (lactic acid) mechanical properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 59(1), 37-43.
- Pérez-Loredo, M. G., García-Ochoa, F., & Barragán-Huerta, B. E. (2016). Comparative analysis of betalain content in *Stenocereus stellatus* fruits and other cactus fruits using principal component analysis. *International journal of food properties*, 19(2), 326-338.
- Pérez-Ramírez, E., Lima, E., & Guzmán, A. (2015). Natural betalains supported on γ -alumina: A wide family of stable pigments. *Dyes and Pigments*, 120, 161-168.
- Persson, A. (2018). Identification of Alternative Solvents to DCM for Dissolving PLA.
- Piattelli M, Minale L, Prota G (1964) Isolation, structure and absolute configuration of indicaxanthin. *Tetrahedron* 20:2325-2329.
- Pillin, I., Montrelay, N., & Grohens, Y. (2006). Thermo-mechanical characterization of plasticized PLA: Is the miscibility the only significant factor?. *Polymer*, 47(13), 4676-4682.
- Pimienta-Barrios, E., & Nobel, P. S. (1994). Pitaya (*Stenocereus* spp., Cactaceae): an ancient and modern fruit crop of Mexico. *Economic Botany*, 48(1), 76-83.
- Pitalua E, Jimenez M, Vernon-Carter EJ, Beristain CI (2010) Antioxidative activity of microcapsules with beetroot juice using gum Arabic as wall material. *Food and Bioproducts Processing* 88:253-258

- Pitkanen L, Sontag T, Kanerva P. 2013. Enhanced separation and characterization of gluten polymers by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled with multiple detectors. *Journal of Cereal Science* 59, 126-131.
- Pospiskova, K., Safarik, I., Sebela, M., & Kuncova, G. (2012). Magnetic particles-based biosensor for biogenic amines using an optical oxygen sensor as a transducer. *Microchimica Acta An International Journal on Analytical Micro- and Nanochemistry*, 311–318.
- Puligundla, P., Jung, J., & Ko, S. (2012). Carbon dioxide sensors for intelligent food packaging applications. *Food Control*, 25(1), 328-333.
- Plackett, D. V., Holm, V. K., Johansen, P., Ndoni, S., Nielsen, P. V., Sipilainen-Malm, T., ... & Verstichel, S. (2006). Characterization of l-poly lactide and l-poly lactide–polycaprolactone co-polymer films for use in cheese-packaging applications. *Packaging Technology and Science: An International Journal*, 19(1), 1-24.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 4290-4302.
- Radusin, T., Tomšik, A., Šarić, L., Ristić, I., Giacinti Baschetti, M., Minelli, M., & Novaković, A. (2019). Hybrid Pla/wild garlic antimicrobial composite films for food packaging application. *Polymer Composites*, 40(3), 893-900.
- Rasal, R. M., Janorkar, A. V., & Hirt, D. E. (2010). Poly (lactic acid) modifications. *Progress in polymer science*, 35(3), 338-356.
- Ravichandran K, Palaniraj R, Saw NMMT, Gabr AM, Ahmed, AR, Knorr D, Smetanska I (2014) Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extract. *Journal of food science and technology* 51:2216-2221
- Realini, C. E., & Marcos, B. (2014). Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat science*, 98(3), 404-419.
- Reshmi, S. K., Aravindhan, K. M., & Suganyadavi, P. (2012). The effect of light, temperature, pH on stability of betacyanin pigments in basella alba fruit. *Asian J. Pharm. Clin. Res*, 4(3), 107-110.
- Robert, P., Torres, V., García, P., Vergara, C., & Sáenz, C. (2015). The encapsulation of purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) pulp by using polysaccharide-proteins as encapsulating agents. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 1039-1045.

- Rodríguez-Sánchez, J. A., y Victoria, M. T. C., & Barragán-Huerta, B. E. (2017). Betaxanthins and antioxidant capacity in *Stenocereus pruinosus*: Stability and use in food. *Food Research International*, *91*, 63-71.
- Rodríguez, A. J. (1987). Manual de prácticas de bioquímica. 4 Ed. Facultad de ciencias biológicas, universidad autónoma de Nuevo León. Monterrey.
- Rodríguez-Martínez, A. V., Sendón, R., Abad, M. J., González-Rodríguez, M. V., Barros-Velázquez, J., Aubourg, S. P., & de Quiros, A. R. B. (2016). Migration kinetics of sorbic acid from polylactic acid and seaweed based films into food simulants. *LWT-Food Science and Technology*, *65*, 630-636.
- Roriz CL, Barros L, Prieto MA, Barreiro MF, Morales P, Ferreira IC (2017) Modern extraction techniques optimized to extract betacyanins from *Gomphrena globosa* L. *Industrial crops and products*, *105*: 29-40
- Ruiz GM, Amaya GC, Quintero RA, Pérez CE, Ruiz AT, Báez GJ, Meléndez PC (2015) Effect of extrusion cooking on bioactive compounds in encapsulated red cactus pear powder. *Molecules*, *20*: 8875-8892
- Saani, M., & Lawrence, R. (2016). evaluation of pigments as antioxidant and antibacterial agents from *beta vulgaris* linn. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, *8*(3).
- Saénz, C., Tapia, S., Chávez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, *114*(2), 616-622.
- Sant'Anna, V., Gurak, P. D., Marczak, L. D. F., & Tessaro, I. C. (2013). Tracking bioactive compounds with colour changes in foods—A review. *Dyes and Pigments*, *98*(3), 601-608.
- Seligra, P. G., Jaramillo, C. M., Famá, L., & Goyanes, S. (2016). Biodegradable and non-retrogradable eco-films based on starch–glycerol with citric acid as crosslinking agent. *Carbohydrate polymers*, *138*, 66-74.
- Serra AT, Poejo J, Matias AA, Bronze MR, Duarte CM (2013) Evaluation of *Opuntia spp.* derived products as antiproliferative agents in human colon cancer cell line (HT29). *Food research international* *54*:892-901
- Serris GS, Biliaderis CG (2001) Degradation kinetics of beetroot pigment encapsulated in polymeric matrices. *Journal of the Science of Food and Agriculture* *81*:691-700

- Silvestre, C., Duraccio, D., & Cimmino, S. (2011). Food packaging based on polymer nanomaterials. *Progress in polymer science*, 36(12), 1766-1782.
- Sikorski, Z.; Kolakoski, E. in: Seafood enzymes, N. Haard, B. Simpson (eds), Marcel Dekker, New York, USA, 2000, p. 451.
- Singh, A.; Munshi, S.; Raghavan, V. (2013). Effect of external electric field stress on gliadin protein conformation. *Proteomes*. 1, 25-39.
- Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., & Dalla Rosa, M. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19(12), 634-643.
- Souza, B. W., Cerqueira, M. A., Ruiz, H. A., Martins, J. T., Casariego, A., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). Effect of chitosan-based coatings on the shelf life of salmon (*Salmo salar*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(21), 11456-11462.
- Soquetta MB, Terra LDM, Bastos CP (2018) Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. *CyTA-Journal of Food*, 16: 400-412
- Sung, S. Y., Sin, L. T., Tee, T. T., Bee, S. T., Rahmat, A. R., Rahman, W. A. W. A., et al. (2013). Antimicrobial agents for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 33(2), 110e123.
- Shaaruddin S, Ghazali HM, Mirhosseini SH, Muhammad K (2017) Stability of betanin in pitaya powder and confection as affected by resistant maltodextrin. *LWT*, 84: 129-134.
- Smolander, M. (2008). Freshness indicators for food packaging. In J. F. Kerry, & F. Butler (Eds.), *Smart packaging technologies for fast moving consumer goods* (pp. 111–128). West Sussex, England: John Wiley and Sons Ltd.
- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in food science & technology*, 15(1), 19-38.
- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2007). Betalains—emerging prospects for food scientists. *Trends in Food Science & Technology*, 18(10), 514-525.
- Stintzing FC, Schieber A, Carle R (2000) Cactus pear—a promising component to functional food. *Obst-, Gemuese-und Kartoffelverarbeitung* (Germany).

- Strack D, Vogt T, Schliemann W (2003) Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* 62:247-269.
- Swamy, G. J., Sangamithra, A., & Chandrasekar, V. (2014). Response surface modeling and process optimization of aqueous extraction of natural pigments from Beta vulgaris using Box–Behnken design of experiments. *Dyes and Pigments*, 111, 64-74.
- Tenore, G. C., Calabrese, G., Stiuso, P., Ritieni, A., Giannetti, D., & Novellino, E. (2014). Effects of Annurca apple polyphenols on lipid metabolism in HepG2 cell lines: A source of nutraceuticals potentially indicated for the metabolic syndrome. *Food research international*, 63, 252-257.
- Tenore, G. C., Novellino, E., & Basile, A. (2012). Nutraceutical potential and antioxidant benefits of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) extracts. *Journal of functional foods*, 4(1), 129-136.
- Timestrip (2012). Timestrip® cold chain products for food. http://www.timestrip.com/coldchain_food.php (Last accessed: 15/03/2014)
- Tipachan, C., & Kajorncheappunngam, S. (2017). Biodegradable Poly (Lactic Acid)/Perkalite Clay Nanocomposites: Gas Barrier Properties. In *Key Engineering Materials* (Vol. 718, pp. 10-14). Trans Tech Publications.
- Tiwari BK, Cullen PJ (2013) Extraction of red beet pigments. In *Red Beet Biotechnology* (pp. 373-391). Springer, Boston, MA
- Tornuk, F., Hancer, M., Sagdic, O., & Yetim, H. (2015). LLDPE based food packaging incorporated with nanoclays grafted with bioactive compounds to extend shelf life of some meat products. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 540-546.
- Tumbas Šaponjac V, Čanadanović-Brunet J, Ćetković G, Jakišić M, Djilas S, Vulić J, Stajčić S (2016) Encapsulation of beetroot pomace extract: RSM optimization, storage and gastrointestinal stability. *Molecules*, 21: 584
- Turalija, M., Bischof, S., Budimir, A., & Gaan, S. (2016). Antimicrobial PLA films from environment friendly additives. *Composites Part B: Engineering*, 102, 94-99.
- Thirugnanasambandham, K., & Sivakumar, V. (2017). Microwave assisted extraction process of betalain from dragon fruit and its antioxidant activities. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(1), 41-48.
- Trouillas P, Sancho-Garcia JC, De Freitas V, Gierschner J, Otyepka M, Dangles O (2016) Stabilizing and modulating color by copigmentation: Insights from theory and experiment. *Chemical reviews*, 116: 4937-4982

- Urayama, H., Moon, S. I., & Kimura, Y. (2003). Microstructure and thermal properties of polylactides with different L-and D-unit sequences: importance of the Helical nature of the L-sequenced segments. *Macromolecular Materials and Engineering*, 288(2), 137-143.
- Van Aardt, M., Duncan, S. E., Marcy, J. E., Long, T. E., O'Keefe, S. F., & Sims, S. R. (2007). Release of antioxidants from poly (lactide-co-glycolide) films into dry milk products and food simulating liquids. *International journal of food science & technology*, 42(11), 1327-1337.
- Vargas CL, Valle GS, Martínez BF, Salinas MY, Lobato CC, Calvo LAD (2018) Encapsulation and pigmenting potential of betalains of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruit. *Journal of food science and technology*, 55: 2436-2445
- Vergara, C., Saavedra, J., Sáenz, C., García, P., & Robert, P. (2014). Microencapsulation of pulp and ultrafiltered cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) extracts and betanin stability during storage. *Food chemistry*, 157, 246-251.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., van Beest, M., de Kruijf, N., & Debevere, J. (1999). Developments in the active packaging of foods. *Trends in food science & technology*, 10(3), 77-86.
- Vinceković M, Viskiđ M, Jurić S, Giacometti J, Kovačević DB, Putnik P, Donsi F, Barba FJ, Jambrak AR (2017) Innovative technologies for encapsulation of Mediterranean plants extracts. *Trends in food science & technology*, 69: 1-12
- Vink, E. T., & Davies, S. (2015). Life cycle inventory and impact assessment data for 2014 Ingeo™ polylactide production. *Industrial Biotechnology*, 11(3), 167-180.
- Vos, P.; Faas, M.; Spasojevic, M.; Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*. 20, 292-302.
- Vulić, J. J., Čebović, T. N., Čanadanović, V. M., Četković, G. S., Djilas, S. M., Čanadanović-Brunet, J. M., ... & Tumbas, V. T. (2013). Antiradical, antimicrobial and cytotoxic activities of commercial beetroot pomace. *Food & function*, 4(5), 713-721.
- Wang, J. (2006). Analytical electrochemistry. New York: John Wiley & Sons Ltd (Chapter 6).
- Wieser H. 2007. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology* 24: 115-119.

- Wen, P., Zhu, D. H., Feng, K., Liu, F. J., Lou, W. Y., Li, N., ... & Wu, H. (2016). Fabrication of electrospun polylactic acid nanofilm incorporating cinnamon essential oil/ β -cyclodextrin inclusion complex for antimicrobial packaging. *Food chemistry*, *196*, 996-1004.
- Woerdeman, D.L.; Ye, P.; Shenoy, S.; Parnas, R. S.; Wnek, G. E.; Trofimova, O. (2005). Electrospun fibers from wheat protein: Investigation of the interplay between molecular structure and fluid dynamics of the electrospinning process. *Biomacromolecules*, *6*, 707-712.
- Xie, J., Jiang, J., Davoodi, P., Srinivasan, M. P., & Wang, C. H. (2015). Electrohydrodynamic atomization: A two-decade effort to produce and process micro-/nanoparticulate materials. *Chemical engineering science*, *125*, 32-57.
- Xu, H., Cai, S., Sellers, A., & Yang, Y. (2014). Electrospun ultrafine fibrous wheat glutenin scaffolds with three-dimensionally random organization and water stability for soft tissue engineering. *Journal of biotechnology*, *184*, 179-186.
- Yam, K. L., Takhistov, P. T., & Miltz, J. (2005). Intelligent packaging: concepts and applications. *Journal of Food Science*, *70*, R1eR10.
- Yang, S. B., Rabbani, M. M., Ji, B. C., Han, D. W., Lee, J. S., Kim, J. W., & Yeum, J. H. (2016). Optimum conditions for the fabrication of zein/Ag composite nanoparticles from ethanol/H₂O co-solvents using electrospinning. *Nanomaterials*, *6*(12), 230.
- Yang, H. J., Lee, J. H., Won, M., & Song, K. B. (2016). Antioxidant activities of distiller dried grains with solubles as protein films containing tea extracts and their application in the packaging of pork meat. *Food chemistry*, *196*, 174-179.
- Yáñez-López, L., Domínguez, J., Fajardo, M. C., Malpica, F., Soriano, J., Pelayo, C., ... & Díaz-de-Leon, F. (2005). Quality attributes of different types of cactus pitaya fruits (*Stenocereus griseus*). *Acta horticulturae*.
- Yen, G. C., Duh, P. D., & Tsai, H. L. (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food chemistry*, *79*(3), 307-313.
- Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2004). Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(2), 255-260.
- Yilmaz, E., & Bagci, P. O. (2018). Production of phytotherapeutics from broccoli juice by integrated membrane processes. *Food chemistry*, *242*, 264-271.

- Yin, H., Zhang, Q., Zhou, Y., Ma, Q., Zhu, L., & Ai, S. (2011). Electrochemical behavior of catechol, resorcinol and hydroquinone at graphene–chitosan composite film modified glassy carbon electrode and their simultaneous determination in water samples. *Electrochimica Acta*, 56(6), 2748-2753.
- Yong, Y. Y., Dykes, G., Lee, S. M., & Choo, W. S. (2018). Effect of refrigerated storage on betacyanin composition, antibacterial activity of red pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) and cytotoxicity evaluation of betacyanin rich extract on normal human cell lines. *LWT*, 91, 491-497.
- Yong, Y. Y., Dykes, G., Lee, S. M., & Choo, W. S. (2017). Comparative study of betacyanin profile and antimicrobial activity of red pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) and red spinach (*Amaranthus dubius*). *Plant foods for human nutrition*, 72(1), 41-47.
- Yoshida, C. M., Maciel, V. B. V., Mendonça, M. E. D., & Franco, T. T. (2014). Chitosan biobased and intelligent films: Monitoring pH variations. *LWT-Food Science and technology*, 55(1), 83-89.
- Yuniarto, K., Welt, B. A., Purwanto, A., Purwadaria, H. K., Abdellatief, A., Sunarti, T. C., & Purwanto, S. (2014). Effect of plasticizer on oxygen permeability of cast polylactic acid (PLA) films determined using dynamic accumulation method. *Journal of Applied Packaging Research*, 6(2), 5.
- Zaeim, D., Sarabi-Jamab, M., Ghorani, B., Kadkhodae, R., & Tromp, R. H. (2018). Electrospray-assisted drying of live probiotics in acacia gum microparticles matrix. *Carbohydrate polymers*, 183, 183-191.
- Zafra-Rojas, Q. Y., Cruz-Cansino, N., Ramírez-Moreno, E., Delgado-Olivares, L., Villanueva-Sánchez, J., & Alanís-García, E. (2013). Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(5), 1283-1288.
- Zamani, M., Prabhakaran, M. P., San Thian, E., & Ramakrishna, S. (2014). Protein encapsulated core–shell structured particles prepared by coaxial electrospraying: investigation on material and processing variables. *International journal of pharmaceutics*, 473(1-2), 134-143.
- Zhang, X., Do, M. D., Dean, K., Hoobin, P., & Burgar, I. M. (2007). Wheat-gluten-based natural polymer nanoparticle composites. *Biomacromolecules*, 8(2), 345-353.

- Zarchi, A. A. K., Abbasi, S., Faramarzi, M. A., Gilani, K., Ghazi-Khansari, M., & Amani, A. (2015). Development and optimization of N-Acetylcysteine-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles by electrospray. *International journal of biological macromolecules*, 72, 764-770.
- Zou DM, Brewer M, Garcia F, Feugang JM, Wang J, Zang, Zou C (2005) Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutrition journal* 4:25
- Zhu, J. Y., Tang, C. H., Yin, S. W., & Yang, X. Q. (2018). Development and characterization of novel antimicrobial bilayer films based on Polylactic acid (PLA)/Pickering emulsions. *Carbohydrate polymers*, 181, 727-735.

ANEXOS 1

Artículos

J Food Sci Technol
https://doi.org/10.1007/s13197-019-04120-x



REVIEW ARTICLE

Stabilization of betalains by encapsulation—a review

D. D. Castro-Enríquez¹ · B. Montaña-Leyva¹ · C. L. Del Toro-Sánchez¹ ·
J. E. Juaréz-Onofre² · E. Carvajal-Millan³ · S. E. Burruel-Ibarra⁴ ·
J. A. Tapia-Hernández¹ · C. G. Barreras-Urbina¹ · F. Rodríguez-Félix¹

Revised: 18 September 2019 / Accepted: 27 September 2019
© Association of Food Scientists & Technologists (India) 2019

Abstract Betalains are pigments that have properties that benefit health, such as antioxidant, anticancer, and antimicrobial activity, and they also possess a high ability to provide color. However, these pigments, although used as colorants in certain foods, have not been able to be potentialized to diverse areas such as pharmacology, due to their instability to physicochemical factors such as high temperature, pH changes and high water activity. For this reason, different stabilization methods have been reported. The method that has presented best results for diversifying the use of betalains has been encapsulation. Encapsulation is a method of entrapment where the objective is to protect a compound utilizing more stable matrices from encapsulation technologies. This method has been employed to provide greater stability to betalains, using different matrices and encapsulation technologies. However, a review does not exist, to our knowledge, which analyzes the effect of matrices and encapsulation technologies on betalains stabilization. Therefore, the objective of this review article was to evaluate the different matrices and encapsulation techniques that have been employed to

stabilize betalains, in order to arrive at specific conclusions concerning the effect of encapsulation on their stabilization and to propose new techniques and matrices that could promote their stabilization.

Keywords Betalains · Encapsulation · Matrix · Stabilization · Effects






Introduction

Betalains are pigments found in fruits, flowers, roots, and leaves of plants (Gengatharan et al. 2015). They are synthesized from the amino acid tyrosine into two structural groups, betacyanins, and betaxanthins, it being the nature of the additional residue that determines the classification of the pigment (Gandía-Herrero and García-Carmona 2013). Betalains have interesting properties, such as high water solubility and color intensity, and they possess antioxidant and anticancer effects (Stintzing and Carle 2007).

However, one of the main problems that limit the application of betalains is their instability (Castellar et al.

Article

Effect of Ultrafiltration of Pitaya Extract (*Stenocereus thurberi*) on Its Phytochemical Content, Antioxidant Capacity, and UPLC-DAD-MS Profile

Daniela D. Castro-Enriquez ¹, Beatriz Montaña-Leyva ¹, Carmen L. Del Toro-Sánchez ¹, Josué E. Juárez-Onofre ², Elizabeth Carvajal-Millán ³, Guadalupe A. López-Ahumada ¹, Carlos G. Barreras-Urbina ¹, José A. Tapia-Hernández ¹ and Francisco Rodríguez-Félix ^{1,*}

- ¹ Department of Food Research and Graduate Program, University of Sonora, Hermosillo 83000, Sonora C.P., Mexico; daniela.castro.e@hotmail.com (D.D.C.-E.); beatriz.montano@unison.mx (B.M.-L.); carmen.deltoro@unison.mx.onmicrosoft.com (C.L.D.T.-S.); amanda.lopez@unison.mx (G.A.L.-A.); carlosgbarrerasu@gmail.com (C.G.B.-U.); tapia_hernandez_agustin@hotmail.com (J.A.T.-H.)
 - ² Department of Physical, University of Sonora, Hermosillo 83000, Sonora C.P., Mexico; josue.juarez@unison.mx
 - ³ Research Center for Food and Development, A.C. Biopolymers-CFAOA, Hermosillo 83304, Sonora C.P., Mexico; ecarvajal@ciad.mx
- * Correspondence: rodriguez_felix_fco@hotmail.com

Received: 2 December 2019; Accepted: 23 December 2019; Published: 9 January 2020



Abstract: *Stenocereus thurberi* is an endemic species in northwestern Mexico. It produces colorful fruits called pitayas that have an edible pulp. They have phytochemical compounds associated with biological activities. Ultrafiltration is a widely used method for the clarification of fruit juices and the recovery of phytochemicals. However, its effect has not been extensively studied in extracts. Therefore, the objective of this work is to study the effect of the ultrafiltration of pitaya extract (*Stenocereus thurberi*) on its phytochemical content, antioxidant capacity, and identification of phenolic compounds by UPLC-DAD-MS, providing greater knowledge about the pitaya. In this study, two extracts were analyzed, the unclarified extract (UE) and the clarified extract (CE). The antioxidant capacity was higher in the CE with 15.93 ± 0.42 mM TE/g, DPPH and 18.37 ± 0.016 mM TE/g, ABTS. The UPLC-MS analysis indicated the decrease in phenolic compounds in the CE and the presence of gallic acid and resorcinol, compounds that had not been identified in other species of *Stenocereus* spp. The correlation analysis indicated that all the phytochemicals present in the pitaya contribute significantly to the antioxidant capacity. The ultrafiltration process could be a viable option to improve the biological activity of the natural extracts.

4 **Quality increase of refrigerated fish by employment of a**
5 **gelatine biofilm including a protein hydrolysate obtained**
6 **from alga *Fucus spiralis***

7
8
9
10
11 Daniela D. Castro-Enríquez¹, José M. Miranda², Jorge Barros-Velázquez²
12 and Santiago P. Aubourg^{3,*}

13
14
15
16 ¹ Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, University of Sonora,
17 Hermosillo (Sonora, Mexico)

18 ² Departamento de Química Analítica, Nutrición y Ciencia de los Alimentos, Facultad
19 de Ciencias Veterinarias, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo (Spain).

20 ³ Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Instituto de Investigaciones
21 Marinas (CSIC), Vigo (Spain)

22 * Corresponding author: e-mail: saubourg@iim.csic.es

Dear Prof. Aubourg,

I have the pleasure to inform you that the manuscript entitled: **Quality increase of refrigerated fish by employment of a gelatine biofilm including a protein hydrolysate obtained from alga Fucus spiralis**

By: **Daniela D. Castro-Enríquez, José M. Miranda, Jorge Barros-Velázquez, Santiago P. Aubourg**

has been recommended by the referees and is accepted for publication in the journal "Bulgarian Chemical Communications", Special Issue D, vol. 52, 2020.

I will transfer the further correspondence with you to the Editorial office.

With best regards:

Guest editor:

Prof. Petko Denev, PhD

Artículo escrito para mandarlo a la revista: Food Analytical Methods de la editorial Springer

1 **Optimization of the betalains extraction process of pitaya pulp (*Stenocereus***
2 ***thurberi*) using response surface methodology and its antioxidant capacity**

3 D.D. Castro-Enriquez^a, B. Montaña-Leyva^a, C.L. Del Toro-Sánchez^a, J.E. Juárez-Onofre^b, E.
4 Carvajal-Millán^c, J.L. Cárdenas-López^a, D. Canseco-González^d, C.G. Barreras-Urbina^a, J.A.
5 Tapia-Hernández^a, F. Rodríguez-Félix^{a,*}

6

7 ^aDepartamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora, Encinas y Rosales s/n.
8 C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México.

9 ^bDepartamento de Física. Universidad de Sonora, Encinas y Rosales s/n. C.P. 83000, Hermosillo, Sonora,
10 México.

11 ^cCentro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, A.C. Biopolímeros-CTAOA. Carretera a la Victoria
12 Km. 0.6. C.P. 83304, Hermosillo, Sonora, México.

13 ^dCONACYT-Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal, Universidad
14 Autónoma Chapingo. C.P. 56230, Texcoco de Mora, México.

15

16 *Corresponding author: rodriguez_felix_fco@hotmail.com; Tel.: +52-662-259-2207

Estancias académicas

- 17-28/04/17 Estancia de investigación en el Instituto tecnológico de Sonora (ITSON), en el Centro de Investigación e Innovación en Biotecnología, Agropecuaria y Ambiental (CIIBA), en el laboratorio de tecnologías emergentes en Cd. Obregón, Sonora, México con el Dr. Saúl Ruíz Cruz. El objetivo fue identificar y cuantificar compuestos bioactivos de la pulpa de pitaya por la técnica de UPLC-DAD-MS.
- 20/05-12/07/19 Estancia de investigación en el Instituto de Investigaciones Marinas, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), en el laboratorio de química de productos marinos en Vigo, España con el Dr. Santiago Aubourg. El objetivo fue la aplicación de películas con compuestos bioactivos en filetes de pescado.

Reconocimientos recibidos

Obtención del 2do lugar en el concurso de trabajo de investigación en modalidad cartel a nivel posgrado en la categoría Funcionalidad y Nutrición titulado: Efecto de la ultrafiltración sobre el contenido fitoquímico y capacidad antioxidante del extracto de pitaya (*Stenocereus thurberi*). En el XI congreso internacional sobre inocuidad, calidad y funcionalidad de los alimentos en la industria y servicios de alimentación. Llevado a cabo del 1 al 5 de octubre de 2018 en Aguascalientes, Aguascalientes, México.

Participación en congresos

- 13-14/05/19 **Participación en el congreso internacional de Nanomaterials and Technology.** Con presentación de cartel titulado: Ultrafiltration effect on the phytochemical content and

antioxidant capacity of the pitaya (*Stenocereus thurberi*) extract and its encapsulation by electrospray technique. Llevado a cabo en Valencia, España.

- 28-30/11/18 **Participación en la XXIII reunión universitaria de investigación en materiales.** Con presentación de cartel titulado: Efecto de la ultrafiltración sobre el contenido fitoquímico y capacidad antioxidante del extracto de pitaya (*Stenocereus thurberi*). Llevado a cabo en Hermosillo, Sonora, México.
- 1-5/10/18 **Participación en XI congreso internacional sobre inocuidad, calidad y funcionalidad de los alimentos en la industria y servicios de alimentación.** Con presentación de cartel titulado: Efecto de la ultrafiltración sobre el contenido fitoquímico y capacidad antioxidante del extracto de pitaya (*Stenocereus thurberi*). Llevado a cabo en Aguascalientes, Aguascalientes, México.

ANEXOS 2

Gráfico de la deconvolución de la banda amida I de las proteínas (FSG)

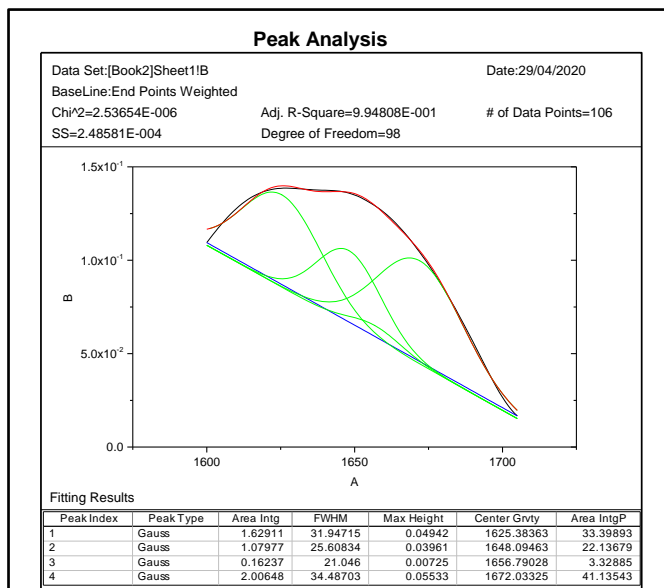


Gráfico de la deconvolución de la banda amida I de las partículas sin betalainas (P-FSG)

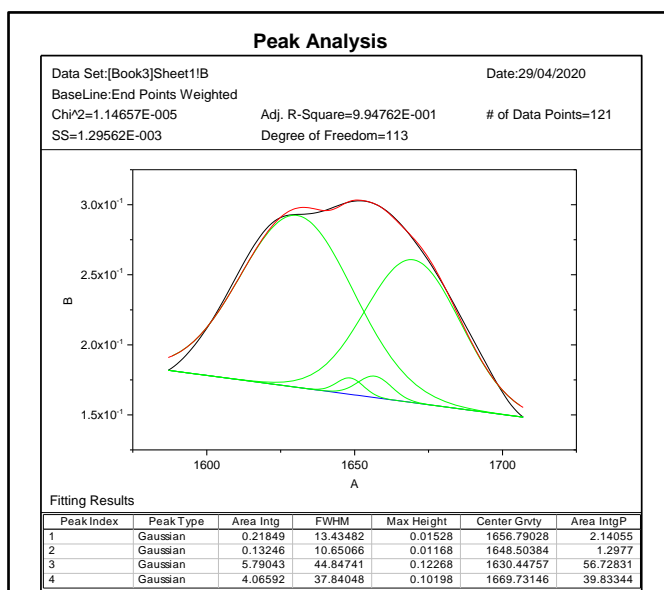


Gráfico de la deconvolución de la banda amida I de las partículas con betalainas (P-NC-B)

