



**Casa abierta al tiempo**

**Universidad Autónoma Metropolitana**

**Unidad Iztapalapa**

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

Caracterización de frutos del género *Opuntia*, extracción y  
coacervación compleja de sus betalaínas

Tesis para la obtención del grado de Doctor en Biotecnología

Presenta

**Alumno**

Juan Pablo Carreón Hidalgo

**Directora**

Dra. Laura J. Pérez Flores

Departamento de Ciencias de la Salud DCBS UAMI

**Asesores**

Dra. Angélica Román Guerrero

Departamento de Biotecnología DCBS UAMI

Dr. Arturo Navarro Ocaña

Departamento Alimentos y Biotecnología Fac. Química UNAM

15 de diciembre de 2022

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, con la referencia 001466, y cuenta con apoyo del mismo Consejo”

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis  
**Caracterización de frutos del género *Opuntia*, extracción y coacervación compleja  
de sus betalaínas**

que presentó

Juan Pablo Carreón Hidalgo

**Comité tutorial:**

Directora: Dra. Laura J. Pérez Flores

Asesora: Dra. Angélica Román Guerrero

Asesor: Dr. Arturo Navarro Ocaña

**Jurado:**

Presidente: Dr. José Ramón Verde Calvo \_\_\_\_\_

Secretaria: Dra. Angélica Román Guerrero \_\_\_\_\_

Vocal: Dra. Helia Reyna Osuna Fernández \_\_\_\_\_

Vocal: María de los Ángeles Fortis Barrera \_\_\_\_\_

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca con el número de asignación 68991.

A la Dra. Laura J. Pérez Flores por haberme aceptado en su grupo de investigación, por su dirección durante todo mi doctorado y por todas sus enseñanzas.

A mi asesora la Dra. Angélica Román Guerrero por todas sus contribuciones a este trabajo.

A mi asesor el Dr. Arturo Navarro Ocaña por sus observaciones.

A cada uno de mis compañeros del grupo de investigación de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

A mi familia, en especial a mis papás y hermano. Ustedes son mi apoyo en infinidad de sentidos.

A la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa y a cada una de las personas que hacen posible el funcionamiento de esta institución. Sin mi universidad no sería quien soy ahora. ¡Muchas gracias por todo y hasta pronto!

## Resumen

Las betalaínas son pigmentos hidrosolubles encontrados en distintas especies vegetales y pueden utilizarse para impartir color a alimentos. Añadir estos compuestos como colorante también puede ofrecer un valor agregado ya que se sabe que las betalaínas tienen varias propiedades funcionales que pueden ser benéficas para la salud del consumidor. La principal fuente de estos pigmentos es el betabel (*Beta vulgaris*), sin embargo, es necesario caracterizar otras especies vegetales que puedan ofrecer ventajas desde un punto de vista agronómico y composicional. Para producir aditivos alimentarios a partir de especies vegetales es necesario desarrollar procesos que permitan obtener los máximos rendimientos de extracción de los compuestos de interés, que contribuyan o mantengan o mejorar su estabilidad y que sean amigables con el ambiente.

En el presente estudio se llevó a cabo la caracterización de cuatro variedades de frutos del género *Opuntia*: *Vigor*, *Pirámides*, *Pelota* y *Mandarina*. La caracterización se llevó a cabo mediante la medición de distintos parámetros químicos, color, cantidad de betalaínas, capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales en los extractos acuosos de la pulpa, los cuales se compararon con los obtenidos en betabel, tomando en cuenta que es la fuente de betalaínas más utilizada y estudiada. Los resultados obtenidos en las variedades de tuna estuvieron dentro de los rangos reportados para otras variedades provenientes de otras regiones. Para llevar a cabo las siguientes etapas del estudio se seleccionaron dos variedades de tuna, *Vigor* de color púrpura, por su alto contenido de pigmentos y *Mandarina* por su coloración atractiva amarillo-naranja y por su menor disponibilidad en la naturaleza.

En la segunda etapa de este estudio se estableció el método de extracción de compuestos funcionales provenientes de las pulpas de tuna *Vigor* y *Mandarina*. Una triple extracción acuosa en relación 1:2 (g/mL) utilizando pulpa fresca de tuna se estableció como el mejor método de extracción de betalaínas y otros compuestos funcionales en comparación con otros de los tipos de extracción evaluados, tales como el porcentaje de etanol en agua como solvente, el aumento del volumen de solvente, la aplicación de ultrasonido por hasta 6 min

y la aplicación de microondas-ultrasonido por hasta 10 min. La extracción con etanol en agua redujo significativamente los rendimientos de extracción de los compuestos de interés hasta en un 35%, mientras mayores volúmenes de solvente aumentaron los rendimientos hasta en un 45%. La aplicación de microondas-ultrasonido no tuvo ningún efecto sobre la extracción y, notoriamente, la aplicación de ultrasonido por 3 min aumentó los rendimientos de extracción de compuestos funcionales en ambas variedades de tuna. La triple extracción acuosa con una relación 1:2 (g/mL) en pulpa de tuna *Vigor* permitió obtener, en comparación con la aplicación de sonotrodo por 3 min, por ejemplo, 14.2% más betacianinas, 6.0% más compuestos fenólicos totales, 31.4% más capacidad antioxidante por ABTS y 66.3% más capacidad antioxidante por DPPH. En pulpa de tuna *Mandarina*, la triple extracción acuosa resultó en 6.4% más betaxantinas, 19.4% menos compuestos fenólicos totales, 15.6% más capacidad antioxidante por ABTS y hasta 2 veces más capacidad antioxidante por DPPH que la aplicación de sonotrodo por 3 y 6 min.

En una tercera etapa, se llevaron a cabo pruebas de estabilidad térmica con los extractos acuosos de las pulpas de las tunas *Vigor* y *Mandarina*, así como de betabel. Las betaxantinas provenientes de tuna *Mandarina* resultaron más termoestables que las betaxantinas de betabel en un rango de temperaturas de 50 a 90 °C, mientras que las betacianinas de tuna *Vigor* mostraron una termo estabilidad similar a las de los extractos de betabel. La capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos totales en los extractos acuosos sometidos a distintas temperaturas mostraron una disminución significativa respecto al tiempo de tratamiento térmico, pero no se registró un efecto claro por el aumento de la temperatura. Esto pudo deberse a la presencia de otros compuestos provenientes de la materia prima y a la generación de compuestos de degradación de betalaínas y compuestos fenólicos por efecto de la temperatura.

Finalmente, se llevó a cabo el establecimiento del proceso de encapsulación mediante coacervación compleja de las betalaínas en la pulpa de las variedades de tuna *Vigor* y *Mandarina*. Utilizando proteína de soya y pectina, se planteó un diseño de superficie de respuesta (Box-Behnken) variando el pH, el porcentaje de proteína de soya y la concentración de betalaínas. Lo anterior permitió obtener una eficiencia de encapsulación

de betacianinas de hasta el 39% utilizando un pH de 4, un porcentaje de proteína de 2.0% (p/v) y una absorbancia de 0.2 a 538 nm, mientras que en el caso de betaxantinas se obtuvieron eficiencias entre 37 - 47% utilizando absorbancias de 0.2 a 483 nm. Las eficiencias de encapsulación de betalaínas obtenidas en este estudio estuvieron por debajo de lo reportado en estudios recientes de encapsulación mediante coacervación simple y compleja de betalaínas. Lo anterior pudo deberse a la poca afinidad de las betalaínas por el coacervado formado con los biopolímeros utilizados para llevar a cabo la coacervación compleja.

Los resultados de este estudio pueden ayudar a la selección de variedades de tuna con potencial para ser utilizadas como fuente de betalaínas, así como al establecimiento de procesos de extracción y encapsulación mediante coacervación compleja. En adición, en este estudio también se presenta una metodología que puede utilizarse para evaluar y comparar la termo estabilidad de distintas fuentes. Es necesario llevar a cabo más investigación para determinar el papel de otros compuestos en la actividad antioxidante durante el tratamiento térmico y si el proceso de encapsulación mediante coacervación compleja puede contribuir a aumentar la estabilidad de las betalaínas.

## Abstract

Known for their use as food colorants, betalains are water-soluble pigments found in various plant species. Adding these compounds as a colorant can also offer added value, as betalains are known to have several functional properties that can be beneficial to consumer health. Although the main source of these pigments is beet (*Beta vulgaris*), it is imperative to characterize other plant species that can offer advantages from an agronomic and compositional approach. In order to produce food additives from plant species, processes must be developed that allow obtaining the maximum extraction yields of the compounds of interest, that contribute to maintain or improve their stability and that are environmentally friendly

This study carried out the characterization of four varieties of fruits of the genus *Opuntia*: *Vigor*, *Pirámides*, *Pelota*, and *Mandarina*. Characterization was carried out by measuring different chemical parameters, color, quantity of betalains, antioxidant capacity, and total phenolic compounds in the aqueous extracts of the pulp, which were compared with those obtained in beet, taking into account that it is the most used and studied source of betalains. The results obtained in the prickly pear varieties were within the ranges reported for other varieties from other regions. To carry out the next stages of the study, two varieties of prickly pear were selected: *Vigor*, with a purple color, for its high pigment content, and *Mandarina*, for its attractive yellow-orange color and its lower availability in nature.

The second stage of this study entailed establishing the extraction method of functional compounds from *Vigor* and *Mandarina* prickly pear pulp. A triple aqueous extraction at a 1:2 ratio (g/mL) using fresh prickly pear pulp was established as the best method of extraction of betalains and other functional compounds in comparison with other types of extraction evaluated, such as the percentage of ethanol in water as solvent, the increase of solvent volume, the application of ultrasound for up to 6 min, and the application of microwave-ultrasound for up to 10 min. Extraction with ethanol in water significantly reduced extraction yields of the compounds of interest by up to 35%, while higher solvent volumes increased yields by up to 45%. The application of microwave-ultrasound had no



effect on extraction and, notably, the application of ultrasound for 3 min increased extraction yields of functional compounds in both varieties of prickly pear. Triple aqueous extraction with a 1:2 ratio (g/mL) in *Vigor* prickly pear pulp yielded, compared to sonotrode application for 3 min, e.g., 14.2% more betacyanins, 6.0% more total phenolic compounds, 31.4% more antioxidant capacity by ABTS, and 66.3% more antioxidant capacity by DPPH. Regarding *Mandarina* prickly pear pulp, triple aqueous extraction resulted in 6.4% more betaxanthins, 19.4% less total phenolic compounds, 15.6% more antioxidant capacity by ABTS, and up to 2 times more antioxidant capacity by DPPH than sonotrode application for 3 and 6 min.

A third stage involved carrying out heat stability tests with aqueous extracts of *Vigor* and *Mandarina* prickly pear pulp, as well as beet pulp. Betaxanthins from *Mandarina* prickly pear were found to be more thermostable than beet betaxanthins at a temperature range of 50 to 90°C, while *Vigor* prickly pear betacyanins exhibited similar thermostability to beet extracts. Although the antioxidant capacity and total phenolic compounds in the aqueous extracts subjected to different temperatures showed a significant decrease with respect to heat treatment time, no clear effect was recorded for increasing temperature. This could be due to the presence of other compounds from the raw material and the generation of degradation compounds of betalains and phenolic compounds due to the effect of temperature.

Finally, the process of encapsulation by complex coacervation of betalains in the pulp of *Vigor* and *Mandarina* prickly pear varieties was established. A response surface design (Box-Behnken) was proposed using soy protein and pectin through variations in pH, percentage of soy protein, and betalain concentration. This allowed obtaining an encapsulation efficiency of up to 39% for betacyanins using a pH of 4, a protein percentage of 2.0% (w/v) and an absorbance of 0.2 at 538 nm, while in the case of betaxanthins, efficiencies between 37 - 47% were obtained using absorbances of 0.2 at 483 nm. The encapsulation efficiencies of betalains obtained in this study were below those reported in recent studies of encapsulation by simple and complex coacervation of betalains. This could be due to the

low affinity of betalains for the coacervate formed with the biopolymers used to carry out the complex coacervation.

The results of this study can contribute to the selection of prickly pear varieties with potential for use as a betalain source, as well as to the establishment of extraction and encapsulation processes by complex coacervation. In addition, this study also provides a methodology that can be used to evaluate and compare the thermostability of different sources. Further research is required to determine the role of other compounds in the antioxidant activity during heat treatment and whether the encapsulation process by complex coacervation can play a part in betalain stability increase.

## Contenido

1. Marco teórico .....	1
1.1 Betalaínas como pigmentos y compuestos funcionales.....	1
1.1.1 Pigmentos vegetales y su clasificación.....	1
1.1.2 Estructura y estabilidad de las betalaínas.....	3
1.1.2.1 Estructura .....	3
1.1.2.2 Estabilidad .....	5
1.1.3 Utilización de betalaínas como pigmentos .....	7
1.1.4 Evaluación de la calidad de pigmentos y su capacidad antioxidante .....	8
1.1.5 Propiedades funcionales de las betalaínas .....	9
1.1.5.1 Capacidad antioxidante .....	9
1.1.5.2 Otras propiedades funcionales.....	10
1.2 Fuentes vegetales de betalaínas.....	11
1.2.1 Especies del género <i>Opuntia</i> como fuentes de betalaínas .....	11
1.2.2 Proceso de extracción convencional de betalaínas provenientes de la tuna ....	14
1.3 Métodos convencionales para la extracción de fitoquímicos .....	14
1.4 Métodos no convencionales de extracción de fitoquímicos .....	15
1.4.1 Extracción asistida por microondas .....	15
1.4.2 Extracción asistida por ultrasonido.....	16
1.4.2 Extracción asistida por microondas-ultrasonido.....	16
1.5 Tipos de solventes utilizados en la extracción de betalaínas .....	16
1.6 Encapsulación de compuestos funcionales .....	17
1.6.1 Técnicas de encapsulación .....	17
1.6.2 Coacervación como método de encapsulación .....	18

1.6.2.1 Biopolímeros utilizados para llevar a cabo la encapsulación mediante coacervación compleja .....	20
1.6.2.2 Proteína de soya .....	21
1.6.2.3 Pectina .....	21
1.6.2.4 Alginato.....	22
2. Justificación .....	23
3. Hipótesis .....	24
4. Objetivo general .....	25
5. Objetivos particulares.....	25
6. Materiales y métodos.....	26
6.1 Material biológico .....	26
6.2 Caracterización química y color en pulpa .....	27
6.2.1 Sólidos solubles totales (°Brix) .....	27
6.2.2 Acidez titulable y pH.....	27
6.2.3 Humedad .....	28
6.2.4 Color .....	28
6.3 Determinación espectrofotométrica de betaxantinas y betacianinas .....	28
6.3.1 Extracción acuosa (extracción convencional) .....	28
6.3.2 Cuantificación espectrofotométrica de betalaínas .....	28
6.5 Capacidad antioxidante .....	30
6.5.1 ABTS.....	30
6.5.2 DPPH.....	30
6.6 Identificación de betalaínas en extractos de tuna mediante HPLC.....	31
6.6.1 Semisíntesis y purificación de betaxantinas .....	31

6.6.2 Metodología HPLC.....	31
6.7 Evaluación de distintos factores y métodos no convencionales sobre el proceso de extracción de betalaínas de pulpa de tuna <i>Vigor</i> y <i>Mandarina</i> .....	32
6.7.1 Evaluación del número de extracciones y el estado de la materia prima .....	32
6.7.2 Evaluación de la concentración de etanol y la relación masa:volumen .....	33
6.7.3 Evaluación de la aplicación de ultrasonido y ultrasonido-microondas .....	33
6.8 Análisis de la estabilidad por efecto de la temperatura en extractos de betabel y tunas <i>Vigor</i> y <i>Mandarina</i> .....	34
6.9 Establecimiento del proceso de coacervación compleja para la encapsulación de betalaínas de tuna .....	35
6.9.1 Obtención de extractos acuosos de betalaínas .....	35
6.9.1 Punto de equivalencia en soluciones de proteína de soya, pectina y alginato .	35
6.9.2 pH óptimo para llevar a cabo el proceso de coacervación .....	35
6.9.3 Potencial Zeta.....	36
6.9.4 Proceso de coacervación compleja de betalaínas .....	36
6.9.5 Diseño de superficie de respuesta para mejorar la eficiencia de encapsulación de betalaínas .....	37
6.9.6 Determinación de la eficiencia de encapsulación.....	39
6.10 Análisis de datos .....	39
7. Resultados.....	41
7.1 Caracterización de las variedades de tuna ( <i>O. ficus-indica</i> ) provenientes de San Martín de las Pirámides .....	41
7.1.1 Caracterización química de la pulpa .....	41
7.1.2 Espectros de absorción y contenido de betalaínas.....	43
7.1.3 Capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales.....	46

7.1.4 Identificación de betalaínas por HPLC .....	48
7.1.5 Análisis de componentes principales (PCA) .....	49
7.2 Evaluación de distintos factores sobre el proceso de extracción de betalaínas de pulpa de tuna <i>Vigor</i> y tuna <i>Mandarina</i> .....	52
7.2.1 Evaluación del número de extracciones y el estado de la materia prima (pulpa fresca o liofilizada) .....	52
7.2.2 Evaluación del efecto de la concentración de etanol y la relación masa:volumen .....	55
7.2.3 Evaluación de la aplicación de ultrasonido .....	58
7.2.4 Evaluación de la aplicación de microondas-ultrasonido.....	60
7.3 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de betalaínas provenientes de tunas <i>Vigor</i> y <i>Mandarina</i> .....	62
7.3.1 Estabilidad de betalaínas.....	62
7.3.2 Efecto de la temperatura sobre la retención de la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos totales .....	65
7.4 Encapsulación de betalaínas mediante coacervación compleja .....	71
7.4.1 Punto de equivalencia en soluciones de proteína de soya, pectina y alginato .	71
7.4.2 Potencial Z y determinación del pH óptimo para llevar a cabo el proceso de coacervación.....	72
7.4.3 Proceso de coacervación compleja de betalaínas .....	74
7.4.4 Mejoramiento del proceso de encapsulación de betalaínas mediante coacervación compleja.....	76
8. Conclusiones.....	80
9. Perspectivas y recomendaciones .....	82
10. Literatura citada .....	83

11. Anexos .....	100
A.1 Eficiencias de encapsulación obtenidas para la capacidad antioxidante por ABTS y el contenido de compuestos fenólicos totales .....	100
A.2 Eficiencias de encapsulación obtenidas para la capacidad antioxidante por ABTS y el contenido de compuestos fenólicos totales .....	100
A.3 Proceso de doble emulsión junto a coacervación compleja para la encapsulación de betalaínas de tuna.....	102
A.4 Productos derivados del trabajo de investigación.....	103

## Índice de figuras

Figura 1. Color y estructuras representativas de diferentes clases de pigmentos vegetales. .....	2
Figura 2. Estructura química del ácido betalámico (A), la betanidina (B) (una betacianina) y la indicaxantina (C) (una betaxantina) (Khan & Giridhar, 2015; Khan, 2016a). .....	4
Figura 3. Estructura química de la betanina (Gonçalves et al., 2012). .....	5
Figura 4. Factores que influyen sobre la estabilidad de las betalaínas (Herbach, Stintzing & Carle, 2006; Esatbeyoglu et al., 2015). .....	6
Figura 5. Proceso de elaboración de colorante de tuna (FAO, 2013). .....	14
Figura 6. Estructura molecular básica de la pectina (Zegada, 2015). .....	22
Figura 7. Características estructurales del alginato. M: residuo de manuronato; G: residuo de guluronato (Bennacef et al., 2021). .....	22
Figura 8. Frutos y pulpa de las variedades de tuna caracterizadas en este estudio. Mandarina (A), Mandarina 3/4 (B), Vigor (C), Pirámides (D) y Pelota (E). .....	27
Figura 9. Espectros de absorción obtenidos en extractos acuosos de betabel (A) y tunas Mandarina (B), Mandarina 3/4 (C), Vigor (D), Pirámides (E) y Pelota (F). Se indican las longitudes de onda en nm donde se registraron máximos de absorción. ....	44
Figura 10. Contenido de betacianinas (A) y betaxantinas (B) en pulpa de cuatro variedades de tuna y betabel. Se representa la media de tres repeticiones $\pm$ DE. Los resultados se muestran en términos de peso seco (PS). Letras distintas indican diferencias significativas entre medias (Tukey HSD, $\alpha = 0.05$ ). .....	46
Figura 11. Capacidad antioxidante determinada por ABTS (A) y DPPH (B) y compuestos fenólicos totales (C) en pulpa de cuatro variedades de tuna y betabel. Se representa la media de tres repeticiones $\pm$ DE. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias (Tukey HSD, $\alpha = 0.05$ ). .....	47
Figura 12. Cromatogramas obtenidos a 535 nm (A) y 480 nm (B) para la identificación de betacianinas y betaxantinas, respectivamente, en extractos acuosos de pulpa de tuna Vigor. .....	48



Figura 13. Cromatogramas obtenidos a 535 nm (A) y 480 nm (B) para la identificación de betacianinas y betaxantinas, respectivamente, en extractos acuosos de pulpa de tuna Mandarin. ?: compuesto no identificado ..... 49

Figura 14. Gráfica de puntajes (scores) (A) y pesos (loadings) (B) para el componente principal 1 (PC1) y el componente principal 2 (PC2) obtenidos mediante análisis de componentes principales realizado con los datos registrados en betabel y las variedades de tuna. AT: acidez titulable; BEC: cantidad de betacianinas; BEX: cantidad de betaxantinas; BET: cantidad de betalaínas totales; ABTS: capacidad antioxidante por ABTS; DPPH: capacidad antioxidante por DPPH; CFT: compuestos fenólicos totales; SST: sólidos solubles totales; a, b y L: parámetros de color  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ , respectivamente. .... 50

Figura 15. Efecto del número de extracciones en la extracción de betacianinas (A) en pulpa de tuna Vigor, la capacidad antioxidante determinada por ABTS (B) y DPPH (C) y el contenido de compuestos fenólicos totales (D). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ). ..... 53

Figura 16. Efecto del número de extracciones en la extracción de betaxantinas (A) en pulpa de tuna Mandarin, la capacidad antioxidante determinada por ABTS (B) y DPPH (C) y el contenido de compuestos fenólicos totales (D). Media de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ). ..... 54

Figura 17. Efecto de la relación masa:volumen (m:v) y el porcentaje de etanol en la extracción de betacianinas (A) en pulpa de tuna Vigor, la capacidad antioxidante determinada mediante ABTS (B) y DPPH (C) y el contenido de compuestos fenólicos totales (D). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. En A, letras minúsculas distintas indican diferencias significativas para el porcentaje de etanol; letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas para la relación masa:volumen ( $\alpha < 0.05$ ). ..... 56

Figura 18. Efecto de la relación masa:volumen (m:v) y el porcentaje de etanol en la extracción de betaxantinas (A) en pulpa de tuna Mandarin, la capacidad antioxidante determinada mediante ABTS (B) y DPPH (C) y el contenido de compuestos fenólicos totales (D). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas para el porcentaje de etanol; letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas para la relación masa:volumen ( $\alpha < 0.05$ ). ..... 57

Figura 19. Efecto de la aplicación de ultrasonido en la extracción de betacianinas (A) en pulpa de tuna Vigor, la capacidad antioxidante por ABTS (B) y DPPH (C), y en el contenido de compuestos fenólicos totales (D). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ). ..... 59

Figura 20. Efecto de la aplicación de ultrasonido en la extracción de betaxantinas (A) en pulpa de tuna Mandarinina, la capacidad antioxidante por ABTS (B) y DPPH (C), y el contenido de compuestos fenólicos totales (D). Medias de tres repeticiones $\pm$ DE. Letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ).....	60
Figura 21. Efecto de la aplicación de microondas-ultrasonido en la extracción de betacianinas (A) en pulpa de tuna Vigor, la capacidad antioxidante por ABTS (B) y DPPH (C), y el contenido de compuestos fenólicos totales (D). Medias de tres repeticiones $\pm$ DE. Letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ). .....	61
Figura 22. Efecto de la aplicación de microondas-ultrasonido en la extracción de betaxantinas (A) en pulpa de tuna Mandarinina, la capacidad antioxidante por ABTS (B) y DPPH (C), y la cantidad de compuestos fenólicos totales (D). Medias de tres repeticiones $\pm$ DE. Letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ).....	61
Figura 23. Efecto del tratamiento térmico sobre el porcentaje de retención (PR) de betacianinas de tuna Vigor y betabel (A) y de betaxantinas de tuna Mandarinina y betabel (B). Medias de tres repeticiones $\pm$ DE.....	65
Figura 24. Efecto del tratamiento térmico sobre el porcentaje de retención (PR) de la actividad antioxidante por ABTS en extractos acuosos de pulpa de tuna Vigor y betabel (A) y de extractos acuosos de tuna Mandarinina y betabel (B). Medias de tres repeticiones $\pm$ DE. ....	68
Figura 25. Efecto del tratamiento térmico sobre el porcentaje de retención (PR) de la actividad antioxidante por DPPH en extractos acuosos de pulpa de tuna Vigor y betabel (A) y de extractos acuosos de tuna Mandarinina y betabel (B). Medias de tres repeticiones $\pm$ DE. ....	69
Figura 26. Efecto del tratamiento térmico sobre el porcentaje de retención (PR) del contenido de compuestos fenólicos totales en extractos acuosos de pulpa de tuna Vigor y betabel (A) y de extractos acuosos de tuna Mandarinina y betabel (B). Medias de tres repeticiones $\pm$ DE.....	70
Figura 27. Titulación de soluciones al 0.5% (p/v) de proteína de soya (A), pectina (B) y alginato (C).....	72
Figura 28. Efecto del pH sobre la turbidez de mezclas de pectina-proteína de soya (A) y alginato-proteína de soya (B). Medias de tres repeticiones $\pm$ DE. Letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ). .....	73

Figura 29. Evaluación del potencial Z en soluciones de polímeros al 0.5% (p/v).....	73
Figura 30. Coacervación compleja en el sistema alginato-proteína de soya (A) y pectina-proteína de soya (B) en un blanco con agua (1) y en extractos acuosos de pulpa de tuna Vigor (2), de pulpa de tuna Mandarina (3) y de betabel (4). Con flechas rojas se indica el coacervado formado después de 24 h a 4 °C y con flechas azules se indica la solución de equilibrio.....	74
Figura 31. Eficiencia de encapsulación de betacianinas. Medias de tres repeticiones $\pm$ DE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ). C1: concentración 1 de betacianinas (0.6 a 538 nm). C2: concentración 2 de betacianinas (1.2 a 538 nm). ....	75
Figura 32. Eficiencia de encapsulación de betaxantinas. Medias de tres repeticiones $\pm$ DE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ). C1: concentración 1 de betaxantinas (0.6 a 483 nm). C2: concentración 2 de betaxantinas (1.2 a 483 nm).....	76
Figura 33. Eficiencia de encapsulación de la actividad antioxidante por ABTS (A) y el contenido de compuestos fenólicos totales (B) en extractos acuosos de pulpa de tuna Vigor y de betabel. Medias de tres repeticiones $\pm$ DE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ). C1: concentración 1 de betacianinas (0.6 a 538 nm). C2: concentración 2 de betacianinas (1.2 a 538 nm). ....	101
Figura 34. Eficiencia de encapsulación de betaxantinas (A), de la actividad antioxidante por ABTS (B) y la cantidad de compuestos fenólicos totales (C) en extractos acuosos de pulpa de tuna Mandarina y de betabel. Medias de tres repeticiones $\pm$ DE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ). C1: concentración 1 de betaxantinas (0.6 a 483 nm). C2: concentración 2 de betaxantinas (1.2 a 483 nm).....	101

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Principales nutrientes y otros compuestos funcionales en pulpa de tunas del género <i>Opuntia</i> (Barba et al., 2017).....	13
Cuadro 2. Valores tomados en cuenta para el experimento factorial 3X2 .....	33
Cuadro 3. Valores tomados en cuenta para el experimento factorial 3 <sup>2</sup> .....	33
Cuadro 4. Valores considerados en experimentos de extracción de un solo factor.....	33
Cuadro 5. Volúmenes de polímeros utilizados para determinar el pH óptimo de coacervación compleja .....	36
Cuadro 6. Diseño experimental para la encapsulación de betalaínas mediante coacervación compleja (los niveles de cantidad de betacianinas y betaxantinas se consideraron en experimentos separados).....	37
Cuadro 7. Factores y niveles considerados en el diseño de superficie de superficie de respuesta (Box-Behnken) para llevar a cabo el proceso de encapsulación de betalaínas mediante coacervación compleja.....	38
Cuadro 8. Volúmenes requeridos de soluciones de biopolímeros para llevar a cabo el proceso de coacervación compleja en cada tratamiento del diseño de Box-BehnKen. ....	38
Cuadro 10. Coeficientes de correlación entre las variables cuantificadas en las variedades de tuna y betabel. El símbolo * indica correlación significativa ( $\alpha = 0.5$ ).....	51
Cuadro 11. Energía de activación (EA) y vida media ( $t_{1/2}$ ) de las betalaínas en extractos acuosos de tuna y betabel. Los valores EA se presentan como media $\pm$ SD ( $n = 3$ ) y letras diferentes indican diferencias significativas (prueba t de Student, $\alpha = 0,05$ ).....	64
Cuadro 12. Modelo de superficie de respuesta para la eficiencia de encapsulación de betacianinas de tuna Vigor. Con * se indican los términos del modelo significativos ( $\alpha = 0.05$ ). $R^2=0.74$ , $R^2$ ajustado=0.67, p-value del modelo = $1.2*10^{-4}$ .....	77
Cuadro 13. Modelo de superficie de respuesta para la eficiencia de encapsulación de betaxantinas de tuna Mandarin. Con * se indican los términos del modelo significativos ( $\alpha = 0.05$ ). $R^2=0.91$ , $R^2$ ajustado=0.87, p-value del modelo = $2.34*10^{-9}$ .....	78

# 1. Marco teórico

## 1.1 Betalaínas como pigmentos y compuestos funcionales

### 1.1.1 Pigmentos vegetales y su clasificación

El color que producen los pigmentos se debe a una estructura específica en la molécula (cromóforo) que absorbe energía luminosa en determinadas longitudes de onda y refleja o refracta el resto en la región del espectro visible. La percepción de color se genera cuando la luz reflejada es recibida por el ojo humano (Delgado-Vargas, Jiménez & Paredes-López, 2000). El color es un aspecto fundamental en la selección del consumidor en la mayoría de los productos y en el caso particular de alimentos el color incluso puede afectar la manera en que percibimos el sabor y el aroma (Spence, 2018).

Los principales productores de pigmentos naturales son las plantas. En estos organismos los pigmentos participan en funciones importantes tales como la fotosíntesis (clorofilas y carotenoides) o la protección ante condiciones de estrés (flavonoides) (Delgado-Vargas, Jiménez & Paredes-López, 2000). El interés en los pigmentos vegetales ha aumentado por sus beneficios potenciales a la salud y la preocupación por los efectos adversos de los colorantes sintéticos de alimentos. Las principales áreas de estudio sobre pigmentos naturales son: la elucidación estructural, métodos analíticos de identificación y cuantificación, composición en alimentos, efecto del procesamiento incluyendo las reacciones químicas en estos compuestos, biodisponibilidad, estabilidad y métodos de estabilización, producción y efectos sobre la salud (Rodríguez-Amaya, 2019). Sin embargo, los pigmentos naturales no son tan estables ni producen coloraciones tan intensas como los sintéticos, particularmente en aplicaciones a valores de pH neutros o básicos. Por esta razón en la industria alimentaria la búsqueda de nuevas fuentes de pigmentos vegetales sigue siendo un área de gran interés, así como el desarrollo de tecnologías que mejoren sus características funcionales (de Mejía *et al.*, 2020).

Los pigmentos vegetales incluyen a las clorofilas, carotenoides, antocianinas y betalaínas (Fig. 1). Los pigmentos pueden clasificarse con base en el tipo de cromóforo, por sus características estructurales, por su origen, por la forma en que son aplicados y por su uso

como aditivos alimentarios. Por el tipo de cromóforo se dividen en cromóforos con sistemas conjugados (carotenoides, antocianinas, betalainas, pigmentos sintéticos y lacas) y porfirinas (clorofilas y sus derivados). Por su estructura química se dividen en derivados de tetrapirrol (clorofilas), derivados de isoprenoide (carotenoides e iridoides), compuestos N-heterocíclicos (purinas, flavinas, fenazinas, fenoxazinas y betalainas), derivados de benzopirano (antocianinas y otros pigmentos flavonoides), quinonas y melaninas (Delgado-Vargas, Jiménez & Paredes-López, 2000; Yusuf, Shabbir & Mohammad, 2017).

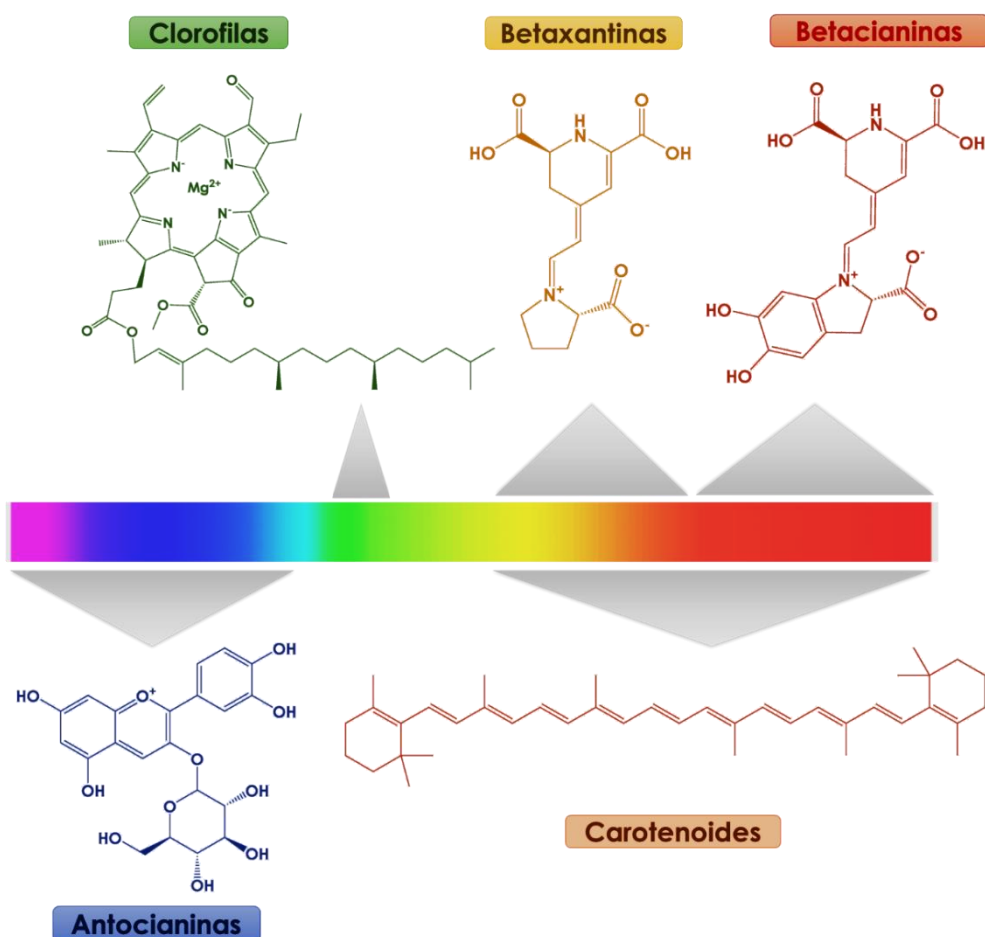


Figura 1. Color y estructuras representativas de diferentes clases de pigmentos vegetales.

Por su origen se pueden clasificar de la siguiente forma (Henry, 1996):

- *Colorantes sintéticos*. Se producen por síntesis química (tartrazina, por ejemplo).
- *Colorantes idénticos a los naturales*. Se producen por síntesis química, tienen una estructura química igual a la encontrada en compuestos de origen vegetal o animal.

- *Colorantes naturales*. Compuestos orgánicos obtenidos de fuentes vegetales o animales (curcumina, bixina y antocianinas, por ejemplo).

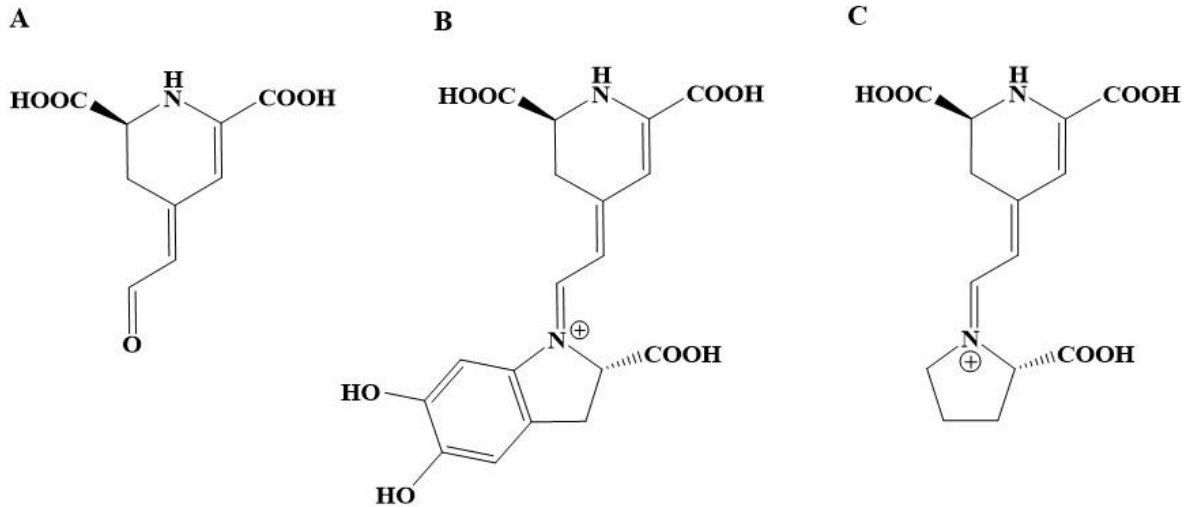
La FDA (*Food and Drug Administration*) define como aditivo colorante a cualquier colorante, pigmento o sustancia que, cuando es agregada o aplicada a un alimento, fármaco o cosmético, es capaz (sola o por reacción con otros compuestos) de impartir color. Como aditivos, los colorantes se pueden clasificar como sigue (Barrows, Lipman & Bailey, 2003; FDA, 2016):

- *Certificables*. Pigmentos sintéticos y lacas.
- *Exentos de certificación*. Incluyen pigmentos provenientes de fuentes vegetales, animales o minerales, así como colorantes derivados o producidos a partir de pigmentos naturales.

#### 1.1.2 Estructura y estabilidad de las betalaínas

##### 1.1.2.1 Estructura

Las betalaínas son pigmentos hidrofílicos derivados del metabolismo del aminoácido tirosina. Este tipo de pigmentos se encuentran en plantas pertenecientes al orden de las Cariofilales. El ácido betalámico (Fig. 2A) es la estructura común y el cromóforo en todas las betalaínas las cuales se dividen en betaxantinas, de coloración amarillo-naranja y máxima absorción en una longitud de onda de 480 nm, y betacianinas, de coloración rojo-violeta y máxima absorción en 536 nm (Fig. 2B-C). Dependiendo de la proporción entre ambos tipos de betalaínas, se producen diferentes coloraciones en las flores, hojas o frutos donde se encuentran (Azeredo, 2009; Gandía-Herrero & García-Carmona, 2013).



**Figura 2.** Estructura química del ácido betalámico (A), la betanidina (B) (una betacianina) y la indicaxantina (C) (una betaxantina) (Khan & Giridhar, 2015; Khan, 2016a).

De los dos grupos de betalainas, en los tejidos vegetales las betacianinas se encuentran con más frecuencia que las betaxantinas. En el grupo de betacianinas se han identificado 42 compuestos, mientras que en el caso de las betaxantinas se han identificado 32, y actualmente el número de betalainas caracterizadas sigue en aumento debido al uso de nuevas tecnologías analíticas en cromatografía de líquidos y espectroscopia de masas. Generalmente, las betacianinas se encuentran en grandes cantidades en frutas, flores, hojas y raíces, mientras que las betaxantinas también se encuentran en tubérculos y ocasionalmente en hojas (Martins *et al.*, 2017; Polturak *et al.*, 2018).

En betacianinas es posible observar una gran variedad de estructuras, lo que se debe a la glicosilación de la betanina con uno o más monosacáridos y posteriores acilaciones de los 5-O o 6-O-glucósidos. Una de las betacianinas más estudiadas es la betanina (betanidina 5-O-β-glucósido; Fig. 3), que es la betacianina más abundante en el betabel (*B. vulgaris*). En el caso de las betaxantinas, estas son el producto de la condensación del ácido betalámico con aminoácidos o aminas. Las más estudiadas son la glutamina-betaxantina (vulgaxantina I), la betaxantina más abundante en el betabel, y la indicaxantina (prolina-betaxantina; Fig. 2C), la betaxantina predominante en tunas amarillas (*Opuntia* spp.) (Herbach, Stintzing & Carle, 2006).



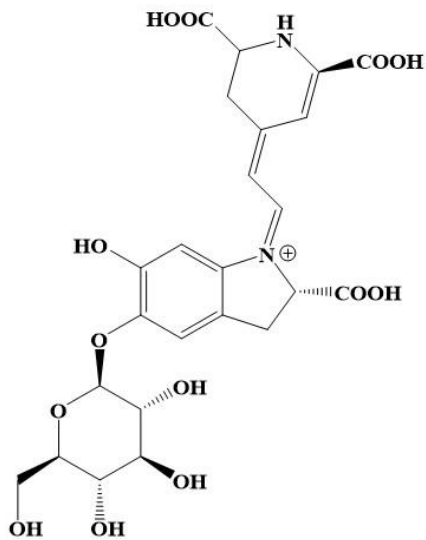


Figura 3. Estructura química de la betanina (Gonçalves *et al.*, 2012).

En condiciones naturales, y al igual que las antocianinas, las betalainas tienen la función de atraer polinizadores. Su producción puede ser inducida por radiación ultravioleta (UV) en especies como *Mesembryanthemum crystallinum* L., y por infección vírica en betabel, lo que sugiere que las betalainas también tienen la función de proteger a la planta ante condiciones adversas o de distintos tipos de estrés (Pavokovic & Krsnik-Rasol, 2011).

#### 1.1.2.2 Estabilidad

La estabilidad de las betalainas está influida por factores intrínsecos como la estructura y la composición molecular (grado de acilación y glucosilación), y factores extrínsecos como el pH, la actividad de agua, la luz, la temperatura y las concentraciones de oxígeno, metales y/o antioxidantes (Fig. 4). El factor más importante que influye sobre la estabilidad de las betalainas es la temperatura. Se sabe que un incremento en este factor está asociado a una mayor velocidad de degradación. Entre las betacianinas y las betaxantinas, se ha reportado que las betaxantinas son más estables a altas temperaturas o durante el proceso de digestión (Azeredo, 2009; Martins *et al.*, 2017).

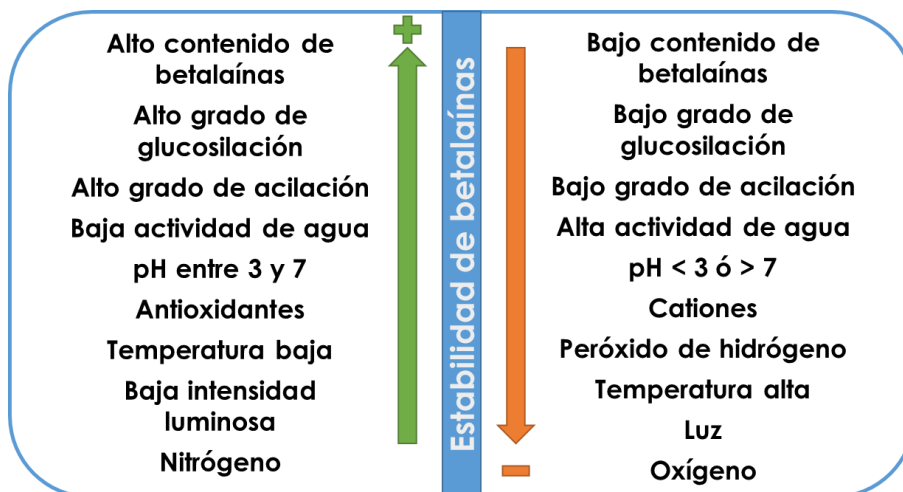


Figura 4. Factores que influyen sobre la estabilidad de las betalainas (Herbach, Stintzing & Carle, 2006; Esatbeyoglu *et al.*, 2015).

Otro de los factores importantes que influye sobre la estabilidad de betalainas es el pH del medio, en especial durante el tratamiento térmico. En betacianinas provenientes de *Opuntia joconostle* se reportó una reducción en la concentración de estos pigmentos de hasta el 66.4% al reducir el pH de 7 a 3 a una temperatura de 80 °C y durante un tiempo de 16 min (Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2013). Dentro del rango de pH de 3 a 7 se sabe que los valores de pH óptimos para mantener la integridad de las betalainas están entre 5 y 6, como lo reportado en betaxantinas provenientes de cáscara de pitaya (*Selenicereus megalanthus*) (Cejudo-Bastante *et al.*, 2016).

La glicosilación y acilación se produce exclusivamente en los grupos hidroxilo en la estructura de las betacianinas. La glicosilación puede incrementar la estabilidad de este tipo de pigmentos, por ejemplo, la betanidina y la isobetanidina tienen una vida media hasta 17 veces mayor que sus derivados no glicosilados. Esto se puede atribuir al hecho de que las formas glicosiladas tienen un menor potencial de óxido-reducción. Adicionalmente, también se sabe que la esterificación con ácidos grasos de este tipo de pigmentos aumenta su estabilidad (Herbach, Stintzing & Carle, 2006).

De toda el agua en un alimento una fracción está “ligada” a diversos componentes de este y otra fracción está “libre”. La actividad de agua es un indicador del agua libre o disponible en un alimento para llevar a cabo reacciones químicas o el crecimiento de microorganismos (Badui, 2006). Los valores altos de actividad de agua pueden contribuir a la degradación de

las betalaínas, lo cual se debe a que se promueven reacciones de hidrólisis en estos pigmentos. En betanina, por ejemplo, se reportó un incremento en la degradación de hasta un orden de magnitud cuando la actividad de agua aumentó de 0.32 a 0.75 (Herbach, Stintzing & Carle, 2006; Azeredo, 2009).

La incidencia de luz puede tener un papel importante en la estabilidad de betalaínas durante su almacenamiento. En extractos con etanol (96% v/v) de betalaínas provenientes de *Hylocereus polyrhizus* la incidencia de luz durante el almacenamiento a temperatura ambiente (25 °C) tuvo el mayor efecto sobre la degradación de betacianinas en comparación con otros factores como el pH o un pretratamiento térmico de hasta 85 °C. Después de una semana bajo luz ambiental se registró una pérdida en la concentración de betacianinas del 50% y después de tres semanas de hasta el 85% (Woo *et al.*, 2011).

La presencia de otros compuestos en el medio ya sea añadidos o provenientes de la matriz de donde se extraen la betalaínas también puede influir sobre la estabilidad de estos pigmentos. La adición de antioxidantes, por ejemplo, puede aumentar la estabilidad de las betalaínas, especialmente el ácido ascórbico (vitamina C) y el isoascórbico. Se ha reportado que las concentraciones entre 0.003 y 0.2% (p/v) aumentan la vida media de estos pigmentos, aunque a concentraciones superiores a 0.1 % (p/v) también puede producirse una mayor tasa de degradación (Herbach, Stintzing & Carle, 2006). El oxígeno y cationes metálicos ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ ) en el medio afectan la estabilidad de betalaínas, en especial en conjunción con la incidencia de luz y el aumento de la temperatura (Calva-Estrada, Jiménez-Fernández & Lugo-Cervantes, 2022).

### 1.1.3 Utilización de betalaínas como pigmentos

La betanina (Fig. 3), también llamada “rojo remolacha”, está entre los pigmentos naturales aceptados para su uso en alimentos y está clasificado como el aditivo E-162 (UE) y el 73.40 (FDA, USA). Este pigmento es usado en dulces, yogurts, helados, aderezos para ensalada, glaseados, mezclas para pasteles, sustitutos de carne y polvos para la preparación de bebidas y gelatinas. Las betalaínas son más solubles y exhiben una capacidad tintórea hasta tres veces mayor que las antocianinas. Una de sus características más importantes, al ser

aplicadas a alimentos, es su estabilidad dentro de un amplio rango de pH (de 3 a 7), lo que hace a este grupo de compuestos particularmente adecuados para su aplicación en alimentos neutros y de baja acidez. De esta forma, las betalaínas pueden sustituir a las antocianinas, que bajo el mismo rango de pH tienden a degradarse o a variar su color (Stintzing & Carle, 2007; Sáenz, Cancino & Robert, 2015; Khan, 2016b).

Sin embargo, la susceptibilidad de las betalaínas a las altas temperaturas, a la presencia de oxígeno y a valores altos de actividad de agua puede limitar su uso como colorante. La aplicación de este tipo de pigmentos suele hacerse en alimentos que reciben un tratamiento térmico moderado y/o que tienen una baja actividad de agua. En el caso de la betanina extraída de betabel sus aplicaciones más importantes se hacen en helados (en concentraciones entre 15 y 25 ppm), yogurt (de 4 a 8 ppm), confitería y como polvo en mezclas o productos secos. En la mayoría de estos alimentos, una concentración estimada de 50 mg betanina (o menos) por kilogramo de alimento puede producir el color deseado (Henry, 1996; Khan, 2016b).

Las betalaínas también tienen el potencial de ser usadas en la industria textil, la cosmética y la farmacéutica. En este tipo de industrias han comenzado a preferirse las alternativas naturales de bajo impacto ambiental o que no dañen a la salud del consumidor (Yusuf, Shabbir & Mohammad, 2017).

#### 1.1.4 Evaluación de la calidad de pigmentos y su capacidad antioxidante

Existen distintas variables o métodos que pueden utilizarse para caracterizar un extracto de pigmentos de origen vegetal, como pueden ser la absorbancia máxima (referida como densidad óptica [DO]), la concentración de pigmentos, el pH en solución, la acidez titulable, la capacidad antioxidante, la viscosidad, los grados brix (°Brix), el color (parámetros cromáticos  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  y  $h^*$ ), así como las diferencias  $\Delta L^*$ ,  $\Delta C^*$  y  $\Delta E^*$ . También se ha reportado el uso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) para la determinación del perfil de betalaínas, el análisis de estabilidad bajo diferentes condiciones (pH, temperatura de almacenamiento y tiempo), así como el análisis de los productos de degradación (mediante HPLC) a 50 °C y a diferentes valores de pH

(Castellar *et al.*, 2003; Castellar *et al.*, 2006; Mello *et al.*, 2015; Mikołajczyk-Bator & Czapski, 2017).

En adición, en los extractos de pigmentos es posible llevar a cabo ensayos diseñados para medir la capacidad antioxidante o el potencial reductor, interpretado como un indicador de la capacidad total de un organismo para resistir el estrés provocado por la presencia de radicales libres. Algunas de estas pruebas también pueden ser utilizadas para evaluar la capacidad antioxidante de extractos vegetales, en cuya composición puede haber nutrientes o compuestos con potencial reductor. Es importante mencionar que la capacidad antioxidante no debería ser determinada con base en una sola prueba y de forma general se utilizan varios métodos *in vitro* para evaluar esta actividad en las muestras de interés. Estos métodos pueden diferir en varios aspectos, por lo que podría resultar difícil compararlos y en general se ha reportado que dan valores diferentes para una misma muestra (Wood, Gibson & Garg, 2006; Alam, Bristi & Rafiquzzaman, 2012).

#### 1.1.5 Propiedades funcionales de las betalaínas

##### 1.1.5.1 Capacidad antioxidante

El cuerpo humano posee varios sistemas de defensa contra la acción de radicales libre y otros compuestos oxidantes. Estos sistemas pueden ser enzimáticos y no enzimáticos. Se sabe que los radicales libres y el estrés oxidante están relacionados con el desarrollo de numerosas enfermedades, incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares, neuronales y hepáticas, Alzheimer, Parkinson, colitis ulcerosa y aterosclerosis. Se ha sugerido que la protección contra los radicales libres y a el estrés oxidante puede ser mejorada al consumir antioxidantes (Alam, Bristi & Rafiquzzaman, 2012).

Las betalaínas tienen la capacidad de secuestrar radicales libres o de inducir mecanismos celulares antioxidantes. Se sabe que inducen la actividad de factores de transcripción como el Nrf2, el cual regula la expresión de genes que codifican para enzimas como la hemo oxigenasa-1, la NAD(P)H-quinona oxidoreductasa 1, glutatión S-transferasas, glutatión peroxidasa, tioredoxina reductasa 1, peroxirredoxina 1 y aldehído oxigenasa, así como

otros genes relacionados con la regulación de la respuesta al estrés oxidante (Gañán-Gómez *et al.*, 2013; Khan, 2016a).

Las betalaínas provenientes de betabel y de frutos de la familia Cactaceae exhiben capacidades antioxidantes altas, inhibiendo la peroxidación de lípidos y contrarrestando la actividad de lipoperoxidasas, enzimas que pueden dañar a las células gastrointestinales durante el proceso de digestión (Esatbeyoglu *et al.*, 2015; Gengatharan, Dykes & Choo, 2015).

#### 1.1.5.2 Otras propiedades funcionales

En adición a su capacidad antioxidante, las betalaínas tienen otras propiedades funcionales, tales como inhibidores de la proliferación de células tumorales y propiedades anti-lipídicas y antimicrobianas. En células HepG2 (línea celular de hepatocitos provenientes de un paciente con carcinoma) la aplicación de extractos de betanina y betaína tuvo un efecto citotóxico significativo. También se ha demostrado que los extractos de betabel tienen un efecto inhibitorio significativo en el desarrollo de cáncer de piel e hígado en ratón (Lee *et al.*, 2014; Gengatharan, Dykes & Choo, 2015). En relación con su efecto hipolipemiante, en estudios *in vivo* con humanos y ratones se ha publicado que el consumo o la aplicación de betalaínas provenientes de diversas fuentes vegetales contribuyó a la reducción de los niveles de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad, así como a incrementar los niveles de lipoproteínas de alta densidad en sangre (Gengatharan, Dykes & Choo, 2015).

El efecto antimicrobiano de las betalaínas provenientes de *Opuntia matudae*, betabel y pitahaya (*H. polyrhizus*) se ha reportado en varias especies de microorganismos como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Cladosporium herbarum* y *Botrytis cinérea*. Aunque el mecanismo específico aún no se define por completo, se ha sugerido que la actividad antimicrobiana de este tipo de compuestos puede deberse al daño que producen sobre la estructura, función y permeabilidad de la membrana celular de estos organismos, lo que conlleva a la inviabilidad y/o muerte celular (Čanadanović-Brunet *et al.*, 2011; Gengatharan, Dykes & Choo, 2015).

## 1.2 Fuentes vegetales de betalaínas

El betabel o remolacha (*B. vulgaris*) es la fuente principal de betalaínas a nivel industrial. Sin embargo, existen otras especies que se utilizan de forma comercial para la producción de betalaínas, como varias pertenecientes a los géneros *Opuntia* y *Amaranthus* y frutos como la pitaya (*Hylocereus undatus*) (Pavokovic & Krsnik-Rasol, 2011; Khan & Giridhar, 2015).

La producción de betalaínas de *B. vulgaris* tiene varias desventajas, ya que se obtienen extractos con poca variedad de betacianinas y betaxantinas, con mal sabor debido a la presencia de geosmina y varias pirazinas, así como un alto contenido de nitratos que pueden formar nitrosaminas, compuestos carcinogénicos una vez que son consumidos. Además, ya que se utiliza la raíz de esta hortaliza, existe el riesgo de contaminación por microorganismos provenientes de la tierra de cultivo. Todo lo anterior hace necesario estudiar fuentes alternativas y económicas para su producción (Pavokovic & Krsnik-Rasol, 2011; Khan & Giridhar, 2015).

Se sabe que las especies de los géneros *Amaranthus* y *Celosia* (ambos pertenecientes a la familia Amaranthaceae) producen pigmentos de buena calidad además de tener buenas características agronómicas y producciones altas en los terrenos donde se cultiva. Sin embargo, *Amaranthus* sp. contiene saponina y *Celosia* sp. contiene grandes cantidades de dopamina, lo que podría restringir la aceptación de este tipo de cultivos (Pavokovic & Krsnik-Rasol, 2011).

### 1.2.1 Especies del género *Opuntia* como fuentes de betalaínas

Las cactáceas son una familia constituida por alrededor de 1600 especies. Los miembros de esta familia se encuentran en forma nativa desde Chile y Argentina hasta Canadá, y se cultivan en más de 30 países. Existen alrededor de 100 especies, principalmente del género *Opuntia*, de las cuales se obtienen frutos comestibles. Su cultivo se logra en terrenos áridos, donde pocas plantas pueden sobrevivir. México se considera el centro de origen de este género, siendo el país con mayor número de especies silvestres y al menos 126 con diferente grado de domesticación (Esquivel, 2004; del Socorro Santos Díaz *et al.*, 2017).

En las regiones donde se cultivan o desarrollan las especies de esta familia se consideran una fuente importante de betalaínas, en particular, las especies pertenecientes a los géneros *Opuntia* e *Hylocereus* y algunas del género *Mamillaria*. Los frutos de *Opuntia stricta* Haw tienen una concentración aproximada de 0.8 mg de betalaínas por gramo de peso fresco, que es mayor a la encontrada en algunas variedades comerciales de betabel (con rendimientos entre 0.2 y 20 mg/g de raíz) (Pavokovic & Krsnik-Rasol, 2011).

De las especies comestibles del género *Opuntia* se consumen los cladodios jóvenes y los frutos conocidos como tunas. De este género se han estudiado las especies *Opuntia ficus-indica*, *Opuntia stricta*, *Opuntia streptacantha*, *Opuntia robusta*, *Opuntia undulate*, *Opuntia lasiacantha*, *Opuntia decumbens*, *Opuntia boldinghii*, *Opuntia matudae*, *O. joconostle* y *Opuntia macrorhiza* (Sáenz, Cancino & Robert, 2015). La superficie de cultivo de las tunas de *Opuntia* abarca entre 50 000 y 70 000 ha, con una producción anual bruta de 300 000 a 500 000 toneladas. México es el mayor productor (45% de la producción mundial), seguido de Italia (12,2%) y Sudáfrica (3,7%). En adición, México presenta una gran variabilidad genética de esta especie, lo que se ve reflejado en la gran variedad de coloraciones de la pulpa y cáscara de la tuna, que incluyen rojo, naranja, púrpura, blanco, verde y amarillo. La tuna también se cultiva en Italia, Sudáfrica, Chile, Argentina y USA, y se encuentra en Brasil, Colombia, Egipto, Túnez, Argelia, Marruecos, Turquía, España y Grecia (García-Cayuela *et al.*, 2019; Andreu-Coll *et al.*, 2020).

En relación con la producción de tuna en México, este cuenta con 20000 productores los cuales cosechan anualmente en promedio 352000 toneladas en 48000 hectáreas. Los principales estados productores son Estado de México, Zacatecas, Puebla e Hidalgo, seguidos de San Luis Potosí y Guanajuato. La producción se distribuye en diversos climas y terrenos con superficies promedio por productor de cinco hectáreas, siendo el Estado de México y Zacatecas los que aportan aproximadamente el 64.4% de la superficie total disponible (Granillo *et al.*, 2019). También en México se conocen alrededor de 23 variedades de tuna comestibles, agrupando frutos de coloración blanca, púrpura, roja, naranja y amarilla. Las tunas de pulpa blanca y cáscara verde son las de mayor consumo, abarcando el 95% de la producción total (Sumaya-Martínez *et al.*, 2010)



Las tunas de *Opuntia* también son una fuente de otros nutrientes y compuestos funcionales (Cuadro 1) lo que hace a estos frutos una fuente vegetal atractiva para la producción de pigmentos y la elaboración de distintos alimentos como mermeladas, dulces, licores y jugos (Pinedo-Espinoza *et al.*, 2017).

**Cuadro 1. Principales nutrientes y otros compuestos funcionales en pulpa de tunas del género *Opuntia* (Barba *et al.*, 2017).**

<b>Nutriente o compuesto</b>	<b>Unidad</b>	<b>Cantidad por 100 g</b>
Agua	g	87.55
Energía	kcal	41
Energía	kJ	172
Proteína	g	0.73
Lípidos totales	g	0.51
Cenizas	g	1.64
Carbohidratos	g	9.57
Fibra	g	3.6
<b>Minerales</b>		
Calcio, Ca	mg	56
Hierro, Fe	mg	0.3
Magnesio, Mg	mg	85
Fósforo, P	mg	24
Potasio, K	mg	220
Sodio, Na	mg	5
<b>Vitaminas</b>		
Vitamina C	mg	14
Niacina	mg	0.46
Folato	µg	6
Vitamina A, IU	IU	43
<b>Polifenoles</b>		
Isorhamnetina	mg	0.7
Kaempferol	mg	0.2
Quercetina	mg	4.9

En cuanto a la composición de betalaínas y otros compuestos funcionales como los fenólicos, la cantidad y tipos de estos puede variar dependiendo de la variedad de tuna y la coloración de la pulpa. En tunas de coloraciones rojo, púrpura y amarillo-naranja, provenientes de México y España, se reportó a la betanina (Fig. 3) como la betacianina mayoritaria, mientras que la indicaxantina (Fig. 2C) fue la betaxantina en mayor cantidad. En estas mismas variedades se detectaron y cuantificaron diferentes compuestos fenólicos,

principalmente glucósidos flavonoides (isorhamnetina, quercetina y kaempferol) y un ácido fenólico, el ácido piscídico (García-Cayuela *et al.*, 2019).

### 1.2.2 Proceso de extracción convencional de betalaínas provenientes de la tuna

Para la elaboración de colorante, el fruto de *O. ficus-indica* es procesado de la misma forma que para la elaboración de jugo a partir de frutos desespinaados, con la excepción de que en el proceso de obtención de colorante es posible usar el fruto completo, incluyendo la piel. Posteriormente, el extracto se concentra y almacena (Fig. 5) (FAO, 2013).



Figura 5. Proceso de elaboración de colorante de tuna (FAO, 2013).

### 1.3 Métodos convencionales para la extracción de fitoquímicos

Existen diferentes métodos de extracción para la obtención de compuestos provenientes de matrices vegetales. Los métodos tradicionales de extracción incluyen la utilización de Soxhlet y maceración, en donde se usan uno o más solventes junto a operaciones de mezclado y aplicación de calor. Es frecuente que en este tipo de metodologías se requieran grandes cantidades de solvente, tiempos prolongados de operación y temperaturas elevadas que podrían tener un efecto negativo en la actividad o integridad de los compuestos de interés, principalmente si se trata de compuestos termolábiles como las betalaínas (Ruiz-Montañez *et al.*, 2014; Odabaş & Koca, 2016).

También es importante que durante la extracción de betalaínas se tomen en cuenta las condiciones del proceso (tipo de solvente, adición de antioxidantes, uso de metodologías de extracción convencionales o no convencionales, temperatura, tiempo, etc.) así como las características de la materia prima (propiedades y composición, por ejemplo) ya que cualquiera de estos factores puede influir en los rendimientos de extracción y (Prakash Maran & Manikandan, 2012; Celli & Brooks, 2017).

#### **1.4 Métodos no convencionales de extracción de fitoquímicos**

Los métodos emergentes o no convencionales de extracción están enfocados en el mejoramiento de la eficiencia de los métodos convencionales o tradicionales. Algunas de estas tecnologías también contribuyen a reducir el posible impacto ambiental usando una menor cantidad de solventes, o bien solventes verdes, con un menor tiempo de extracción. Entre estos métodos se encuentran la extracción asistida por microondas y la extracción asistida por ultrasonido (Ruiz-Montañez *et al.*, 2014).

##### **1.4.1 Extracción asistida por microondas**

Este método aprovecha la interacción que se genera entre las microondas (con longitudes de onda entre 1 cm y 100  $\mu\text{m}$ ) y las moléculas en el medio de extracción. Fenómenos como la rotación dipolar y la conducción iónica contribuyen a la generación de calor y a que la presión interna de las células en el material vegetal aumente, facilitando la ruptura de la pared y membrana celular y la liberación del material que contienen. De esta forma es posible reducir significativamente los tiempos de extracción (Rodríguez-Rojo *et al.*, 2012; Cardoso-Ugarte *et al.*, 2014; Alonso-Carrillo *et al.*, 2017).

La extracción asistida por microondas ya ha sido aplicada en la extracción de diversos compuestos funcionales provenientes de diversas fuentes vegetales. Se ha reportado un mayor rendimiento en la extracción de compuestos como polifenoles y cafeína provenientes de hojas de té verde, de betalaínas de betabel y de ácido carnósico de hojas desgrasadas y molidas de romero. En los tres casos los resultados se compararon con métodos convencionales de extracción como la maceración y el reflujo con el uso de Soxhlet (Pan, Niu & Liu, 2003; Rodríguez-Rojo *et al.*, 2012; Cardoso-Ugarte *et al.*, 2014).

#### 1.4.2 Extracción asistida por ultrasonido

En la extracción asistida por ultrasonido, la cavitación y el mezclado mecánico son los principales fenómenos que contribuyen al proceso de extracción. Este método reduce el tiempo de proceso, ya que la transferencia de masa aumenta debido a la disrupción celular y al aumento en la penetración de solvente (Alonso-Carrillo *et al.*, 2017). Esta metodología de extracción ha contribuido a aumentar los rendimientos de extracción de compuestos funcionales, en comparación con métodos convencionales, en mango Ataúlfo (mangiferina y lupeol) (Ruiz-Montañez *et al.*, 2014), té negro (polifenoles) (Both, Chemat & Strube, 2014), residuos de manzana (polifenoles) (Virost *et al.*, 2010) y hojas frescas de romero (ácido rosmarínico y carnósico) (Rodríguez-Rojo *et al.*, 2012).

#### 1.4.2 Extracción asistida por microondas-ultrasonido

Combinar el uso de microondas con ultrasonido puede favorecer el proceso de extracción de compuestos funcionales, ya que una de las desventajas que tiene el uso de microondas por sí solo es que el calentamiento que produce puede no ser homogéneo en todo el material. Esto puede evitarse si se usa ultrasonido, lo que aumenta la transferencia de masa y la disrupción celular (Chen *et al.*, 2010).

La aplicación de extracción asistida por microondas-ultrasonido ha mostrado tener varias ventajas en comparación con métodos convencionales de extracción. En *Satureja macrostema* (poleo) la aplicación de esta metodología de extracción permitió obtener extractos con una mayor capacidad antioxidante (determinada mediante ABTS) así como una cantidad equivalente de fenoles totales en un menor tiempo de extracción, esto en comparación con extracción por reflujo (Alonso-Carrillo *et al.*, 2017). En *Inotus obliquus* (hongo Chaga), la aplicación de esta metodología, comparada con la extracción tradicional con agua caliente, tuvo un efecto positivo en el rendimiento de extracción y pureza de los polisacáridos obtenidos de este hongo (Chen *et al.*, 2010).

### **1.5 Tipos de solventes utilizados en la extracción de betalaínas**

Los solventes utilizados para la extracción de betalaínas varían dependiendo de la materia prima, así como de la metodología utilizada para este fin. En algunas publicaciones por su

naturaleza hidrofílica, incluso no se reporta el uso de solventes, realizando la extracción de estos compuestos simplemente mediante molienda, centrifugación y purificación (Kanner, Harel & Granit, 2001).

Para la extracción tanto de betacianinas como de betaxantinas provenientes de especies como *B. vulgaris* y varias del género *Opuntia* se ha reportado la utilización de solventes como el agua, metanol, etanol, acetona, etilenglicol o mezclas de estos en distintas proporciones. La utilización de mezclas de solventes puede mejorar la eficiencia del proceso de extracción dependiendo de los solventes utilizados y de su proporción en la mezcla (Kujala *et al.*, 2001; Castellar *et al.*, 2003; Koubaier *et al.*, 2014; Fathordoobady *et al.*, 2016).

## **1.6 Encapsulación de compuestos funcionales**

### 1.6.1 Técnicas de encapsulación

La temperatura, como se mencionó previamente, es el factor con mayor influencia sobre la estabilidad de las betalaínas en aplicaciones en alimentos durante su procesamiento y almacenamiento. Con el objetivo de evitar este problema, la adición de compuestos como antioxidantes, quelantes, pectina, goma guar o  $\beta$ -ciclodextrina, contribuyen a aumentar la estabilidad de estos pigmentos, lo que en algunos casos se puede deber a la formación de complejos de inclusión. Cabe mencionar que la adición de estos compuestos no siempre es necesaria, ya que pueden provenir del vegetal de donde se extraen las betalaínas (Herbach, Stintzing & Carle, 2006; Khan, 2016b).

En adición a lo anterior, la encapsulación de compuestos es otra alternativa para mejorar su estabilidad. La encapsulación consiste en el recubrimiento de los compuestos de interés con materiales relativamente inertes con el objetivo de protegerlos de condiciones adversas, previniendo así su degradación. Existen diferentes métodos de encapsulación, como son el secado por aspersión, la extrusión, la coacervación, la formación de liposomas, la cocrystalización y la liofilización. Las propiedades tanto del material de recubrimiento como del compuesto a encapsular determinan la eficiencia del proceso (Onwulata, 2013). Los principales usos de la encapsulación son proteger al compuesto de interés de condiciones ambientales adversas (luz, oxígeno o pH, por ejemplo), promover la liberación

controlada del compuesto encapsulado (lo que influye en la asimilación de los compuestos una vez que se consume el encapsulado), enmascarar malos olores o sabores, diluir el compuesto cuando se requiere en bajas cantidades y producir barreras entre compuestos presentes en el alimento (Vieira da Silva, Barreira & Oliveira, 2016).

Como compuestos de recubrimiento para encapsular betalaínas se han reportado el uso de maltodextrina, goma arábica, pectina, goma guar y glucosa (Ravichandran *et al.*, 2014). En *O. streptacantha* (tuna Cardona) se reportó el uso de maltodextrinas para la obtención de un polvo con color y características fisicoquímicas similares (una vez reconstituido en agua) a las del jugo natural (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2005). En frutos de pulpa púrpura de *O. ficus-indica* se utilizó alginato de calcio para encapsular a los pigmentos de este fruto, lo que demostró ser un método efectivo para aumentar la estabilidad de las betalaínas en comparación con el extracto liofilizado (Otálora *et al.*, 2016). En *O. stricta* Haw se utilizó jarabe de glucosa, lo cual permitió obtener un colorante estable a temperatura ambiente (sin cambios de color durante un mes) y bajo refrigeración aplicado a yogurt (Obón *et al.*, 2009).

El secado por atomización o aspersion se utiliza generalmente en la industria para la producción de encapsulados. Este proceso consiste en mezclar el compuesto de interés con un material o compuesto de recubrimiento. Posteriormente, esta mezcla se atomiza a través de una boquilla para producir gotas de las cuales se evapora el agua mediante una corriente de aire caliente, lo que finalmente produce encapsulados esféricos en un rango de tamaños entre 10 y 100  $\mu\text{m}$  (Khan, 2016b).

#### 1.6.2 Coacervación como método de encapsulación

La coacervación es el proceso en el que un sistema coloidal se separa en dos fases líquidas. El término coacervado se refiere a la fase más concentrada en coloides mientras que a la fase diluida se denomina solución de equilibrio. Los coacervados se forman mediante la interacción en un medio acuoso de especies con cargas opuestas como proteínas, polisacáridos y surfactantes (Eghbal & Choudhary, 2018).

La coacervación se divide en coacervación simple y compleja. En la simple, se utiliza un solo polímero y este se concentra en el medio por la adición de sales o alcoholes que tienen una mayor afinidad por el agua que por el polímero (Celli, Ghanem & Brooks, 2015). En el caso de la coacervación compleja, esta ocurre cuando biopolímeros de cargas opuestas interactúan en el medio acuoso hasta alcanzar el equilibrio electrostático en la fase concentrada (Eghbal & Choudhary, 2018).

La coacervación compleja puede usarse para la encapsulación de compuestos, en sistemas biomiméticos (sistemas cuyas propiedades y composición son similares a los producidos por distintas especies o generados en la naturaleza), producción de películas de envasado y emulsiones alimentarias o geles. El punto crítico en el proceso de coacervación compleja es el establecimiento de las condiciones óptimas (Eghbal & Choudhary, 2018). Un procedimiento típico de encapsulación mediante coacervación compleja comienza con la suspensión, o emulsificación, del compuesto a recubrir (núcleo) con gelatina (carga negativa) o goma Arábiga (carga positiva). Posteriormente, se adiciona un segundo material con carga opuesta a la del primero, lo que ocasiona la formación de complejos y una separación de fases líquido-líquido. En una de las dos fases se concentra el encapsulado (coacervados) que posteriormente puede ser sometido a secado para obtener un polvo. Por lo general, este tipo de encapsulación resulta adecuado para proteger ingredientes funcionales inestables, como pueden ser los polifenoles o las betalaínas (Fang & Bhandari, 2010; Onwulata, 2013; Celli, Ghanem & Brooks, 2015; Vieira da Silva, Barreira & Oliveira, 2016).

En general, los factores que influyen sobre la formación de coacervados son los relacionados con la modulación de las interacciones electrostáticas entre biopolímeros. De esta forma, la coacervación compleja es influida por el pH del medio, la fuerza iónica, la composición química/molecular de los biopolímeros, proporción entre los biopolímeros utilizados y su concentración total, fuerzas de cizallamiento (p. ej., agitación en el medio) y la temperatura (Moschakis & Biliaderis, 2017).

El proceso de encapsulación mediante coacervación compleja se ha aplicado en la encapsulación de compuestos hidrofóbicos como la zeaxantina y la vitamina D<sub>3</sub>, utilizando

mezclas de gelatina-carboximetil celulosa y gelatina-goma de tara carboximetilada, respectivamente (Santos, de Carvalho & Garcia-Rojas, 2021; Zhang *et al.*, 2021). La coacervación compleja también se ha aplicado en la encapsulación de compuestos hidrofílicos, tales como antocianinas y la vitamina C, utilizando mezclas de gelatina-goma arábica y gelatina-caseinato de sodio, respectivamente (Shaddel *et al.*, 2018; Fraj *et al.*, 2021). La coacervación compleja en compuestos hidrofílicos puede requerir la incorporación previa de estos en una doble emulsión. Sin embargo, la encapsulación mediante coacervación compleja sin la utilización de emulsiones se ha reportado en nisina en combinación con antioxidantes de cáscara de aguacate utilizando mezclas de colágeno-alginato y colágeno-pectina (Calderón-Oliver *et al.*, 2017), lo que da evidencia de que este tipo de compuestos puede interaccionar con el coacervado. Recientemente, también se reportó la encapsulación mediante coacervación simple de betalaínas provenientes de cáscara de *H. polyrhizus*. Lo anterior utilizando pectina como compuesto de recubrimiento y mediante la incorporación directa de los extractos acuosos de betalaínas en la solución de biopolímero (Rahayuningsih *et al.*, 2021). Esto remarca el potencial que podría tener la coacervación simple y compleja para llevar a cabo el proceso de encapsulación de betalaínas.

#### *1.6.2.1 Biopolímeros utilizados para llevar a cabo la encapsulación mediante coacervación compleja*

Como proteínas de origen animal se ha reportado ampliamente el uso de gelatina, así como proteína del suero de leche, globulina de huevo y colágeno hidrolizado. También se ha reportado el uso de proteínas de origen vegetal tales como la proteína de soya, proteína de chícharo, proteína de lenteja, proteína de canola, proteína de semilla de girasol y proteína de trigo. Las proteínas de origen vegetal pueden ofrecer una alternativa más saludable que las de origen animal y han ganado popularidad en años recientes (Timilsena *et al.*, 2019).

En cuanto a los polisacáridos utilizados para llevar a cabo la coacervación compleja, se ha reportado una amplia gama de estos, tales como el quitosano, alginato, pectina, carboximetilcelulosa, goma guar, carragenina y goma de anacardo (Eghbal & Choudhary, 2018; Timilsena *et al.*, 2019).



### 1.6.2.2 Proteína de soya

La proteína de la soya, en particular el aislado de proteína de soya, presenta un punto isoeléctrico en torno a un pH de 4.5 y está compuesta principalmente por albúminas y globulinas. La proteína de soya presenta una buena compatibilidad con distintos polisacáridos, lo que le confiere un uso potencial como material de pared en procesos de encapsulación de compuestos hidrofóbicos, como lo reportado en aceite de algas (Yuan *et al.*, 2017), e hidrofílicos, como en el caso de betalaínas de betabel (Zhao, Ma & Jing, 2020). Se han estudiado varias técnicas de microencapsulación utilizando proteína de soya como material de pared, incluyendo el secado por aspersión, la gelificación térmica y enzimática, así como la coacervación. En todos estos casos, la proteína de soya produjo efectos positivos, como una elevada estabilidad a la oxidación de lípidos y una alta retención de los compuestos de interés en comparación con otros tipos y fuentes de proteínas o polisacáridos (Casamides & González, 2014).

### 1.6.2.3 Pectina

La pectina puede utilizarse para la encapsulación mediante secado por aspersión, emulsión y mediante la formación de hidrogeles, liposomas y nano complejos. Además, el uso de pectina en combinación con otros compuestos como proteínas y lípidos ha resultado prometedor para encapsular compuestos de naturaleza hidrofóbica, como el D-limoneno (Ghasemi *et al.*, 2018), e hidrofílica, como lo reportado en compuestos fenólicos de hojas de oliva (Mohammadi *et al.*, 2016). La pectina está presente en la pared celular y lámina media de todas las células vegetales. Tradicionalmente, este polisacárido se extrae con agua caliente (60-100 °C) acidificada en un rango de pH de 1.5-3 durante varias horas. Como fuentes a nivel industrial se utilizan principalmente residuos de manzana y cáscaras de cítricos. Químicamente, la pectina está compuesta por al menos 17 tipos diferentes de monosacáridos con el ácido D-galacturónico como componente principal, seguido de la D-galactosa y la L-arabinosa (Fig. 6) (Rehman *et al.*, 2019).

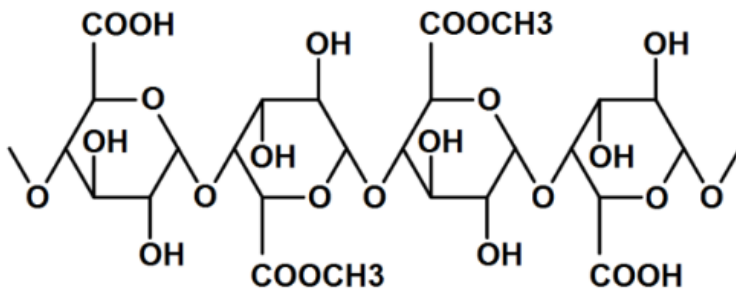


Figura 6. Estructura molecular básica de la pectina (Zegada, 2015).

#### 1.6.2.4 Alginato

El alginato es la sal del ácido algínico, un polímero natural de ácidos urónicos (ácidos manurónicos y gularónicos) extraído especialmente de las algas marinas pardas y también de algunas bacterias, como *Pseudomonas aeruginosa*. Un uso importante del alginato en la actualidad es en la tecnología de encapsulación gracias a su biocompatibilidad y capacidad de formar un hidrogel mediante enlaces cruzados iónicos con cationes divalentes, como los iones de calcio. El alginato está formado por cadenas de ácido β-D-manurónico (unidades M) y α-L-ácido gularónico (unidades G), unidos a través de enlaces β (1 → 4) glicosídicos en secuencias MM y enlaces α (1 → 4) glicosídicos en secuencias GG y GM (Fig. 7). Este polisacárido es ampliamente utilizado en varios métodos de encapsulación, tales como la extrusión, el secado por atomización y la coacervación compleja en conjunción con gelatina y proteína de suero de leche (Bennacef *et al.*, 2021). El alginato se ha utilizado para encapsular compuestos hidrofóbicos, como el caso de aceite rico en omega-3 (Hamed *et al.*, 2020), y compuestos hidrofílicos, como lo reportado en compuestos fenólicos de rábano (Tsai, Kitamura & Kokawa, 2017).

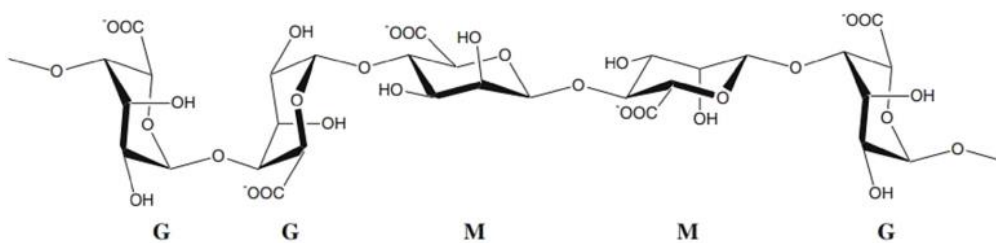


Figura 7. Características estructurales del alginato. M: residuo de manuronato; G: residuo de gularonato (Bennacef *et al.*, 2021).

## 2. Justificación

Las betalaínas son pigmentos vegetales utilizados para impartir color a diversos alimentos, además pueden ofrecer un valor adicional ya que se sabe que estos compuestos tienen varias propiedades funcionales, principalmente su actividad antioxidante. La principal fuente de estos pigmentos es el betabel; sin embargo, es necesario estudiar y caracterizar otras especies vegetales que ofrezcan beneficios adicionales desde un punto de vista agronómico, por ejemplo, especies nacionales de fácil cultivo y adaptadas al clima del país, así como ventajas desde un punto de vista composicional, esto es, que ofrezcan una mayor variedad de betalaínas y coloraciones, además de aportar otros compuestos bioactivos y nutrientes. Las especies del género *Opuntia* pueden ofrecer estas ventajas.

Es importante considerar que para producir aditivos alimentarios a partir de especies vegetales es indispensable desarrollar tecnologías y procesos orientados al mejoramiento de los rendimientos de extracción de los compuestos de interés, que aumenten o mantengan su estabilidad y que sean amigables con el ambiente. Sumado a lo anterior, la encapsulación de los compuestos de interés mediante metodologías como la coacervación compleja podría contribuir a mantener su integridad ante factores ambientales, así como a ampliar sus posibles aplicaciones.

### **3. Hipótesis**

La caracterización de distintas variedades de tuna hará posible identificar los frutos con el mayor contenido de betalaínas y otros parámetros tales como la capacidad antioxidante. En las variedades seleccionadas, la aplicación de distintos métodos de extracción en la pulpa de tuna permitirá establecer el mejor proceso para la obtención de betalaínas y otros compuestos, mientras que la aplicación de distintas temperaturas en los extractos obtenidos permitirá caracterizar y comparar la termo-estabilidad de las betalaínas. La coacervación compleja con distintos sistemas de biopolímeros hará posible la encapsulación de las betalaínas en los extractos de pulpa de tuna.

#### **4. Objetivo general**

Caracterizar la pulpa de distintas variedades de frutos del género *Opuntia*, establecer el proceso de extracción, caracterizar su termo-estabilidad y evaluar el proceso de coacervación compleja como método de encapsulación en las betalainas y otros compuestos funcionales.

#### **5. Objetivos particulares**

Caracterizar cuatro variedades del género *Opuntia* cultivadas en San Martín de las Pirámides, Estado de México, para seleccionar los frutos con mayor cantidad de betalainas y otras características de interés como el color.

Evaluar distintos factores y metodologías no convencionales para establecer el mejor proceso de extracción de betalainas y otros compuestos funcionales provenientes de las variedades de tuna seleccionadas.

Caracterizar la termo-estabilidad de las betalainas y otros compuestos bioactivos presentes en los extractos.

Evaluar el proceso de coacervación compleja como posible método de encapsulación de las betalainas y otros compuestos funcionales provenientes de las variedades seleccionadas.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Material biológico

Las variedades de tuna (*O. ficus-indica*) utilizadas en este estudio (Fig. 8) provinieron de plantaciones ubicadas en el municipio de San Martín de las Pirámides, Estado de México. Las variedades recolectadas, así como la localización de los cultivos en coordenadas *GPS* (obtenidas de forma aproximada mediante los servicios de geolocalización de *Google*), fueron *Mandarina* (19.789 Lat.; -98.729 Long.) (Fig. 8A-B) en dos estados de madurez (madurez de consumo y madurez “3/4”), *Vigor* (19.702 Lat.; -98.833 Long.) (Fig. 8C), *Pirámides* (19.698 Lat.; -98.827 Long.) (Fig. 8D) y *Pelota* (19.820 Lat.; -98.713 Long.) (Fig. 8E). Todo el material se recolectó el 24 de julio de 2018 y se trasladó el mismo día a las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. Los frutos se lavaron con agua potable para remover las espinas y después se desinfectaron con agua clorada a 100 ppm, para cada variedad se formaron tres grupos de tunas de tamaños iguales, los frutos se pelaron y la pulpa se homogenizó mediante el uso de un triturador doméstico. El homogenizado obtenido se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -70 °C hasta el momento de su uso. Todos los análisis y experimentos se realizaron por triplicado, donde cada réplica correspondió a cada grupo.

Ya que el betabel es la fuente de betalaínas más utilizada a nivel industrial y la más reportada en estudios relacionados con estos pigmentos, como material de referencia en la caracterización de las variedades de tuna se utilizó esta hortaliza adquirida en un comercio local. El material se picó, se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

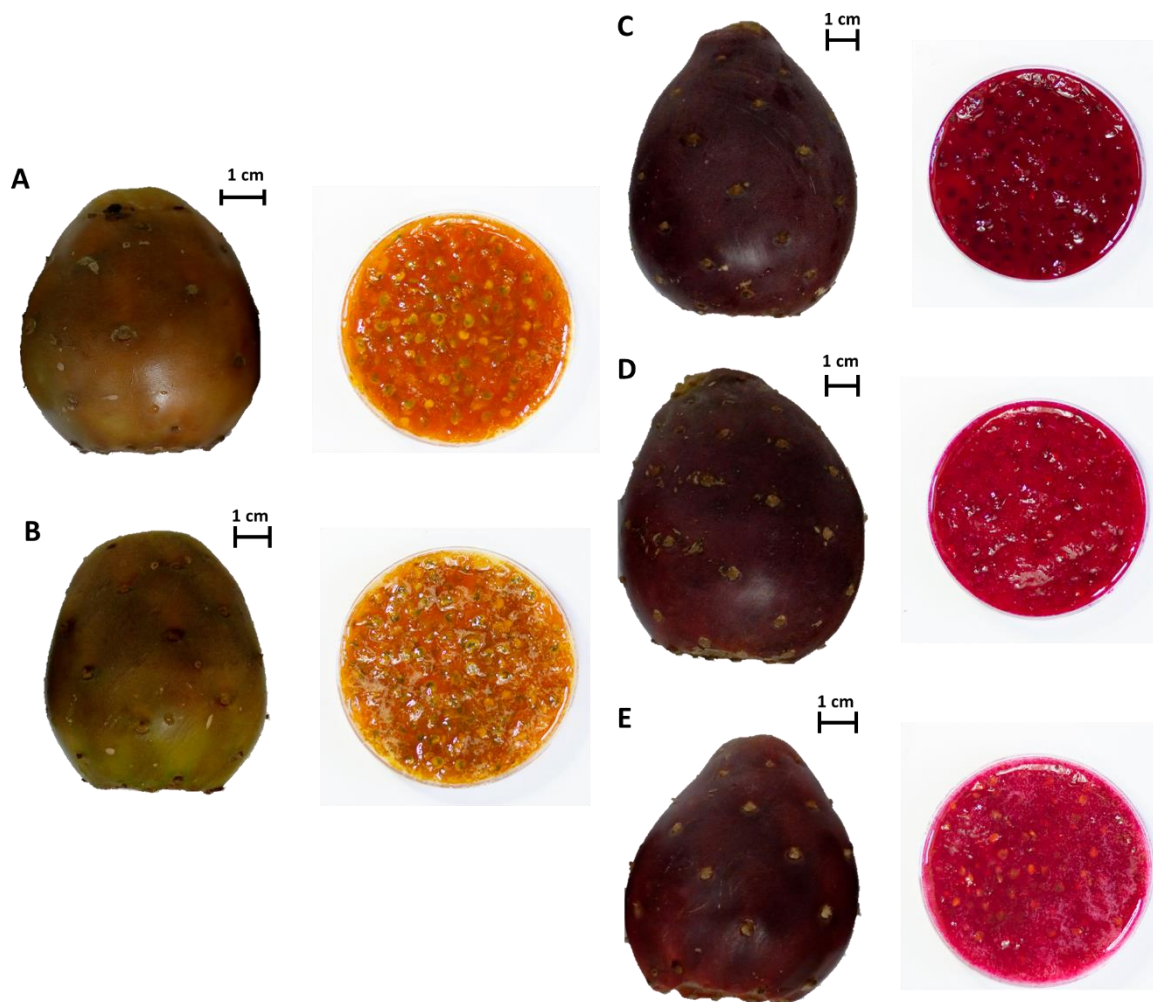


Figura 8. Frutos y pulpa de las variedades de tuna caracterizadas en este estudio. Mandarinina (A), Mandarinina 3/4 (B), Vigor (C), Pirámides (D) y Pelota (E).

## 6.2 Caracterización química y color en pulpa

### 6.2.1 Sólidos solubles totales (°Brix)

La determinación de los grados brix en la pulpa de cada variedad se realizó con un refractómetro (*ERMA INC. TOKIO*®).

### 6.2.2 Acidez titulable y pH

La acidez titulable se determinó en cada variedad siguiendo el método de la *AOAC 942.15* (*AOAC, 2000*). Se pesaron 5 g de pulpa y se adicionaron 25 mL de agua destilada, el pH inicial se registró con un potenciómetro y posteriormente se llevó a cabo una titulación con NaOH

0.1 N hasta llegar a un pH de 8.2. La acidez se expresó en porcentaje de ácido cítrico para tuna y en porcentaje de ácido oxálico para betabel.

#### 6.2.3 Humedad

La humedad de la pulpa se determinó mediante el método de la AOAC 925.09 (AOAC, 2000), con algunas modificaciones. Por triplicado, se pesaron 5 g de pulpa y se colocaron en un horno de laboratorio a 50 °C hasta registrar un peso constante.

#### 6.2.4 Color

Adicionalmente, los parámetros de color L\*a\*b\* se midieron en la pulpa de las variedades de tuna con un colorímetro CHROMA METER CR-400 (*Konica Minolta Sensing, Inc.*).

### **6.3 Determinación espectrofotométrica de betaxantinas y betacianinas**

#### 6.3.1 Extracción acuosa (extracción convencional)

Se añadió agua a la pulpa de tuna en una relación masa:volumen de 1:2 (g/mL), se agitó con vórtex por 30 s (3000 rpm) y se centrifugó a 25 000 g por 5 min a 4 °C. Posterior a la separación del sobrenadante, el proceso de adición de agua, agitación y centrifugación se repitió dos veces el procedimiento para asegurar una mayor extracción de los compuestos de interés. Finalmente, los sobrenadantes se mezclaron (Castellar *et al.*, 2003; Pérez-Loredo *et al.*, 2016). En el caso del betabel, el proceso de extracción se adecuó a la materia prima. La extracción se llevó a cabo utilizando agua como solvente en una relación masa:solvente de 1:5 (g/mL), se agitó con vórtex durante 30 s (3000 rpm) y se centrifugó a 30 000 g por 10 min a 4 °C. El procedimiento se repitió dos veces y finalmente los sobrenadantes se mezclaron.

Los extractos obtenidos por el método descrito en esta sección también se utilizaron para la cuantificación de la capacidad antioxidante por ABTS y DPPH, y la cantidad de compuestos fenólicos totales en la caracterización de la pulpa de las variedades de tuna.

#### 6.3.2 Cuantificación espectrofotométrica de betalaínas

Posterior a la extracción acuosa, los contenidos de betacianinas y betaxantinas se determinaron de forma espectrofotométrica en los extractos y se expresaron en términos



de las betalaínas mayoritarias en los frutos de *Opuntia*: betanina para betacianinas, e indicaxantina en el caso de betaxantinas (García-Cayuela *et al.*, 2019). Las concentraciones de betalaínas se calcularon con las siguientes ecuaciones (Yahia & Mondragon-Jacobo, 2011).

$$BEC [g/L] = \frac{A_{538 \text{ nm}} * FD * 550 \frac{g}{mol} * 1000}{60000 \frac{L}{mol * cm} * l (cm)}$$

$$BEX [g/L] = \frac{A_{483 \text{ nm}} * FD * 308 \frac{g}{mol} * 1000}{48000 \frac{L}{mol * cm} * l (cm)}$$

Donde  $A_{538 \text{ nm}}$  y  $A_{483 \text{ nm}}$  son las absorbancias de la betanina y la indicaxantina, respectivamente, *BEC* es la concentración de betacianinas y *BEX* la de betaxantinas, *FD* es el factor de dilución y *l* es la longitud de paso óptico de la celda. 550 y 308 g/mol corresponden a los pesos moleculares de la betanina e indicaxantina, respectivamente. 60,000 y 48,000 L/mol\*cm son las absortividades molares de la betanina e indicaxantina, respectivamente (Yahia & Mondragon-Jacobo, 2011). En el caso de betaxantinas de betabel se utilizó el peso molecular la Vulgaxantina-I (339 g/mol), la betaxantina mayoritaria en esta hortaliza (Stintzing, Schieber & Carle, 2002). En adición, en los extractos acuosos se registró el espectro de absorción (200 – 700 nm).

#### 6.4 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales

En los extractos acuosos de tuna y betabel (sección 6.7.1), se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales mediante el método de *Folin-Ciocalteu*. Se mezclaron 200 µL de extracto con 1 mL de reactivo de *Folin-Ciocalteu* (diluido con agua destilada en una relación 1/5 v/v). Después de 1 min se adicionaron 0.8 mL de carbonato de sodio al 7.5% p/v y las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 1 h. Finalmente se midió la absorbancia a 765 nm. El cálculo de concentraciones se realizó mediante una curva patrón de ácido gálico (Pinedo-Espinoza *et al.*, 2017).

## 6.5 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante mediante los métodos de ABTS y DPPH se determinó en los extractos acuosos de pulpa de tuna y betabel.

### 6.5.1 ABTS

El catión radical  $ABTS^{•+}$  tiene una absorbancia máxima a 734 nm, lo que produce una coloración “verde azulada”. Este radical se produce por la pérdida de un electrón en el átomo de nitrógeno de la molécula de ABTS [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)]. En presencia de Trolox (u otro compuesto antioxidante capaz de donar un átomo de hidrógeno) el átomo de nitrógeno se reduce, produciendo una disminución del color en el medio (Pisoschi & Negulescu, 2012).

Para la determinación de la capacidad antioxidante en los extractos acuosos de tuna y betabel, primero se preparó una solución añadiendo 96.2 mg de ABTS a 100 mL de agua destilada y para generar el radical  $ABTS^{•+}$ , se agregaron 16.5 mg de persulfato de potasio. Esta solución se preparó 16 h antes de su uso. Posteriormente, la solución de *ABTS* se diluyó con agua hasta obtener una absorbancia de 0.7 y se añadió 1 mL de esta a 100  $\mu$ L de extracto. Después de 10 min de reacción se midió la absorbancia a 734 nm. El cálculo de concentraciones se realizó utilizando una curva patrón de Trolox y los resultados se expresaron en  $\mu$ mol Trolox/g de peso seco (Re *et al.*, 1999; Pinedo-Espinoza *et al.*, 2017).

### 6.5.2 DPPH

El radical  $DPPH^{•}$  (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) es estable debido a la deslocalización del electrón desapareado en la molécula completa. La deslocalización produce un color púrpura, con una absorbancia máxima alrededor de 520 nm. Cuando el  $DPPH^{•}$  reacciona con un antioxidante donador de hidrógeno, se produce la forma reducida DPPH, acompañada de la disminución del color. La disminución en la absorbancia depende linealmente de la concentración de compuestos antioxidantes en el medio (Pisoschi & Negulescu, 2012).

Para las determinaciones de la capacidad antioxidante mediante DPPH en los extractos acuosos de pulpa de tuna, se diluyeron 24 mg de DPPH en 100 mL de metanol a 4 °C. Posteriormente se añadió 1 mL de solución diluida de DPPH (con una absorbancia de 1.1 a 515 nm) a 100 µL extracto. Después de 30 min de reacción, se midió la absorbancia a 515 nm. Las concentraciones se determinaron con una curva patrón de Trolox y los resultados se expresaron en µmol Trolox/g de peso seco (Pinedo-Espinoza *et al.*, 2017).

## **6.6 Identificación de betalaínas en extractos de tuna mediante HPLC**

### **6.6.1 Semisíntesis y purificación de betaxantinas**

Se realizó la semisíntesis de indicaxantina para su identificación en la pulpa de tuna. Se hidrolizaron 10 mg de betanina en 1 mL de NH<sub>4</sub>OH 3 N, se agitó en vórtex para asegurar la disolución del pigmento, y se monitoreó la hidrólisis para formar ácido betalámico mediante mediciones de absorbancia a 420 nm durante 45 min a temperatura ambiente. Posteriormente, el ácido betalámico producido en la reacción anterior se mezcló con L-prolina, disuelta en HCL 0.1 N, en proporción 10:1 aminoácido:betanina (mol:mol) y se registró la absorbancia a 483 nm de 20 min a 60 min para asegurar un máximo de absorbancia. La mezcla de reacción se concentró en rotavapor utilizando vacío a 30 °C (*BÜCHI R-200*, *BÜCHI Heating Bath B-490* y *BÜCHI Vacuum Pump V-100*) y el residuo sólido se resuspendió en 1 mL de agua. La betaxantina obtenida se purificó en una columna de vidrio (1 cm d. i. X 46 cm) utilizando 3 g de fase inversa C18 (7 cm de altura dentro de la columna). Primero, se activó la columna eluyendo 15 mL de metanol seguidos de 15 mL de agua acidificada con ácido trifluoacético (TFA) a pH 2. Posteriormente, se añadió la mezcla de reacción de la indicaxantina seguida de dos volúmenes de agua acidificada. Para la elución de la betaxantina se añadieron 10 mL de metanol y se midió el pH en la solución metanólica para asegurar un valor entre 6 y 7 (Stintzing, Schieber & Carle, 1999; Kugler, Stintzing & Carle, 2004; Castellanos-Santiago & Yahia, 2008).

### **6.6.2 Metodología HPLC**

De manera complementaria, en la variedad de mayor contenido de betalaínas, variedad púrpura *Vigor*, y en la variedad amarillo-naranja *Mandarina* se llevó a cabo la identificación

de betalaínas mediante HPLC. Se utilizó un equipo HPLC *Shimadzu SPD-10A*, equipado con un detector *SPD 10A UV/Vis* y una columna *Zorbax Eclipse XDB* (4.6 mm x 250 mm, 5 µm). Se utilizó un flujo de 0.5 mL/min y un volumen de inyección de 50 µL para la elución. Como fase móvil se utilizó una mezcla de agua con 0.1% (v/v) de ácido fórmico (fase A) y acetonitrilo con 0.1% (v/v) de ácido fórmico (fase B). Se realizó el siguiente gradiente: 0-10% B (0-25 min), 10-15% B (25- 34 min), 15-18% B (34-43 min), 18-50% B (43-60 min). Las betacianinas y las betaxantinas se identificaron a 535 y 480 nm, respectivamente (García-Cruz *et al.*, 2017). Como compuestos de referencia se utilizó indicaxantina obtenida mediante semisíntesis y un estándar comercial de betanina (Sigma-Aldrich). Los tiempos de retención obtenidos para ambas betalaínas se compararon con los obtenidos en los extractos acuosos de pulpa de tuna.

### **6.7 Evaluación de distintos factores y métodos no convencionales sobre el proceso de extracción de betalaínas de pulpa de tuna *Vigor* y *Mandarina***

Con el objetivo de evaluar el efecto de distintos factores sobre el proceso de extracción, se llevaron a cabo experimentos en la pulpa de las variedades *Vigor* (Fig. 6C) (coloración púrpura y la de mayor contenido de betalaínas) y *Mandarina* (Fig. 6A) (coloración amarillo-naranja). Como variables respuesta en estos experimentos se cuantificó la cantidad de betalaínas, la cantidad de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante determinada mediante los métodos de ABTS y DPPH. En el caso de la tuna *Vigor*, solo se tomó en cuenta la cantidad de betacianinas, mientras que en la tuna *Mandarina* solo se consideró la cantidad de betaxantinas. Todos los resultados se expresaron en base húmeda.

#### **6.7.1 Evaluación del número de extracciones y el estado de la materia prima**

Para evaluar el efecto del número de extracciones en combinación con el estado de la materia prima se realizó un experimento factorial 3X2 con tres niveles para el número de extracciones y dos niveles para el estado de la materia prima (cuadro 2).

**Cuadro 2. Valores tomados en cuenta para el experimento factorial 3X2**

<b>Factor</b>	Número de extracciones	Estado de la materia prima
<b>Niveles</b>	1, 2 y 3	Pulpa fresca y liofilizada

Para cada tratamiento se añadió agua destilada para obtener una proporción masa:solvente de 1:2 (g/mL), se agitó con vórtex durante 30 s (3000 rpm) y se centrifugó a 25 000 g durante 5 min a 4 °C. Para la pulpa liofilizada se pesaron cantidades equivalentes a las de la pulpa fresca tomando en cuenta la humedad de la pulpa y se añadió la misma cantidad de agua.

#### 6.7.2 Evaluación de la concentración de etanol y la relación masa:volumen

Para la evaluación del efecto de la concentración de etanol y la relación masa:volumen sobre el proceso de extracción de compuestos funcionales se realizó un experimento factorial 3<sup>2</sup> (cuadro 3).

**Cuadro 3. Valores tomados en cuenta para el experimento factorial 3<sup>2</sup>**

<b>Factor</b>	Porcentaje de etanol en agua (% v/v)	Relación masa:volumen (g/mL)
<b>Niveles</b>	0, 30 y 60	1:1, 1:4 y 1:7

De acuerdo con el tratamiento de extracción, se añadió el volumen de solvente necesario a la pulpa de tuna, la muestra se agitó con vórtex durante 30 s (3000 rpm), y se centrifugó a 25 000 g durante 5 min a 4 °C.

#### 6.7.3 Evaluación de la aplicación de ultrasonido y ultrasonido-microondas

Para la evaluación de metodologías no convencionales de extracción se plantearon experimentos donde solo se consideró el tiempo de aplicación (cuadro 4).

**Cuadro 4. Valores considerados en experimentos de extracción de un solo factor**

<b>Método de extracción</b>	<b>Tiempo de extracción (min)</b>
Ultrasonido	0, 3 y 6
Microondas-ultrasonido	0, 5 y 10

Para la aplicación de ultrasonido se añadió agua destilada a la pulpa de tuna en relación 1:2 masa:volumen (g/mL) y se utilizó un sonotrodo (*SONICS vibra cell TM, 20 kHz, model VCX130PB*) manteniendo una amplitud fija (80%) con una frecuencia. En el caso de ultrasonido-microondas se añadió agua destilada a la pulpa de tuna en relación 1:10 masa:volumen (g/mL) y se utilizó un equipo CW-2000A (*Ultrasonic-Microwave Cooperative*

*Extractor/Reactor*) con una potencia de 400 W para microondas y una frecuencia de 40 kHz para ultrasonido.

### **6.8 Análisis de la estabilidad por efecto de la temperatura en extractos de betabel y tunas *Vigor y Mandarina***

Para el análisis de la estabilidad se realizaron extractos acuosos de betabel y pulpa de tunas *Vigor y Mandarina* siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.7.1. La estabilidad térmica de las betacianinas y de betaxantinas se caracterizó por separado. Para la estabilidad de betacianinas, solo se utilizaron los extractos de pulpa de tuna púrpura *Vigor*, mientras que para la estabilidad de betaxantinas solo se consideraron los extractos de la tuna amarillo-naranja *Mandarina*, tomando en cuenta su potencial como fuente de pigmentos amarillos. En ambos casos, se incluyeron extractos de betabel como referencia. La absorbancia de los extractos acuosos se ajustó a 0.7 a 538 nm para betacianinas, y a 0.7 a 483 nm para betaxantinas. Se añadieron alícuotas de 5 mL a viales de vidrio y se probaron cinco temperaturas (50, 60, 70, 80 y 90 °C) de forma independiente durante nueve tiempos de muestreo (0, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180 y 240 min) colocando los extractos en un horno de laboratorio (*Lab-line Instruments, INC., Model 3608*). Los viales de vidrio se muestrearon en cada tiempo por triplicado, y se enfriaron inmediatamente en un baño de agua a 4 °C. Se cuantificaron las betalaínas de forma espectrofotométrica, compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante mediante ABTS y DPPH. Los resultados para cada variable se expresaron como un porcentaje de retención siguiendo la siguiente ecuación (Gengatharan, Dykes & Choo, 2016; Otálora *et al.*, 2016; Rodríguez-Sánchez, Cruz y Victoria & Barragán-Huerta, 2017).

$$\text{Porcentaje de retención (PR) (\%)} = \frac{C_t}{C_0} * 100$$

Donde  $C_0$  es la concentración inicial y  $C_t$  es la concentración a un tiempo determinado de muestreo.

Solo en el caso de betalaínas, se obtuvo una constante de velocidad de degradación térmica (k) ajustando los datos a un modelo de primer orden para cada temperatura ensayada. A

partir de estos modelos se calculó la vida media ( $t_{1/2}$ ) y posteriormente se calculó la energía de activación (AE) de betacianinas y betaxantinas ajustando las constantes de degradación a un modelo de *Arrhenius*, con AE en kJ/mol, temperatura (T) en K, y  $R = 8,3143 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  (Tsai *et al.*, 2010).

## **6.9 Establecimiento del proceso de coacervación compleja para la encapsulación de betalaínas de tuna**

### 6.9.1 Obtención de extractos acuosos de betalaínas

Se realizó la extracción de betalaínas de betabel y de las pulpas de tuna *Vigor* y *Mandarina* de acuerdo con lo descrito en la sección 6.7.1. Posteriormente, para retirar el mucilago, en el caso de los extractos de tuna, y la proteína, y que estos biopolímeros no interfirieran con el proceso de coacervación, se añadió a los extractos etanol al 96% (v/v) en relación 1:1 (mL/mL), se agitaron por 20 min y se filtraron con un embudo Büchner y papel filtro (Whatman, celulosa, 20  $\mu\text{m}$ ). El etanol se eliminó mediante vacío en un rotavapor a 30 °C y los extractos se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su uso (Stintzing, Schieber & Carle, 2002).

### 6.9.1 Punto de equivalencia en soluciones de proteína de soya, pectina y alginato

Para la determinación del punto de equivalencia se prepararon soluciones de proteína de soya (*Fabpsa FABPSAPROY 204*), pectina cítrica (*Camén Química*) y alginato de sodio (*Deiman*) comerciales al 0.5% p/v. Posteriormente, se tomaron 15 mL de solución de polímero y se tituló con la adición de alícuotas de 0.2 mL de NaOH 0.1 N hasta alcanzar un pH aproximadamente constante ( $\approx 11$ ). Entre cada adición de NaOH se esperaron 60 s para asegurar el equilibrio y el pH se registró con un potenciómetro a temperatura ambiente. El punto de inflexión de la titulación, calculado como  $\Delta\text{pH}$ , se consideró como el punto de equivalencia (Espinosa-Andrews *et al.*, 2010).

### 6.9.2 pH óptimo para llevar a cabo el proceso de coacervación

Para la determinación del pH óptimo de coacervación se tomaron en cuenta los miliequivalentes de cada solución de polímero obtenidos en la sección 6.9.1. Se

consideraron dos sistemas de polímeros, alginato-proteína de soya y pectina-proteína de soya, y cuatro valores de pH (2, 3, 4 y 5). Para cada sistema y valor de pH se mezclaron volúmenes de las soluciones (0.5% p/v) asegurando la proporción entre equivalentes de cada polímero (cuadro 5) y se ajustó el pH con HCl 0.1 N. La mezcla de polímeros se agitó por 30 min a temperatura ambiente e inmediatamente se midió la absorbancia a 600 nm. El pH donde se obtuvo la mayor absorbancia a 600 nm se consideró como el pH óptimo. Todas las pruebas se realizaron por triplicado (Calderón-Oliver *et al.*, 2017).

**Cuadro 5. Volúmenes de polímeros utilizados para determinar el pH óptimo de coacervación compleja**

<b>Sistema de polímeros</b>	<b>Proteína de soya (mL)</b>	<b>Alginato o pectina (mL)</b>
Alginato-Proteína de soya	4.8	3
Pectina-Proteína de soya	3	5

### 6.9.3 Potencial Zeta

Los valores de potencial Zeta se utilizaron como indicativo de las cargas eléctricas en las soluciones de polímeros. Para favorecer la coacervación es deseable que en uno de los compuestos o polímeros usados predominen cargas positivas (valores positivos de potencial Zeta) y en el otro predominen cargas negativas (valores negativos de potencial Zeta) (Rocha-Selmi *et al.*, 2013).

En las soluciones de proteína de soya, alginato y pectina (0.5% p/v) se midió el potencial Z con un equipo *Zetasizer Nano series (Nano-75)* en valores de pH de 2, 3, 4 y 5. El pH de cada solución se ajustó con HCl 0.1 N.

### 6.9.4 Proceso de coacervación compleja de betalaínas

Para el establecimiento del proceso de coacervación se realizaron dos experimentos <sup>23</sup> independientes, uno para betacianinas de tuna *Vigor* y otro para betaxantinas de tuna *Mandarina* (cuadro 6).



**Cuadro 6. Diseño experimental para la encapsulación de betalaínas mediante coacervación compleja (los niveles de cantidad de betacianinas y betaxantinas se consideraron en experimentos separados).**

<b>Factor</b>	<b>Nivel 1</b>	<b>Nivel 2</b>
Sistema de polímeros	Alginato-Proteína de soya	Pectina-Proteína de soya
Absorbancia para betacianinas (538 nm) o betaxantinas (483 nm)	0.6	1.2
Fuente de betalaínas	Pulpa de tuna	Betabel

Para fijar las cantidades de betalaínas, la absorbancia de los extractos acuosos de pulpa de tuna y betabel se ajustó a 538 nm para el experimento de betacianinas y a 483 nm para el experimento de betaxantinas. Se tomaron en cuenta las cantidades de polímeros establecidas previamente, así como el pH óptimo de cada sistema. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Se tomó el volumen necesario de solución de proteína de soya (0.5% p/v) (cuadro 5) y se añadieron 2 mL del extracto de betalaínas correspondiente. La mezcla se agitó con vórtex por 30 s (3000 rpm), se añadió la solución de polisacárido (cuadro 5) y se volvió a agitar con vórtex por 30 s (3000 rpm). El pH de la mezcla se ajustó con HCl 0.1 N al valor óptimo de cada sistema de polímeros y se refrigeró a 4 °C por 24 h para favorecer la separación de fases (Calderón-Oliver *et al.*, 2017).

#### 6.9.5 Diseño de superficie de respuesta para mejorar la eficiencia de encapsulación de betalaínas

Con el objetivo de aumentar las eficiencias de encapsulación de las betalaínas provenientes de pulpa de tuna se llevó a cabo un diseño de Box-Behnken considerando tres factores: el porcentaje de proteína de soya, el pH del medio para llevar a cabo la coacervación y la concentración de betacianinas de tuna *Vigor* o betaxantinas de tuna *Mandarina* (cuadro 7). El diseño consistió en 16 tratamientos, los cuales se corrieron por duplicado y completamente al azar.

**Cuadro 7. Factores y niveles considerados en el diseño de superficie de superficie de respuesta (Box-Behnken) para llevar a cabo el proceso de encapsulación de betalaínas mediante coacervación compleja.**

Factor	Niveles		
	-1	0	+1
pH del medio	3	4	5
Porcentaje de proteína de soya (% p/v)	0.5	1.25	2.0
Absorbancia para betacianinas (538 nm) o betaxantinas (483 nm)	0.2	0.6	1.0

En el diseño solo se utilizó al sistema pectina-proteína de soya, lo que se estableció tomando en cuenta la alta viscosidad (visualmente parecida a la de la miel) de las soluciones de alginato con concentraciones por arriba del 0.5% p/v, lo que dificultó su manejo. Los porcentajes de proteína de soya se establecieron tomando en cuenta los volúmenes necesarios, tanto de proteína como de pectina, para llevar a cabo el proceso de coacervación así como la mayor concentración de pectina necesaria para asegurar la proporción masa:masa entre proteína y polisacárido. El porcentaje de pectina se fijó al 1% p/v ya que a porcentajes mayores su manejo también se complicó por la alta viscosidad. En relación a los niveles de pH, estos se establecieron tomando en cuenta los resultados obtenidos en las pruebas de turbidez y potencial Z para el sistema pectina-proteína de soya. El pH de 2 no se consideró ya que a un pH por debajo de 3 se observó una pérdida total del color en los extractos de ambas variedades de tuna y de betabel.

Para llevar cabo cada tratamiento se siguió un procedimiento similar al descrito en la sección anterior. Se tomó el volumen necesario de solución de proteína de soya (cuadro 8) y se añadieron 2 mL del extracto de betalaínas correspondiente. La mezcla se agitó con vórtex por 30 s (3000 rpm), se añadió la solución de pectina al 1% p/v (cuadro 8) y se volvió a agitar con vórtex por 30 s (3000 rpm). El pH de la mezcla se ajustó con HCl 0.1 N al valor indicado en el tratamiento y se refrigeró a 4 °C por 24 h para favorecer la separación de fases.

**Cuadro 8. Volúmenes requeridos de soluciones de biopolímeros para llevar a cabo el proceso de coacervación compleja en cada tratamiento del diseño de Box-BehnKen.**

Porcentaje de proteína de soya (% p/v)	Volumen de proteína (mL)	Volumen de pectina al 1% p/v (mL)
0.5	6	5
1.25	6	12.5
2.0	6	20

#### 6.9.6 Determinación de la eficiencia de encapsulación

Después de la separación de fases, las muestras se centrifugaron a 25 000 *g* por 15 min a 4 °C (*Beckman Coulter, Avanti J-30I*), el sobrenadante se decantó y al pellet, el coacervado aislado, se le añadieron 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos (pH 7). Posteriormente las muestras se agitaron con vórtex por 1 min (3000 rpm) y se colocaron en un baño con ultrasonido (*Unisonic Universal Photonics*) a 60 Hz por 5 min para asegurar la completa disociación del coacervado y la liberación de los compuestos de interés (Rocha-Selmi *et al.*, 2013). Finalmente, las muestras se centrifugaron a 25 000 *g* por 1 h a 4 °C y se decantó el sobrenadante, en el cual se cuantificó la concentración de betalaínas de forma espectrofotométrica (sección 6.3). Los resultados se expresaron como un porcentaje con la siguiente ecuación.

$$EE\ BET\ (\%) = \frac{C_{encapsulado}}{C_{extracto}} * 100$$

Donde *EE BET* es la eficiencia de encapsulación de betalaínas (betacianinas o betaxantinas),  $C_{encapsulado}$  es la cantidad de pigmentos en el disociado del encapsulado y  $C_{extracto}$  es la cantidad inicial de pigmentos en el extracto sin encapsular.

#### 6.10 Análisis de datos

El diseño de experimentos, el análisis estadístico y las gráficas de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante el programa estadístico *R* (R Core Team, 2020) y los paquetes *tidyverse* (Wickham *et al.*, 2019) y *agricolae* (de Mendiburu, 2020). En los resultados experimentales de la caracterización de las variedades de tuna, la evaluación de distintos factores sobre el proceso de extracción, la estabilidad térmica y el establecimiento del proceso de coacervación compleja, los datos se analizaron mediante análisis de varianza

(ANOVA) con un nivel de significancia de 0.05 y pruebas de *Tukey* para la comparación entre medias. Para la comparación de las energías de activación obtenidas en las pruebas de estabilidad térmica, se realizó una prueba de *t* con un nivel de significancia de 0.05. En adición, con los datos de caracterización de las cuatro variedades de tuna y de betabel se llevó a cabo un análisis de componentes principales.

## 7. Resultados

### 7.1 Caracterización de las variedades de tuna (*O. ficus-indica*) provenientes de San Martín de las Pirámides

#### 7.1.1 Caracterización química de la pulpa

Los resultados de caracterización química y parámetros de color se muestran en el cuadro 9. La acidez titulable se expresó en porcentajes de los ácidos mayoritarios, ácido cítrico para tuna y ácido oxálico para betabel.

Para tuna, el valor de sólidos solubles totales puede considerarse un índice de madurez y se requieren valores > 12-13% para garantizar que el fruto tenga una buena calidad (Andreu *et al.*, 2018; FAO, 2018). Considerando el rango anterior de sólidos solubles totales, las tres variedades púrpuras y la variedad amarilla-naranja en sus dos estados de madurez tuvieron valores aceptables y similares a lo reportado en variedades verdes de *O. ficus-indica* (10 – 15.7%) (Andreu *et al.*, 2018). Los valores de pH, acidez titulable y humedad también fueron similares a lo reportado en variedades de tuna verdes, amarillas, amarillo-naranjas y rojo-naranjas cultivadas en Brasil y España con valores de pH entre 5.41 y 6.15, acidez titulable entre 0.022 y 0.07%, y un porcentaje de humedad entre 79.0 y 84.4% (de Souza *et al.*, 2015; Andreu *et al.*, 2018; Fernández-López *et al.*, 2018).

En particular, los sólidos solubles totales de la variedad *Mandarina* fueron dos veces más altos, los de acidez titulable más bajos (en un 44%) y la relación entre las variables anteriores (SST/AT) fue dos veces mayor en comparación con la variedad *Pelota*, en la que se registraron los menores valores de estos parámetros (cuadro 9). La relación SST/AT podría desempeñar un papel en la aceptabilidad de la tuna, aunque se requiere más investigación relacionada con el análisis sensorial de los frutos enteros y su relación con diferentes parámetros químicos.

Cuadro 9. Caracterización química y parámetros de color en betabel y variedades de tuna. Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

	<b>Mandarina 3/4</b>	<b>Mandarina</b>	<b>Pelota</b>	<b>Pirámides</b>	<b>Vigor</b>	<b>Betabel</b>
AT (%)	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.09 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.05 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.12 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
pH	6.5 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	6.6 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	5.3 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>	6.3 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	6.4 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	8.2 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>
SST (%)	13.7 $\pm$ 0.6 <sup>bc</sup>	15.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	14.5 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	14.2 $\pm$ 0.3 <sup>bc</sup>	13.2 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	13.8 $\pm$ 0.3 <sup>bc</sup>
SST / AT	327.8 $\pm$ 33.6 <sup>a</sup>	387.7 $\pm$ 68.5 <sup>a</sup>	164.5 $\pm$ 32.4 <sup>bc</sup>	305.8 $\pm$ 23.5 <sup>a</sup>	279.4 $\pm$ 52.9 <sup>ab</sup>	112.2 $\pm$ 6.1 <sup>c</sup>
Humedad (%)	77.5 $\pm$ 0.5 <sup>c</sup>	78.6 $\pm$ 0.4 <sup>bc</sup>	80.2 $\pm$ 3.4 <sup>abc</sup>	81.7 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	81.5 $\pm$ 0.0 <sup>ab</sup>	82.6 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>
L*	25.1 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	25.4 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>	26.6 $\pm$ 4.4 <sup>a</sup>	17.8 $\pm$ 4.8 <sup>b</sup>	14.5 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	17.3 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>
a*	6.6 $\pm$ 1.6 <sup>c</sup>	7.1 $\pm$ 1.0 <sup>c</sup>	20.2 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	20.7 $\pm$ 4.2 <sup>a</sup>	21.8 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	12.8 $\pm$ 3.1 <sup>b</sup>
b*	15.2 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	14.1 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	5.8 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>	6.3 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup>	6.3 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	2.6 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>

En cuanto a los parámetros de color, la coloración roja de la pulpa de *Vigor* medida a través del parámetro  $a^*$  fue hasta tres veces mayor que la de *Mandarina*, y aproximadamente dos veces mayor que la de betabel. En contraste, la coloración amarilla ( $b^*$ ) y la luminosidad ( $L^*$ ) en la pulpa de *Mandarina* fueron hasta dos veces más altas que las de *Vigor*, y, en comparación con los valores en betabel, los valores de  $L^*$  y  $b^*$  en *Mandarina* fueron dos veces y cinco veces más altos, respectivamente. Lo anterior fue similar a lo reportado en la pulpa de variedades de tuna producidas en Guanajuato, México, con valores de  $a^* = 34.9$ ,  $b^* = 3.9$ , y  $L^* = 34.5$  para una variedad púrpura, y  $a^* = 0.2$ ,  $b^* = 14.6$ , y  $L^* = 58.0$  para una variedad amarilla (Yahia & Mondragon-Jacobo, 2011).

#### 7.1.2 Espectros de absorción y contenido de betalaínas

Los espectros de absorción entre 200 y 700 nm para las variedades de tuna y betabel se muestran en la figura 9. Los máximos de absorción en la variedad *Mandarina*, tanto para el estado de madurez 3/4 como para el fruto completamente maduro, se localizaron en 229, 262-270, 469 y 482-483 nm (Fig. 9A-B). Con relación a las variedades púrpuras (*Vigor*, *Pirámides* y *Pelota*), los máximos de absorción se localizaron en 201-207, en 267-268, en 534-536 nm y en 492 nm solo para la variedad *Pelota* (Fig. 9C-E). Para betabel, los máximos se localizaron en 261, 487 y en 539 nm (Fig. 9F). La longitud de onda de máxima absorción de las betacianinas se ha reportado alrededor de 536 nm y la de betaxantinas alrededor de 483 nm (Gandía-Herrero & García-Carmona, 2013). En el caso de las variedades *Vigor* y *Pirámides*, no fue posible observar un máximo que pudiera corresponder a betaxantinas, lo que podría deberse a la baja proporción de estos pigmentos en relación con el mayor contenido de betacianinas. Los espectros obtenidos entre 400 y 600 nm para las variedades púrpuras mencionadas fueron similares a lo reportado en el colorante obtenido de *Opuntia lasiacantha* (Sánchez *et al.*, 2006).

Tanto en los espectros obtenidos para las variedades de tuna como para el de betabel, se pudo observar un pico de máxima absorción en la región entre 262 y 270 nm. Lo anterior fue similar a lo reportado en jiotilla (*Escontria chiotilla* [Weber] Britton & Rose) a una longitud de onda de 280 nm en extractos realizados con metanol. En estas longitudes de

onda pueden absorber varios compuestos presentes en los extractos, como pueden ser proteínas, compuestos nitrogenados y compuestos fenólicos (Soriano-Santos *et al.*, 2007).

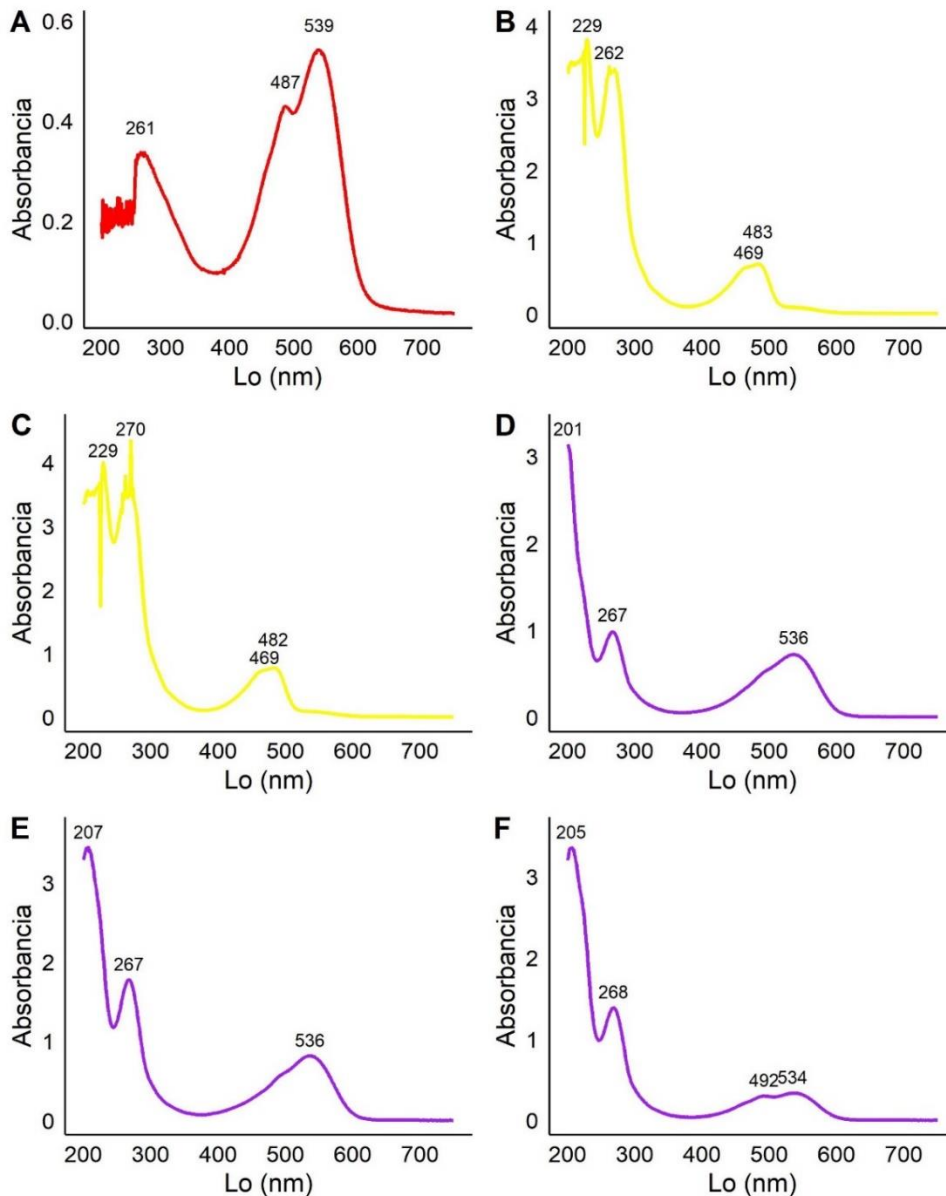


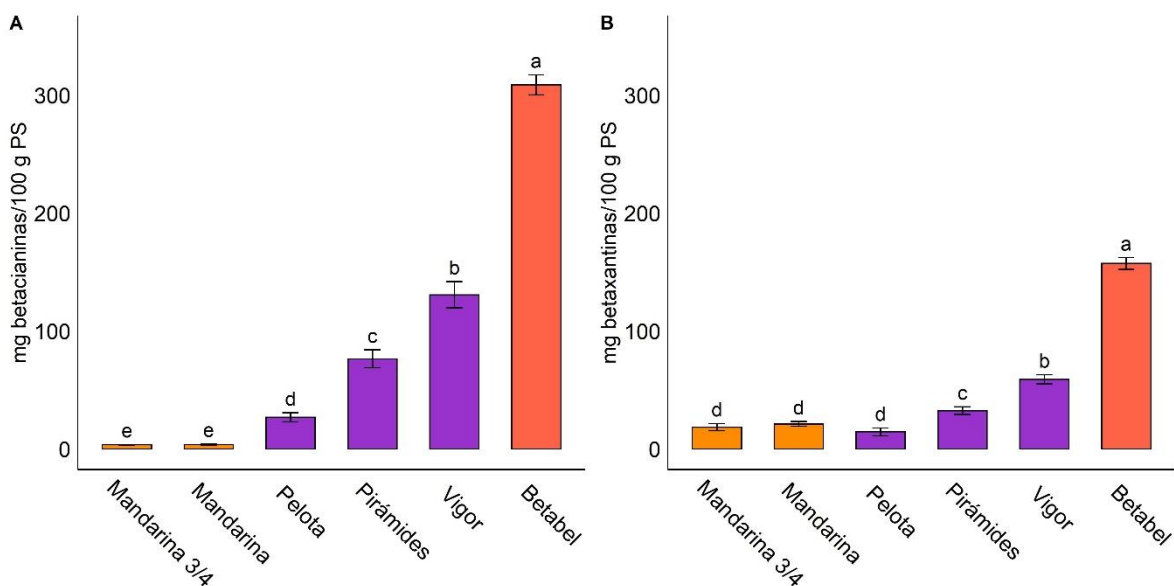
Figura 9. Espectros de absorción obtenidos en extractos acuosos de betabel (A) y tunas *Mandarina* con madurez de consumo (B), *Mandarina* con madurez 3/4 (C), *Vigor* (D), *Pirámides* (E) y *Pelota* (F). Se indican las longitudes de onda en nm donde se registraron máximos de absorción.

Al realizar el cálculo del contenido de betalaínas con la absorbancia obtenida se observó que la variedad *Vigor* presentó un mayor contenido de betacianinas ( $130.7 \pm 11.1$  mg/100 g peso seco), betaxantinas ( $59.0 \pm 3.8$  mg/100 g peso seco) y betalaínas totales ( $189.7 \pm 14.7$  mg/100 g peso seco) en comparación con el resto de las variedades. En comparación con



las otras variedades de tuna caracterizadas, en *Vigor* se registró un 70% más betacianinas que en *Pirámides* y aproximadamente tres veces más betaxantinas que *Mandarina* (Fig. 10) En tuna *Vigor* también se registraron hasta tres veces más betacianinas y el doble de betaxantinas, en comparación con accesiones rojas de *Opuntia* spp. provenientes de Zacatecas, México, para las que se reportaron cantidades entre 2.60 y 45.71 mg de betacianinas/100 g peso seco y entre 4.11 y 29.67 mg de betaxantinas 100/g peso seco (Pinedo-Espinoza *et al.*, 2017). En un estudio más reciente, se reportaron cantidades en un rango de 32.0 - 37.0 mg de betaxantinas/100 g peso para variedades amarillas de tuna provenientes de Puebla, México (García-Cayuela *et al.*, 2019). Aunque el contenido de betaxantinas en los extractos de pulpa de *Mandarina* fue menor hasta en un 30% que en el reporte anterior, su coloración amarillo-naranja podría ser atractiva para aplicaciones en alimentos o textiles (Guesmi *et al.*, 2012).

Ya que el betabel es la fuente de betalaínas más utilizada y reportada en estudios relacionados con estos pigmentos, los resultados de las variedades de tuna se compararon con lo registrado en betabel adquirido en un comercio local (Fig. 10) En específico, la cantidad de betacianinas en betabel fue del doble en comparación con la variedad *Vigor*, mientras que la cantidad de betaxantinas en esta hortaliza fue hasta 6 veces mayor en comparación con *Mandarina*. Aunque las variedades de tuna caracterizadas en este estudio registraron menores cantidades de betalaínas que el betabel, estos frutos tienen un alto valor comercial ya que en general, de la pulpa de tuna de coloraciones púrpura, roja, naranja y amarilla, es posible elaborar productos deshidratados, jugos, mermeladas, colorantes alimentarios, dulces e incluso vinagres de distintas coloraciones. También es importante resaltar que las especies de *Opuntia* están adaptadas a climas áridos por lo que sus requerimientos de agua pueden ser menores a los de otros cultivos (del Socorro Santos Díaz *et al.*, 2017; FAO, 2018). A lo anterior se suma que los colorantes obtenidos de betabel pueden contener pirazinas y geosmina que imparten sabores u olores extraños a los productos donde se aplican (Pavokovic & Krsnik-Rasol, 2011; Khan & Giridhar, 2015).



**Figura 10. Contenido de betacianinas (A) y betaxantinas (B) en pulpa de cuatro variedades de tuna y betabel. Se representa la media de tres repeticiones  $\pm$  DE. Los resultados se muestran en términos de peso seco (PS). Letras distintas indican diferencias significativas entre medias (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).**

### 7.1.3 Capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales

Se registraron valores hasta dos veces mayores en la capacidad antioxidante determinada por ABTS en los extractos acuosos de las variedades de tuna púrpuras (*Vigor*, *Pirámides* y *Pelota*) en comparación con la variedad *Mandarina* en sus dos estados de madurez (Fig. 11A). Los valores de capacidad antioxidante por ABTS en las variedades de tuna caracterizadas en este estudio mostraron valores similares a lo reportado en variedades rojas provenientes de Zacatecas, México (Pinedo-Espinoza *et al.*, 2017) y, en contraste, valores mayores a lo registrado en tunas de color rojo, naranja y amarillo ( $3 - 10 \mu\text{M}$  Trolox/g peso seco) provenientes de Sicilia, Italia (Koss-Mikołajczyk *et al.*, 2019). En el betabel utilizado como material de referencia, se registró un 27% más capacidad antioxidante por ABTS en comparación con las variedades púrpuras, y hasta dos veces más en comparación con la variedad *Mandarina* en sus dos estados de madurez.

La variedad *Vigor* registró el doble de capacidad antioxidante por DPPH (Fig. 11B) en comparación con la variedad *Mandarina* en sus dos estados de madurez. Tomando en cuenta a todas las variedades de tuna caracterizadas, las actividades antioxidantes por DPPH fueron inferiores en un 50 - 85% a los valores reportados para variedades de tuna

rojas provenientes de Zacatecas, México (Pinedo-Espinoza *et al.*, 2017) y similares a lo reportado en tunas de color rojo, naranja y amarillo provenientes de Sicilia, Italia (Koss-Mikołajczyk *et al.*, 2019). Cabe resaltar que en la capacidad antioxidante determinada por DPPH no se registraron diferencias significativas entre tuna *Vigor* y betabel.

Los resultados de compuestos fenólicos totales en las variedades caracterizadas en este estudio (Fig. 11C) fueron cercanos a lo reportado en pulpa de tuna de tres variedades púrpuras provenientes de España, con 207.0 – 285.3 mg ácido gálico/100 g peso seco, y en pulpa de dos variedades amarillas, con 189.0 – 244.2 mg ácido gálico/100 g peso seco (García-Cayuela *et al.*, 2019). En el caso de *Mandarina 3/4*, se registraron tres veces menos compuestos fenólicos totales en comparación al betabel.

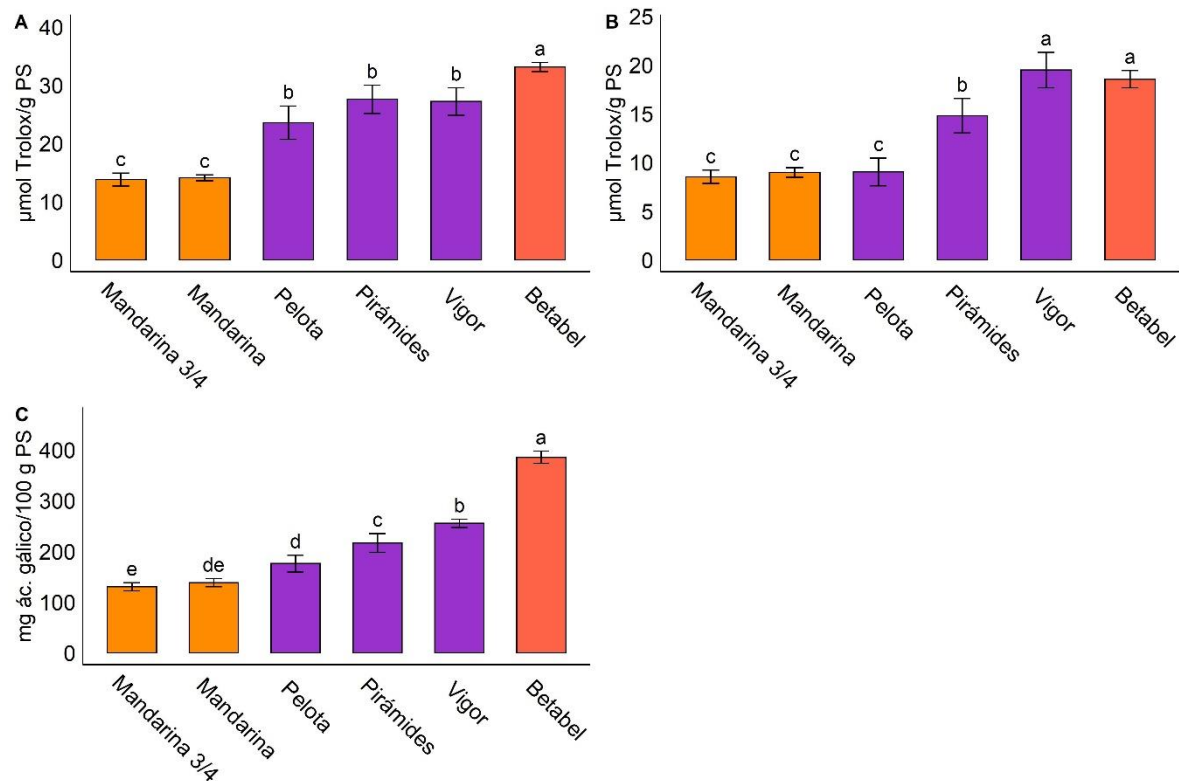


Figura 11. Capacidad antioxidante determinada por ABTS (A) y DPPH (B) y compuestos fenólicos totales (C) en pulpa de cuatro variedades de tuna y betabel. Se representa la media de tres repeticiones ± DE. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias (Tukey HSD, α = 0.05).

#### 7.1.4 Identificación de betalaínas por HPLC

De manera complementaria, se llevó a cabo la identificación de betalaínas mediante HPLC en la variedad de tuna púrpura *Vigor*, la de mayor contenido de betalaínas, y en la variedad de tuna amarillo-naranja *Mandarina*, seleccionada por su coloración. Al comparar los tiempos de retención obtenidos en los estándares con los de las muestras de pulpa de tuna analizadas en este trabajo, se identificaron betanina, isobetanina e indicaxantina en ambas variedades (Fig. 12 y 13). En otros estudios, se ha reportado a la betanina como la betalaína mayoritaria en variedades de tuna púrpuras, mientras que la indicaxantina se identificó como la principal betalaína en variedades de tuna amarillo-naranjas (Albano *et al.*, 2015; García-Cayuela *et al.*, 2019), lo que es consistente con los resultados obtenidos en este estudio.

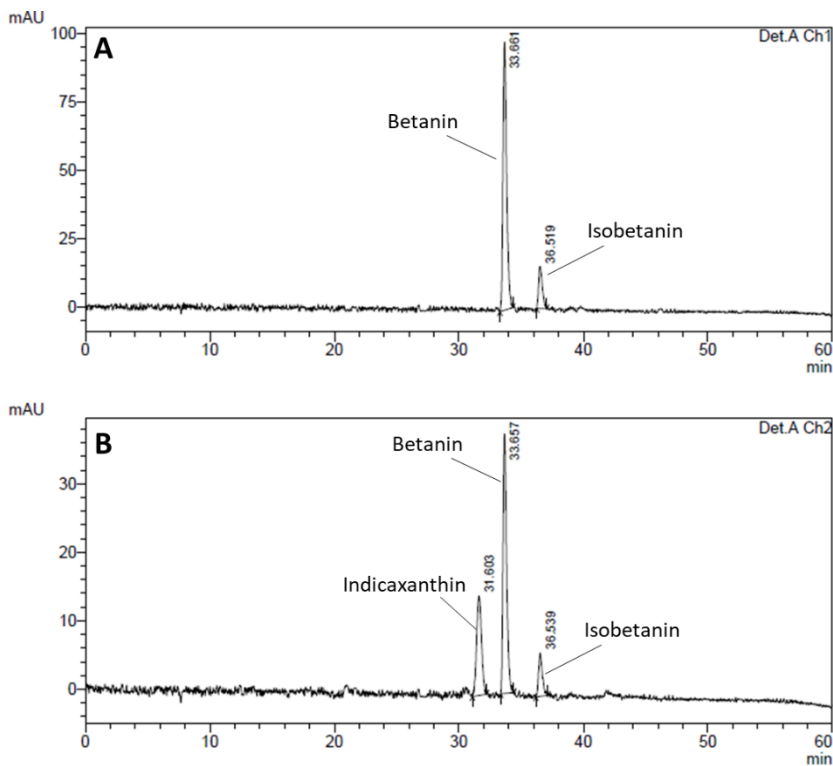
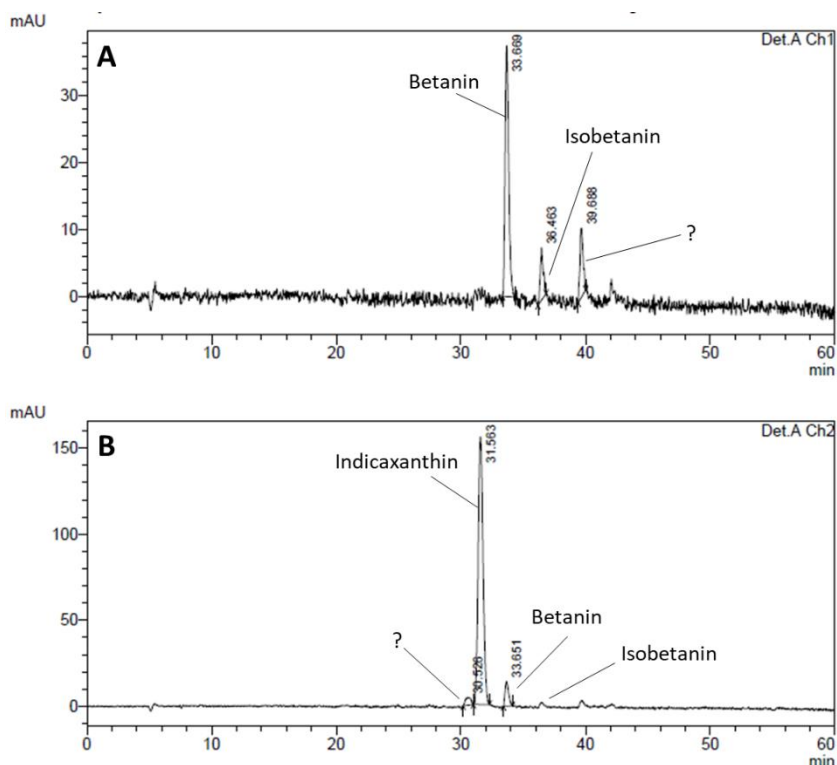


Figura 12. Cromatogramas obtenidos a 535 nm (A) y 480 nm (B) para la identificación de betacianinas y betaxantinas, respectivamente, en extractos acuosos de pulpa de tuna *Vigor*.

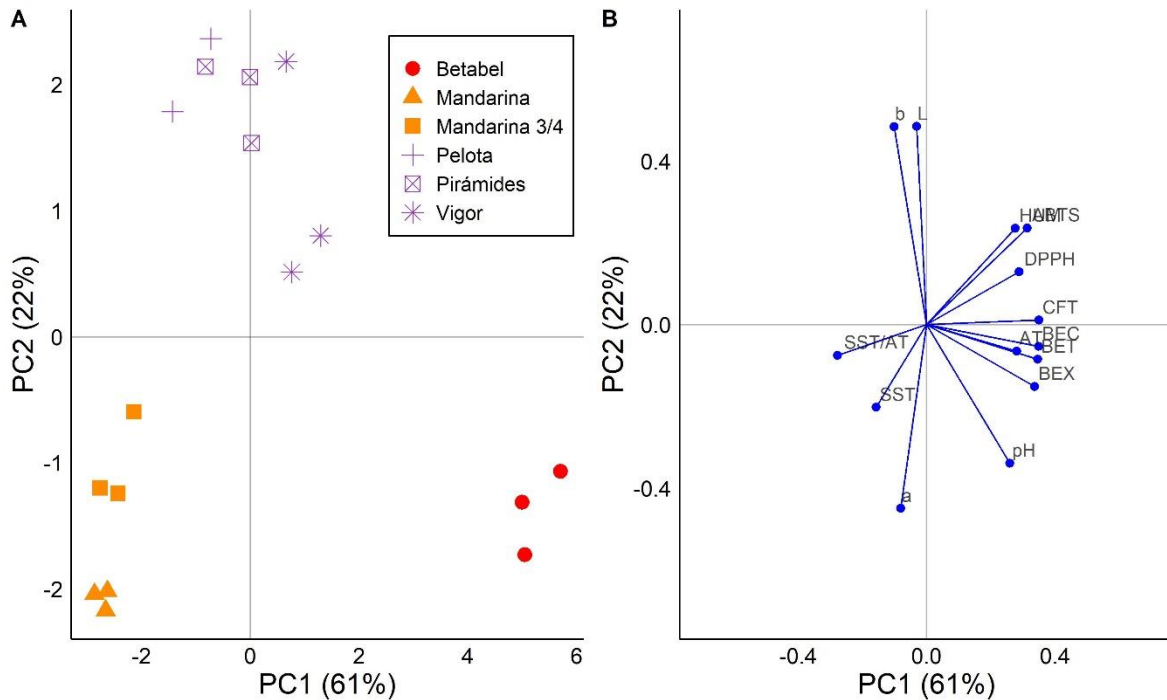


**Figura 13. Cromatogramas obtenidos a 535 nm (A) y 480 nm (B) para la identificación de betacianinas y betaxantinas, respectivamente, en extractos acuosos de pulpa de tuna *Mandarina*. ?: compuesto no identificado**

### 7.1.5 Análisis de componentes principales (PCA)

Se realizó un análisis de componentes principales con todos los datos de caracterización química, color, cantidad de betalaínas, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante obtenidos en betabel y todas las variedades de tuna (Fig. 14), esto con el objetivo de visualizar diferencias, semejanzas y correlaciones entre los datos de cada variedad de tuna y el betabel (Bro & Smilde, 2014). En la gráfica de puntajes (*scores*) se observaron agrupaciones entre las variedades de tuna púrpuras, entre los dos estados de madurez de la variedad *Mandarina* y entre los resultados de betabel (Fig. 14A). Las diferencias y agrupaciones a lo largo del componente principal 1 se debieron a la mayor contribución de variables como las cantidades de betalaínas totales, betacianinas, betaxantinas y compuestos fenólicos totales, mientras que los parámetros de color  $L^*a^*b^*$  tuvieron una mayor importancia en las diferencias y agrupaciones a lo largo del componente principal 2 (Fig. 14A), lo que es razonable tomando en cuenta las diferencias en el color registradas entre las variedades de tuna y el betabel (cuadro 9). En la figura 14B también se

podieron observar correlaciones positivas entre la cantidad de betalaínas, betacianinas, betaxantinas, compuestos fenólicos totales y la acidez titulable (líneas paralelas en las mismas direcciones), así como correlaciones negativas entre los parámetros  $L^*$  y  $a^*$ , y entre  $b^*$  y  $a^*$  (líneas paralelas en direcciones opuestas).



**Figura 14.** Gráfica de puntajes (*scores*) (A) y pesos (*loadings*) (B) para el componente principal 1 (PC1) y el componente principal 2 (PC2) obtenidos mediante análisis de componentes principales realizado con los datos registrados en betabel y las variedades de tuna. AT: acidez titulable; BEC: cantidad de betacianinas; BEX: cantidad de betaxantinas; BET: cantidad de betalaínas totales; ABTS: capacidad antioxidante por ABTS; DPPH: capacidad antioxidante por DPPH; CFT: compuestos fenólicos totales; SST: sólidos solubles totales; a, b y L: parámetros de color  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ , respectivamente.

Lo anterior se muestra más claramente en una matriz de correlaciones (cuadro 10). Se registraron correlaciones positivas y significativas entre las cantidades de betalaínas, betacianinas y betaxantinas con la cantidad de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante por ABTS y DPPH, así como entre la acidez titulable y la capacidad antioxidante por ABTS y la cantidad de compuestos fenólicos totales. Es importante mencionar que las metodologías para la cuantificación de la capacidad antioxidante y de los compuestos fenólicos totales no son específicas para algún tipo de compuesto, ya que en un extracto vegetal sin purificar varios compuestos pueden participar en reacciones de óxido reducción y contribuir positivamente a estos parámetros, como las propias betalaínas, compuestos

fenólicos e incluso ácidos orgánicos (Shahidi & Zhong, 2015). Por ejemplo, la contribución de las betalainas a la capacidad antioxidante por ABTS ya se ha corroborado en extractos acuosos de pulpa de tunas amarillas, naranjas y rojas de *O. ficus-indica* y en extractos acuosos de betabel, donde se observó una mayor contribución de las betacianinas, seguida de la contribución de betaxantinas y otros compuestos como la vitamina C (Koss-Mikołajczyk *et al.*, 2019). La presencia de compuestos fenólicos también contribuyó a la capacidad antioxidante por DPPH, como lo reportado en extractos de betabel realizados con etanol (70% v/v) (Georgiev *et al.*, 2010). En pulpa de tuna de diferentes variedades y coloraciones se han identificado compuestos fenólicos como flavonoides (quercetina e isorhamnetina) y ácidos fenólicos (ferúlico, p-cumárico y piscidico) (Barba *et al.*, 2017; García-Cayuela *et al.*, 2019), sin embargo, la contribución de este tipo de compuestos a la capacidad antioxidante o a la cantidad de compuestos fenólicos totales no se ha establecido claramente en extractos acuosos de pulpa de tuna.

**Cuadro 9. Coeficientes de correlación entre las variables cuantificadas en las variedades de tuna y betabel. El símbolo \* indica correlación significativa ( $\alpha = 0.5$ ).**

	pH	HUM	AT	SST/AT	SST	L*	a*	b*	BEC	BEX	BET	ABTS	DPPH	CFT
pH	1	0.34	0.55*	-0.37	-0.12	-0.52*	0.24	-0.69*	0.8*	0.88*	0.83*	0.41	0.48*	0.73*
HUM		1	0.45	-0.53*	-0.4	0.17	-0.44	0.16	0.73*	0.62*	0.7*	0.92*	0.81*	0.81*
AT			1	-0.93*	-0.12	-0.17	-0.29	-0.34	0.78*	0.79*	0.78*	0.63*	0.37	0.76*
SST/AT				1	0.35	-0.06	0.37	0.19	-0.73*	-0.7*	-0.72*	-0.71*	-0.48*	-0.73*
SST					1	-0.38	0.09	-0.04	-0.4	-0.32	-0.38	-0.48*	-0.59*	-0.42
L*						1	-0.6*	0.53*	-0.15	-0.29	-0.2	0.19	0.12	-0.09
a*							1	-0.59*	-0.16	-0.05	-0.13	-0.49*	-0.13	-0.24
b*								1	-0.35	-0.49*	-0.39	0.14	-0.03	-0.24
BEC									1	0.98*	0.99*	0.84*	0.8*	0.99*
BEX										1	0.99*	0.74*	0.71*	0.95*
BET											1	0.81*	0.78*	0.98*
ABTS												1	0.85*	0.9*
DPPH													1	0.84*
CFT														1

AT: acidez titulable; BEC: cantidad de betacianinas; BEX: cantidad de betaxantinas; BET: cantidad de betalainas totales; ABTS: capacidad antioxidante por ABTS; DPPH: capacidad antioxidante por DPPH; CFT: compuestos fenólicos totales; SST: sólidos solubles totales.

## 7.2 Evaluación de distintos factores sobre el proceso de extracción de betalaínas de pulpa de tuna *Vigor* y tuna *Mandarina*

Para la evaluación de distintos factores sobre el proceso de extracción de betalaínas de pulpa de tuna solo se utilizó a la variedad púrpura *Vigor* y la variedad amarillo-naranja *Mandarina*. Lo anterior tomando en cuenta la identificación, el color, y la cuantificación de las betalaínas en ambas variedades de tuna.

Para la evaluación de los rendimientos de extracción de betalaínas solo se tomó en cuenta la cantidad de betacianinas en la variedad *Vigor*, mientras que para *Mandarina* solo se tomó en cuenta la cantidad de betaxantinas. En adición, en los extractos obtenidos en todos los experimentos de extracción se determinaron la capacidad antioxidante por ABTS y DPPH y la cantidad de compuestos fenólicos totales.

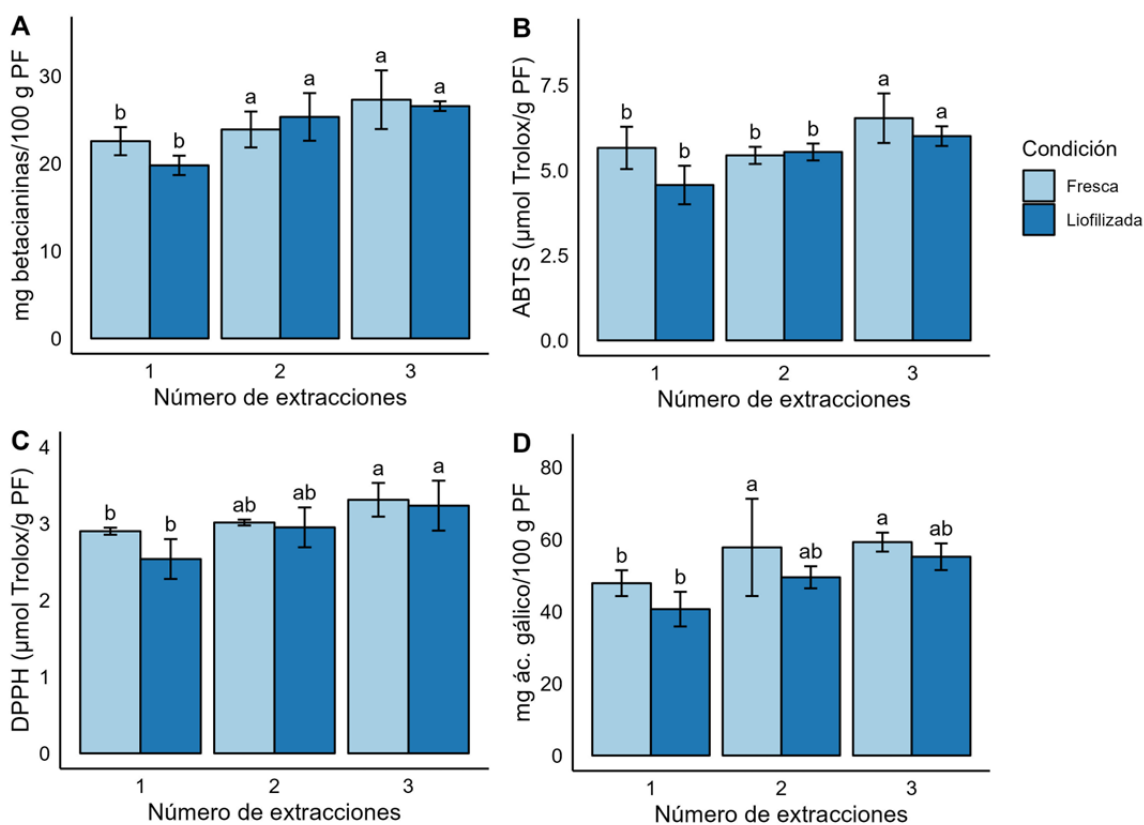
### 7.2.1 Evaluación del número de extracciones y el estado de la materia prima (pulpa fresca o liofilizada)

Tanto en pulpa de tuna *Vigor* (Fig. 15) como en pulpa de tuna *Mandarina* (Fig. 16), y para todas las respuestas evaluadas, no se observó un efecto significativo en los rendimientos de extracción por efecto del estado de la materia ( $p > 0.05$ ). En contraste, se determinó un efecto significativo del número de extracciones. En ambas variedades de tuna y para la mayoría de las variables estudiadas solo se observó un incremento significativo hasta la tercera extracción.

En pulpa de tuna *Vigor*, con tres extracciones se registraron cantidades de  $27.3 \pm 3.4$  mg betacianinas/100 g peso fresco, de  $59.2 \pm 2.6$  mg ác. gálico/100 g peso fresco, de  $3.3 \pm 0.2$   $\mu\text{mol Trolox/ g peso fresco}$  y de  $6.5 \pm 0.7$  y  $\mu\text{mol Trolox/ g peso fresco}$  para la capacidad antioxidante por DPPH y ABTS, respectivamente. Para una sola extracción se obtuvieron  $22.5 \pm 1.6$  mg betacianinas/100 g peso fresco,  $47.8 \pm 3.6$  mg ácido gálico/100 g peso fresco,  $2.9 \pm 0.1$   $\mu\text{mol Trolox/ g peso fresco}$  (DPPH) y  $5.7 \pm 0.6$   $\mu\text{mol Trolox/ g peso fresco}$  (ABTS). En comparación con una sola extracción, la aplicación de tres extracciones implicó aumentos en los rendimientos de hasta el 37% para betacianinas (Fig. 15A), de 43% y 30%



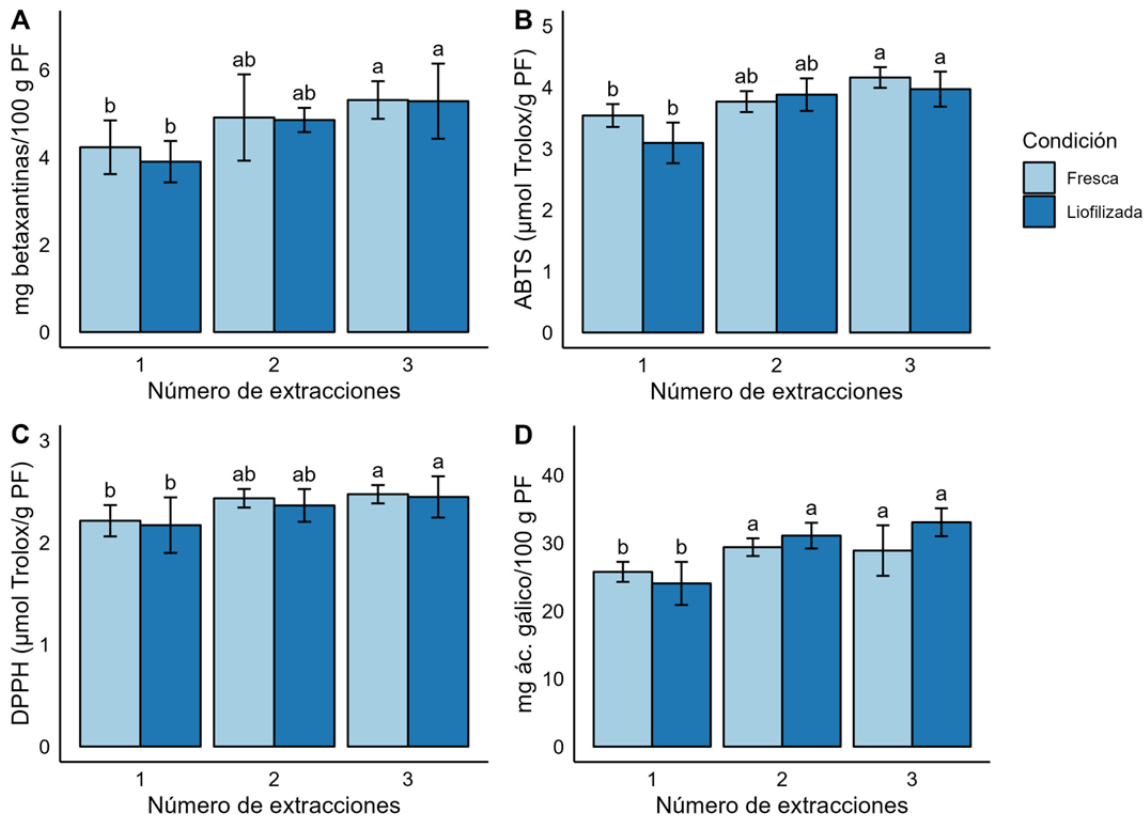
para la capacidad antioxidante por ABTS (Fig. 15B) y DPPH (Fig. 15C), respectivamente, y de 46% para la cantidad de compuestos fenólicos totales (Fig. 15D).



**Figura 15.** Efecto del número de extracciones en la extracción de betacianinas (A) en pulpa de tuna *Vigor*, la capacidad antioxidante determinada por ABTS (B) y DPPH (C) y el contenido de compuestos fenólicos totales (D). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ).

En el caso de pulpa de tuna *Mandarina*, para tres extracciones se obtuvieron  $5.3 \pm 0.4$  mg betaxantinas/100 g peso fresco,  $33.0 \pm 2.1$  mg ácido gálico/100 g peso fresco,  $2.5 \pm 0.1$   $\mu\text{mol Trolox/g}$  peso fresco y  $4.2 \pm 0.2$   $\mu\text{mol Trolox/g}$  peso fresco para la capacidad antioxidante por DPPH y ABTS, respectivamente. Con una extracción se registraron cantidades de  $4.2 \pm 0.6$  mg betaxantinas/100 g peso fresco, de  $25.7 \pm 1.5$  mg ác. gálico/100 g peso fresco, de  $3.5 \pm 0.2$   $\mu\text{mol Trolox/g}$  peso fresco y de  $2.2 \pm 0.2$   $\mu\text{mol Trolox/g}$  peso fresco para las capacidades antioxidantes. De forma similar a lo observado en pulpa de tuna *Vigor*, en pulpa de tuna *Mandarina* la aplicación de tres extracciones aumentó los rendimientos de extracción hasta 35% tanto para betaxantinas (Fig. 16A) y para la capacidad antioxidante por ABTS (Fig. 16B), 14% para la capacidad antioxidante (Fig. 16C) por DPPH y hasta un 38%

para la cantidad de compuestos fenólicos totales (Fig. 16D) en comparación con el tratamiento de una sola extracción.



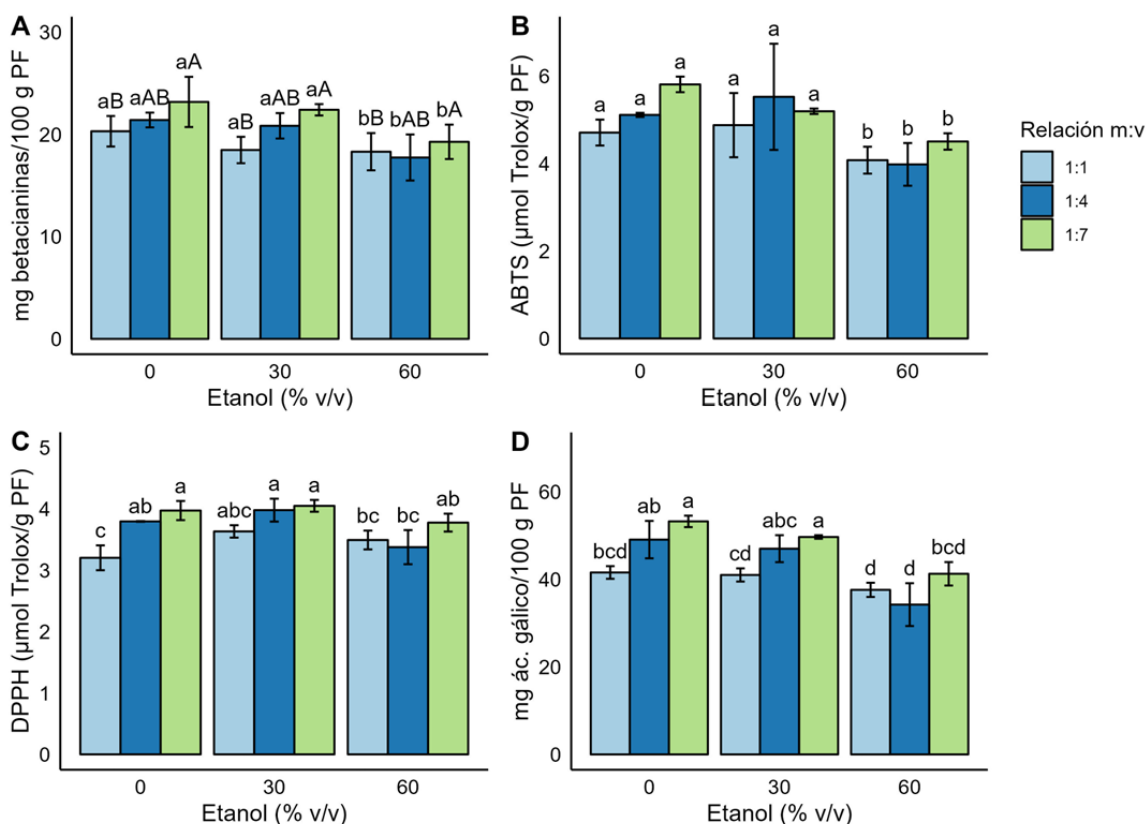
**Figura 16.** Efecto del número de extracciones en la extracción de betaxantinas (A) en pulpa de tuna *Mandarina*, la capacidad antioxidante determinada por ABTS (B) y DPPH (C) y el contenido de compuestos fenólicos totales (D). Media de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ).

El efecto positivo del número de extracciones es razonable tomando en cuenta que en cada extracción se renueva el solvente, lo que favorece la transferencia de masa entre el tejido y el solvente de extracción. Efectos similares se han registrado en otro tipo de compuestos, como se ha reportado en los ácidos grasos de cadena larga provenientes de alfalfa y extraídos con mezclas de hexano:isopropanol (en distintas proporciones), donde se registraron aumentos en los rendimientos de extracción de hasta el 10% al realizar tres extracciones (Ribeiro & Eastridge, 2006).

### 7.2.2 Evaluación del efecto de la concentración de etanol y la relación masa:volumen

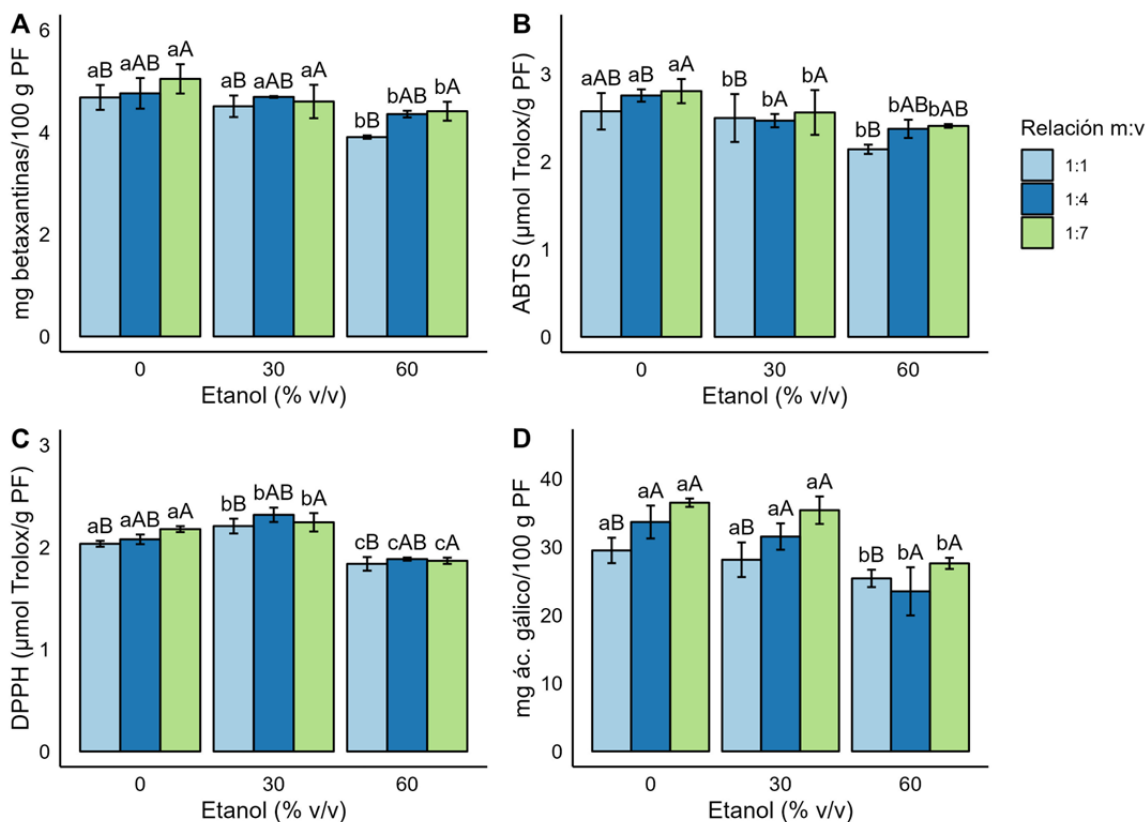
El aumento en la concentración de etanol en agua de 0 a 60% v/v redujo significativamente las cantidades de betacianinas de tuna *Vigor*, betaxantinas de tuna *Mandarina* y compuestos fenólicos, así como la capacidad antioxidante por ABTS y DPPH en la pulpa de ambas variedades. En contraste, el aumento en la cantidad de solvente en un rango de 1:1 a 1:7 (g/mL) tuvo un efecto positivo en las cantidades de todas las variables mencionadas (Fig. 17 y 18).

En pulpa de tuna *Vigor* la extracción con solo agua en una relación 1:7 (g/mL) permitió obtener los mayores rendimientos de extracción con cantidades de  $23.2 \pm 2.5$  mg betacianinas/100 g peso fresco, de  $53.2 \pm 1.3$  mg ác. gálico/100 g peso fresco, de  $4.0 \pm 0.2$   $\mu\text{mol Trolox/ g peso fresco}$  y de  $5.8 \pm 0.2$  y  $\mu\text{mol Trolox/ g peso fresco}$  para la capacidad antioxidante por DPPH y ABTS, respectivamente. En contraste, con la utilización de etanol al 60% (v/v) en relación 1:4 (g/mL) se obtuvieron los menores rendimientos registrándose cantidades de  $17.7 \pm 2.3$  mg betacianinas/100 g peso fresco,  $34.2 \pm 4.9$  mg ácido gálico/100 g peso fresco,  $3.4 \pm 0.3$   $\mu\text{mol Trolox/ g peso fresco}$  (DPPH) y  $4.0 \pm 0.5$   $\mu\text{mol Trolox/ g peso fresco}$  (ABTS). Tomando en cuenta las cantidades anteriores, la extracción solo con agua en una relación masa:volumen de 1:7 (g/mL) permitió obtener 31% más betacianinas (Fig. 17A), 46 y 18% más capacidad antioxidante por ABTS (Fig. 17B) y DPPH (Fig. 17C), respectivamente, y hasta 55% más compuestos fenólicos totales (Fig. 17D) en comparación con la extracción de menores rendimientos.



**Figura 17.** Efecto de la relación masa:volumen (m:v) y el porcentaje de etanol en la extracción de betacianinas (A) en pulpa de tuna *Vigor*, la capacidad antioxidante determinada mediante ABTS (B) y DPPH (C) y el contenido de compuestos fenólicos totales (D). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. En A, letras minúsculas distintas indican diferencias significativas para el porcentaje de etanol; letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas para la relación masa:volumen ( $\alpha < 0.05$ ).

En pulpa de tuna *Mandarina* la extracción con solo agua en una relación 1:7 (g/mL) también permitió obtener los mayores rendimientos de extracción con cantidades de  $5.0 \pm 0.3$  mg betaxantinas/100 g peso fresco, de  $36.5 \pm 0.6$  mg ác. gálico/100 g peso fresco, de  $2.2 \pm 0.0$   $\mu$ mol Trolox/ g peso fresco (DPPH) y de  $2.8 \pm 0.2$  y  $\mu$ mol Trolox/ g peso fresco (ABTS). Con la utilización de etanol al 60% (v/v) en relación 1:1 (g/mL) se obtuvieron los menores rendimientos, registrándose cantidades de  $5.0 \pm 0.3$  mg betaxantinas/100 g peso fresco,  $23.5 \pm 3.5$  mg ácido gálico/100 g peso fresco,  $1.8 \pm 0.1$   $\mu$ mol Trolox/ g peso fresco (DPPH) y  $2.1 \pm 0.1$   $\mu$ mol Trolox/ g peso fresco (ABTS). La extracción solo con agua en relación 1:7 (g/mL) produjo aumentos en los rendimientos de extracción del 29% para betaxantinas (Fig. 18A), de 31 y 18% para la capacidad antioxidante por ABTS (Fig. 18B) y DPPH (Fig. 18C), respectivamente, y de 44% más compuestos fenólicos totales (Fig. 18D), lo anterior en comparación con la extracción donde se registraron los menores rendimientos.

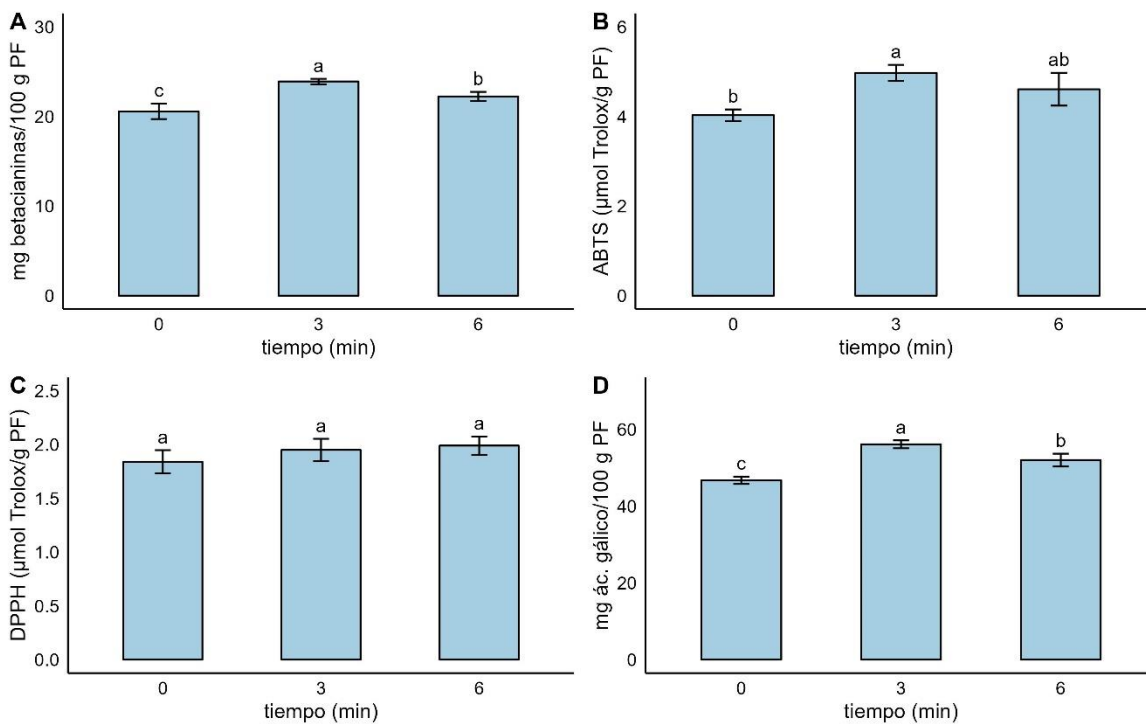


**Figura 18.** Efecto de la relación masa:volumen (m:v) y el porcentaje de etanol en la extracción de betaxantinas (A) en pulpa de tuna *Mandarina*, la capacidad antioxidante determinada mediante ABTS (B) y DPPH (C) y el contenido de compuestos fenólicos totales (D). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas para el porcentaje de etanol; letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas para la relación masa:volumen ( $\alpha < 0.05$ ).

Resultados similares al aumentar el porcentaje de etanol en agua se han reportado en frutos de *O. joconostle*. En polvo de los frutos completos y al usar solo agua como solvente de extracción se obtuvieron hasta 3 veces más betaxantinas en comparación con la utilización de etanol en agua al 80% (v/v) (Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2013), lo que se atribuyó tentativamente a que la utilización de alcohol en grandes concentraciones hace más difícil romper los enlaces de hidrogeno entre las betalaínas y los otros componentes del fruto de *O. joconostle*. En el caso de los mayores rendimientos obtenidos al aumentar la cantidad de solvente, estos pueden atribuirse simplemente a que los mayores volúmenes favorecieron la transferencia de masa de los compuestos de interés.

### 7.2.3 Evaluación de la aplicación de ultrasonido

La aplicación de ultrasonido mediante sonotrodo aumentó de manera significativa la extracción de compuestos funcionales de la pulpa de tuna *Vigor* (Fig. 19) y *Mandarina* (Fig. 20). En tuna *Vigor*, la aplicación de ultrasonido por 3 min permitió obtener  $23.9 \pm 0.3$  mg betacianinas/100 g peso fresco,  $56.1 \pm 1.0$  mg ác. gálico/100 g peso fresco y  $5.0 \pm 0.2$   $\mu\text{mol/g}$  peso fresco (ABTS). Lo anterior representó aumentos en la extracción de betacianinas del 16% (Fig. 19A), en la capacidad antioxidante por ABTS del 24% (Fig. 19B) y en el contenido de compuestos fenólicos totales del 20% (Fig. 19D), en comparación con el tratamiento sin sonotrodo (control de 0 min), en el que se registraron los menores rendimientos con valores de  $20.6 \pm 0.9$  mg betacianinas/100 g peso fresco, 46.7 mg ác. gálico/100 g peso fresco y  $4.0 \pm 0.1$   $\mu\text{mol/g}$  peso fresco (ABTS). En el caso de la capacidad antioxidante por DPPH no se observaron diferencias significativas por la aplicación de ultrasonido (Fig. 19C). Es importante resaltar que al aumentar el tiempo de sonicación a 6 min se registró una disminución en los rendimientos de extracción de betacianinas y compuestos fenólicos totales de 7.5 y 7.8%, respectivamente, en comparación con el tratamiento de 3 min. Esto pudo deberse tentativamente a la degradación de los compuestos de interés por el aumento de la temperatura y el tiempo de extracción. En el caso del tratamiento de sonicación por 6 min se registraron 36 °C, mientras que a los 3 min se registraron 30 °C.

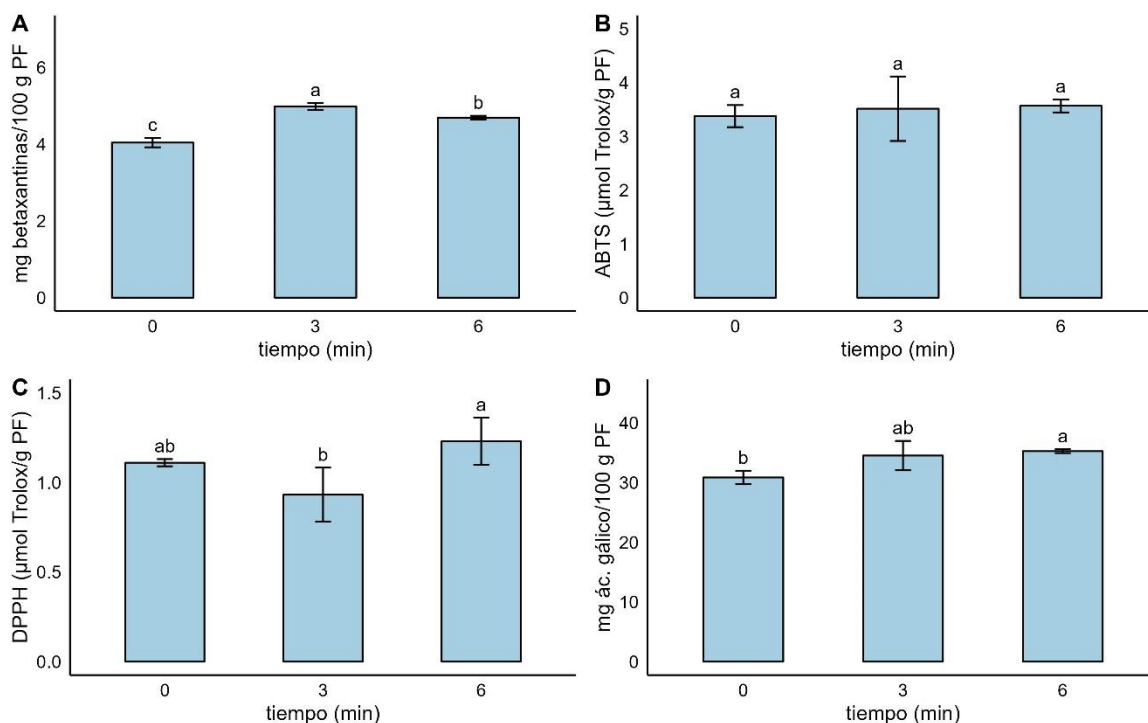


**Figura 19.** Efecto de la aplicación de ultrasonido en la extracción de betacianinas (A) en pulpa de tuna *Vigor*, la capacidad antioxidante por ABTS (B) y DPPH (C), y en el contenido de compuestos fenólicos totales (D). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ).

Se obtuvieron resultados similares al aplicar ultrasonido por 3 min en pulpa de tuna *Mandarina*, lo que aumentó en 24% la extracción de betaxantinas en comparación el tratamiento control de 0 min (Fig. 20A). Sin embargo, solo hasta el min 6 se observó un aumento significativo en la capacidad antioxidante por DPPH (Fig. 20C) y en la cantidad de compuestos fenólicos totales (Fig. 20D), el cual fue de 32 y 14%, respectivamente, en comparación con 0 min. También en el min 6 se observó una reducción del 6% en el contenido de betaxantinas en comparación con el min 3, lo que, como en el caso de pulpa tuna *Vigor*, pudo deberse al aumento de la temperatura (hasta 35 °C después de 6 min). En el caso de la capacidad antioxidante por ABTS no se registraron diferencias significativas por la aplicación de ultrasonido (Fig. 20B).

Los resultados distintos en la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales al aplicar sonotrodo por distintos tiempos en pulpa de tuna *Vigor* (Fig. 19) y pulpa de tuna *Mandarina* (Fig. 20) pudieron deberse a la distinta afinidad de los métodos utilizados para cuantificar las variables mencionadas (Shahidi & Zhong, 2015), a la generación de distintos

compuestos por efecto de la temperatura (Pinelo *et al.*, 2004) o a la distinta composición de las pulpas de ambas variedades de tuna (García-Cayuela *et al.*, 2019).



**Figura 20.** Efecto de la aplicación de ultrasonido en la extracción de betaxantinas (A) en pulpa de tuna *Mandarina*, la capacidad antioxidante por ABTS (B) y DPPH (C), y el contenido de compuestos fenólicos totales (D). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ).

En tunas de *O. stricta* Haw se probó la aplicación de un pretratamiento de ultrasonido en rodajas del fruto fresco y completo de aproximadamente 5 mm de grosor. La aplicación de este método de extracción por 10 min tuvo un efecto significativo al aumentar al doble la extracción de betaxantinas en comparación con un tratamiento de agitación continua por 60 min. Lo anterior se atribuyó a la formación de burbujas de cavitación durante la aplicación de ultrasonido, lo que provocó la ruptura de la membrana celular, facilitando de esta forma la extracción de los compuestos de interés (Koubaa *et al.*, 2016).

#### 7.2.4 Evaluación de la aplicación de microondas-ultrasonido

En la pulpa de ambas variedades de tuna, la aplicación de la combinación de las tecnologías microondas con ultrasonido no tuvo un efecto significativo sobre los rendimientos de extracción de betalainas, capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales, tanto en pulpa de tuna *Vigor* (Fig. 21), como en pulpa de tuna *Mandarina* (Fig. 22).



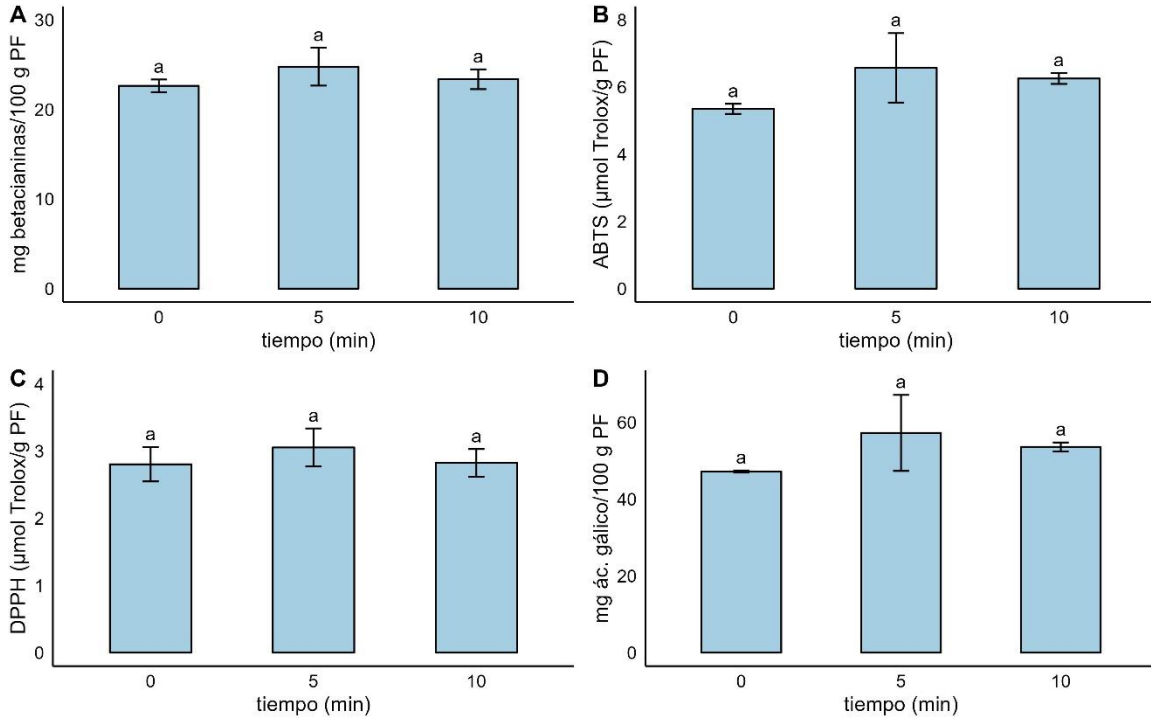


Figura 21. Efecto de la aplicación de microondas-ultrasonido en la extracción de betacianinas (A) en pulpa de tuna Vigor, la capacidad antioxidante por ABTS (B) y DPPH (C), y el contenido de compuestos fenólicos totales (D). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ).

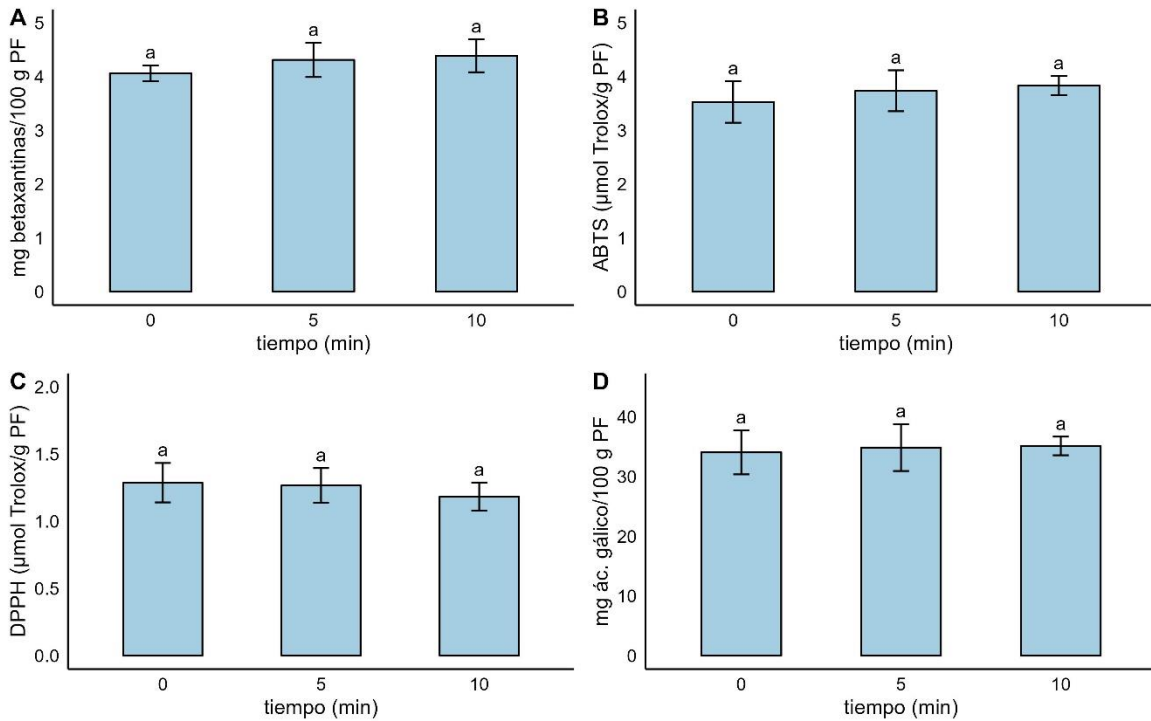


Figura 22. Efecto de la aplicación de microondas-ultrasonido en la extracción de betaxantinas (A) en pulpa de tuna *Mandarina*, la capacidad antioxidante por ABTS (B) y DPPH (C), y la cantidad de compuestos fenólicos totales (D). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ).

En general, los resultados anteriores para la pulpa de ambas variedades pudieron deberse a que la aplicación de microondas-ultrasonido se realizó en pulpa previamente homogenizada, lo que de antemano podría haber facilitado la ruptura celular y la difusión de los compuestos de interés. La aplicación de la tecnología de microondas se ha reportado en materias primas fibrosas como la raíz de betabel, en la cual la aplicación de esta metodología de extracción por 100 s permitió obtener el doble de betacianinas y hasta tres veces más betaxantinas en comparación con una extracción mediante agitación a temperatura ambiente durante el mismo tiempo (Cardoso-Ugarte *et al.*, 2014).

Finalmente, al considerar todos los experimentos de extracción, la triple extracción acuosa con una relación 1:2 (g/mL) en pulpa de tuna *Vigor* permitió obtener, en comparación con la aplicación de sonotrodo por 3 min, por ejemplo, 14.2% más betacianinas, 6.0% más compuestos fenólicos totales, 31.4% más capacidad antioxidante por ABTS y 66.3% más capacidad antioxidante por DPPH. En pulpa de tuna *Mandarina*, la triple extracción acuosa resultó en 6.4% más betaxantinas, 19.4% menos compuestos fenólicos totales, 15.6% más capacidad antioxidante por ABTS y hasta 2 veces más capacidad antioxidante por DPPH que la aplicación de sonotrodo por 3 y 6 min. Con base en lo anterior, la triple extracción acuosa en relación 1:2 (g/mL) se seleccionó como tratamiento general de extracción para todas las pruebas en este estudio.

### **7.3 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de betalaínas provenientes de tunas *Vigor* y *Mandarina***

La estabilidad térmica de betacianinas se evaluó solo considerando las provenientes de la variedad *Vigor*, mientras que para la estabilidad de la betaxantinas solo se utilizó a la variedad *Mandarina*. Lo anterior se estableció, al igual que en la evaluación de distintos factores sobre el proceso de extracción de betalaínas, tomando en cuenta la identificación, el color, y la cuantificación de las betalaínas en la pulpa de ambas variedades de tuna.

#### **7.3.1 Estabilidad de betalaínas**

La temperatura y el tiempo tuvieron un efecto significativo en el porcentaje de retención tanto de betacianinas como de betaxantinas (Fig. 23). Las temperaturas en el rango de 50 a

90 °C aumentaron la tasa de degradación de ambos tipos de pigmentos, lo que también se reflejó en una reducción proporcional de las vidas medias (el tiempo necesario para reducir la concentración de pigmentos en un 50%) al aumentar la temperatura (Cuadro 11). Así, el aumento de la temperatura de 50 a 90 °C redujo la vida media de las betacianinas en un 80% en los extractos de *Vigor* y betabel, mientras que en el caso de betaxantinas en el mismo rango de temperaturas, la vida media de estos pigmentos se redujo en un 85% para los extractos de *Mandarina* y betabel.

La energía de activación en este estudio y otros relacionados con la estabilidad térmica de las betalaínas puede interpretarse como la energía necesaria (kJ) para iniciar el proceso de degradación por mol de pigmento. Así, los valores de energía de activación más altos indican una mayor termo estabilidad y vida media (Tsai *et al.*, 2010). No se observaron diferencias significativas entre las energías de activación de las betacianinas de *Vigor* y betabel (Cuadro 11), mostrando pautas de degradación y vidas medias similares (Fig. 23A). En contraste, las betaxantinas de *Mandarina* mostraron una energía de activación más alta (en un 20%) en comparación con las betaxantinas de betabel, lo que también se observó como tasas de degradación más bajas con el aumento del tiempo y la temperatura (Fig. 23B) y mayores vidas medias (Cuadro 11) para las betaxantinas de esta variedad. Por ejemplo, a 70 °C y al final del tratamiento térmico (240 min), se calcularon porcentajes de retención de betaxantina del 54% para *Mandarina* y del 25% para betabel, respectivamente. Se han reportado patrones de degradación similares para betalaínas de otras fuentes, como las betacianinas de *Chenopodium formosanum* (65.5 kJ/mol) (Tsai *et al.*, 2010), betaxantinas de *Stenocereus pruinosus* (66.3 kJ/mol) (Rodríguez-Sánchez, Cruz y Victoria & Barragán-Huerta, 2017) y de tuna (61.1 kJ/mol) (Coskuner *et al.*, 2000), betanina (82.06 kJ/mol) y vulgaxantina-I (69.08 kJ/mol) de betabel (Saguy, 1979).

**Cuadro 10. Energía de activación (EA) y vida media ( $t_{1/2}$ ) de las betalaínas en extractos acuosos de tuna y betabel. Los valores EA se presentan como media  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) y letras diferentes indican diferencias significativas (prueba t de Student,  $\alpha = 0,05$ ).**

	T (°C)	Betacianinas		Betaxantinas	
		<i>Vigor</i>	Betabel	<i>Mandarina</i>	Betabel
$t_{1/2}$ (min)	50	291	308	718	356
	60	146	157	397	204
	70	99	104	233	128
	80	75	80	145	97
	90	48	50	86	58
EA (kJ/mol)		42.0 $\pm$ 0.4 a	42.3 $\pm$ 0.6 a	51.2 $\pm$ 0.9 a	42.7 $\pm$ 0.4 b

Las cinéticas de degradación de betalaínas reportadas en este estudio no son exclusivas para este tipo de pigmentos, ya que comportamientos similares también han sido reportados en antocianinas, compuestos hidrofílicos, de granada (Bhalerao & Chakraborty, 2021) y licopeno de jitomate (Badin *et al.*, 2021). A pesar de los elevados porcentajes de degradación de las betacianinas de *Vigor* y betabel, de hasta el 93% a 90 °C y 240 min, y de las betaxantinas de *Mandarina* y betabel, de hasta el 83% a la misma temperatura y tiempo, se debe resaltar que en la pasteurización convencional de alimentos de acidez moderada ( $\text{pH} < 4.5$ ), como los jugos, y de menor acidez ( $\text{pH} > 4,5$ ), como los productos lácteos, se utilizan temperaturas de 60 - 90 °C durante tiempos que van de 0.5 s a 30 min, dependiendo del alimento (Fellows, 2016). Recientemente, se reportó que el procesamiento térmico del jugo de tuna de la especie *O. dillenii* Haw. durante 36 s a 90 °C fue suficiente para garantizar la inhibición de microorganismos y la retención del color, con una retención de betacianina de hasta el 90%. En este estudio se recomendaron temperaturas de almacenamiento inferiores a 20 °C para garantizar la estabilidad del producto durante un máximo de 2 meses (Bassama *et al.*, 2020). En adición a lo anterior, es necesario realizar más investigación para desarrollar metodologías de estabilización de estos pigmentos tales como la encapsulación, lo que podría ampliar sus aplicaciones en alimentos y otros productos como los cosméticos (Azwanida *et al.*, 2014).

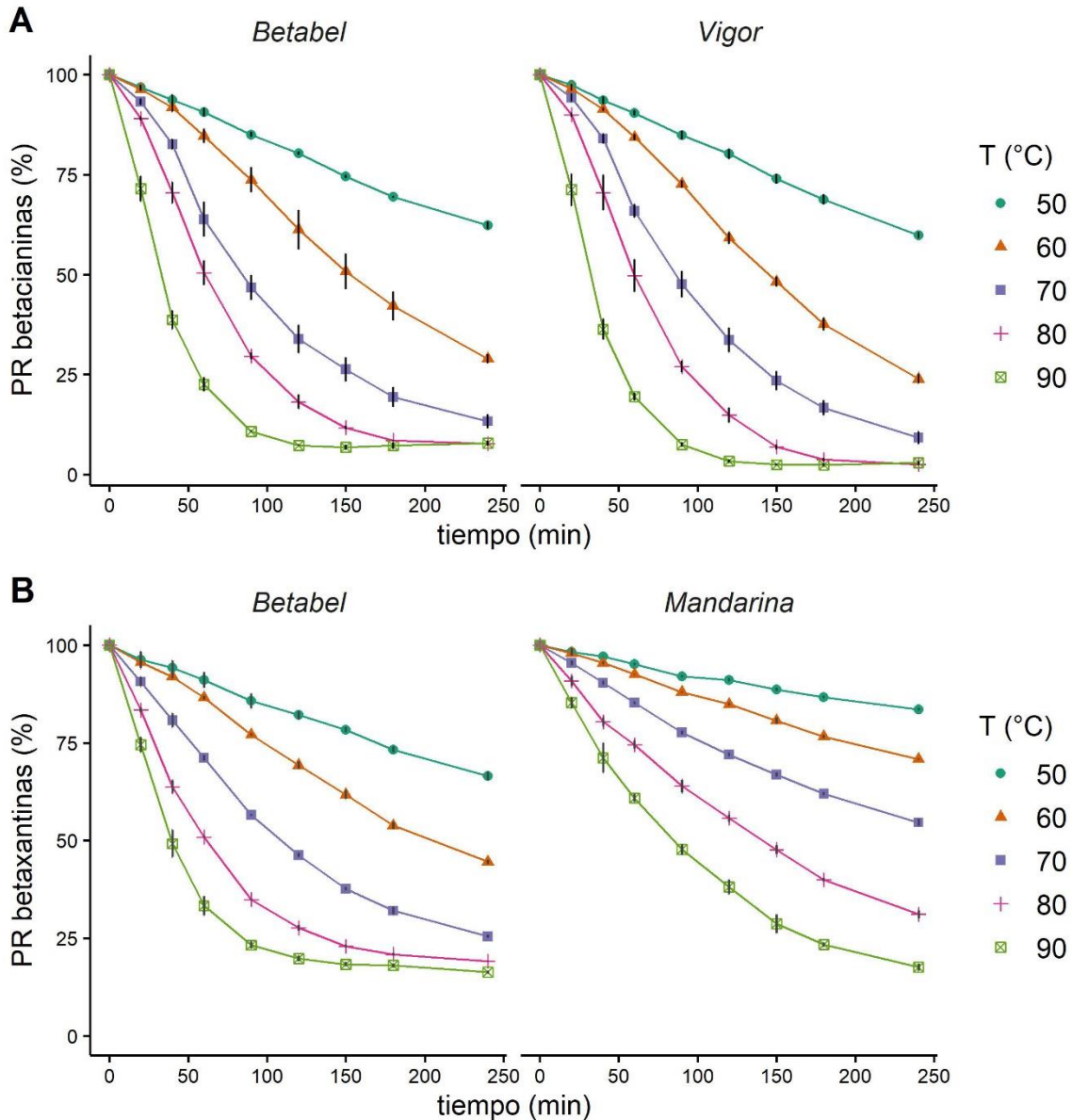


Figura 23. Efecto del tratamiento térmico sobre el porcentaje de retención (PR) de betacianinas de tuna *Vigor* y betabel (A) y de betaxantinas de tuna *Mandarina* y betabel (B). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE.

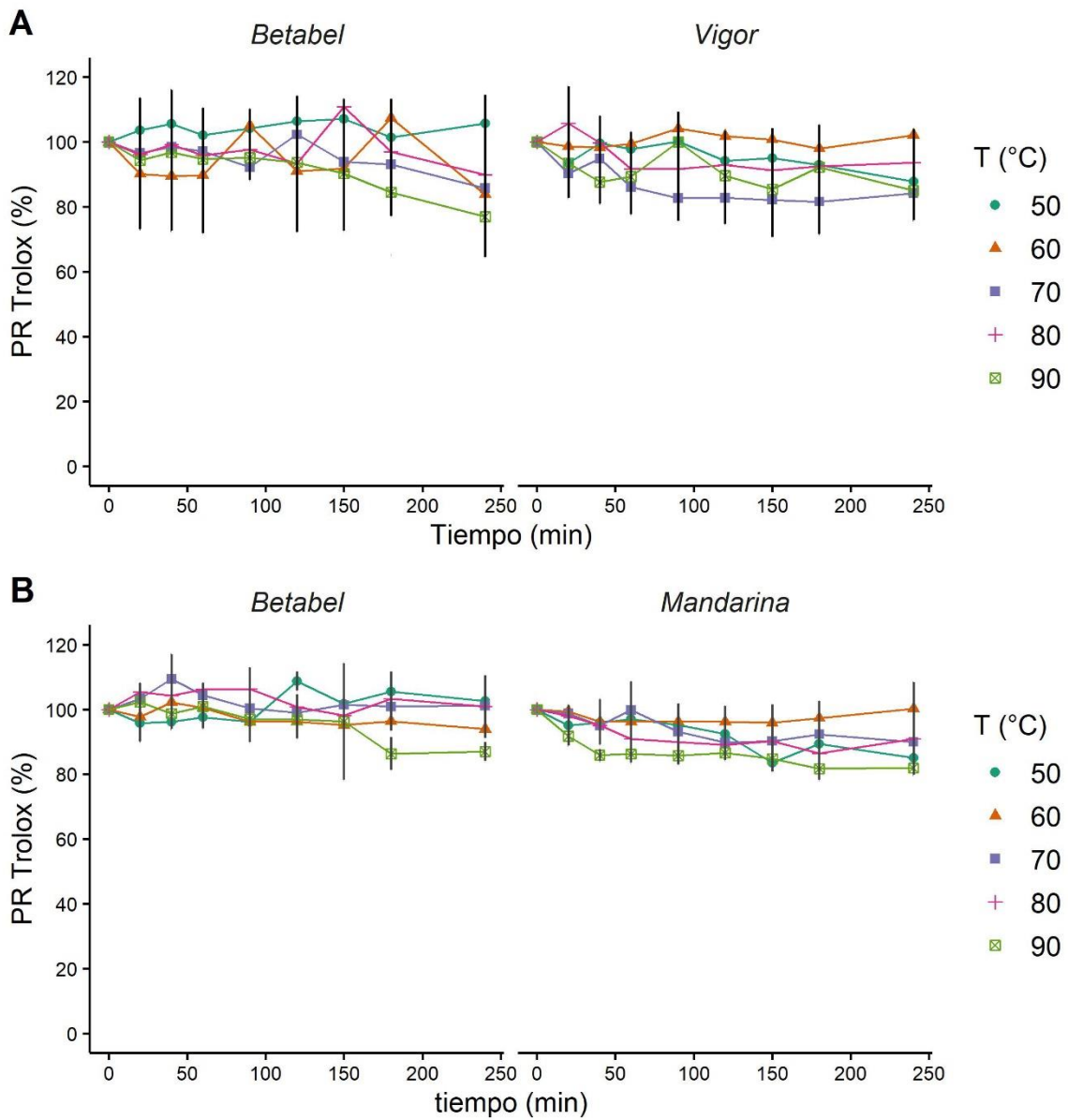
### 7.3.2 Efecto de la temperatura sobre la retención de la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos totales

A diferencia de las betalainas, los porcentajes de retención de la capacidad antioxidante por ABTS (Fig. 24) y DPPH (Fig. 25), así como de la cantidad de compuestos fenólicos totales (Fig. 26) en los extractos acuosos de ambas variedades de tuna y de betabel no mostraron tendencias claras de degradación durante los tratamientos térmicos. Sin embargo, la

temperatura y el tiempo tuvieron un efecto significativo sobre estos parámetros, mostrando una tendencia de reducción en concordancia con otros reportes en *C. formosanum* y *S. pruinosus* (Tsai *et al.*, 2010; Rodríguez-Sánchez, Cruz y Victoria & Barragán-Huerta, 2017).

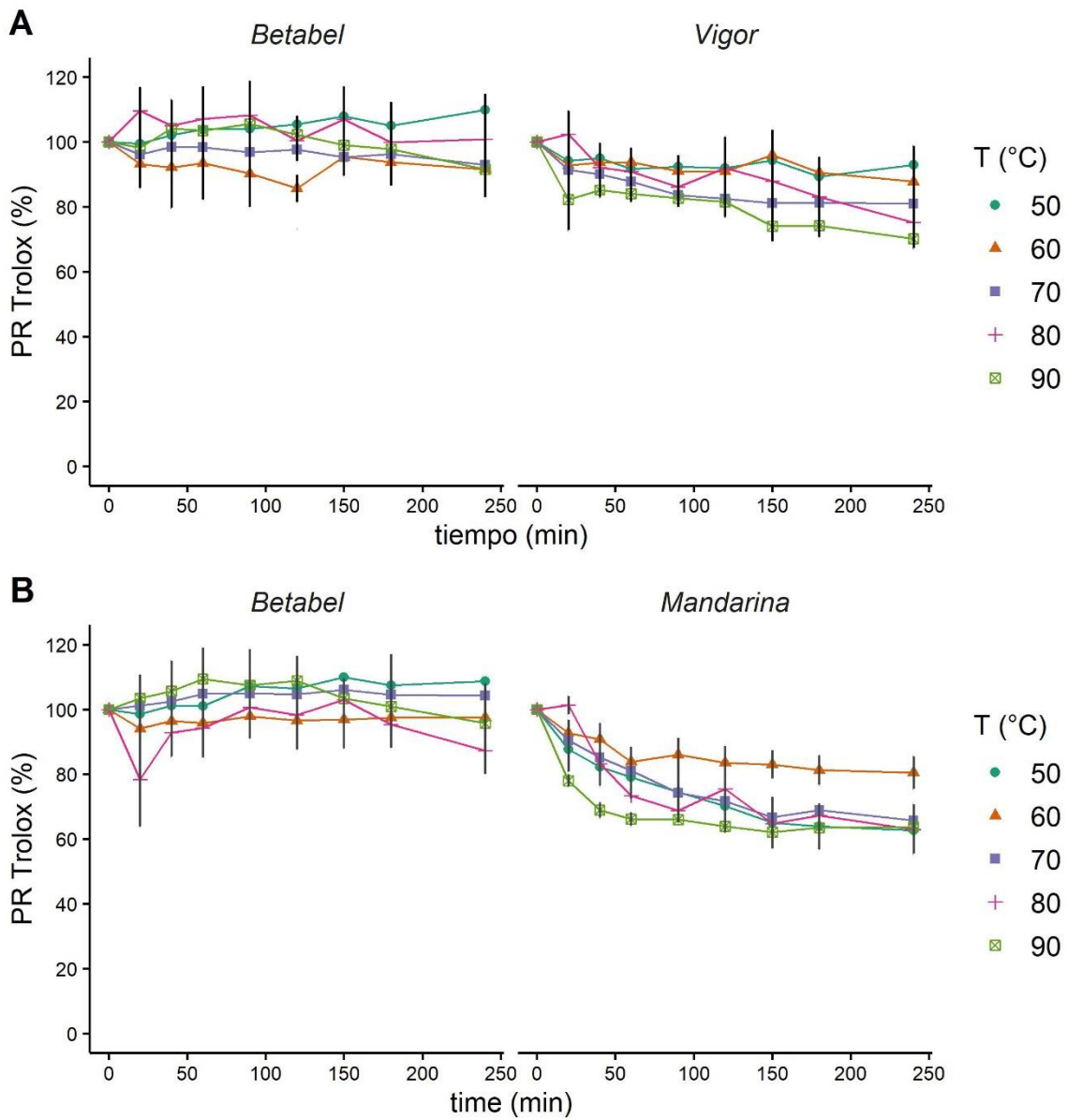
En general, considerando todas las temperaturas y tiempos, en los extractos acuosos de betabel se registraron valores significativamente más altos de actividad antioxidante (hasta un 7% para ABTS y un 23% para DPPH) y de compuestos fenólicos totales (hasta un 2%) en comparación con los obtenidos en ambas variedades de tuna. De manera notable, los porcentajes de retención respecto al valor inicial de estos parámetros no disminuyeron por debajo del 70%, en contraste con los patrones de degradación de betacianinas y betaxantinas, donde los porcentajes de retención respecto al valor inicial fueron inferiores al 15% a 90 °C y 240 min, por ejemplo. Los patrones poco claros podrían deberse a la presencia de otros compuestos en los extractos acuosos, además de las betalainas, que podrían ser más termoestables y contribuir a la actividad antioxidante a lo largo del tratamiento térmico. Por ejemplo, en la capacidad antioxidante por DPPH de soluciones de quercetina se reportaron pautas de retención poco claras durante el tratamiento térmico a 60 °C, donde se registró un aumento de la capacidad antioxidante durante las etapas iniciales del tratamiento térmico y una posterior disminución, terminando con valores cercanos a los iniciales después de 100 días (Pinelo *et al.*, 2004). Los autores del estudio anterior atribuyeron este comportamiento a las reacciones de escisión oxidativa y polimerización de la quercetina para generar compuestos con mayor actividad antioxidante. Sin embargo, esta idea no se contrastó experimentalmente. También se ha informado de un ligero aumento del contenido de compuestos fenólicos en productos de tuna procesados (conservas, jugo y pulpa seca) de las especies *O. robusta* cv Robusta y *O. ficus-indica*, lo que se atribuyó a un aumento de la capacidad de extracción de los compuestos fenólicos o a reacciones de hidrólisis en estos compuestos debido al tratamiento térmico (du Toit *et al.*, 2018). Se necesita más investigación para dilucidar la contribución de los compuestos fenólicos a la actividad antioxidante durante el tratamiento térmico.

Otra razón para el comportamiento poco claro en los porcentajes de retención de la capacidad antioxidante y el de compuestos fenólicos totales durante el tratamiento térmico podría ser la generación de compuestos de degradación derivados de la deglicosilación, hidrólisis, descarboxilación y deshidrogenación en las betalaínas (Castellar *et al.*, 2003; Herbach, Stintzing & Carle, 2006). Todo esto también podría tener una implicación en la actividad funcional de los productos o alimentos derivados de tuna producidos a altas temperaturas, pero, como en el caso de los compuestos fenólicos, se necesita más investigación para dilucidar la posible contribución de los productos de degradación de la betalaínas a la actividad antioxidante y al contenido de compuestos fenólicos.



**Figura 24.** Efecto del tratamiento térmico sobre el porcentaje de retención (PR) de la actividad antioxidante por ABTS en extractos acuosos de pulpa de tuna *Vigor* y betabel (A) y de extractos acuosos de tuna *Mandarina* y betabel (B). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE.





**Figura 25.** Efecto del tratamiento térmico sobre el porcentaje de retención (PR) de la actividad antioxidante por DPPH en extractos acuosos de pulpa de tuna *Vigor* y betabel (A) y de extractos acuosos de tuna *Mandarina* y betabel (B). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE.

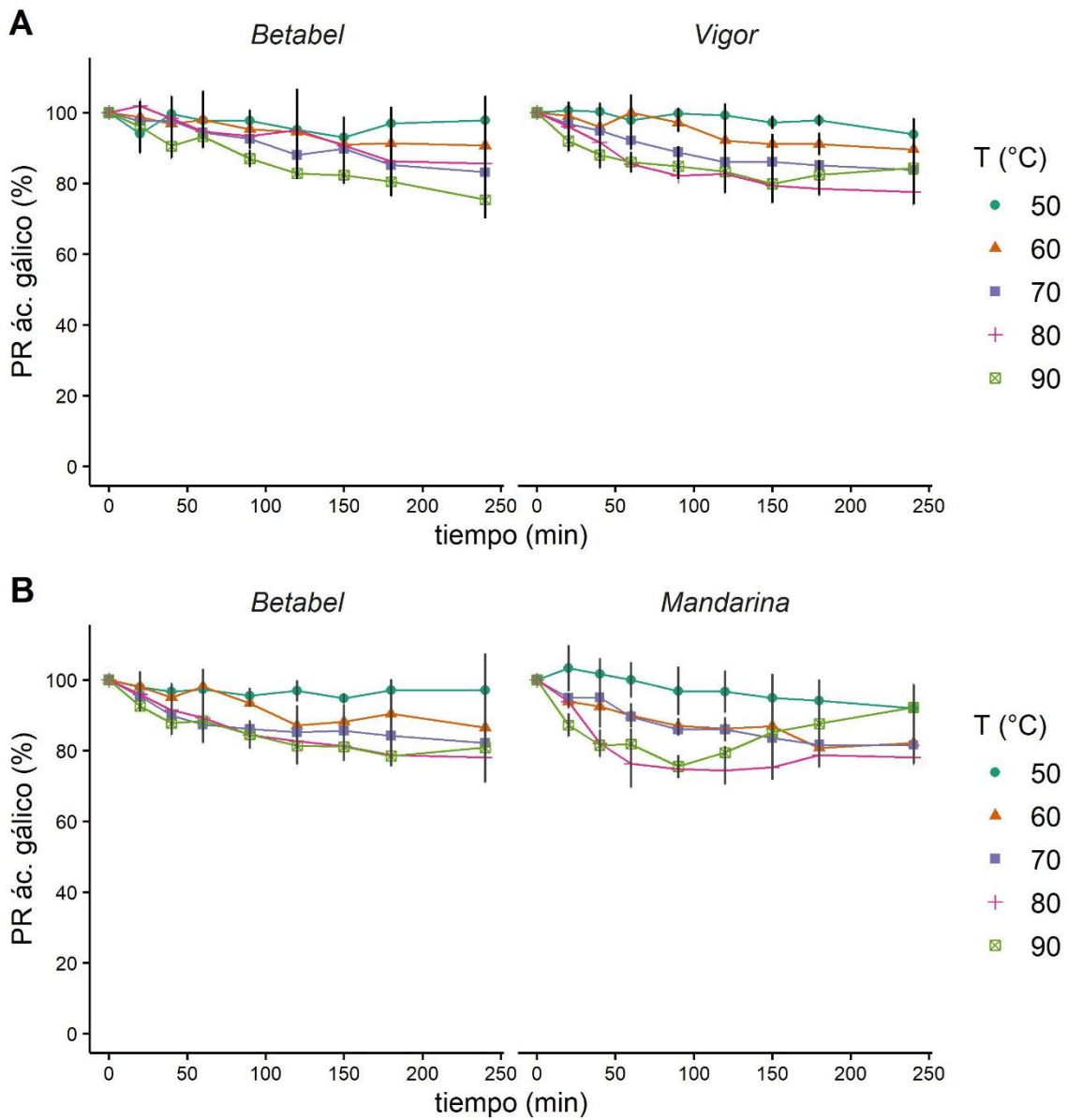


Figura 26. Efecto del tratamiento térmico sobre el porcentaje de retención (PR) del contenido de compuestos fenólicos totales en extractos acuosos de pulpa de tuna *Vigor* y betabel (A) y de extractos acuosos de tuna *Mandarina* y betabel (B). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE.

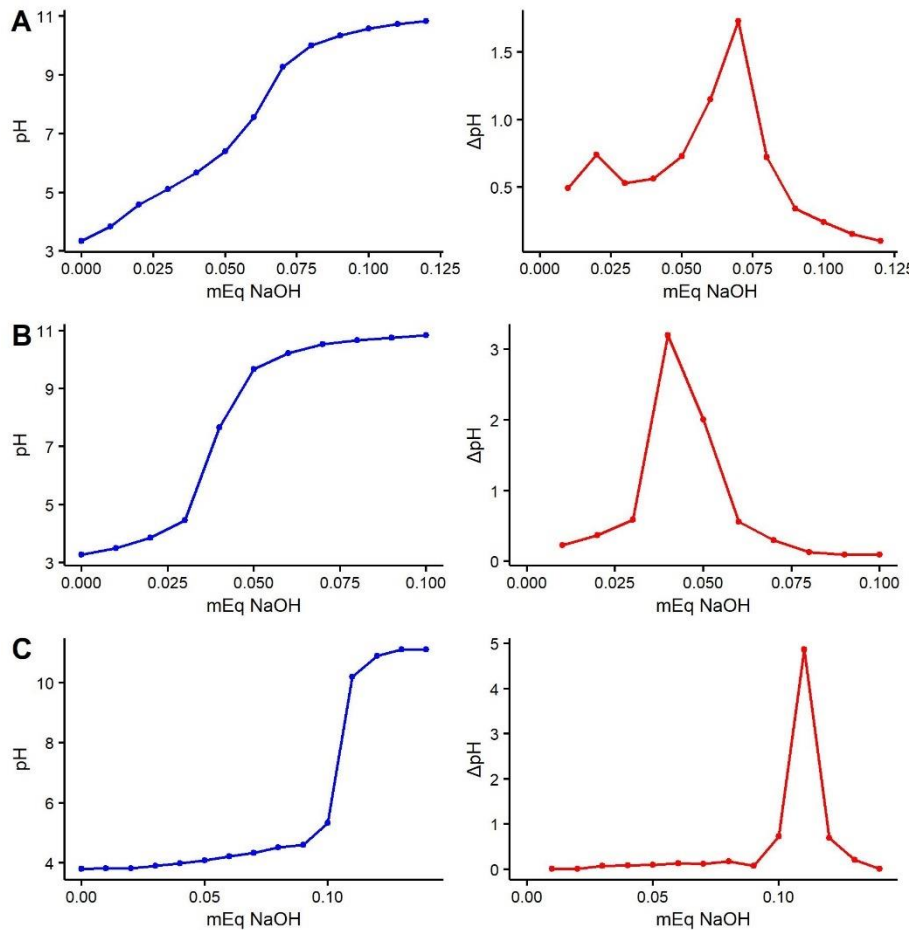
## 7.4 Encapsulación de betalaínas mediante coacervación compleja

De forma similar a lo realizado con la extracción y estabilidad térmica en betalaínas, el proceso de coacervación compleja de betacianinas se evaluó solo considerando a la variedad de tuna *Vigor*, mientras que para betaxantinas solo se utilizó a la variedad *Mandarina*.

### 7.4.1 Punto de equivalencia en soluciones de proteína de soya, pectina y alginato

Los resultados de la titulación de las soluciones de polímeros al 0.5% (p/v) se muestran en la figura 25. Mediante el registro del punto de inflexión en la gráfica del cambio de pH ( $\Delta$ pH) se determinaron los mEq por grama para cada polímero, los cuales fueron 0.93 mEq/g de proteína de soya (Fig. 27A), 0.33 mEq/g de pectina (Fig. 27B) y 1.47 mEq/g de alginato (Fig. 27C). Curvas de titulación similares ya han sido reportadas en gelatina, proteína de origen animal (Milanović *et al.*, 2014), pectina y alginato (Calderón-Oliver *et al.*, 2017).

A partir de los mEq de cada polímero se determinaron las relaciones masa:masa de las soluciones de polímeros para llevar a cabo el proceso de coacervación. Para el sistema pectina-proteína de soya se determinó una relación 5:3 (g pectina/g proteína de soya) y para el sistema alginato-proteína de soya de 3:4.8 (g alginato/g proteína de soya).

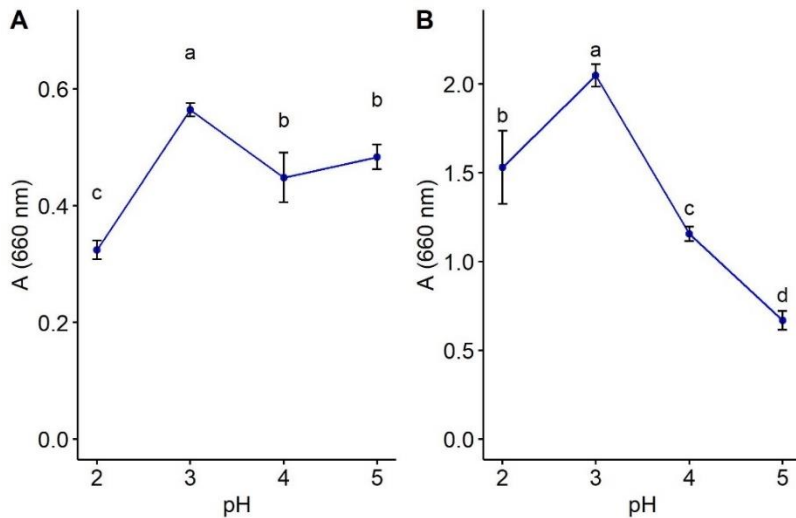


**Figura 27. Titulación de soluciones al 0.5% (p/v) de proteína de soya (A), pectina (B) y alginato (C).**

#### 7.4.2 Potencial Z y determinación del pH óptimo para llevar a cabo el proceso de coacervación

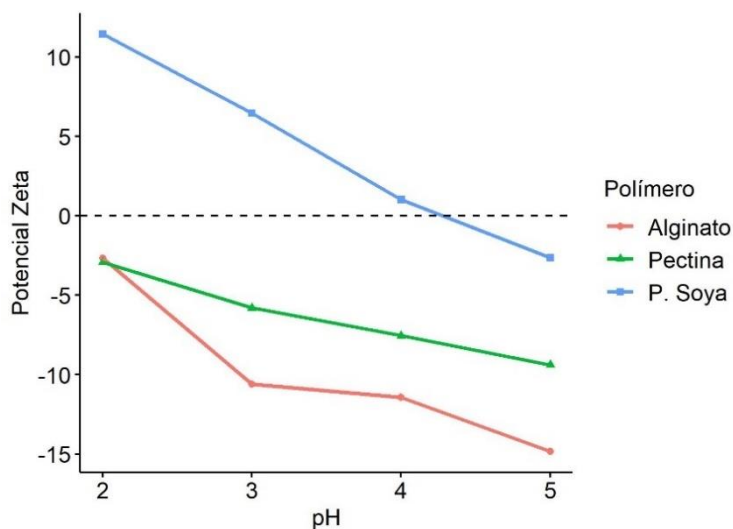
Una vez que se definieron las relaciones masa:masa para cada sistema de polímeros, se determinó el pH óptimo para llevar a cabo el proceso de coacervación (Fig. 28). Para ambos sistemas se determinó un pH óptimo de 3, en el cual se observó la mayor turbidez (absorbancia a 600 nm). A un pH de 3 también se registró un potencial Zeta positivo para la solución de proteína de soya y valores negativos para las soluciones de alginato y pectina (Fig. 29), mientras que, por ejemplo, a un pH de 5 todos los polímeros tuvieron valores de potencial Zeta negativos, lo que se vio reflejado en una menor interacción y por tanto en una menor turbidez en ambos sistemas. En sistemas de colágeno-alginato y colágeno-pectina también se determinó un pH óptimo de 3 para llevar a cabo el proceso de

coacervación compleja (Calderón-Oliver *et al.*, 2017), mientras que en un sistema de gelatina-carboximetil celulosa se reportó un pH óptimo de 4.3 (Zhang *et al.*, 2021).



**Figura 28.** Efecto del pH sobre la turbidez de mezclas de pectina-proteína de soya (A) y alginato-proteína de soya (B). Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ).

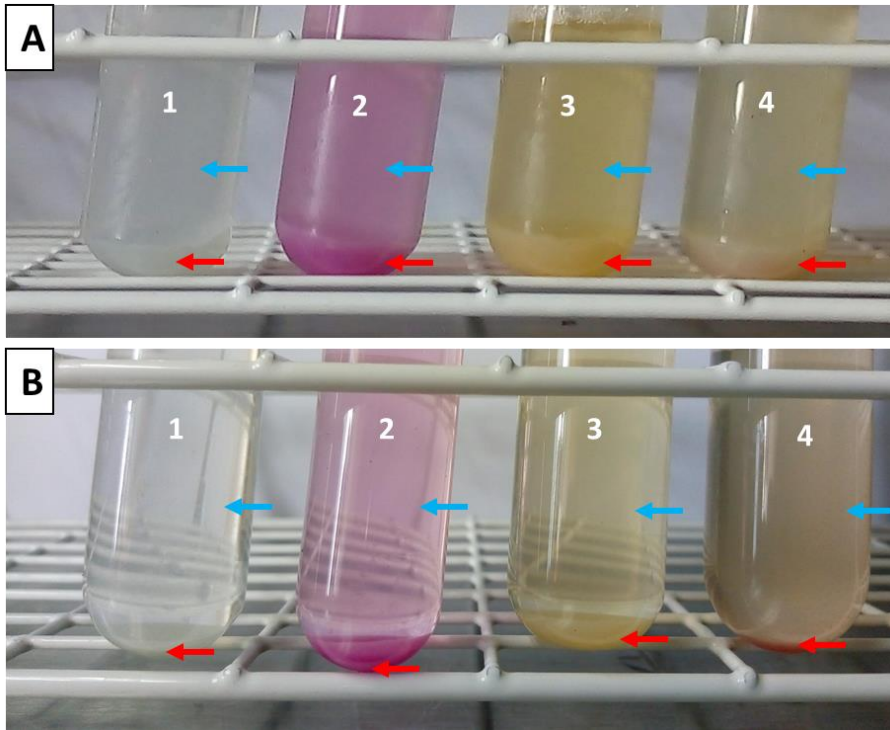
En relación con el potencial Zeta de proteínas, se espera que su carga neta sea positiva en valores de pH por debajo de su punto isoeléctrico, lo que concuerda con lo observado en la figura 29 para la proteína de soya, cuyo punto isoeléctrico es 4 (Milanović *et al.*, 2014). En contraste, en polisacáridos se espera que su carga neta sea negativa en un amplio rango de pH, como se ha reportado para carboximetil celulosa (Zhang *et al.*, 2021).



**Figura 29.** Evaluación del potencial Z en soluciones de polímeros al 0.5% (p/v)

### 7.4.3 Proceso de coacervación compleja de betalaínas

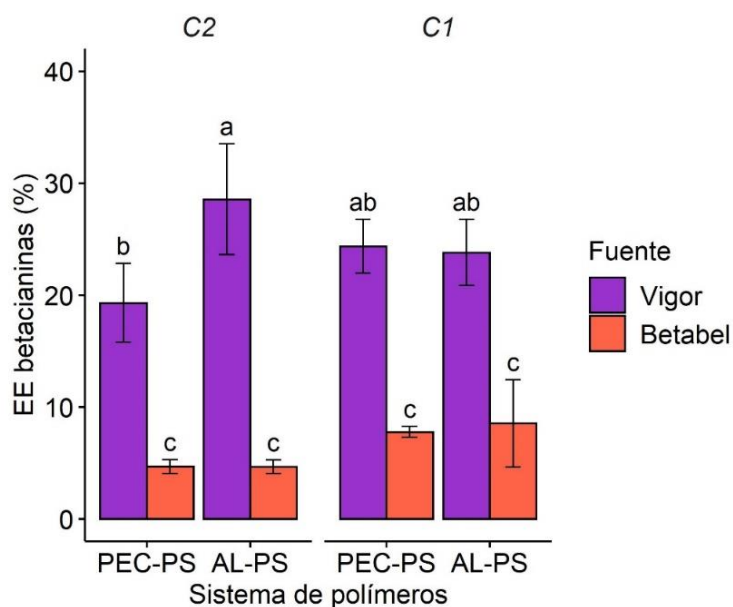
El proceso de coacervación compleja se llevó a cabo en los extractos acuosos de betabel y de pulpa de tunas *Vigor* y *Mandarina*. Lo anterior se apreció de forma visual como una separación de fases en el medio acuoso para ambos sistemas de polímeros (Fig. 30).



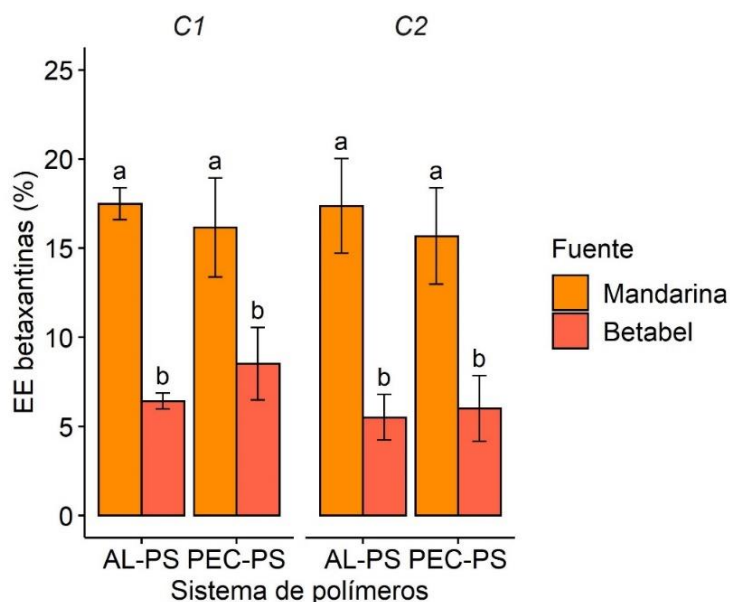
**Figura 30.** Coacervación compleja en el sistema alginato-proteína de soya (A) y pectina-proteína de soya (B) en un blanco con agua (1) y en extractos acuosos de pulpa de tuna *Vigor* (2), de pulpa de tuna *Mandarina* (3) y de betabel (4). Con flechas rojas se indica el coacervado formado después de 24 h a 4 °C y con flechas azules se indica la solución de equilibrio.

El proceso de coacervación compleja de betacianinas permitió obtener eficiencias de encapsulación de hasta el 28% en extractos de tuna *Vigor* y de hasta el 8.5% en betabel, ambas eficiencias se obtuvieron para el sistema alginato-proteína de soya (Fig. 31). Para betaxantinas el proceso de coacervación permitió obtener eficiencias de encapsulación de hasta el 17.5% en extractos de tuna *Mandarina* con el sistema alginato-proteína de soya, y del 8.5% en extractos de betabel con el sistema pectina-proteína de soya, sin observarse diferencias significativas entre las distintas cantidades de betaxantinas utilizadas (Fig. 32). En compuestos fenólicos provenientes cáscara de aguacate, compuestos de naturaleza hidrofílica, se reportaron eficiencias de encapsulación de hasta el 69% en los encapsulados

obtenidos mediante coacervación compleja con un sistema colágeno-pectina y la incorporación directa de los extractos (Calderón-Oliver *et al.*, 2017). En zeaxantina, compuesto hidrofóbico, la encapsulación mediante coacervación compleja utilizando un sistema gelatina-carboximetil celulosa, permitió obtener una eficiencia de encapsulación de hasta el 93% (Zhang *et al.*, 2021). En el caso de compuestos hidrofílicos, también es posible incorporarlos en una doble emulsión antes del proceso de coacervación, como se ha reportado en antocianinas de frambuesa negra emulsionadas con aceite de soya y posteriormente encapsuladas mediante un sistema de gelatina-goma arábica. Lo anterior permitió obtener eficiencias de encapsulación de hasta el 90% (Shaddel *et al.*, 2018). Recientemente, se reportó la encapsulación de betacianinas de *H. polyrhizus* mediante coacervación simple utilizando pectina, lo que permitió obtener eficiencias de encapsulación de hasta el 93% (Rahayuningsih *et al.*, 2021). También recientemente se reportó la encapsulación mediante coacervación compleja de betalainas de betabel utilizando quitosano y goma persa, polisacárido del tronco y las ramas del almendro silvestre. En este estudio se obtuvo una eficiencia de encapsulación del 90% (Namazzadeh, Ehsani & Ghasempour, 2022).



**Figura 31.** Eficiencia de encapsulación de betacianinas. Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ). C1: concentración 1 de betacianinas (0.6 a 538 nm). C2: concentración 2 de betacianinas (1.2 a 538 nm).



**Figura 32.** Eficiencia de encapsulación de betaxantinas. Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ). C1: concentración 1 de betaxantinas (0.6 a 483 nm). C2: concentración 2 de betaxantinas (1.2 a 483 nm).

En adición a la eficiencia de encapsulación de betalaínas, se llevó a cabo la cuantificación del contenido de compuestos fenólicos totales y de la capacidad antioxidante mediante ABTS (Anexo 1), sin embargo, se registró una gran variabilidad en las eficiencias de encapsulación para ambos parámetros, tanto en el experimento con extractos de pulpa de tuna *Vigor* y betabel, como en el experimento con extractos de tuna *Mandarina* y betabel (Anexo 2). Esto podría deberse a la interferencia de polímeros residuales en el medio acuoso al realizar la cuantificación de estas variables. También cabe señalar que este tipo de parámetros no han sido reportados en la mayoría de los estudios de coacervación citados en este estudio.

#### 7.4.4 Mejoramiento del proceso de encapsulación de betalaínas mediante coacervación compleja

Tomando en cuenta todo lo anterior se plantearon dos conjuntos de experimentos con el objetivo de mejorar las eficiencias de encapsulación. Primero se probó el uso de dobles emulsiones utilizando aceite de soya y lecitina de soya como emulsificante junto al proceso de coacervación compleja (Anexo 3), pero el proceso no fue adecuado ya que al disociar el



encapsulado el medio quedó completamente turbio, lo que imposibilitó la cuantificación espectrofotométrica de las betalaínas. Como segunda opción se llevó a cabo un diseño de superficie de respuesta variando el porcentaje de proteína de soya, el pH del medio para realizar la coacervación y la concentración de betalaínas. Como sistema de polímeros solo se utilizó el de pectina-proteína de soya y las cuantificaciones se centraron solo en las betacianinas de pulpa de tuna *Vigor* y las betaxantinas de tuna *Mandarina*. Los resultados del diseño de superficie de respuesta se muestran en el cuadro 12 para betacianinas y en el cuadro 13 para betaxantinas.

En el modelo de la eficiencia de encapsulación de betacianinas de tuna *Vigor* (cuadro 12), los términos significativos fueron los lineales de los tres factores considerados, la interacción entre el porcentaje de proteína de soya y la concentración de betacianinas, así como el término cuadrático del porcentaje de proteína. Aunque el coeficiente de determinación y el coeficiente de determinación ajustado estuvieron por debajo de 0.9, el modelo resultó ser significativo ( $p\text{-value} < 0.05$ ) con los factores considerados. De manera general, la reducción del pH de 5 a 3, el aumento en el porcentaje de proteína de soya de 0.5 a 2.0% p/v y la reducción de la concentración de betacianinas de 1.0 a 0.2 a 538 nm tuvieron un efecto positivo sobre la eficiencia de encapsulación de estos pigmentos. Con un pH de 4, un porcentaje de proteína de 2.0% (p/v) y una absorbancia de 0.2 se obtuvo la mayor eficiencia de encapsulación con un valor de 39%. Esto representó un aumento del 13% respecto a los resultados presentados en la sección anterior (7.4.3).

**Cuadro 11. Modelo de superficie de respuesta para la eficiencia de encapsulación de betacianinas de tuna *Vigor*. Con \* se indican los términos del modelo significativos ( $\alpha = 0.05$ ).  $R^2=0.74$ ,  $R^2$  ajustado=0.67,  $p\text{-value}$  del modelo =  $1.2 \cdot 10^{-4}$**

<b>Término</b>	<b>Coficiente</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Valor de t</b>
Intercepto	6.2	2.0	3.1*
pH	-3.1	1.4	-2.2*
PP	4.1	1.4	2.9*
CBC	-7.2	1.4	-5.1*
pH:PP	3.2	2.0	1.6
pH:CBC	0.3	2.0	0.16
PP:CBC	-6.0	2.0	-3.0*
pH <sup>2</sup>	0.4	2.0	0.2
PP <sup>2</sup>	5.4	2.0	2.7*
CBC <sup>2</sup>	3.8	2.0	1.9

PP: porcentaje de proteína de soya (% p/v). CBC: Concentración de betacianinas (absorbancia a 538 nm).

Respecto al modelo de la eficiencia de encapsulación de betaxantinas de tuna *Mandarina* (cuadro 13), solo los términos lineal y cuadrático de la concentración de betaxantinas resultaron ser significativos. Al igual que lo observado en betacianinas de tuna *Vigor* la reducción de la concentración de 1.0 a 0.2 a 483 nm tuvo un efecto positivo en la eficiencia de encapsulación de betaxantinas. Para este modelo el coeficiente de determinación y el coeficiente de determinación ajustado fueron cercanos a 0.9 y el modelo resultó ser significativo ( $p\text{-value} < 0.05$ ) con los factores considerados. Considerando todos los tratamientos en los cuales se utilizó una absorbancia de 0.2 a 483 nm, se obtuvieron eficiencias de encapsulación de betaxantinas entre 36.7 y 46.9%, lo que representó un aumento de hasta el 30% en comparación con los resultados de la sección 7.4.3.

**Cuadro 12. Modelo de superficie de respuesta para la eficiencia de encapsulación de betaxantinas de tuna *Mandarina*. Con \* se indican los términos del modelo significativos ( $\alpha = 0.05$ ).  $R^2=0.91$ ,  $R^2$  ajustado= $0.87$ ,  $p\text{-value}$  del modelo =  $2.34 \times 10^{-9}$**

<b>Término</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Valor de t</b>
Intercepto	16.2	1.9	8.7*
pH	2.0	1.3	1.5
PP	0.3	1.3	0.2
CBX	-18.2	1.3	-13.7*
pH:PP	-0.6	1.9	-0.3
pH:CBX	0.9	1.9	0.5
PP:CBX	-2.4	1.9	-1.3
pH <sup>2</sup>	2.4	1.9	1.3
PP <sup>2</sup>	-1.7	1.9	-0.9
CBX <sup>2</sup>	8.5	1.9	4.5*

PP: porcentaje de proteína de soya (% p/v). CBX: Concentración de betaxantinas (absorbancia a 483 nm).

Las eficiencias de encapsulación tanto para betacianinas de tuna *Vigor* como para betaxantinas de tuna *Mandarina* se mantuvieron por debajo de lo reportado en de betacianinas de pitahaya (*H. polyrhizus*) encapsuladas mediante coacervación simple utilizando pectina, con eficiencias de encapsulación de hasta el 93% (Rahayuningsih *et al.*, 2021) y lo reportado en betalaínas de betabel encapsuladas mediante coacervación compleja utilizando quitosano y goma persa, con una eficiencia de encapsulación del 90% (Namazzadeh, Ehsani & Ghasempour, 2022). Las bajas eficiencias de encapsulación podrían deberse a la poca afinidad de los compuestos de interés por el coacervado formado con los con la proteína de soya y los polisacáridos utilizados, pero hasta la fecha no hay estudios que hayan comprobado las posibles interacciones moleculares de las betalaínas con uno o

más biopolímeros, lo cual podría realizarse mediante espectroscopía infrarroja (*FTIR*), por ejemplo. Una forma de aumentar las eficiencias de encapsulación podría ser mediante la reutilización de la solución de equilibrio (Fig. 28). Esto es, una vez separado el coacervado, la solución de equilibrio contendrá los pigmentos no encapsulados, los cuales podrían someterse a un segundo proceso de coacervación compleja.

Es importante resaltar que hay evidencia experimental de que el proceso de encapsulación mediante coacervación depende de las propiedades de los biopolímeros utilizados y de los compuestos a encapsular, así como de las condiciones utilizadas para llevar a cabo el proceso (Timilsena *et al.*, 2019). Lo anterior se ha visto reflejado en un amplio rango de eficiencias de encapsulación, por ejemplo, en la encapsulación de eugenol, un compuesto hidrofóbico, utilizando alginato y gelatina se reportó un rango de eficiencias de encapsulación del 6 al 16% (Shinde & Nagarsenker, 2011), mientras que en aceite de lavanda se reportó un rango de eficiencias de entre 37 y 60% utilizando un sistema de colágeno hidrolizado y quitosano (Ocak, 2012).

Es notable que el proceso de encapsulación mediante coacervación compleja ya ha sido establecido a nivel piloto, con el potencial de ser escalado a nivel industrial, para la encapsulación de limoneno utilizando un sistema de alginato-gelatina, obteniéndose eficiencias de encapsulación de hasta el 83% (Tang, Scher & Jeoh, 2020). Esto demuestra que la coacervación compleja sigue teniendo el potencial de ofrecer un método de encapsulación adaptable a distintos tipos de compuestos funcionales, tanto hidrofóbicos como hidrofílicos.

## 8. Conclusiones

Los resultados obtenidos en la caracterización química de las variedades de tuna en este estudio estuvieron dentro de los rangos reportados para otras especies y variedades de *Opuntia* provenientes de otras regiones. Las cantidades de betacianinas, betaxantinas y compuestos fenólicos totales, así como la capacidad antioxidante por ABTS en las variedades de tuna caracterizadas también estuvieron dentro lo reportado para otras especies de *Opuntia* y respecto al betabel. De forma complementaria en las variedades seleccionadas se identificaron mediante HPLC betacianinas como la betanina e isobetanina, y betaxantinas como la indicaxantina. Con base en lo anterior, las variedades de tuna caracterizadas en este estudio se pueden considerar una fuente atractiva de betalaínas y otros compuestos funcionales tales como flavonoides, vitamina C, ácidos fenólicos, fibra soluble y niacina.

El número de extracciones tuvo un efecto significativo sobre la extracción de betalaínas y otros parámetros como la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos totales. En contraste, el estado de la materia prima (lío filizada o fresca) no tuvo efecto sobre la mayoría de las variables mencionadas. El aumento en el porcentaje de etanol hasta 60% p/v disminuyó de manera significativa la extracción de betalaínas y compuestos funcionales mientras que el aumento del volumen de solvente respecto a la masa de pulpa (hasta 1:7 g/mL) tuvo un efecto positivo en la extracción. En cuanto a la aplicación de metodologías no convencionales de extracción, solo la aplicación de ultrasonido por 3 min tuvo un efecto positivo sobre la extracción de betalaínas y compuestos funcionales, mientras que la aplicación de microondas-ultrasonido hasta por 10 min no tuvo un efecto significativo en ninguna de las respuestas evaluadas. Debido a su simpleza, el método de extracción se estableció como la triple extracción en pulpa fresca utilizando agua como solvente en una relación 1:2 (g/mL).

Las betaxantinas de tuna *Mandarina* fueron más termoestables que las de betabel y registraron una energía de activación mayor que en esta hortaliza, mientras que las betacianinas de tuna *Vigor* tuvieron una termo estabilidad similar a las del betabel. En

general, el aumento de la temperatura, de 50 a 90 °C, y el tiempo de tratamiento térmico, de 0 a 240 min, tuvieron un efecto significativo en las retenciones de betacianinas, betaxantinas, la capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos totales. De forma notable, los porcentajes de retención de la capacidad antioxidante y de los compuestos fenólicos totales no mostraron un patrón claro de comportamiento durante todo el tratamiento térmico, lo que pudo deberse a la presencia de otros compuestos en los extractos acuosos de tuna y betabel.

Finalmente, se estableció el proceso de encapsulación mediante coacervación compleja de betacianinas de tuna *Vigor* y betaxantinas de tuna *Mandarina*, utilizando pectina y proteína de soya como biopolímeros de encapsulación. Mediante de un diseño de superficie de respuesta tomando en cuenta el pH, el porcentaje de proteína de soya y la concentración de betalaínas, fue posible mejorar los rendimientos de encapsulación tanto de betacianinas como de betaxantinas. Sin embargo, los rendimientos de encapsulación obtenidos estuvieron por debajo de lo reportado para betalaínas de otras fuentes vegetales y otro tipo de biopolímeros para llevar a cabo la coacervación. Esto pudo deberse a la poca afinidad de las betalaínas provenientes de pulpa de tuna por el coacervado formado con la proteína de soya y la pectina.

Los resultados de este estudio pueden ayudar a la selección de variedades de tuna con potencial para ser utilizadas como fuente de betalaínas, así como al establecimiento de procesos de extracción y encapsulación mediante coacervación compleja. En particular, las variedades *Vigor* de coloración púrpura y *Mandarina* de coloración amarillo-naranja pueden considerarse una fuente atractiva de betalaínas. De la pulpa de ambas variedades es posible obtener extractos de pigmentos de manera simple mediante la utilización de agua y una triple extracción. La encapsulación de betalaínas puede llevarse a cabo mediante coacervación compleja utilizando un sistema de proteínas de soya y pectina; sin embargo, es necesario llevar a cabo más investigación para determinar si el proceso de encapsulación puede contribuir a aumentar la estabilidad de las betalaínas durante el tratamiento térmico o posteriormente durante el almacenamiento.

## 9. Perspectivas y recomendaciones

- El análisis sensorial de las variedades de tuna caracterizadas en este estudio contribuiría a determinar aspectos importantes como su aceptabilidad, perfil de sabores y aromas, así como a establecer la relación entre el aspecto sensorial y los parámetros químicos en la pulpa de la tuna.
- Para complementar los resultados de caracterización, también resultaría importante llevar a cabo la identificación de otros compuestos funcionales, tales como compuestos fenólicos.
- La evaluación de distintos factores y metodologías no convencionales sobre el proceso de extracción de betalaínas y otros compuestos funcionales también se podría llevar a cabo en la cáscara de tuna, lo que permitiría aprovechar todo el fruto o valorizar la parte no consumida y generalmente desechada.
- Se necesita más investigación para dilucidar la contribución de las betalaínas, compuestos fenólicos y ácidos orgánicos a la actividad antioxidante durante el tratamiento térmico.
- La energía de activación, obtenida mediante las pruebas de termo estabilidad, puede ser utilizada para estimar la cinética de degradación de las betalaínas dentro del rango de temperaturas evaluado, lo que permitiría calcular las cantidades de pigmento retenido en procesos de pasteurización o en la elaboración de productos que requieran temperaturas relativamente altas.
- De forma complementaria, se podrían realizar otras pruebas en los encapsulados obtenidos mediante coacervación compleja, como estabilidad térmica, cinéticas de liberación de los compuestos de interés y su aplicación en alimentos. Lo anterior permitiría determinar si la coacervación compleja es un método de encapsulación adecuado para betalaínas y de esta forma aumentar la aplicabilidad de estos pigmentos.

## 10. Literatura citada

Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2012). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>

Albano, C., Negro, C., Tommasi, N., Gerardi, C., Mita, G., Miceli, A., De Bellis, L., & Blando, F. (2015). Betalains, phenols and antioxidant capacity in cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] fruits from Apulia (South Italy) genotypes. *Antioxidants*, 4(2), 269–280. <https://doi.org/10.3390/antiox4020269>

Alonso-Carrillo, N., Aguilar-Santamaría, M. de los Á., Vernon-Carter, E. J., Jiménez-Alvarado, R., Cruz-Sosa, F., & Román-Guerrero, A. (2017). Extraction of phenolic compounds from *Satureja macrostema* using microwave-ultrasound assisted and reflux methods and evaluation of their antioxidant activity and cytotoxicity. *Industrial Crops and Products*, 103(September), 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.002>

Andreu, L., Nuncio-Jáuregui, N., Carbonell-Barrachina, Á. A., Legua, P., & Hernández, F. (2018). Antioxidant properties and chemical characterization of Spanish *Opuntia ficus-indica* Mill. cladodes and fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4), 1566–1573. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8628>

AOAC. (2000). *Official methods of analysis, AOAC International* (17° ed.). AOAC International.

Azeredo, H. M. C. (2009). Betalains: Properties, sources, applications, and stability—A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2365–2376. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01668.x>

Azwanida, N. N., Normasarah, N., & Afandi, A. (2014). Utilization and evaluation of betalain pigment from red dragon fruit (*Hylocereus Polyrhizus*) as a natural colorant for lipstick. *Jurnal Teknologi*, 69(6), 139–142. <https://doi.org/10.11113/jt.v69.3326>

Badin, E. E., Quevedo-Leon, R., Ibarz, A., Ribotta, P. D., & Lespinard, A. R. (2021). Kinetic modeling of thermal degradation of color, lycopene, and ascorbic acid in crushed tomato.

*Food and Bioprocess Technology*, 14(2), 324–333. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02579-1>

Badui Dergal, S. (2006). *Química de los alimentos* (4ta edición). Pearson Educación.

Barba, F. J., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Poojary, M. M., Roohinejad, S., Lorenzo, J. M., & 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 and Technology*, 67, 260–270. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.012>

Barrows, J. N., Lipman, A. L., & Bailey, C. J. (2003). *Color Additives: FDA's Regulatory Process and Historical Perspectives*. Food Safety Magazine. <https://www.fda.gov/forindustry/coloradditives/regulatoryprocesshistoricalperspectives/>

Bassama, J., Tamba, A., Ndong, M., Sarr, K. D. D., & Cissé, M. (2020). Degradation kinetics of betacyanins during the pasteurization and storage of cactus pear (*Opuntia dillenii* Haw.) juice using the Arrhenius, Eyring, and Ball models. *Beverages*, 7(1), 2. <https://doi.org/10.3390/beverages7010002>

Ben Haj Koubaier, H., Snoussi, A., Essaidi, I., Chaabouni, M. M., Thonart, P., & Bouzouita, N. (2014). Betalain and phenolic compositions, antioxidant activity of Tunisian Red beet (*Beta vulgaris* L. conditiva) roots and stems extracts. *International Journal of Food Properties*, 17(9), 1934–1945. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.772196>

Bennacef, C., Desobry-Banon, S., Probst, L., & Desobry, S. (2021). Advances on alginate use for spherification to encapsulate biomolecules. *Food Hydrocolloids*, 118, 106782. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106782>

Bhalerao, P. P., & Chakraborty, S. (2021). Integrated calculation of pasteurization time: A case study for thermal inactivation kinetics of a mixed fruit beverage. *Journal of Food Process Engineering*, 44(8). <https://doi.org/10.1111/jfpe.13761>



Both, S., Chemat, F., & Strube, J. (2014). Extraction of polyphenols from black tea—Conventional and ultrasound assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, *21*(3), 1030–1034. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.11.005>

Bro, R., & Smilde, A. K. (2014). Principal component analysis. *Anal. Methods*, *6*(9), 2812–2831. <https://doi.org/10.1039/C3AY41907J>

Calderón-Oliver, M., Pedroza-Islas, R., Escalona-Buendía, H. B., Pedraza-Chaverri, J., & Ponce-Alquicira, E. (2017). Comparative study of the microencapsulation by complex coacervation of nisin in combination with an avocado antioxidant extract. *Food Hydrocolloids*, *62*, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.028>

Calva-Estrada, S. J., Jiménez-Fernández, M., & Lugo-Cervantes, E. (2022). Betalains and their applications in food: The current state of processing, stability and future opportunities in the industry. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, *4*, 100089. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100089>

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. <https://doi.org/10.17221/210/2010-CJFS>

Cardoso-Ugarte, G. A., Sosa-Morales, M. E., Ballard, T., Liceaga, A., & San Martín-González, M. F. (2014). Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). *LWT - Food Science and Technology*, *59*(1), 276–282. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.025>

Casamides, J. M., & González, H. (2014). *Soy protein: Production methods, functional properties and food sources*. Nova Science Publishers, Inc.

Castellanos-Santiago, E., & Yahia, E. M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(14), 5758–5764. <https://doi.org/10.1021/jf800362t>

Castellar, M. R., Obón, J. M., & Fernández-López, J. A. (2006). The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colourant from *Opuntia stricta* fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*(1), 122–128. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2285>

Castellar, R., Obón, J. M., Alacid, M., & Fernández-López, J. A. (2003). Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(9), 2772–2776. <https://doi.org/10.1021/jf021045h>

Cejudo-Bastante, M. J., Hurtado, N., Delgado, A., & Heredia, F. J. (2016). Impact of pH and temperature on the colour and betalain content of Colombian yellow pitaya peel (*Selenicereus megalanthus*). *Journal of Food Science and Technology*, *53*(5), 2405–2413. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2215-y>

Celli, G. B., & Brooks, M. S. L. (2017). Impact of extraction and processing conditions on betalains and comparison of properties with anthocyanins—A current review. *Food Research International*, *100*, 501–509. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.034>

Celli, G. B., Ghanem, A., & Brooks, M. S. L. (2015). Bioactive encapsulated powders for functional foods—A review of methods and current limitations. *Food and Bioprocess Technology*, *8*(9), 1825–1837. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1559-z>

Chen, Y., Gu, X., Huang, S. Quan, Li, J., Wang, X., & Tang, J. (2010). Optimization of ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) of polysaccharides from *Inonotus obliquus* and evaluation of its anti-tumor activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, *46*(4), 429–435. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.02.003>

Coskuner, Y., Turker, N., Ekiz, H. I., Aksay, S., & Karababa, E. (2000). Effect of pH and temperature on the thermostability of prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) yellow-orange pigments. *Food/Nahrung*, *44*(4), 261–263. [https://doi.org/10.1002/15213803\(20000701\)44:4<261::AID-FOOD261>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/15213803(20000701)44:4<261::AID-FOOD261>3.0.CO;2-Y)

de Mejia, E. G., Zhang, Q., Penta, K., Eroglu, A., & Lila, M. A. (2020). The colors of health: Chemistry, bioactivity, and market demand for colorful foods and natural food sources of colorants. *Annual Review of Food Science and Technology*, *11*, 145–182. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051729>

de Mendiburu, F. (2020). *agricolae: Statistical procedures for agricultural research* (1.3-2). <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>

de Souza, R. L. A., Santana, M. F. S., de Macedo, E. M. S., de Brito, E. S., & Correia, R. T. P. (2015). Physicochemical, bioactive and functional evaluation of the exotic fruits *Opuntia ficus-indica* and *Pilosocereus pachycladus* Ritter from the Brazilian caatinga. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(11), 7329–7336. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1821-4>

del Socorro Santos Díaz, M., Barba de la Rosa, A.-P., Héliès-Toussaint, C., Guéraud, F., & Nègre-Salvayre, A. (2017). *Opuntia* spp.: Characterization and benefits in chronic diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2017/8634249>

Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains—Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *40*(3). <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>

du Toit, A., de Wit, M., Osthoff, G., & Hugo, A. (2018). Relationship and correlation between antioxidant content and capacity, processing method and fruit colour of cactus pear fruit. *Food and Bioprocess Technology*, *11*(8), 1527–1535. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2120-7>

Eghbal, N., & Choudhary, R. (2018). Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems. *LWT*, *90*, 254–264. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.036>

Esatbeyoglu, T., Wagner, A. E., Schini-Kerth, V. B., & Rimbach, G. (2015). Betanin - A food colorant with biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research*, *59*(1), 36–47. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400484>

Espinosa-Andrews, H., Sandoval-Castilla, O., Vázquez-Torres, H., Vernon-Carter, E. J., & Lobato-Calleros, C. (2010). Determination of the gum arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and

rheological features of their coacervates. *Carbohydrate Polymers*, 79(3), 541–546. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.040>

Esquivel, P. (2004). Los frutos de las cactáceas y su potencial como materia prima. *Agronomía Mesoamericana*, 15(2), 215–219.

Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols—A review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(10), 510–523. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>

FAO. (2013). *Agro-industrial utilization of cactus pear*.

FAO. (2018). *Ecología del cultivo, manejo y usos del nopal*. <https://www.fao.org/3/i7628es/I7628ES.pdf>

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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.121>

FDA. (2016). *Color Additives Listed for Use in Food (From the Code of Federal Regulations)*. <https://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditives/ColorAdditivesinSpecificProducts/InFood/ucm130054.htm>

Fellows, P. J. (2016). *Food Processing Technology: Principles and Practice.: Vol. 4th ed.* Woodhead Publishing.

Fernández-López, J. A., Roca, M. J., Angosto, J. M., & Obón, J. M. (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. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0664-3>

Fraj, J., Petrović, L., Đekić, L., Budinčić, J. M., Bučko, S., & Katona, J. (2021). Encapsulation and release of vitamin C in double W/O/W emulsions followed by complex coacervation in gelatin-sodium caseinate system. *Journal of Food Engineering*, 292, 110353. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110353>

- Gañán-Gómez, I., Wei, Y., Yang, H., Boyano-Adánez, M. C., & García-Manero, G. (2013). Oncogenic functions of the transcription factor Nrf2. *Free Radical Biology and Medicine*, *65*, 750–764. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.041>
- Gandía-Herrero, F., & García-Carmona, F. (2013). Biosynthesis of betalains: Yellow and violet plant pigments. *Trends in Plant Science*, *18*(6), 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.01.003>
- García-Cayuela, T., Gómez-Maqueo, A., Guajardo-Flores, D., Welti-Chanes, J., & Cano, M. P. (2019). Characterization and quantification of individual betalain and phenolic compounds in Mexican and Spanish prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) tissues: A comparative study. *Journal of Food Composition and Analysis*, *76*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.11.002>
- García-Cruz, L., Dueñas, M., Santos-Buelgas, C., Valle-Guadarrama, S., & Salinas-Moreno, Y. (2017). Betalains and phenolic compounds profiling and antioxidant capacity of pitaya (*Stenocereus* spp.) fruit from two species (*S. pruinosus* and *S. stellatus*). *Food Chemistry*, *234*, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.174>
- Gengatharan, A., Dykes, G. A., & Choo, W. S. (2015). Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT - Food Science and Technology*, *64*(2), 645–649. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.052>
- Gengatharan, A., Dykes, G. A., & Choo, W. S. (2016). Stability of betacyanin from red pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) and its potential application as a natural colourant in milk. *International Journal of Food Science and Technology*, *51*(2), 427–434. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12999>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0156-6>

- Ghasemi, S., Jafari, S. M., Assadpour, E., & Khomeiri, M. (2018). Nanoencapsulation of d-limonene within nanocarriers produced by pectin-whey protein complexes. *Food Hydrocolloids*, 77, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.030>
- Gonçalves, L. C. P., Trassi, M. A. D. S., Lopes, N. B., Dörr, F. A., dos Santos, M. T., Baader, W. J., Oliveira, V. X., & Bastos, E. L. (2012). A comparative study of the purification of betanin. *Food Chemistry*, 131(1), 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.067>
- Granillo Macias, R., Gonzalez Hernandez, I. J., Santana Robles, F., & Martinez Flores, J. L. (2019). Estrategia de centros de consolidación para la distribución de tuna en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(2), 265–276. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i2.790>
- Guesmi, A., Hamadi, N. B., Ladhari, N., & Sakli, F. (2012). Dyeing properties and colour fastness of wool dyed with indicaxanthin natural dye. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.07.026>
- Hamed, S. F., Hashim, A. F., Abdel Hamid, H. A., Abd-Elsalam, K. A., Golonka, I., Musiał, W., & El-Sherbiny, I. M. (2020). Edible alginate/chitosan-based nanocomposite microspheres as delivery vehicles of omega-3 rich oils. *Carbohydrate Polymers*, 239, 116201. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116201>
- Henry, B. S. (1996). Natural food colours. In *Natural Food Colorants* (pp. 40–79). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2155-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2155-6_2)
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). Betalain stability and degradation—Structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science*, 71(4), 41–50. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00022.x>
- Kanner, J., Harel, S., & Granit, R. (2001). Betalains - A new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5178–5185. <https://doi.org/10.1021/jf010456f>

- Khan, M. I. (2016a). Plant betalains: Safety, antioxidant activity, clinical efficacy, and bioavailability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 316–330. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12185>
- Khan, M. I. (2016b). Stabilization of betalains: A review. *Food Chemistry*, 197, 1280–1285. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.043>
- Khan, M. I., & Giridhar, P. (2015). Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *Phytochemistry*, 117, 267–295. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.06.008>
- Koss-Mikołajczyk, I., Kusznerewicz, B., Wiczowski, W., Sawicki, T., & Bartoszek, A. (2019). The comparison of betalain composition and chosen biological activities for differently pigmented prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) and beetroot (*Beta vulgaris*) varieties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 70(4), 442–452. <https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1529148>
- Koubaa, M., Barba, F. J., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.04.015>
- Kugler, F., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2004). Identification of betalains from petioles of differently colored swiss chard (*Beta vulgaris* L. ssp. *Cicla* [L.] Alef. Cv. Bright Lights) by High-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 2975–2981. <https://doi.org/10.1021/jf035491w>
- Kujala, T., Loponen, J., & Pihlaja, K. (2001). Betalains and phenolics in red beetroot (*Beta vulgaris*) peel extracts: Extraction and characterisation. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 56(5–6), 343–348. <https://doi.org/10.1515/znc-2001-5-604>
- Lee, E. J., An, D., Nguyen, C. T. T., Patil, B. S., Kim, J., & Yoo, K. S. (2014). Betalain and betaine composition of greenhouse- or field-produced beetroot (*Beta vulgaris* L.) and inhibition of HepG2 cell proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(6), 1324–1331. <https://doi.org/10.1021/jf404648u>

- Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Coloring attributes of betalains: A key emphasis on stability and future applications. *Food Function*, 8(4), 1357–1372. <https://doi.org/10.1039/C7FO00144D>
- Mello, F. R. de, Bernardo, C., Dias, C. O., Gonzaga, L., Amante, E. R., Fett, R., & Candido, L. M. B. (2015). Antioxidant properties, quantification and stability of betalains from pitaya (*Hylocereus undatus*) peel. *Ciência Rural*, 45(2), 323–328. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140548>
- Mikołajczyk-Bator, K., & Czapski, J. (2017). Effect of pH changes on antioxidant capacity and the content of betalain pigments during the heating of a solution of red beet betalains. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 67(2), 123–128. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2016-0012>
- Milanović, J., Petrović, L., Sovilj, V., & Katona, J. (2014). Complex coacervation in gelatin/sodium caseinate mixtures. *Food Hydrocolloids*, 37, 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.016>
- Mohammadi, A., Jafari, S. M., Assadpour, E., & Faridi Esfanjani, A. (2016). Nano-encapsulation of olive leaf phenolic compounds through WPC–pectin complexes and evaluating their release rate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 816–822. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.025>
- Moschakis, T., & Biliaderis, C. G. (2017). Biopolymer-based coacervates: Structures, functionality and applications in food products. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 28, 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.03.006>
- Namazzadeh, G., Ehsani, A., & Ghasempour, Z. (2022). Microencapsulation of red beet extract using chitosan-Persian gum complex coacervates. *Journal of Food Processing and Preservation*, 00, e17148. <https://doi.org/10.1111/jfpp.17148>
- Obón, J. M., Castellar, M. R., Alacid, M., & Fernández-López, J. A. (2009). Production of a red–purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 471–479. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.013>



- Ocak, B. (2012). Complex coacervation of collagen hydrolysate extracted from leather solid wastes and chitosan for controlled release of lavender oil. *Journal of Environmental Management*, 100, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.01.026>
- Odabaş, H. İ., & Koca, I. (2016). Application of response surface methodology for optimizing the recovery of phenolic compounds from hazelnut skin using different extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 91, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.05.033>
- Onwulata, C. I. (2013). Microencapsulation and functional bioactive foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37(5), 510–532. <https://doi.org/10.1111/j.17454549.2012.00680.x>
- Otálora, M. C., Carriazo, J. G., Iturriaga, L., Osorio, C., & Nazareno, M. A. (2016). Encapsulating betalains from *Opuntia ficus-indica* fruits by ionic gelation: Pigment chemical stability during storage of beads. *Food Chemistry*, 202, 373–382. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.115>
- Pan, X., Niu, G., & Liu, H. (2003). Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing*, 42(2), 129–133. [https://doi.org/10.1016/S0255-2701\(02\)00037-5](https://doi.org/10.1016/S0255-2701(02)00037-5)
- Pavokovic, D., & Krsnik-Rasol, M. (2011). Complex biochemistry and biotechnological production of betalains. *Food Technology and Biotechnology*, 49(2), 145–155.
- 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. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1022259>
- Pinedo-Espinoza, J. M., Aguirre-Mancilla, C. L., Jiménez-Alvarado, R., Raya-Pérez, J. C., Iturriaga, G., Ramírez-Pimentel, J. G., & Hernández-Fuentes, A. D. (2017). Bioactive compounds and antioxidant activity evolution during the ripening process of 12 *Opuntia* spp. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(2), 138–148. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-09-1324>

- Pinelo, M., Manzocco, L., Nuñez, M. J., & Nicoli, M. C. (2004). Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. *Food Chemistry*, *88*(2), 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.034>
- Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2012). Methods for total antioxidant activity determination: A review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, *01*(01), 1–10. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000106>
- Polturak, G., Heinig, U., Grossman, N., Battat, M., Leshkowitz, D., Malitsky, S., Rogachev, I., & Aharoni, A. (2018). Transcriptome and metabolic profiling provides insights into betalain biosynthesis and evolution in *Mirabilis jalapa*. *Molecular Plant*, *11*(1), 189–204. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.12.002>
- Prakash Maran, J., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2012.06.007>
- R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. <https://www.R-project.org/>
- Rahayuningsih, E., Setiawan, F. A., Rahman, A. B. K., Siahaan, T., & Petrus, H. T. B. M. (2021). Microencapsulation of betacyanin from red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peels using pectin by simple coacervation to enhance stability. *Journal of Food Science and Technology*, *58*(9), 3379–3387. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04910-8>
- Ravichandran, K., Palaniraj, R., Saw, N. M. M. T., Gabr, A. M. M., Ahmed, A. R., Knorr, D., & Smetanska, I. (2014). Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extract. *Journal of Food Science and Technology*, *51*(9), 2216–2221. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0728-6>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

- Rehman, A., Ahmad, T., Aadil, R. M., Spotti, M. J., Bakry, A. M., Khan, I. M., Zhao, L., Riaz, T., & Tong, Q. (2019). Pectin polymers as wall materials for the nano-encapsulation of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 90, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.015>
- Ribeiro, C. V. D. M., & Eastridge, M. L. (2006). Short communication: Effect of number of extractions on percentage of long-chain fatty acids from fresh alfalfa. *Journal of Dairy Science*, 89(9), 3505–3507. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72390-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72390-6)
- Rocha-Selmi, G. A., Theodoro, A. C., Thomazini, M., Bolini, H. M. A., & Favaro-Trindade, C. S. (2013). Double emulsion stage prior to complex coacervation process for microencapsulation of sweetener sucralose. *Journal of Food Engineering*, 119(1), 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.002>
- Rodríguez-Amaya, D. B. (2019). Update on natural food pigments—A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Research International*, 124, 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.028>
- Rodríguez-Hernández, G. R., González-García, R., Grajales-Lagunes, A., Ruiz-Cabrera, M. A., & Abud-Archila, M. (2005). Spray-drying of cactus pear juice (*Opuntia streptacantha*): Effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product. *Drying Technology*, 23(4), 955–973. <https://doi.org/10.1080/DRT-200054251>
- Rodríguez-Rojo, S., Visentin, A., Maestri, D., & Cocero, M. J. (2012). Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.029>
- Rodríguez-Sánchez, J. A., Cruz y Victoria, M. T., & Barragán-Huerta, B. E. (2017). Betaxanthins and antioxidant capacity in *Stenocereus pruinosus*: Stability and use in food. *Food Research International*, 91, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.023>
- Ruiz-Montañez, G., Ragazzo-Sánchez, J. A., Calderón-Santoyo, M., Velázquez-De La Cruz, G., Ramírez De León, J. A., & Navarro-Ocaña, A. (2014). Evaluation of extraction methods for preparative scale obtention of mangiferin and lupeol from mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry*, 159, 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.009>

- Sáenz, C., Cancino, B., & Robert, P. (2015). Red betalains from *Opuntia* spp.: Natural colorants with potential applications in foods. *Israel Journal of Plant Sciences*, *60*(3), 291–299. <https://doi.org/10.1560/IJPS.60.2.291>
- Saguy, I. (1979). Thermostability of red beet pigments (betanine and vulgaxanthin-I): Influence of pH and temperature. *Journal of Food Science*, *44*(5), 1554–1555. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb06488.x>
- Sánchez, F. D., Santos, E. M., Kerstupp, S. F., Ibarra, R. V., & Scheinvar, L. (2006). Colorant extract from red prickly pear (*Opuntia lasiacantha*) for food application. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, *5*(2), 1330–1337.
- Sanchez-Gonzalez, N., Jaime-Fonseca, M. R., San Martin-Martinez, E., & Zepeda, L. G. (2013). Extraction, stability, and separation of betalains from *Opuntia joconostle* cv. using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(49), 11995–12004. <https://doi.org/10.1021/jf401705h>
- Santos, M. B., de Carvalho, C. W. P., & Garcia-Rojas, E. E. (2021). Microencapsulation of vitamin D3 by complex coacervation using carboxymethyl tara gum (*Caesalpinia spinosa*) and gelatin A. *Food Chemistry*, *343*, 128529. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128529>
- Shaddel, R., Hesari, J., Azadmard-Damirchi, S., Hamishehkar, H., Fathi-Achachlouei, B., & Huang, Q. (2018). Double emulsion followed by complex coacervation as a promising method for protection of black raspberry anthocyanins. *Food Hydrocolloids*, *77*, 803–816. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.024>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, *18*, 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Shinde, U., & Nagarsenker, M. (2011). Microencapsulation of eugenol by gelatin-sodium alginate complex coacervation. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *73*(3), 311–315.
- Soriano-Santos, J., Franco-Zavaleta, M., Pelayo-Zaldivar, C., Armella-Villalpando, M., Yanez-Lopez, M., & Guerrero-Legarreta, I. (2007). A partial characterization of the red pigment

from the Mexican fruit cactus “jiotilla.” *REVISTA MEXICANA DE INGENIERIA QUIMICA*, 6(1), 19–25.

Spence, C. (2018). Background colour & its impact on food perception & behaviour. *Food Quality and Preference*, 68, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.02.012>

Stintzing, F. C., & Carle, R. (2007). Betalains—Emerging prospects for food scientists. *Trends in Food Science and Technology*, 18(10), 514–525. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.04.012>

Stintzing, F. C., Schieber, A., & Carle, R. (1999). Amino acid composition and betaxanthin formation in fruits from *Opuntia ficus-indica*\*. *Planta Medica*, 65(7), 632–635. <https://doi.org/10.1055/s-1999-14037>

Stintzing, F. C., Schieber, A., & Carle, R. (2002). Identification of betalains from yellow beet (*Beta vulgaris* L.) and cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2302–2307. <https://doi.org/10.1021/jf011305f>

Sumaya-Martínez, M. T., Diéguez, T. S., García, E. A., & Sampedro, J. G. (2010). Innovación de productos de alto valor agregado a partir de la tuna mexicana. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 27, 435–441.

Tang, Y., Scher, H. B., & Jeoh, T. (2020). Industrially scalable complex coacervation process to microencapsulate food ingredients. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 59, 102257. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102257>

Timilsena, Y. P., Akanbi, T. O., Khalid, N., Adhikari, B., & Barrow, C. J. (2019). Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 1276–1286. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.144>

Tsai, F. H., Kitamura, Y., & Kokawa, M. (2017). Effect of gum arabic-modified alginate on physicochemical properties, release kinetics, and storage stability of liquid-core hydrogel

beads. *Carbohydrate Polymers*, 174, 1069–1077. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.031>

Tsai, P. J., Sheu, C. H., Wu, P. H., & Sun, Y. F. (2010). Thermal and pH stability of betacyanin pigment of djulis (*Chenopodium formosanum*) in Taiwan and their relation to antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 1020–1025. <https://doi.org/10.1021/jf9032766>

Vieira da Silva, B., Barreira, J. C. M., & Oliveira, M. B. P. P. (2016). Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. *Trends in Food Science and Technology*, 50, 144–158. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.007>

Virost, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C. M. C. G., & Chemat, F. (2010). Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(6), 1066–1074. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.10.015>

Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., Takahashi, K., Vaughan, D., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open-Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>

Woo, K. K., Ngou, F. H., Ngo, L. S., Soong, W. K., & Tang, P. Y. (2011). Stability of Betalain Pigment from Red Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *American Journal of Food Technology*, 6(2), 140–148. <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.140.148>

Wood, L. G., Gibson, P. G., & Garg, M. L. (2006). A review of the methodology for assessing in vivo antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2057–2066. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2604>

Yahia, E. M., & Mondragon-Jacobo, C. (2011). Nutritional components and anti-oxidant capacity of ten cultivars and lines of cactus pear fruit (*Opuntia* spp.). *Food Research International*, 44(7), 2311–2318. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.042>

Yuan, Y., Kong, Z.-Y., Sun, Y.-E., Zeng, Q.-Z., & Yang, X.-Q. (2017). Complex coacervation of soy protein with chitosan: Constructing antioxidant microcapsule for algal oil delivery. *LWT*, 75, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.045>

Yusuf, M., Shabbir, M., & Mohammad, F. (2017). Natural colorants: Historical, processing and sustainable prospects. *Natural Products and Bioprospecting*, 7(1), 123–145. <https://doi.org/10.1007/s13659-017-0119-9>

Zegada Franco, V. Y. (2015). Extracción de pectina de residuos de cáscara de naranja por hidrólisis ácida asistida por microondas (HMO). *INVESTIGACION & DESARROLLO*, 15(1), 65–76. <https://doi.org/10.23881/idupbo.015.1-6i>

Zhang, J., Jia, G., Wanbin, Z., Minghao, J., Wei, Y., Hao, J., Liu, X., Gan, Z., & Sun, A. (2021). Nanoencapsulation of zeaxanthin extracted from *Lycium barbarum* L. by complex coacervation with gelatin and CMC. *Food Hydrocolloids*, 112, Article 106280. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106280>

Zhao, H.-S., Ma, Z., & Jing, P. (2020). Interaction of soy protein isolate fibrils with betalain from red beetroots: Morphology, spectroscopic characteristics and thermal stability. *Food Research International*, 135, Article 109289. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109289>

## 11. Anexos

### A.1 Eficiencias de encapsulación obtenidas para la capacidad antioxidante por ABTS y el contenido de compuestos fenólicos totales

En los sobrenadantes obtenidos en la sección 6.9.6 también se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales (sección 6.4) y la capacidad antioxidante mediante ABTS (sección 6.5.1). Las eficiencias se expresaron como un porcentaje mediante la siguiente ecuación.

$$EE\ CA/CTF\ (\%) = \frac{C_{encapsulado}}{C_{extracto}} * 100$$

Donde  $EE\ CA/CTF$  es la eficiencia de encapsulación de la capacidad antioxidante mediante ABTS o del contenido de compuestos fenólicos totales,  $C_{encapsulado}$  es la cantidad obtenida de estas variables en el disociado del encapsulado y  $C_{extracto}$  es la cantidad inicial de estos parámetros en el extracto sin encapsular.

### A.2 Eficiencias de encapsulación obtenidas para la capacidad antioxidante por ABTS y el contenido de compuestos fenólicos totales

En el experimento de tuna *Vigor* y betabel, se registraron eficiencias de encapsulación de la actividad antioxidante por ABTS de hasta el 150% para extractos de betabel con el sistema alginato-proteína de soya, y del 98% para extractos de tuna *Vigor* con el mismo sistema de polímeros (Fig. 33A). En cuanto a la eficiencia registrada en la cantidad de compuestos fenólicos totales se obtuvieron valores de hasta el 73 y 41% en extractos de betabel y tuna *Vigor*, respectivamente, utilizando el sistema alginato-proteína de soya (Fig. 33B). En el experimento con extractos de tuna *Mandarina* y betabel no se registraron diferencias significativas en las eficiencias de encapsulación de la actividad antioxidante por ABTS (Fig. 33A), mientras que en el caso de compuestos fenólicos totales se obtuvieron eficiencias de hasta el 31 y el 16% para los extractos de betabel y tuna *Mandarina*, respectivamente (Fig. 34B).



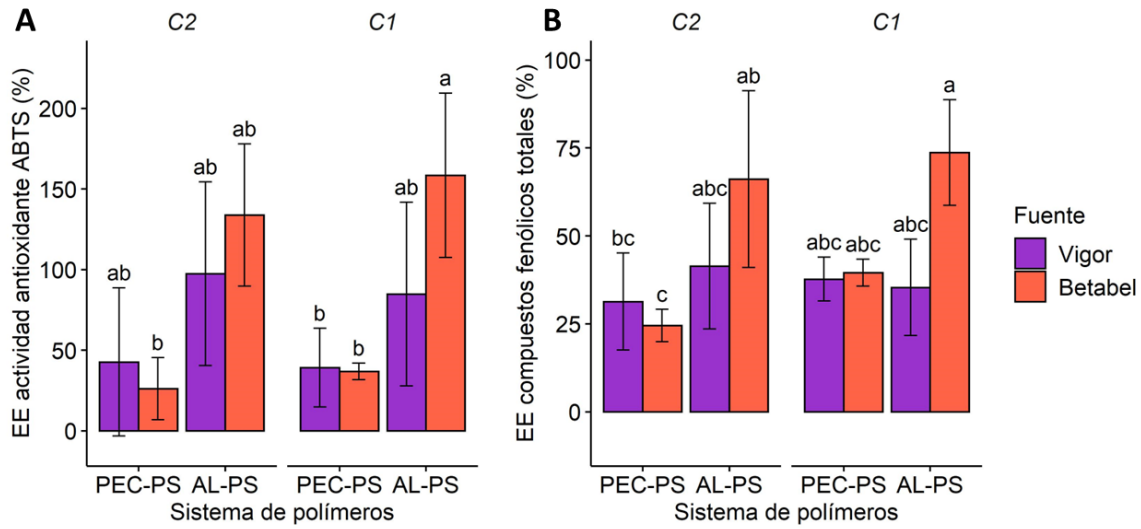


Figura 33. Eficiencia de encapsulación de la actividad antioxidante por ABTS (A) y el contenido de compuestos fenólicos totales (B) en extractos acuosos de pulpa de tuna *Vigor* y de betabel. Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ). C1: concentración 1 de betacianinas (0.6 a 538 nm). C2: concentración 2 de betacianinas (1.2 a 538 nm).

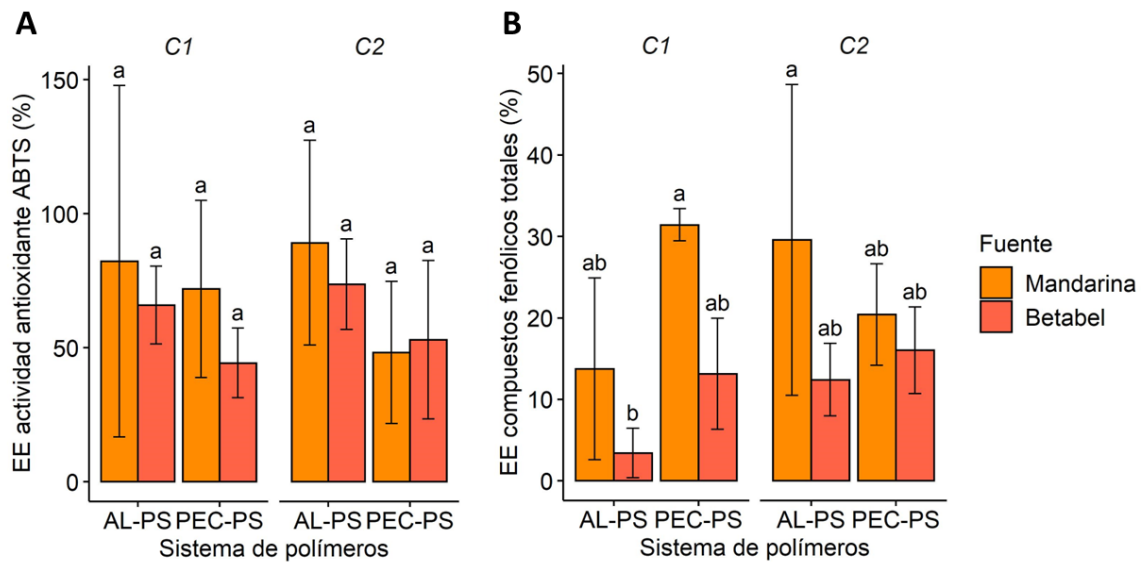


Figura 34. Eficiencia de encapsulación de betaxantinas (A), de la actividad antioxidante por ABTS (B) y la cantidad de compuestos fenólicos totales (C) en extractos acuosos de pulpa de tuna *Mandarina* y de betabel. Medias de tres repeticiones  $\pm$  DE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ). C1: concentración 1 de betaxantinas (0.6 a 483 nm). C2: concentración 2 de betaxantinas (1.2 a 483 nm).

### A.3 Proceso de doble emulsión junto a coacervación compleja para la encapsulación de betalaínas de tuna

Para llevar a cabo el proceso de encapsulación mediante doble emulsión y coacervación compleja se utilizó el mismo diseño experimental que en la sección 6.9.4 y el procedimiento de encapsulación se modificó para integrar la doble emulsión. Se tomaron 2 mL de extracto acuoso de pulpa de tuna y se añadieron 4 mL de aceite de soya y 0.18 g de lecitina de soya como emulsificante. Para producir la emulsión primaria (W/O) el medio se homogenizó a 12 800 rpm (*Benchmark D1000 Homogenizer*) por 4 min. Posteriormente, se añadió el volumen de proteína de soya indicado (cuadro 5) y el medio se homogenizó a 8500 rpm para producir la doble emulsión (W/O/W). Finalmente, para llevar a cabo el proceso de coacervación compleja, se añadió el volumen indicado de polisacárido (cuadro 5), se agitó en vórtex por 15 s (3000 rpm), se ajustó el pH a 3 mediante la adición de HCl 0.1 N y se refrigeró a 4 °C por 24 h (Rocha-Selmi *et al.*, 2013; Calderón-Oliver *et al.*, 2017). Para llevar a cabo la separación y disociación de los encapsulados, así como la cuantificación de betalaínas y el cálculo de las eficiencias de encapsulación se siguió el procedimiento descrito en la sección 6.9.6.

## A.4 Productos derivados del trabajo de investigación



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

### Food Research International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodres](http://www.elsevier.com/locate/foodres)



## Betalain plant sources, biosynthesis, extraction, stability enhancement methods, bioactivity, and applications

Juan Pablo Carreón-Hidalgo<sup>a</sup>, Diana Carolina Franco-Vásquez<sup>a</sup>, Darío R. Gómez-Linton<sup>b</sup>, Laura J. Pérez-Flores<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> *Biotechnology Program, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, CP 09340 Mexico City, Mexico*

<sup>b</sup> *Department of Health Science, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, CP 09340 Mexico City, Mexico*

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Betalains  
Plant sources  
Biosynthesis  
Extraction  
Stability  
Encapsulation  
Biological properties  
Applications

#### ABSTRACT

Betalains are plant pigments with functional properties used mainly as food dyes. However, they have been shown to be unstable to different environmental factors. This paper provides a review of (1) Betalain plant sources within several plant families such as Amaranthaceae, Basellaceae, Cactaceae, Portulacaceae, and Nyctaginaceae, (2) The biosynthesis pathway of betalains for both betacyanins and betaxanthins, (3) Betalain extraction process, including non-conventional technologies like microwave-assisted, ultrasound-assisted, and pulsed electrical field extraction, (4) Factors affecting their stability, mainly temperature, water activity, light incidence, as well as oxygen concentration, metals, and the presence of antioxidants, as well as activation energy as a mean to assess stability, and novel food-processing technologies able to prevent betalain degradation, (5) Methods to increase shelf life, mainly encapsulation by spray drying, freeze-drying, double emulsions, ionic gelation, nanoliposomes, hydrogels, co-crystallization, and unexplored methods such as complex coacervation and electrospraying, (6) Biological properties of betalains such as their antioxidant, hepatoprotective, antitumoral, and anti-inflammatory activities, among others, and (7) Applications in foods and other products such as cosmetics, textiles and solar cells, among others. Additionally, study perspectives for further research are provided for each section.

ORIGINAL ARTICLE

Food Chemistry

# Chemical characterization of yellow-orange and purple varieties of *Opuntia ficus-indica* fruits and thermal stability of their betalains

Juan Pablo Carreón-Hidalgo<sup>1</sup> | Angélica Román-Guerrero<sup>2</sup> |  
Arturo Navarro-Ocaña<sup>3</sup> | Darío R. Gómez-Linton<sup>4</sup> |  
Diana Carolina Franco-Vásquez<sup>1</sup> | Adrián Marcelo Franco-Vásquez<sup>5</sup> |  
Roberto Arreguín-Espinosa<sup>5</sup> | Laura J. Pérez-Flores<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Program, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa Mexico City, Mexico

<sup>2</sup>Department of Biotechnology, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa Mexico City, Mexico

<sup>3</sup>Department of Food and Biotechnology, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán Mexico City, Mexico

<sup>4</sup>Department of Health Science, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa Mexico City, Mexico

<sup>5</sup>Department of Biomacromolecule Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán Mexico City, Mexico

## Correspondence

Laura J. Pérez-Flores. Av. FF. CC. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Leyes de Reforma 1st Section, CP. 09310 Iztapalapa, Mexico City, Mexico.  
Email: ljpf@xanum.uam.mx

## Funding information

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa; CONACyT to Juan Pablo Carreón-Hidalgo, Grant/Award Number: 68991

**Abstract:** Betalains are plant pigments with biological properties and can be used instead of synthetic colorants to confer color and functional properties to foods. The objective of this work was to carry out the chemical characterization of two varieties of prickly pear of *Opuntia ficus-indica*, one of yellow-orange coloration (*Mandarina*) and the other of purple coloration (*Vigor*), through measurements of chemical parameters and color in pulp, antioxidant activity, total phenolic compounds, and betalain content. Considering the thermolability of betalains and their potential applications in food, the thermal stability and activation energy of betacyanins from *Vigor* variety and betaxanthins from the *Mandarina* variety were also evaluated and compared with those from beetroot, the main source of betalains. Results for chemical characterization agreed with previous prickly pear reports of other regions, while the thermal degradation kinetics of betalains showed a first-order degradation pattern with respect to time and temperature treatment. Betacyanins from *Vigor* prickly pear showed similar thermal stability to those from beetroot, which was reflected in similar values of activation energy, while betaxanthins from *Mandarina* prickly pear showed a higher stability, and therefore a higher activation energy, than those from beetroot. Based on the results, the prickly pear varieties used in this study can be considered as a good source of betalains with potential applications in food and, in addition, the methodology for the evaluation of thermostability can be used to compare the stability of betalains from different sources in a temperature range of 50–90°C.



LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
y  
EL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD



Otorgan la presente

## Constancia

a:

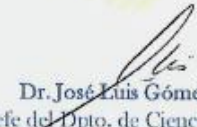
Carreón Hidalgo Juan Pablo, Román Guerrero Angélica, Navarro Ocaña Arturo, Pérez Flores Laura Josefina

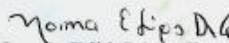
Por la presentación del trabajo:

**"EXTRACCIÓN Y ESTABILIZACIÓN EN MICROENCAPSULADOS DE BETALAÍNAS  
OBTENIDAS DE FRUTOS DEL GÉNERO OPUNTIA"**

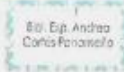
en el **XXIII Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud**

22 al 26 de Octubre de 2018  
Sala Cuicacalli

  
Dr. José Luis Gómez Olivares  
Jefe del Dpto. de Ciencias de la Salud

  
Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero  
Coordinadora

  
Dra. Elsa Cervantes Ríos  
Coordinadora



LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
y  
EL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD



Otorgan la presente



*Constancia*

a:

Carreón Hidalgo Juan Pablo, Román Guerrero Angélica, Navarro Ocaña Arturo, Pérez Flores Laura J.

Por la presentación del trabajo:

Compuestos funcionales en variedades de Opuntia provenientes de San  
Martín de las Pirámides, Estado de México

en el XXIV Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud

Celebrado los días 30 de Septiembre al 04 de Octubre del 2019

  
Dr. José Luis Gómez Olivares  
Jefe del Dpto. de Ciencias de la Salud

  
Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero  
Coordinadora

  
Dra. Elsa Cervantes Ríos  
Coordinadora



Otorgan la presente

## Constancia

a: Juan Pablo Carreón-Hidalgo, Diana Carolina Franco-Vásquez, Darío R. Gómez-Linton, Laura Josefina Pérez-Flores.

Por la presentación del trabajo:

**Betalain plant sources, biosynthesis, extraction, stability enhancement methods, bioactivity, and applications (Fuentes vegetales de betalainas, biosíntesis, extracción, métodos para mejorar su estabilidad, bioactividad y aplicaciones)**

En el XXVI Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud

Celebrado los días 6 al 10 de Diciembre del 2021



Dr. José Luis Gómez Olivares  
Jefe del Departamento de Ciencias de la Salud



Extiende la presente

*Constancia*

a



*Carreón Hidalgo Juan Pablo\*, Román Guerrero  
Angélica, Navarro Ocaña Arturo & Pérez Flores.*

Por su destacada participación con el trabajo:

*Caracterización fisicoquímica, extracción y estabilidad de  
betalainas provenientes de dos variedades de tuna  
(Opuntia ficus-indica).*

*18 y 19 de marzo del 2021.*

*En la presentación de trabajos de investigación modalidad cartel.  
Durante el XIII Congreso Internacional Virtual, Sobre Inocuidad, Calidad y  
Funcionalidad de los Alimentos en la Industria y Servicios de Alimentación.*



Q.A Esmeralda Paz Lemus  
PRESIDENTA NACIONAL  
SOMEICCA A.C

Dra. M. A. Patricia Porrás Loaiza  
COORDINADORA COMITÉ  
CIENTÍFICO

Dra. Ofelia Araceli López Mejía  
COORDINADORA COMITÉ  
CIENTÍFICO





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00274

Matrícula: 2153805293

Caracterización de frutos del género *Opuntia*, extracción y coacervación compleja de sus betalainas.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:30 horas del día 15 del mes de diciembre del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE RAMON VERDE CALVO  
DRA. MARIA DE LOS ANGELES FORTIS BARRERA  
DRA. HELIA REYNA OSUNA FERNANDEZ  
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO



JUAN PABLO CARREON HIDALGO  
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: JUAN PABLO CARREON HIDALGO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

  
DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

  
DR. JOSE RAMON VERDE CALVO

VOCAL

  
DRA. MARIA DE LOS ANGELES FORTIS BARRERA

VOCAL

  
DRA. HELIA REYNA OSUNA FERNANDEZ

SECRETARIA

  
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO